

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2009 - Thèse n°



LA PANLEUCOPENIE FELINE: DONNEES ACTUELLES ET DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 30 janvier 2009
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

ALCARAZ Céline
Née le 24 avril 1982
à Bron



DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL

Mise à jour : 18/09/2008

Directeur : Stéphane MARTINOT

	PR EX	PR 1	PR 2	ISPV, MC, MC(HC)	Contractuel, Associé, IPAC	Praticiens hospitaliers
DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE						
Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD	A. KODJO		V. GUERIN-FAUBLEE (HC) D. GREZEL		
Pathologie infectieuse	M. ARTOIS	A. LACHERETZ		J. VIALARD (HC)		
Parasitologie et Maladies Parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT-CARDINAL L. ZENNER G. BOURGOIN (stagiaire)		
Qualité et Sécurité des Aliments		P. DEMONT C. Vernozy		A. GONTHIER S. COLARDELLE (ISPV) D. SERGENTET		
Législation et Jurisprudence		A. LACHERETZ				
Bio-informatique - Bio-statistique		ML. DELIGNETTE		P. SABATIER (HC)		
				K. CHALVET-MONFRAY		
DEPARTEMENT ANIMAUX DE COMPAGNIE						
Anatomie		T. ROGER		S. SAWAYA	C. BOULOCHER	
Chirurgie et Anesthésiologie	JP. GENEVOIS	D. FAU E VIGUIER D. REMY		C. CAROZZO K. PORTIER (stagiaire) S. JUNOT (stagiaire)		
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie		C. FLEURY		T. MARCHAL D. PIN	P. BELLI D. WATRELOT-VIREUX	
Hématologie	C. FOURNEL					
Médecine interne	JL. CADORE	L. CHABANNE		F. PONCE M. HUGONNARD C. ESCRIOU	I. BUBLOT C. POUZOT (siamu)	
Imagerie Médicale						
DEPARTEMENT PRODUCTIONS ANIMALES						
Zootéchnie, Ethologie et Economie Rurale	M. FRANCK			L. MOUNIER	L. COMMUN	
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER (HC) L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON		
Biologie et Pathologie de Reproduction	F. BADINAND	M. RACHAIL-BRETIN P. GUERIN		S. BUFF AC. LEFRANC (stagiaire)		G. LESOBRE C. COLIN P. DEBARNOT P. OTZ
Pathologie Animaux de Production	P. BEZILLE	T. ALOGINOUWA		R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND		
DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES						
Physiologie/Thérapeutique		JM. BONNET-GARIN		JJ. THIEBAULT (HC) V. LOUZIER (stagiaire)		
Biophysique/Biochimie	E. BENOIT F. GARNIER			T. BURONFOSSE		
Génétique et Biologie moléculaire		F. GRAIN		V. LAMBERT		
Pharmacie/Toxicologie Législation du Médicament	G. KECK	P. JAUSSAUD P. BERNY		C. PROUILLAC (stagiaire)		T. AVISON (IPAC) G. MARTIN (IPAC)
Langues						
DEPARTEMENT HIPPIQUE						
Pathologie équine	JL. CADORE			A. BENAMOUC-SMITH		
Clinique équine	O. LEPAGE	A. LEBLOND		M. GANGL		

A Monsieur le Professeur Gharib,
De la Faculté de Médecine de Lyon,
Pour l'honneur qu'il nous a fait d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Grain,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Pour son soutien et sa disponibilité,
Qui a été l'initiatrice de ce travail,
Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Madame le Professeur Lambert,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de faire partie de notre jury
de thèse,
Sincères remerciements.

A Karine Groud, pour son aide et ses conseils précieux,
Sincères remerciements.

A mes amies, **Isa, Anso, Laeti, Oph, Sandy**...votre rencontre est une chance.

A la **famille Antoine**, pour leur accueil et leur générosité.

A ma **Marie**, même maman, tu restes ma petite Lili.

A **Julie**, pour ces 10 années d'amitié incassable.

A **Hubert**, ami mystérieux et merveilleux.

A **Sandy**, la plus forte des petites fleurs fragiles, j'ai réussi grâce à toi.

Au petit **Guigui**, ton entêtement est à la hauteur de ton grand cœur !

A toi, **mon Ange**, tu es ma force, mon envie d'une nouvelle vie. Je t'aime.

A **Moumou**, pour la magie de sa présence à mes côtés, la douceur de ses *vieux* ronrons...

A mon **Lilou**, tu es la plus belle des « familles » qu'on puisse avoir. Je t'aime, mon *petit* grand frère.

A toi **ma Chounette**, tu es ma vie.

A Mi,

Mon fragile papillon bleu,
Ma petite, toute petite maman,
Je t'aime au delà de tout,
Pour toujours.

A tous ceux qui sont blessés.

*C'est ce petit nom que tu m'as donné, Pichou,
Qui a fait d'une petite fille ce qu'elle devient aujourd'hui,
Un Docteur, qui, malgré ses connaissances,
Sait qu'il y a des plaies qui ne cicatrisent pas,
Et laissent un vide, un chagrin que personne ne guérira.
Ton repos restera à jamais ma souffrance,
Ton souvenir, le douloureux rappel de ton absence.*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	27
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	29
I. HISTORIQUE	31
II. LE PARVOVIRUS FELIN	33
A. CLASSIFICATION	33
B. STRUCTURE.....	33
1.La capside	34
❖ Protéines structurales	34
❖ Organisation de la capside	35
❖ Fonctions de la capside et comparaison avec le CPV	37
2.Le génome.....	40
❖ Organisation du génome	40
❖ Séquençage du génome	41
C. PROPRIETES DU FPV	42
1.Résistance du FPV	42
❖ Relation caractéristiques/résistance virales	42
❖ Résistance dans le milieu extérieur	42
❖ Action des agents physico-chimiques	42
a) Agents physiques	42
b) Agents chimiques.....	43
2.Pouvoir hémagglutinant.....	43
3.Pouvoir antigénique	44
❖ Site de fixation des anticorps	44
❖ Mécanisme de neutralisation	44
4.Pouvoir immunogène	44
5.Pouvoir de multiplication.....	44
❖ Particularités du FPV	44
❖ Conséquences sur la multiplication <i>in vivo</i>	45
❖ Multiplication <i>in vitro</i>	45
❖ Multiplication du CPV chez le chat	46
6.Pouvoir pathogène	46
D. PHYLOGENIE	46
III. EPIDEMIOLOGIE	48
A. SOURCES DE L'AGENT PATHOGENE	48
1.Les organismes vivants	48
❖ Source principale	48
❖ Vecteurs	48
2.Les matières virulentes.....	48
3.Les objets inanimés.....	48
B. ESPECES SENSIBLES	48
C. TRANSMISSION	49
1.Transmission directe	49
❖ Horizontale	49
❖ Verticale	49
2.Transmission indirecte	49
D. RECEPTIVITE	49
E. PREVALENCE ACTUELLE DE LA MALADIE.....	50
F. MORTALITE	50

IV. PATHOGENIE DE L'INFECTION PAR LE FPV	50
A. PRINCIPE GENERAL	50
B. ETAPES DE L'INFECTION	51
1. Réplication primaire.....	51
a) Reconnaissance et attachement à la cellule cible.....	51
b) Pénétration et décapsidation du virus	51
c) Multiplication virale.....	51
d) Assemblage et libération des virions	52
2. Virémie et conséquences lésionnelles.....	52
❖ Etapes de la virémie	52
❖ Atteinte de la moelle osseuse	52
❖ Atteinte des autres tissus lymphoïdes	52
❖ Atteinte de l'épithélium intestinal	52
❖ Atteinte du fœtus	53
3. Excrétion.....	53
V. ETUDE CLINIQUE	53
A. SYMPTOMATOLOGIE.....	53
1. Forme classique : gastro-entérite et leucopénie	54
❖ Forme suraiguë	54
❖ Forme aiguë	54
❖ Forme subaiguë	56
a) La forme subclinique	56
b) Association du FPV avec d'autres agents pathogènes.....	56
2. Forme atypique : la forme nerveuse.....	56
B. TABLEAU LESIONNEL	57
1. Lésions macroscopiques	57
❖ Intestins	57
❖ Nœuds lymphatiques	57
❖ Thymus	57
2. Lésions microscopiques	57
❖ Intestins	58
❖ Nœuds lymphatiques	59
❖ Moelle osseuse	59
VI. DIAGNOSTIC	59
A. CLINIQUE.....	59
1. Diagnostic clinique et épidémiologique.....	59
2. Diagnostic para-clinique	60
❖ Modifications hématologiques	60
❖ Modifications biochimiques	60
❖ Radiographie/échographie abdominale	60
3. Diagnostic différentiel.....	60
❖ Concernant la diarrhée et les vomissements	60
❖ Concernant l'atteinte du système immunitaire	61
B. EXPERIMENTAL	61
1. Diagnostic direct	61
❖ Tests utilisés aujourd'hui	61
a) Tests utilisés en clinique vétérinaire	61
i. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	61
ii. Immunofluorescence directe (IF).....	63
iii. Immunomigration rapide sur membrane.....	63
iv. Comparaison des tests.....	65
b) Test de laboratoire : Polymerase Chain Reaction (PCR).....	66
i. PCR conventionnelle	66
ii. PCR quantitative	69
iii. PCR-RFLP.....	69

iv.	Caractéristiques du test PCR.....	70
c)	Conclusion	70
	❖ Tests moins utilisés de nos jours	70
a)	Hémagglutination.....	70
b)	Microscopie électronique.....	71
c)	Culture cellulaire.....	71
d)	Histologie.....	72
	❖ Sensibilité et spécificité des tests directs	72
	2.Diagnostic indirect : sérologie	72
	❖ Séroneutralisation	72
	❖ Inhibition de l'hémagglutination (IHA)	73
	VII. TRAITEMENT.....	73
A.	TRAITEMENT SYMPTOMATIQUE.....	73
	1.Diète hydrique et réalimentation.....	73
	2.Fluidothérapie et équilibre hydro-électrolytique.....	74
	3.Antiémétiques	75
	4.Pansements digestifs et cytoprotecteurs.....	75
	5.Transfusion	75
B.	PREVENTION DES COMPLICATIONS	76
	1.Antibiothérapie	76
	2.Anti-sécrétoires gastriques.....	76
C.	TRAITEMENT ETIOLOGIQUE.....	77
D.	TRAITEMENT ANTIVIRAL, l'interféron ω	77
	VIII. PREVENTION	78
A.	PROPHYLAXIE SANITAIRE.....	78
	1.Mesures d'hygiène.....	78
	2.Cas particuliers des refuges.....	78
	3.Précautions avant la vaccination	78
B.	PROPHYLAXIE MEDICALE.....	78
	1.Immunité passive et vaccination	79
	❖ Transmission de l'immunité maternelle	79
	❖ Durée et efficacité de la protection	79
	❖ Immunité passive et sérum anti-FPV	81
	2.Types de vaccins	81
	3.Efficacité comparée des vaccins	82
	4.Protocole de vaccination	83
	❖ Protocole de départ	83
	❖ Rappels de vaccination	84
	❖ Vaccins FPV et infection par le CPV	84
	5.Vaccination d'animaux immunodéprimés	84
	❖ Chats sous corticoïdes	84
	❖ Chats présentant une maladie chronique	85
	❖ Chats infectés par un rétrovirus	85
	6.Echecs de la vaccination	85
	❖ Réactions défavorables	85
	❖ Efficacité diminuée	86
	7.Conclusion	86
	IX. LEGISLATION.....	86
A.	SUSPICION CLINIQUE	86
B.	LES CRITERES DU DIAGNOSTIC DE SUSPICION.....	87
C.	PROCEDURE DE REDHIBITION	88
	PARTIE EXPERIMENTALE.....	89
	I. INTRODUCTION.....	91
	II. MATERIEL	92

A.	ANIMAUX	92
B.	SOUCHES VACCINALES	92
C.	AMORCES.....	92
D.	CONTROLE INTERNE	93
E.	REACTIFS ET MATERIEL	93
III.	METHODE	93
A.	PRELEVEMENTS.....	93
B.	EXTRACTION DE L'ADN.....	94
1.	Extraction de l'ADN viral à partir des vaccins	94
2.	Extraction de l'ADN à partir des échantillons à tester.....	94
C.	PROTOCOLE PCR.....	94
1.	Préparation du mélange réactionnel pour la PCR	94
❖	Principe	94
❖	Conditions expérimentales	95
a)	PCR PLI et souche vaccinale.....	95
b)	PCR contrôle interne.....	96
c)	PCR PLI sur ADN extrait d'écouvillons rectaux de chats suspects de panleucopénie.....	96
d)	PCR PLI et PCR GAPDH sur le même échantillon de fèces	97
e)	PCR duplex PLI/GAPDH	98
2.	Répartition du mélange réactionnel	98
3.	Addition de l'ADN	98
4.	Amplification	99
❖	Détermination de la température d'hybridation	99
❖	Stringence	99
❖	Programme d'amplification	100
5.	Analyse des produits amplifiés	100
❖	Préparation du gel d'électrophorèse	101
❖	Dépôt des échantillons	102
❖	Migration	102
❖	Révélation des fragments amplifiés	103
D.	PRECAUTIONS	103
1.	Eviter les contaminations	103
❖	Séparation des locaux	103
❖	Matériel et manipulateurs	103
❖	Nettoyage et désinfection	104
2.	Précautions de sécurité.....	104
IV.	RESULTATS	105
A.	RESULTATS DE LA PCR SUR LA SOUCHE VACCINALE FELIGEN® CRP.....	105
1.	Conditions initiales	105
2.	Variation de température.....	106
B.	RESULTATS DE LA PCR CONTROLE INTERNE HPRT	107
C.	RESULTATS DE LA PCR CONTROLE INTERNE GAPDH	108
D.	RESULTATS DES PCR SUR LES FECES DE 6 CHATS SUSPECTS DE PLI	109
E.	PCR PLI ET PCR GAPDH SUR LE MEME ECHANTILLON.....	111
F.	ECHANTILLON TESTE AVEC CONTROLE INTERNE GAPDH EN PCR DUPLEX.....	111
G.	AUTRES ECHANTILLONS TESTES EN DUPLEX PLI/GAPDH.....	112
H.	TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS	114
V.	DISCUSSION	115
A.	TEST PCR.....	115
1.	Extraction de l'ADN	115
❖	Contrôle interne	115
❖	Echantillons testés avec contrôle interne	117
❖	Echantillons testés sans contrôle interne	117
2.	Les paramètres de la PCR	117
❖	Les amorces et la mise au point sur le vaccin	117

❖ La stringence.....	117
❖ Concentration des amorces	118
3.Caractéristiques du test	120
❖ Sensibilité	120
❖ Spécificité	121
❖ Limites de la PCR.....	123
B. RESULTATS	124
1.Positivité des résultats.....	124
2.Négativité des résultats	125
3.Significativité des résultats	125
VI. CONCLUSION DE LA PARTIE EXPERIMENTALE	127
<u>CONCLUSION.....</u>	<u>127</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>131</u>
ANNEXES.....	141

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les trois protéines structurales de la capsidie du FPV.....	p. 34
Figure 2 : Les trois axes de l'icosaèdre.....	p. 35
Figure 3 : Image tridimensionnelle de la capsidie du CPV établie à partir de la structure atomique, et comparable à celle du FPV.....	p. 36
Figure 4 : Structure secondaire de la protéine VP2 du FPV et comparaison avec le CPV.....	p. 37
Figure 5 : Carte des acides aminés exposés à la surface de la capsidie du CPV, et différences avec le FPV.....	p. 39
Figure 6 : Représentation de l'organisation du génome du FPV à l'extrémité 3' ...	p. 41
Figure 7 : Relations phylogéniques entre le FPV et les autres parvovirus.....	p. 47
Figure 8 : Nombre total de leucocytes chez 5 chats après infection expérimentale par le FPV.....	p. 55
Figure 9 : Fonctions et aspect d'une villosité intestinale normale (A) et d'une villosité avec infection par le FPV (B).....	p. 58
Figure 10 : Proportions des types de cellules dans la moelle osseuse à divers stades de l'infection par le FPV.....	p. 59
Figure 11 : Principe du test ELISA direct.....	p. 62
Figure 12 : Test d'immunochromatographie.....	p. 64
Figure 13 : Schéma d'amplification par PCR à partir d'un ADN monocaténaire...	p. 67
Figure 14 : Séquences nucléotidiques du CPV2, du FPV, et du couple d'amorces P2s/P2as.....	p. 68
Figure 15 : Résultats de la PCR montrant la spécificité du couple d'amorces P2 pour le CPV2 et le FPV.....	p. 69
Figure 16 : Taux d'Ig colostrales les premiers jours après la parturition.....	p. 79

Figure 17 : Evolution de l'immunité passive et interférence avec la vaccination...	p. 80
Figure 18 : Représentation des petits et grands supports pour gel d'électrophorèse.....	p. 101
Figure 19 : Electrophorèse des amplicons et marqueurs du front de migration...	p. 102
Figure 20 : Résultats de la PCR PLI sur le vaccin FELIGEN® CRP.....	p. 105
Figure 21 : Résultat de la PCR PLI sur le vaccin FELIGEN® à différentes températures d'hybridation.....	p. 106
Figure 22 : Résultats de la PCR HPRT sur un échantillon de fèces de chat.....	p. 107
Figure 23 : Résultats de la PCR GAPDH sur un échantillon de fèces de chat.....	p. 108
Figure 24 : Résultats de la PCR PLI1 sur 5 des 14 échantillons de fèces de chats suspects de panleucopénie.....	p. 109
Figure 25 : Résultats de la PCR PLI2 sur un échantillon de fèces de chat suspect de panleucopénie.....	p. 110
Figure 26 : Résultats de la PCR PLI3 sur un échantillon de fèces de chat suspect de panleucopénie.....	p. 111
Figure 27 : Résultats des PCR PLI4 sur un échantillon de fèces de chat suspect de paleucopénie.....	p. 112
Figure 28 : Résultats de la PCR duplex PLI5 sur trois échantillons de chats suspects de panleucopénie.....	p. 113
Figure 29 : Résultats des PCR PLI6, PLI7, et PLI8 sur échantillons de fèces provenant de 3 chats suspects de panleucopénie.....	p. 114
Figure 30 : Essais PCR avec contrôle interne HPRT (A) et GAPDH (B).....	p. 116
Figure 31 : Amorces du « mix » visibles à la révélation sur gel d'électrophorèse pour la PCR PLI3.....	p. 119
Figure 32 : Résultats de la PCR PLI sur un échantillon de fèces de chat suspect de parvovirose (A), et essai après dilution au 1/10 ^e du témoin positif (B).....	p. 121

Figure 33 : Proportions des types de parvovirus canin en France entre 1986 et 1997.....p. 122

Figure 34 : Proportions des souches de CPV en France en 2004-2005 déterminées par PCR.....p. 123

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales différences dans la séquence d'acides aminés de VP2 entre le FPV et le CPV.....	p. 38
Tableau II : Pourcentage d'homologie du FPV avec le CPV et le MVM.....	p. 41
Tableau III : Tissus cibles du FPV, lésions et manifestations cliniques.....	p. 58
Tableau IV : Comparaison de 5 tests de diagnostic de routine pour la détection des antigènes du FPV dans les fèces de chat.....	p. 65
Tableau V : Amorces utilisées pour l'étude de PEREIRA <i>et al.</i> (61).....	p. 68
Tableau VI : Pourcentage de déshydratation en fonction des signes cliniques.....	p. 74
Tableau VII : Exemples de vaccins existant aujourd'hui contre la panleucopénie féline.....	p. 82
Tableau VIII : Amorces utilisées pour le diagnostic PLI (panleucopénie infectieuse).....	p. 93
Tableau IX : Concentrations et volumes des réactifs du « mix » PLI pour une concentration en MgCl ₂ de 1 mM et un volume final de 49 µL.....	p. 95
Tableau X : Concentrations et volumes des réactifs du « mix » PLI pour une concentration en MgCl ₂ de 1,5 mM et un volume final de 29 µL.....	p. 96
Tableau XI : Concentrations et volumes des « mix » utilisés pour les PCR PLI et GAPDH sur le même échantillon.....	p. 97
Tableau XII : Concentrations et volumes des « mix » utilisés pour l'essai de la PCR duplex PLI/GAPDH.....	p. 98
Tableau XIII : Récapitulatif des résultats des PCR sur les 14 échantillons de fèces de chats suspects de panleucopénie.....	p. 115

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Tableau récapitulatif des commémoratifs et des résultats PCR des animaux testés

ANNEXE 2 : Matériel et réactifs utilisés pour la réalisation de la PCR PLI

ANNEXE 3 : Modalités de préparation des réactifs de la PCR PLI

ANNEXE 4 : Protocole d'extraction avec le kit *NucleoSpin® Blood Quick Pure*

ANNEXE 5 : Protocole d'extraction avec le kit *QIAmp® DNA Minikit*

LISTE DES ABREVIATIONS

A: Adénine
AAV: Adénovirus associé
ABCD: Advisory Board on Cat Diseases
Ac: Anticorps
ADN: Acide Désoxyribonucléique
Ag: Antigène
Ala: Alanine
Arg: Arginine
ARNm: Acide Ribonucléique messenger
Asn: Asparagine
Asp: Acide Aspartique
BFPV: Parvovirus du renard arctique
BID: 2 fois par jour
BrEt: Bromure d’Ethidium
C: Cytosine
CIVD: Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
CPV: Parvovirus canin
CPV2: Parvovirus canin de type 2
CPV2a: Parvovirus canin de type 2a
CPV2b: Parvovirus canin de type 2b
CPV2c: Parvovirus canin de type 2c
CRFK: Cellules rénales felines de Crandell
dNTPs: 2'-déoxynucléosides 5'-triphosphate
ECP: Effet cytopathogène
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENVL: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
FCV: Calicivirus félin
FeLV: Virus de la leucose féline
FHV: Herpèsvirus félin
FIV: Virus de l’immunodéficiência féline
FPV: Parvovirus félin
G: Guanine
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Glu: Acide glutamique
Gly ou G: Glycine
HA: Hémagglutination
HPRT: Hypoxantine phosphoribosyl transferase
HPV: Parvovirus humain
IF: Immunofluorescence
IgG: Immunoglobuline G

IHA: Inhibition de l'hémagglutination
Ile: Isoleucine
IM: Intramusculaire
IV: Intraveineuse
LVD69: Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône
Lys: Lysine
MEV: Virus entéritique du vison
MGG: May-Grünwald-Giemsa
MVM: Minute virus de la souris
Pb: Paires de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
PFU: Particules formant unité
PO: *Per Os*
PPV: Parvovirus du porc
QID: 4 fois par jour
QSP: Quantité suffisante pour
RD: Parvovirus du chien viverrin
RFLP: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RPV: Parvovirus du raton laveur
SC: Sous-cutané
Ser: Sérine
T: Thymine
TCID₅₀: Dose infectieuse à 50% en culture cellulaire
TID: 3 fois par jour
UV: Ultra Violet
V ou Val: Valine
VPN: Valeur prédictive négative
VPP: Valeur prédictive positive

INTRODUCTION

La panleucopénie féline, également appelée leucopénie infectieuse féline, typhus félin ou parvovirose féline, est une maladie systémique grave des chatons et jeunes chats, provoquée par l'infection du parvovirus félin, appartenant à la famille des *Parvoviridae*. Cette infection peut être transmise par voie oronasale et se traduit dans la majorité des cas par des signes de gastroentérite aiguë associés à une leucopénie sévère, une contagiosité et une mortalité élevées. La contamination *in utero* est également possible, et entraîne la naissance de chatons ataxiques.

La prévalence de la panleucopénie est faible aujourd'hui, car les mesures de prophylaxie médicale sont très efficaces. Il reste néanmoins des foyers d'infection, principalement dans les lieux de collectivité comme les élevages, les refuges. Cette maladie n'est pas éradiquée et les chatons sont les premiers atteints, notamment pendant la période critique durant laquelle les anticorps maternels interfèrent avec la vaccination et empêchent d'obtenir une protection suffisante.

Le but de cette étude est de développer un test PCR capable de détecter le parvovirus félin dans les fèces de chat, et ainsi de mettre à la disposition des praticiens un diagnostic de laboratoire de certitude pour les aider à prendre des mesures adaptées à la contagiosité et à la gravité de cette maladie.

La description du parvovirus félin et l'étude de la panleucopénie féline sont présentées dans la première partie de ce travail. La deuxième partie, expérimentale, détaille la mise au point d'un test PCR capable de détecter le parvovirus félin dans des fèces de chats suspects de panleucopénie.

Partie Bibliographique

I. HISTORIQUE

La première manifestation de la maladie a été observée en Inde dans les **années 1900**, on parlait alors de choléra asiatique (20).

En Europe au début du vingtième siècle sont apparus des cas d'entérite sévissant chez les jeunes chats ; certains scientifiques attribuant leur origine à des infections colibacillaires (REICHEL et MUMMA en 1913 (65)).

C'est en **1928** que VERGE et CRISTOFORINI (88) ont pour la première fois démontré qu'un virus était à l'origine de ces affections félines, en reproduisant expérimentalement la maladie par infection de chats avec des organes provenant d'animaux malades.

A cette époque, on était face à une maladie touchant principalement les jeunes, avec d'une part des symptômes digestifs, mais également respiratoires. En **1932**, MINDLE et FINDLAY (*in* 20) parlent de « maladie du jeune âge du chat ».

Dès **1938** sont proposées des explications cliniques pour la gastro-entérite du chat : LAWRENCE et SYVERTON (47) observent que chez les animaux atteints et présentant de l'asthénie, de l'apathie, avec parfois de l'hyperthermie (supérieure à 40°C) et de la diarrhée, il existe également une leucopénie importante. Cette observation est retrouvée en Allemagne en 1940 par KIKUTH, GONNERT, et SCHWEIKERT (*in* 19) et aux Etats-Unis en 1939 par HAMMON et ENDERS (30).

En France, en **1945**, BRION et BERTRAND (5) identifient cliniquement la leucopénie infectieuse féline. Ils réalisent une étude clinique et expérimentale durant dix-huit mois, qui leur permet de conclure à l'existence fréquente de la leucopénie infectieuse chez le chat en région lyonnaise. Ils mettent au point un vaccin formolé dès 1947, encore largement utilisé dans les années 1970.

Dans les **années 1940-1950**, la maladie s'étend à de nombreux pays : en Allemagne, aux Etats-Unis, au Danemark et au Sri Lanka, ainsi qu'en Roumanie et en Angleterre, et essentiellement chez des léopards ou des chats sauvages (20).

En **1950**, des cas de leucopénie infectieuse chez la panthère, le puma, l'ocelot et le jaguar sont décrits par URBAIN et NOUVEL (85).

Entre 1957 et 1970 plusieurs virus responsables de syndromes respiratoires chez le chat sont isolés (*in* 48):

- l'herpèsvirus, ou virus de la rhino-trachéite féline,
- les picornavirus (nombreuses souches),
- les réovirus (type 3).

Ces virus peuvent être associés entre eux et à celui de la leucopénie infectieuse féline. Ainsi, la multiplicité des symptômes observés dans ce qui est appelé la « maladie du jeune âge du chat » résulte de cette co-infection par plusieurs virus. L'affection pulmonaire est alors clairement distinguée de l'affection digestive.

C'est en **1964** que le virus de la leucopénie infectieuse féline a été isolé par JOHNSON (40) sur culture cellulaire de rein de chaton, et à partir de la rate d'un léopard mort d'une maladie dont les signes cliniques orientaient vers la leucopénie infectieuse.

Par la suite, d'autres chercheurs aux Etats-Unis et en Europe (20, 48) ont isolé des souches du virus de la leucopénie infectieuse féline à partir de chats présentant des symptômes de gastro-entérite et/ou de leucopénie, toutes identiques du point de vue antigénique au virus isolé et identifié précédemment par JOHNSON (40).

JOHNSON montre en **1967** (42) que la leucopénie infectieuse féline et l'entérite virale du vison sont provoquées par le même virus.

Il démontre également la même année, en relation avec KILHAM et MARGOLIS (44), que l'ataxie du chaton est provoquée par l'infection *in utero* du virus de la leucopénie infectieuse.

Toujours en 1967, la pathogénie de l'infection est étudiée par ROHOVSKY et GRIESEMER (67).

Enfin, JOHNSON identifie en **1969** (43) l'agent responsable de la leucopénie infectieuse féline comme appartenant au groupe des « parvovirus ».

Des études concernant d'autres parvovirus ont été réalisées en parallèle, afin de déterminer quelles relations existaient entre eux. Il s'agit du virus entéritique du vison (MEV), du parvovirus du raton laveur (RPV), du parvovirus du renard arctique (BFPV), et du parvovirus du chien viverrin (RD) (76, 73).

Dans les **années 1970**, la leucopénie infectieuse, nommée aussi panleucopénie, était très présente en France : par exemple à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, elle représentait 15% des consultations félines (20).

La maladie est également observée chez les chats domestiques en Angleterre, en Allemagne, en Autriche, ainsi qu'en Australie, aux Etats-Unis, en Inde, en Irlande, en Yougoslavie, en Pologne, en U.R.S.S., en Côte d'Ivoire, à Madagascar et au Brésil (20).

Toujours dans les années 1970 apparaît un virus provoquant une maladie chez le chien similaire à la panleucopénie féline ; il est identifié en 1978 comme étant un parvovirus canin et est nommé CPV2 (8). De nombreuses recherches sont effectuées afin de déterminer l'origine de l'émergence de ce nouveau virus, et ses relations avec les parvovirus déjà identifiés. Deux nouvelles souches dérivées du CPV2 vont rapidement remplacer celui-ci : CPV2a dès 1980 et CPV2b dès 1984 (89).

Enfin, IKEDA *et al.* (39) ont montré l'existence en 2000 d'un nouveau variant du CPV2, nommé CPV2c, isolé chez le chat-léopard d'Asie (*Prionailurus Bengalesis*), qui correspondrait à une adaptation des souches CPV2a et CPV2b à l'espèce féline.

La répartition mondiale de la panleucopénie s'est donc déroulée sur plusieurs dizaines d'années. Des cas isolés ont été observés, mais également des épizooties sévères et meurtrières dans les élevages, chatteries, animaleries de laboratoire. Le reste du temps, la maladie subsistait à l'état endémique pendant toute l'année (48).

II. LE PARVOVIRUS FELIN

A. CLASSIFICATION

Le virus de la panleucopénie féline (FPV) appartient à la famille des *Parvoviridae*, sous-famille des *Parvovirinae*, genre *Parvovirus* (11).

La famille des *Parvoviridae* est divisée en plusieurs genres (3) :

-le genre *Parvovirus* ou virus autonome : les virus de ce genre infectent les mammifères avec un large spectre d'hôte naturel (chats, chiens, renards, rongeurs comme les rats, les lapins, les souris, les hamsters; visons, porcs, bovins, canards, oies, raton-laveurs). Ce genre contient la majorité des virus de la famille des *Parvoviridae* identifiés à ce jour.

-le genre *Dependovirus* ou AAV (adénovirus associés) : les virus de ce genre sont sans pouvoir pathogène propre et ont besoin d'une co-infection par un adénovirus ou un herpèsvirus pour se répliquer (89).

-le genre *Densovirus* : il s'agit de virus qui infectent les insectes.

Parmi le genre *Parvovirus* sont distingués plusieurs **sous-groupes**, dont celui qui contient des virus de **type parvovirus félin** (FPV, RPV, MEV, BFPV), et des virus de type parvovirus canin (CPV2, RD) (89, 3).

B. STRUCTURE

Les parvovirus sont de **petits virus** de forme sphérique, **non enveloppés**, d'un diamètre d'environ 20 nm (+/- 4 nm) (89, 3).

Le virion (ou particule virale complète) est composé d'une capsid protéique contenant une molécule d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Sa masse moléculaire

est comprise entre $5,5$ et $6,2 \times 10^6$ daltons, et est de $1,4 \times 10^6$ daltons pour une particule virale vide, c'est-à-dire sans ADN (2).

La structure du parvovirus félin a été déterminée par cristallographie aux rayons X (3), et comparée à celle du parvovirus canin (3, 90).

1. La capside

Le **diamètre** de la capside du parvovirus est approximativement de 260 \AA (2).

❖ Protéines structurales :

L'étude de la capside vide du FPV montre qu'elle est constituée des protéines **VP1** (10 %) et **VP2** (90 %) (37).

Seule l'étude du parvovirus canin (3, 90, 2) montre qu'il existe une protéine **VP3** présente suite à un clivage de 15 à 20 acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine VP2. Ce clivage est dû à des protéases actives lors d'une infection *in vivo*, et n'est pas observé au sein de la capside vide du CPV (37, 90).

La similarité existant entre le CPV et le FPV suggère que le même clivage est présent au sein de la capside complète du FPV *in vivo*, et que celle-ci est aussi formée des trois protéines VP1, VP2, et VP3.

La séquence en acides aminés de la protéine VP2 est entièrement retrouvée au sein de VP1. Cette dernière possède en plus 143 acides aminés à son extrémité N-terminale (75) (figure 1).

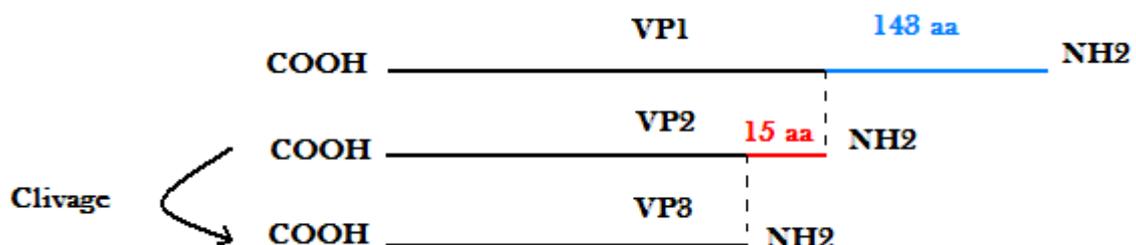


Figure 1 : Les trois protéines structurales de la capside du FPV

La protéine VP1 est composée de 727 acides aminés et son poids moléculaire est d'environ 80 kDa (kilo Dalton), alors que VP2 est constituée de 584 acides aminés et pèse environ 65 kDa (52, 90).

❖ Organisation de la capside :

La capside du parvovirus félin forme un **icosaèdre** composé de **60 sous-unités** (3, 90).

En géométrie, il existe trois types d'axes de symétrie dans un icosaèdre régulier, qui correspondent à des axes de rotation d'ordre 2, 3, et 5 (figure 2) :

- l'axe de rotation d'ordre 2 relie les milieux de deux arrêtes opposées,
- l'axe de rotation d'ordre 3 relie les centres de deux faces opposées,
- l'axe de rotation d'ordre 5 relie deux sommets opposés.

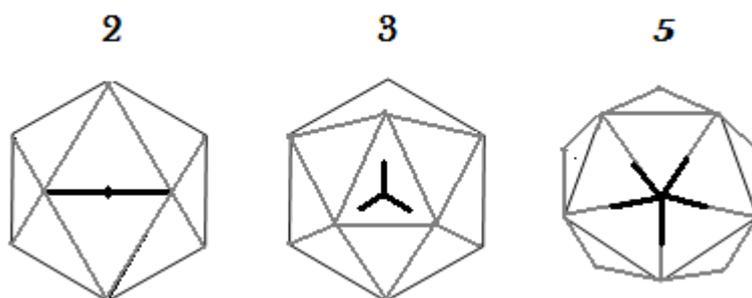


Figure 2 : Les trois axes de l'icosaèdre, d'après (21)

Dans l'organisation icosaédrique du parvovirus, on distingue donc (figure 3) :

- **des axes de symétrie d'ordre 3 (3X)** : au niveau de chaque axe s'élève une **pointe** de 22 Å de longueur et de 70 Å de diamètre (89).
- **des axes de symétrie d'ordre 5 (5X)** : au niveau de chaque axe se trouve un **cylindre** constitué de 5 feuillets β liés en chaînes antiparallèles par des liaisons hydrogènes. Il existe autour de ce cylindre un **canyon** de 11 Å de profondeur, qui débute à distance de 9 Å du sommet du cylindre (89, 3).
- **des axes de symétrie d'ordre 2 (2X)** : au niveau de chaque axe on observe une **dépression**.

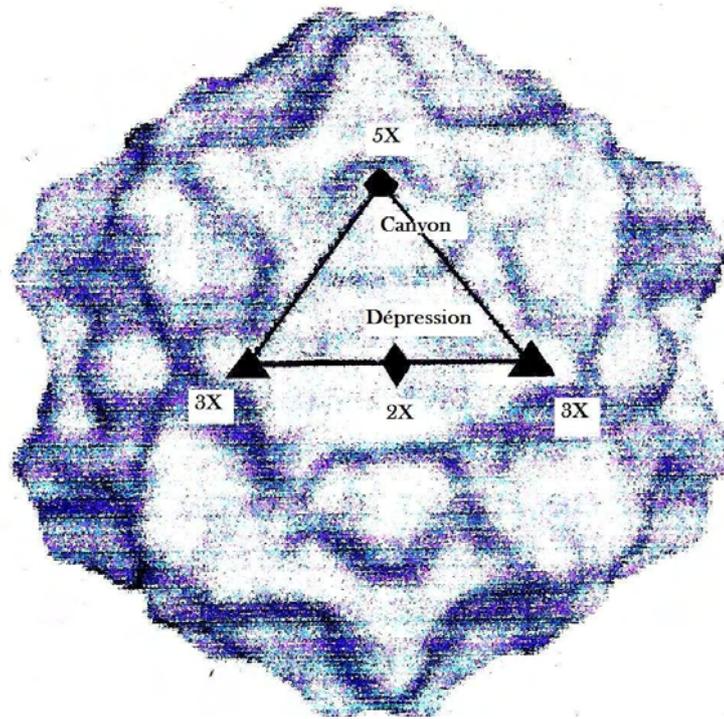


Figure 3 : Image tridimensionnelle de la capside du CPV établie à partir de la structure atomique, et comparable à celle du FPV, d'après (3) et (89)

Triangles : axes **3X**, correspondant à des pointes

Losange : axe **2X**, correspondant à une dépression

Pentamère : axe **5X**, correspondant à un cylindre entouré d'un canyon

Chaque sous-unité de la capside correspond à une chaîne polypeptidique formée d'un même arrangement des protéines VP1, VP2, et VP3 : il s'agit d'une structure β antiparallèle à 8 chaînes, qui est retrouvée dans la plupart des parvovirus (2).

De larges insertions sont observées entre les feuillets β (figure 4) : 36 acides aminés composent la boucle 1 entre les feuillets β B et β C, 74 acides aminés la boucle 2 entre les feuillets β E et β F, et 223 acides aminés les boucles 3 et 4 entre les feuillets β G et β H.

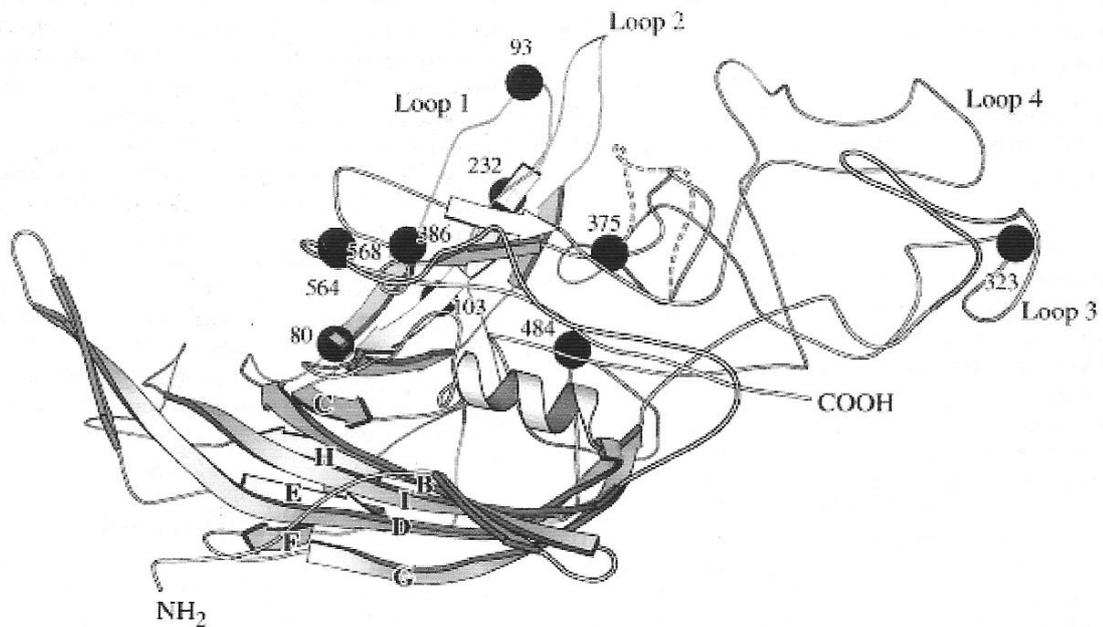


Figure 4 : Structure secondaire de la protéine VP2 du FPV et comparaison avec le CPV, d'après (3)

Les ronds noirs représentent les acides aminés qui diffèrent avec le CPV
Les pointillés représentent la conformation des boucles 3 et 4 chez le CPV
Les flèches représentent les feuillets β
Loop : boucle

Ces boucles constituent la majorité de la surface de la capsid, notamment au niveau des pointes de l'axe 3X, où de nombreuses interactions entre les protéines ont lieu. Ces interactions sont liées à l'existence de sites antigéniques (2).

Un certain pourcentage (environ 13%) des protéines ont leur extrémité N-terminale exposée à la surface de la capsid (89).

On reconnaît, par analyse de la densité électronique des protéines de la capsid, l'extrémité N-terminale de VP2 au niveau de l'axe 5X. Cette partie de la protéine, qui est la cible d'anticorps neutralisants (90, 37), passe probablement par un des pores présents autour de l'axe 5X (90, 89).

Les zones en dépression au niveau des axes 5X et 2X, par analogie avec les picornavirus, peuvent correspondre à des sites de fixation de récepteurs (3).

❖ Fonctions de la capsid et comparaison avec le CPV :

Le FPV et le CPV diffèrent de 8 à 10 acides aminés constituant les protéines VP1 et VP2 (tableau I).

Numéro de résidu	80	93	103	232	323	564	568
Acide aminé CPV2	Arg	Asn	Ala	Ile	Asn	Ser	Gly
Acide aminé FPV	Lys	Lys	Val	Val	Asp	Asn	Ala
Position FPV structure	C Boucle1	V Boucle1	C Boucle1	V Boucle2	V Boucle3	V C-terminal	C C-terminal

Tableau I : Principales différences dans la séquence d'acides aminés de VP2 entre le FPV et le CPV, d'après (3)

La position des acides aminés dans la structure du virus FPV est soit à la surface de la capsidie donc visible (**V**), soit à l'intérieur de la structure donc cachée (**C**). La position des acides aminés au sein de la protéine VP2 est également indiquée (boucles, extrémité C-terminale).

Ala : Alanine **Asp** : Acide aspartique **Lys** : Lysine
Arg : Arginine **Gly** : Glycine **Ser** : Sérine
Asn : Asparagine **Ile** : Isoleucine **Val** : Valine

Ces différences dans la séquence en acides aminés se retrouvent principalement au niveau de la structure de la capsidie, et sont donc associées à des différences biologiques entre les deux virus, notamment en ce qui concerne les interactions avec les récepteurs cellulaires et les anticorps (3).

Le parvovirus félin peut se répliquer chez le chat et dans les cellules félines. Le parvovirus canin peut se répliquer chez le chien et dans les cellules canines. Il a été montré que si l'on transfère directement de l'ADN du FPV dans des cellules canines, l'infection se déroule comme au sein de cellules félines, avec répllication de l'ADN et production de virus (3).

La différence de spectre d'hôte entre le FPV et le CPV résulte donc d'interactions entre la capsidie du virus et les cellules de l'hôte à un stade précoce de l'infection, stade correspondant à la reconnaissance entre le virus et la cellule (3).

Des études ont permis de réaliser une carte des acides aminés exposés à la surface de la capsidie du FPV et du CPV (figure 5). Un emplacement d'acide aminé correspond à un numéro de résidu, et un même résidu peut représenter un acide aminé différent pour chacun des virus.

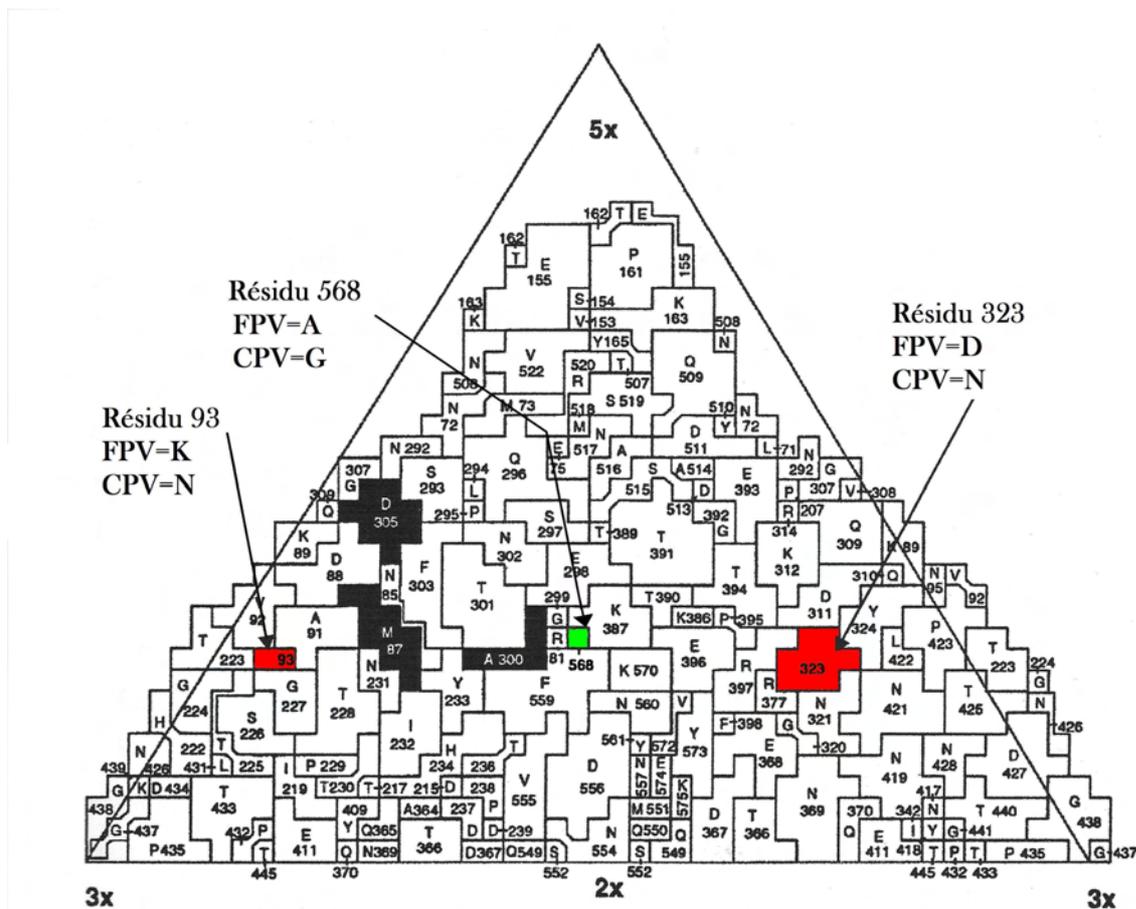


Figure 5 : Carte des acides aminés exposés à la surface de la capsid du CPV, et différences avec le FPV, d'après (3, 89)

En rouge : résidus responsables du spectre d'hôte CPV (93 et 323)

En vert : résidu responsable du spectre d'hôte FPV (568)

En noir : résidus permettant la répliation chez le chat de CPV2a et CPV2b

A : Alanine	Q : Glutamine	L : Leucine	T : Thréonine
R : Arginine	E : Acide glutamique	K : Lysine	Y : Tyrosine
N : Asparagine	G : Glycine	M : Méthionine	V : Valine
D : Acide aspartique	H : Histidine	F : Phénylalanine	
C : Cystéine	I : Isoleucine	P : Proline	
		S : Sérine	

La capacité de répliation du FPV chez le chat est déterminée par les résidus 80, 564, et 568, qui diffèrent entre le FPV et le CPV. Ces résidus sont localisés sur le bord de la dépression de l'axe 2X de la capsid, là où les hélices 1, 3 et 4 de trois protéines VP2 interagissent (3). Seul le résidu 564 est exposé à la surface (tableau I). Ces différences de résidus sont à l'origine de changements dans la conformation de la capsid entre les deux virus.

Les résidus 93, 103 et 323 sont situés au niveau de l'axe 3X. Ils diffèrent entre le CPV et le FPV, et déterminent la capacité de multiplication du CPV dans les

cellules canines *in vitro* et dans les intestins *in vivo* (89, 3). En effet, une mutation qui remplacerait au niveau de ces résidus un acide aminé du CPV par celui homologue (du même résidu) du FPV se traduirait par une diminution de la réplication du CPV dans les cellules canines (89, 35).

Une mutation de l'un des acides aminés des résidus 93, 103 et 323 chez le FPV produit un virus comparable au CPV sauvage, c'est-à-dire avec une capacité de multiplication au sein des cellules canines et une excrétion qui sont similaires (89, 82).

Enfin, les souches évolutives du CPV2, CPV2a et CPV2b, ont acquis la capacité de se répliquer efficacement chez le chat (36), mais ne possèdent pas la séquence d'acides aminés du FPV aux résidus 80, 564, et 568. Cette capacité de réplication chez le chat est probablement liée aux résidus 87, 300, et 305, eux-mêmes situés dans la « région 300 » (45). Celle-ci est proche des acides aminés 80, 564, et 568 au sein de la capsid (27), et une mutation sur cette « région » entraîne l'absence de fixation du CPV aux récepteurs des cellules canines (45) : ces résidus jouent un rôle dans le spectre d'hôte.

2. Le génome

❖ Organisation du génome :

Le parvovirus félin est un virus à ADN simple brin d'environ 5000 nucléotides (3). Il existe deux promoteurs principaux dans l'organisation du génome du FPV :

- le premier est appelé **P4**, il initie la transcription de l'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) à l'origine d'une protéine non structurale **NS1**, composée de 668 acides aminés et dont le poids moléculaire est d'environ 73 kDa (52).

Il a été démontré l'existence de protéines NS1 et NS2 chez le CPV (60), mais les études concernant le FPV n'évoquent pas la présence de NS2 (7, 52, 12).

- le deuxième est appelé **P39** et initie la transcription d'un ARNm qui, par traduction alternative, est à l'origine des protéines **VP1 et VP2** (52, 12).

D'après certains travaux (12, 15), et par analogie avec le MVM (19), il semble que la protéine NS1 participe à la transcription de l'ADN par un mécanisme de *trans*-activation du promoteur P39.

Les extrémités du génome des parvovirus sont caractérisées par des répétitions de séquences d'ADN correspondant à des régions non codantes (52).

Les extrémités 3' et 5' du génome du FPV présentent un rôle dans la réplication de l'ADN (7, 52). Les nucléotides de l'extrémité 3' sont arrangés en forme de « T » (figure 6).

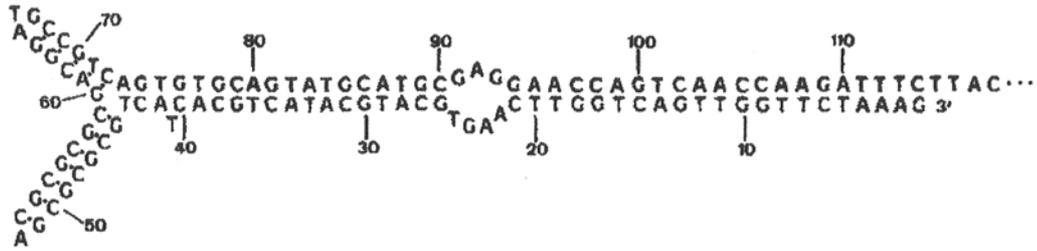


Figure 6 : Représentation de l'organisation du génome du FPV à l'extrémité 3', d'après (52)

A : Adénine C : Cytosine G : Guanine T : Thymin

Au sein de l'extrémité 5' non codante du FPV, il existe deux copies de 59 nucléotides dont la séquence est conservée entre les parvovirus. Cela suppose qu'elle présente un rôle essentiel dans la réplication (52).

La principale différence avec le génome du CPV se trouve au sein de cette région non codante 5'. En effet, plus en aval (à 75 nucléotides de distance des deux copies), on trouve une séquence de 61 nucléotides, qui peut être répétée une, deux, ou trois fois au sein du même virus, mais dont la séquence est variable entre le FPV et le CPV (64, 52).

❖ Séquençage du génome :

L'étude du génome du FPV (64, 7), et la comparaison avec le génome d'autres parvovirus, montre qu'il existe une forte homologie entre le CPV et le FPV comme indiqué dans le tableau II.

	Pourcentage d'homologie du FPV		
	Nucléotides	Acides aminés	
		NS	VP
Avec le CPV	98%	99%	99%
Avec le MVM	68%	73%	57%

Tableau II : Pourcentage d'homologie du FPV avec le CPV et le MVM, d'après (64) et (52)

NS : protéines non structurales

VP : protéines structurales (capside)

MVM : Minute Virus of Mice (parvovirus de la souris)

Le génome du FPV est resté relativement stable au cours des années.

Des séquences nucléotidiques à l'origine de NS1 et VP2 ont été analysées à partir de FPV isolés et collectés au Japon entre 1974 et 1995. Leur comparaison montre qu'il existe des modifications de ces séquences au cours du temps, mais que celles-ci correspondent en grande majorité à des substitutions synonymes (sans changement d'acides aminés) (32).

De plus, le taux d'erreur de l'ADN polymérase est faible pour les virus à ADN (10^{-8} à 10^{-9} erreur par nucléotide par réplication) (84), contrairement aux virus à ARN qui ont des taux importants de mutation et donc la capacité d'évoluer très rapidement.

Cette stabilité est en partie retrouvée entre les différents parvovirus. Par exemple, la séquence génomique correspondant aux acides aminés 22 à 39 de la protéine VP2 est très bien conservée entre eux (89).

C. PROPRIETES DU FPV

1. **Résistance du FPV**

❖ Relation caractéristiques/résistance virales :

Le parvovirus félin est un virus non enveloppé, composé d'une nucléocapside c'est-à-dire d'une capsidie protéique contenant le génome.

Ce type de virus est beaucoup plus résistant que les virus enveloppés, qui, en plus de la nucléocapside, possèdent une enveloppe lipidique facilement détruite par les solvants organiques comme l'éther ou le chloroforme (89).

❖ Résistance dans le milieu extérieur :

Dans les milieux contaminés par le FPV, celui-ci peut rester infectieux plusieurs semaines à plusieurs mois. En effet, une étude sur la résistance du MEV, qui est très proche du FPV, a montré qu'il était capable de survivre dans le milieu extérieur au moins 5 à 10 mois (86).

Le FPV pourrait même résister jusqu'à un an et plus dans l'environnement (6).

❖ Action des agents physico-chimiques :

a) **Agents physiques**

- *Effet de la température :* le FPV résiste à 75°C pendant 30 minutes, et moins d'une minute à 100°C. Il est stable 24 heures à 37°C, et 3 mois à 4°C. Il peut être conservé congelé (48).

- *Effet du pH* : le FPV est stable d'un pH allant de 3 à 9 (48).

b) Agents chimiques

Les désinfectants et détergents classiques comme l'alcool, les acides, les ammoniums quaternaires, les phénols, l'éther et le chloroforme, sont inefficaces sur le FPV.

Il est par contre sensible au formol à 2%, qui peut être utilisé sous forme de gaz pour désinfecter les locaux, ainsi qu'à l'hypochlorite de sodium à 3% (eau de Javel), qui permet de désinfecter le matériel, les litières (50).

2. Pouvoir hémagglutinant

Les résidus impliqués dans le pH d'hémagglutination sont le **323** et le **375**. Ces deux résidus correspondent à l'acide aminé [Asp] chez le FPV, le 323 se trouve à la surface de la capsid, le 375 lui est caché dans la structure. Chez le CPV, on trouve l'acide aminé [Asn] sur les résidus 323 et 375 (3).

Par cette différence, le FPV possède un pouvoir d'hémagglutination à des valeurs de pH en dessous de 6,8, alors que le CPV peut hémagglutiner à des valeurs de pH allant au moins jusqu'à 7,5 (3, 11).

Cette spécificité du pouvoir hémagglutinant est liée à l'acide N-glycolyl neuraminique, présent au sein des récepteurs de surface des érythrocytes auxquels se fixe le virus. Cet acide est présent sur les globules rouges à 70% dans l'espèce féline, alors que la majorité des globules rouges de l'espèce canine ne le possède pas (89).

Une étude comparant le pouvoir hémagglutinant du FPV, du MEV, et de différentes souches de CPV (73) montre que le FPV est capable d'agglutiner à des titres équivalents les érythrocytes de porc et de singe vert d'Afrique. La réaction d'hémagglutination est optimale à 4°C et nécessite un pH compris entre 5,6 et 6.

Les globules rouges de chien et de musaraigne sont également agglutinés mais moins sensibles, ainsi que, par ordre décroissant, les hématies de cheval, chat, hamster et mouton. Enfin, les érythrocytes d'oie, de chèvre, de lapin, de cochon d'Inde, de rat, de souris, de bovin, de poule et d'homme de groupe O ne sont pas agglutinés (73).

Le pouvoir hémagglutinant du virus est une propriété intéressante dans l'établissement de tests diagnostiques.

3. Pouvoir antigénique

❖ Site de fixation des anticorps :

Les sites de fixation des anticorps neutralisants dirigés contre les parvovirus correspondent à des épitopes antigéniques situés à la surface de la capsid (externalisation de la protéine VP2 au sein des axes 5X et 3X) (3, 2).

L'épitope spécifique du CPV est clairement déterminé : les anticorps monoclonaux spécifiques ne se fixent plus si le résidu 93 du CPV [Asn] est remplacé par le résidu 93 du FPV [Lys].

Concernant le FPV, la reconnaissance d'un épitope spécifique du virus par l'anticorps monoclonal spécifique Mab G est affectée par des mutations au sein du résidu **323** (FPV [Asp]) (11).

❖ Mécanisme de neutralisation :

L'induction d'anticorps neutralisants par le FPV est l'un des principaux mécanismes de défense de l'organisme infecté (38). Ils agissent en provoquant l'agrégation des capsides virales.

Une étude a cependant montré que le FPV pouvait persister pendant plusieurs semaines dans les lymphocytes circulants d'un chat préalablement infecté et ce malgré des taux en anticorps neutralisants importants (1).

4. Pouvoir immunogène

L'immunité acquise suite à une infection par le FPV ou suite à la vaccination est solide et durable (79).

La réponse immunitaire cellulaire post-infection est dirigée contre la protéine VP2 de la capsid du FPV (66, 70).

5. Pouvoir de multiplication

❖ Particularités du FPV :

La réplication du parvovirus nécessite l'infection de cellules en phase S de la mitose situées au sein de tissus en division active. En effet, le virus a besoin pour se répliquer de la présence d'une ADN polymérase afin de synthétiser le brin complémentaire d'ADN, première étape dans la réplication virale (50).

❖ Conséquences sur la multiplication *in vivo* :

Le tropisme du virus est donc dirigé vers les cellules en mitose.

Le FPV se multiplie ainsi chez le chat dans les cellules de l'épithélium germinatif du cervelet chez les fœtus et les nouveau-nés (14), et dans les cellules des tissus lymphoïdes, de la moelle osseuse, et de l'épithélium intestinal chez les chatons et les adultes (59).

Le FPV est capable de se répliquer chez le chien seulement dans les tissus lymphoïdes comme la moelle osseuse, la rate, le thymus, mais pas dans les intestins (80).

❖ Multiplification *in vitro* :

La culture du FPV sur cellules de rein de chat entraîne l'apparition d'**inclusions intranucléaires** éosinophiles puis basophiles, évolutives, en environ 24h (48).

La recherche de la présence d'inclusions intranucléaires dans les cellules pour détecter l'infection d'une culture peut se faire avec la coloration May-Grünwald-Giemsa (**MGG**) (48).

JOHNSON a montré en 1965 (41) que le pourcentage d'inclusions intranucléaires variait en fonction :

- de la provenance des cellules rénales de chat
- du nombre de passages cellulaires
- de l'âge de la couche cellulaire lors de l'inoculation (avec un maximum atteint sur cellules de rein infectées dans les 24h après la mise en culture)
- du milieu de culture utilisé
- de la quantité de virus dans l'inoculum
- de la température : entre 33°C et 39°C, les inclusions apparaissent d'autant plus vite, mais disparaissent plus vite également.

On observe la disparition des inclusions après observation du taux maximum.

Une étude datant de 1998 a été réalisée sur trois types cellulaires (38) : FL74 (lignée de cellules lymphoïdes félines), CL-1 (lignée de cellules lymphoïdes canines), et des cellules CRFK (lignée de cellules de rein de chat). La lignée cellulaire FL74 est plus sensible que les deux autres : les titres viraux sont obtenus en 4 jours et sont plus élevés (la dose infectante 50% ou TCID₅₀ est de 10^{4,5} à 10^{5,25}/100µL pour FL74, et de 10^{4,25} à 10^{4,5}/100µL pour CRFK), et l'effet cytopathogène (ECP) c'est-à-dire l'apoptose des cellules pour FL74 est visible dès le premier jour post-inoculation.

❖ Multiplication du CPV chez le chat :

Le CPV2 n'est pas capable d'infecter les chats.

De nouveaux variants sont apparus dans la population canine et sont définis génétiquement et antigéniquement comme les types CPV2a et CPV2b. Ces virus diffèrent de quelques acides aminés avec le CPV2 (36) : cette différence leur a permis d'une part d'améliorer leur capacité d'attachement aux cellules canines, et d'autre part d'acquérir la capacité d'infection de l'espèce féline et ainsi de provoquer une maladie similaire à la panleucopénie (53, 84, 81).

De plus, un autre variant nommé CPV2c, isolé pour la première fois en 2000 chez un chat-léopard d'Asie (39), s'est propagé aujourd'hui en Europe, Asie, Amérique du Sud et récemment Etats-Unis, et est également capable de se répliquer chez l'espèce canine et l'espèce féline (46).

6. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène du virus est à l'origine de modifications hématologiques. Une lymphopénie est parfois observée, et résulte probablement de l'effet direct de lyse cellulaire du virus au sein des tissus lymphoïdes, mais peut également être due à des effets indirects comme la migration des lymphocytes dans les tissus atteints (50).

Le virus se réplique aussi au sein de la moelle osseuse et infecte premièrement les précurseurs des polynucléaires neutrophiles, entraînant une neutropénie, et lors d'atteinte sévère toutes les colonies de cellules (érythroïdes et myéloïdes) peuvent être atteintes et entraîner une panleucopénie (59, 50).

D. PHYLOGENIE

Une étude menée en 1995 par TRUYEN *et al.* (84) sur 24 séquences nucléotidiques du gène codant pour les protéines VP1 et VP2 de la capsid et sur 8 séquences nucléotidiques du gène codant pour la protéine NS1 chez les parvovirus a démontré que le FPV, le MEV, le BFPV, et le RPV sont au niveau phylogénique très proches, et distinctifs des virus CPV2 et RD (figure 7).

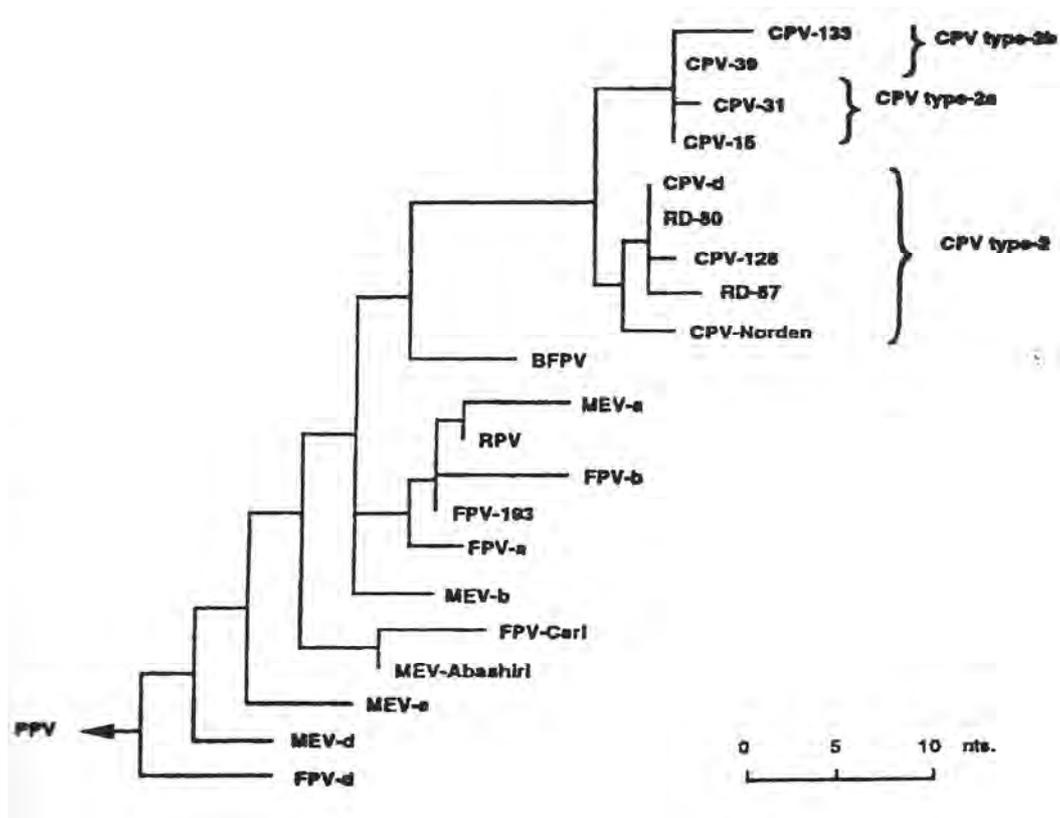


Figure 7 : Relations phylogéniques entre le FPV et les autres parvovirus (84)

BFPV : Parvovirus du renard arctique

CPV : Parvovirus canin

FPV : Parvovirus félin

MEV : Virus entéritique du vison

PPV : Parvovirus du porc

RD : Parvovirus du chien viverrin

RPV : Parvovirus du raton laveur

Il existe au moins dix nucléotides de différence entre le CPV2 et les autres virus (84).

L'hypothèse la plus probable concernant l'émergence du CPV2 reste qu'il serait un mutant direct du FPV ayant acquis la capacité de se multiplier chez le chien (82, 76, 84). La même explication a été donnée pour l'apparition du MEV dans les années 1940 (89).

TRUYEN et PARRISH (80) ont en effet montré que le FPV avait la capacité de se répliquer dans la moelle osseuse et le thymus provenant de chiens, mais pas dans les nœuds lymphatiques mésentériques ni dans les intestins dans lesquels le CPV2 se multiplie. Il suffirait donc à l'ancêtre du CPV2 d'acquies cette faculté de multiplication pour se répandre dans l'espèce canine (89).

Cependant, l'examen de séquences génétiques codant pour des protéines de la capsid virale de plus de 30 isolats de FPV par TRUYEN *et al.* (83) n'a montré l'existence d'aucune séquence ancestrale.

III. EPIDEMIOLOGIE

A. SOURCES DE L'AGENT PATHOGENE

1. Les organismes vivants

❖ Source principale :

Les sécrétions et excréments des individus malades, et surtout les fèces (77), représentent la principale source de l'agent pathogène. Le virus peut également être présent sur le pelage de l'animal.

Les individus présentant la forme subclinique de la maladie sont également excréteurs du virus et peuvent être à l'origine de foyers de contamination au sein de l'environnement (1).

L'existence de porteurs sains et possiblement excréteurs n'a pas été prouvée mais suggérée par certaines observations épidémiologiques (77).

❖ Vecteurs :

Les humains représentent une source de dissémination du virus, notamment les vétérinaires, les éleveurs (50).

Les insectes, en particulier les puces, peuvent jouer un rôle dans la transmission de la maladie (77, 48).

2. Les matières virulentes

La matière virulente principale est représentée par les fèces qui contiennent une grande quantité d'agents pathogènes. Le virus peut aussi être retrouvé dans d'autres excréments et sécrétions : urine (57), gouttelettes respiratoires, salive, écoulement nasal, avortons (48, 31).

3. Les objets inanimés

La très grande résistance du virus dans le milieu extérieur permet l'existence d'autres sources virales comme les cages contaminées, les gamelles de nourriture, les aliments, les litières, ainsi que le matériel, les instruments, les chaussures et les habits des personnes en contact avec l'animal malade (éleveur, vétérinaire) (77, 50, 1).

B. ESPECES SENSIBLES

Le FPV est capable d'infecter les chats, et en règle générale tous les félinés, ainsi que le raton laveur, le vison et le renard (76, 1).

Un parvovirus félin a par exemple été décrit comme provoquant des anomalies de reproduction chez des femelles renards bleus (*Vulpes Lagopus*) en gestation (87).

C. TRANSMISSION

1. Transmission directe

❖ Horizontale :

La transmission de la maladie nécessite un contact étroit entre l'animal sain et l'animal excréteur du virus (animal malade, infecté inapparent), ou entre l'animal sain et l'environnement et/ou l'objet contaminés (57).

Le site d'entrée du virus est généralement la voie oronasale (77), le virus peut également être inhalé (1).

Expérimentalement, la panleucopénie peut être transmise par voie orale, intranasale, sous-cutanée, intracérébrale, et intra-péritonéale (*in* 48).

❖ Verticale :

Il existe également une transmission verticale de la mère au fœtus par voie transplacentaire (57).

2. Transmission indirecte

Elle est assurée par les vecteurs passifs (objets inanimés), et par les vecteurs actifs (insectes).

D. RECEPTIVITE

La panleucopénie est principalement une maladie des chatons non immunisés lors de la période critique (*cf. VIII. B. 1.*), mais on observe occasionnellement des cas cliniques chez des adultes non ou mal immunisés et souvent dans les collectivités (4).

Les **jeunes de deux mois à un an** sont plus sensibles à la maladie. A l'âge adulte, la plupart des chats acquièrent une immunité active, soit par le biais de la vaccination, soit suite à une infection subclinique, la maladie est donc beaucoup plus rare (1).

Enfin, on observe une résurgence de la maladie chez les chats à partir d'un certain âge suite à l'arrêt d'une vaccination régulière.

La réceptivité à l'infection en fonction de l'âge semble être la même chez les mâles et les femelles (10).

Les **rares sélectionnées** paraissent être plus sensibles à la maladie (48).

Enfin, tout état entraînant un remodelage de l'épithélium intestinal et donc une **activation de la division cellulaire** rend l'animal plus réceptif à la maladie (stress, co-infection, ou même changement alimentaire) (1).

E. PREVALENCE ACTUELLE DE LA MALADIE

Peu de données sont actuellement disponibles concernant la prévalence du FPV au sein de la population féline. Cependant il reste évident, malgré une prévalence de la maladie fortement diminuée grâce à la vaccination, que les refuges et les élevages de chats représentent des milieux à risque lors de l'introduction de chatons ou de chats non immunisés (57).

En effet, une étude rétrospective (10) sur la cause du décès de 274 chatons au Royaume-Uni entre 1986 et 2000 montre que 35% sont morts suite à une infection par le FPV, et qu'il s'agissait principalement de chatons provenant de refuges.

L'infection des chats par le CPV2a et le CPV2b existe, et ces virus sont capables d'entraîner une maladie similaire à la panleucopénie féline, mais cette situation est rare en Europe et aux Etats-Unis (81).

Ce phénomène semble plus fréquent dans les pays asiatiques : le parvovirus canin a été isolé en 2000 (39) au Vietnam et à Taïwan à partir de lymphocytes de chats et de léopards : sur 18 isolats de parvovirus, 15 se sont révélés être des parvovirus canins.

Une étude au Japon en 1996 (53) sur les propriétés génétiques et antigéniques de 37 isolats de FPV provenant de chats cliniquement malades a également mis en évidence la présence du CPV.

F. MORTALITE

La mortalité est particulièrement élevée chez les jeunes chats de 2 mois à 1 an ; elle peut aller de 25% à 90% dans le cas d'une forme aiguë et tend à s'aggraver avec une prise en charge tardive de l'animal (77).

IV. PATHOGENIE DE L'INFECTION PAR LE FPV

A. PRINCIPE GENERAL

Le schéma général de la pathogénie de l'infection par le FPV est basé sur l'existence d'une affinité sélective du virus pour les cellules en division. En effet, les

travaux de CSIZA (*in* 48) ont montré qu'il existe un lien entre l'activité mitotique des cellules d'un organe et le nombre de cellules infectées dans celui-ci.

B. ETAPES DE L'INFECTION

Le site d'entrée du virus est la plupart du temps la voie oronasale (77).

1. Réplication primaire

La réplication virale se déroule en plusieurs étapes successives de reconnaissance et d'attachement cellulaire par le virus, de pénétration dans la cellule cible et de réplication de l'ADN pour former de nouveaux virions (72).

a) Reconnaissance et attachement à la cellule cible

C'est cette étape qui conditionne la spécificité de l'infection virale.

La capside du FPV est capable de s'attacher à l'acide N-glycolyl-neuraminique (acide sialique) (1), présent au sein des membranes cellulaires.

De nombreux facteurs influencent l'efficacité de l'attachement, comme la concentration en virus et le nombre de récepteurs des cellules cibles. Une seule particule virale suffit à infecter une cellule.

Les anticorps neutralisants, en se fixant aux épitopes antigéniques, inhibent l'attachement des virus aux cellules cibles.

b) Pénétration et décapsidation du virus

Une série d'événements conduit à la pénétration du virus dans le cytoplasme. Les virus non enveloppés comme le parvovirus utilisent le phénomène d'endocytose pour pénétrer, et intègrent des vésicules recouvertes de protéines appelées clathrines.

La capside doit être suffisamment altérée pour que les gènes soient transcrits. Cette étape est peu connue mais a lieu la plupart du temps dans le cytoplasme, et est favorisée par le pH acide des endosomes.

c) Multiplication virale

La réplication de l'ADN du FPV est intranucléaire et est permise grâce à l'ADN polymérase fournie par la cellule hôte. Les ARNm viraux sont traduits en protéines par les ribosomes de la cellule.

d) Assemblage et libération des virions

L'assemblage de la molécule de génome viral avec les unités protéiques de la capsid se fait dans le cytoplasme, et les nouveaux virions sont libérés par lyse cellulaire.

2. Virémie et conséquences lésionnelles

❖ Etapes de la virémie :

La virémie se déroule entre le 2^{ème} et le 7^{ème} jour après l'infection (1).

Après s'être multiplié dans les cellules des tissus lymphoïdes de l'oropharynx (77, 59), le virus diffuse dans l'organisme par voie sanguine et est isolé entre 1 à 3 jours dans les amygdales, les nœuds lymphatiques rétropharyngiens, le thymus, et les nœuds lymphatiques mésentériques.

Il va ensuite se loger principalement dans les cellules des cryptes intestinales, la moelle osseuse, ainsi que le cervelet chez les fœtus et nouveau-nés (77).

❖ Atteinte de la moelle osseuse :

La **moelle osseuse** peut être sévèrement atteinte par l'infection : en effet, on détecte la présence de l'antigène viral par immunofluorescence des anticorps dans 10% à 20 % des cellules de la moelle osseuse (59).

La neutropénie marquée et précoce observée dans la majorité des cas de typhus félin s'explique probablement par la destruction des précurseurs des polynucléaires neutrophiles dans la moelle osseuse (59). En effet, la diminution de ces colonies de cellules myéloïdes entraîne rapidement une diminution des polynucléaires neutrophiles circulants, leur durée de vie n'étant que de quelques jours.

❖ Atteinte des autres tissus lymphoïdes :

La lymphopénie parfois observée peut être due à la destruction cellulaire au sein des tissus dont les cellules sont en division, comme les centres germinaux des **nœuds lymphatiques** ou le cortex du **thymus**. Cette lyse cellulaire est provoquée par l'effet direct de la multiplication du virus, mais également par des effets indirects comme l'attachement du virus à la cellule, qui peut engendrer une destruction importante lorsque le titre viral est élevé (59). La lymphopénie peut également être influencée par le recrutement des lymphocytes dans les tissus atteints (50).

❖ Atteinte de l'épithélium intestinal :

L'infection de l'**épithélium intestinal**, dans les cellules en division des cryptes des villosités intestinales de l'iléon et du jéjunum, se déroule entre le troisième et le

cinquième jour après l'inoculation. Le virus a envahi tout l'épithélium de ces portions intestinales en quatre à huit jours après l'infection. Il empêche la régénération cellulaire et on observe alors un épithélium détruit avec des villosités intestinales courtes, ce qui entraîne une perte de la régulation osmotique, à l'origine de la diarrhée muco-hémorragique souvent observée chez les individus malades (59).

La sévérité des lésions intestinales semble être liée au taux de régénération cellulaire. Les symptômes peuvent être aggravés en cas de co-infection avec des bactéries ou des virus (coronavirus) ou par la présence de parasites (50, 59).

Enfin, la destruction de la barrière intestinale entraîne le passage d'endotoxines dans la circulation sanguine et provoque une hyperthermie (59). Etant donné les dommages causés au système immunitaire, ce passage dans la circulation générale peut entraîner une septicémie, une endotoxémie et la mort (77).

❖ Atteinte du fœtus :

Toujours selon la même règle de tropisme des cellules en division, le FPV, lorsqu'il **infecte le fœtus *in utero*** ou les chatons nouveau-nés, se réplique principalement dans l'épithélium germinale externe du cervelet et provoque une lyse cellulaire des cellules de Purkinje (14). Cette destruction est à l'origine d'une hypoplasie cérébelleuse responsable d'ataxie chez les chatons viables (59).

Dans le cas d'une infection *in utero* précoce, le virus cible toutes les cellules et entraîne la mort du fœtus (50).

3. Excrétion

Le virus est largement excrété dans les fèces à partir de la phase de dissémination dans les tissus intestinaux, juste après la phase de virémie, c'est-à-dire 3 à 4 jours après l'infection. On relève plus de 10^7 à 10^9 TCID₅₀ (dose infectieuse à 50%) par gramme de fèces (22). Les animaux infectés peuvent excréter le virus plus de 6 semaines après l'infection (77, 57).

V. ETUDE CLINIQUE

A. SYMPTOMATOLOGIE

Les symptômes de la panleucopénie féline sont variés et dépendent de la virulence du virus, de la résistance de l'hôte, des complications bactériennes et/ou virales associées et de la durée de la maladie.

Cependant, deux formes cliniques principales sont distinguées : une forme classique de gastro-entérite associée à une leucopénie et une forme atypique dominée par des signes nerveux présente chez les nouveau-nés.

1. **Forme classique : gastro-entérite et leucopénie**

Elle est principalement retrouvée chez des chatons de 2 mois à 1 an, mais peut également toucher les adultes non immunisés.

❖ Forme suraiguë :

Elle est très souvent confondue avec une intoxication, un empoisonnement (1): les individus atteints présentent en effet une forte hyperthermie suivie rapidement d'une hypothermie et d'un état de tупhos caractérisé par une dépression, un décubitus sterno-abdominal, et la tête posée sur les membres antérieurs étendus (77). La mort survient entre douze et vingt-quatre heures. Occasionnellement, des chats peuvent être retrouvés morts sans symptômes préalables.

❖ Forme aiguë :

La **période d'incubation** est en moyenne de **6 jours** (2 à 10 jours), et dépend de la dose infectieuse de départ, de l'âge de l'animal et des maladies intercurrentes (77). Pendant cette période on assiste à une chute progressive des globules blancs de 14 000-20 000 cellules /mm³ à environ 7000 cellules /mm³ (48).

Les symptômes apparaissent à un taux inférieur à 7000 cellules /mm³ (48) : cette **phase d'état** (environ 24 heures) peut être associée à une hyperthermie élevée (40°C) ; des vomissements sont présents dans 50% des cas et ne sont pas directement liés à la prise alimentaire (57).

L'animal est abattu, prostré, déshydraté, anorexique (77, 57).

Les symptômes deviennent plus prononcés avec la progression de la maladie, et sont d'autant plus graves que le taux de leucocytes est bas : il peut tomber en dessous de 1000 cellules /mm³, et parfois même atteindre les 100 cellules /mm³ (57).

L'animal est dans un **état de tупhos**. Il présente un état « pitoyable », son poil est terne et hérissé, il semble assoiffé (se place souvent vers la gamelle d'eau, mais ne boit pas) (57). La déshydratation devient sévère (pli de peau persistant, énophtalmie avec procidence de la troisième paupière, muqueuses sèches).

Les signes digestifs sont variés : vomissements de mousse ou de bile, diarrhée abondante plus ou moins jaunâtre et nauséabonde, avec souvent présence de sang et de mucus, mais elle n'est pas systématique, et souvent d'apparition plus tardive (57). La palpation abdominale est douloureuse, les anses intestinales semblent épaissies et remplies de gaz et/ou de liquide (77, 57).

Les signes hématologiques sont généralement une **leucopénie sévère** (figure 8) due principalement à une neutropénie, et souvent associée à une lymphopénie et

parfois à une anémie. Plus le taux leucocytaire est bas plus le pronostic tend à être défavorable (77, 57).

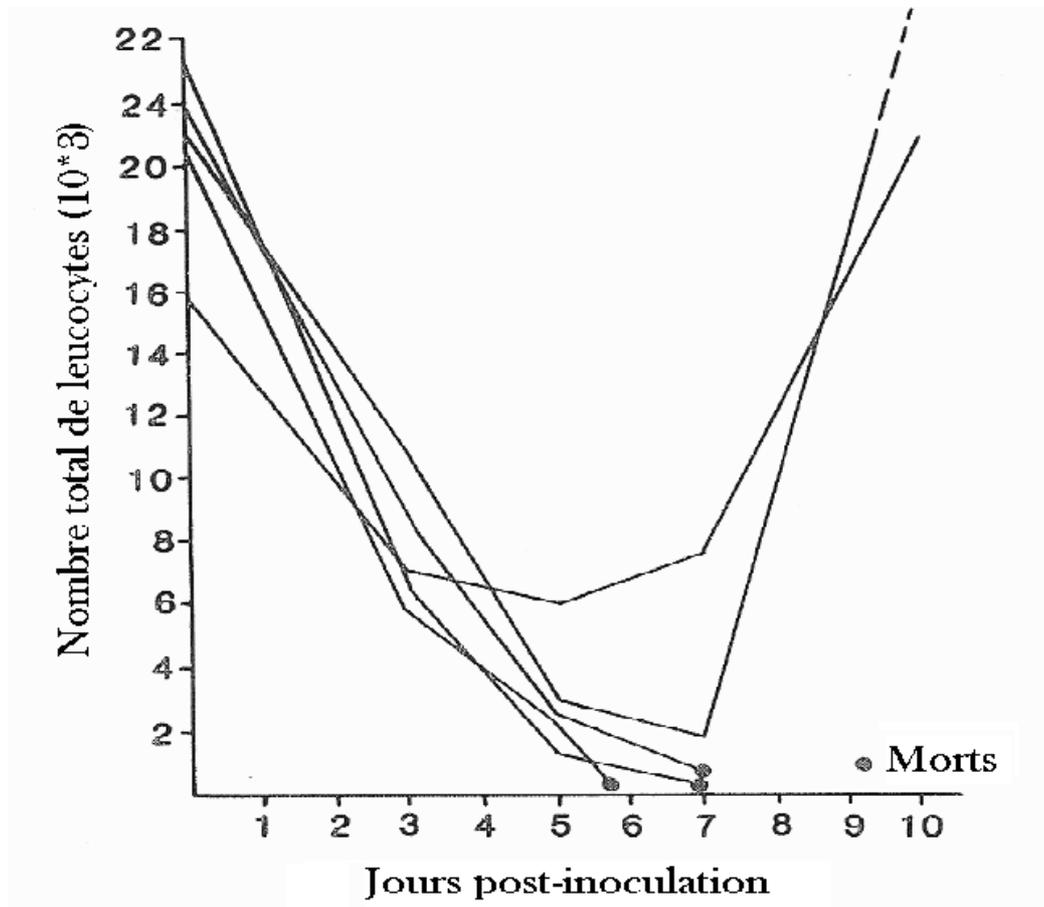


Figure 8 : Nombre total de leucocytes chez 5 chats après infection expérimentale par le FPV, d'après (63)

L'évolution clinique de la maladie peut se faire vers la mort de l'animal, et elle est précédée la plupart du temps par une hypothermie importante et par un syndrome de détresse respiratoire aigu avec œdème pulmonaire (77).

La mort peut parfois survenir avant l'observation de la diarrhée. Elle peut être due à la déshydratation et aux désordres électrolytiques causés par des vomissements intenses, ou due à l'apparition d'une septicémie ou endotoxémie associée à une probable Coagulation Intra Vasculaire Disséminée (CIVD) (77, 1).

Chez les chats qui survivent, le taux de leucocytes remonte significativement en quelques jours (figure 8) (9).

❖ Forme subaiguë :

Elle concerne surtout les chats de plus de un an qui ne sont pas vaccinés, ou les chats âgés qui ne sont plus vaccinés (57).

Elle correspond cliniquement à une gastro-entérite qui évolue vers la guérison en quelques jours, associée parfois à une hyperthermie fugace, une anorexie et un léger abattement (77).

❖ Formes particulières :

a) La forme subclinique

Elle est courante chez les chats adultes non vaccinés, et peut laisser apparaître une très légère fièvre et une faible leucopénie, passant souvent inaperçues (77).

Il semble que cette forme bénigne de la maladie soit assez fréquemment présente dans l'espèce féline, puisque certaines études ont montré qu'un taux important d'anticorps anti-FPV était présent chez de nombreux chats non vaccinés n'ayant jamais été atteints par la forme symptomatique de la maladie (56, 77).

b) Association du FPV avec d'autres agents pathogènes

Suite à l'association du FPV avec d'autres virus et/ou bactéries on peut observer des formes cliniques particulières (48) comme :

- une glossite ulcéreuse (association avec un herpèsvirus et surinfections bactériennes à streptocoques, staphylocoques, et anaérobies)
- une laryngo-trachéite infectieuse (association avec des virus respiratoires, souvent des picornavirus).

2. Forme atypique : la forme nerveuse

Elle concerne essentiellement les chatons nés d'une femelle infectée (souvent inapparente) ou en contact avec celle-ci dans les premiers jours de vie (57). Elle est devenue plus rare de nos jours et peut faire suite à la vaccination d'une femelle gestante par un vaccin vivant atténué (77).

L'infection du fœtus *in utero* lors du dernier tiers de la gestation a pour conséquence la naissance de chatons présentant une ataxie, visible dès qu'ils commencent à être actifs (10 à 14 semaines) (1). Tous les chatons d'une même portée ne sont pas forcément atteints, et ils peuvent également présenter de légers déficits visuels dus aux dommages du virus sur la rétine (77, 57).

Cette ataxie est due à une grave hypoplasie cérébelleuse, le chaton présente des pertes d'équilibre et des tremblements. Le statut mental de l'animal n'est pas affecté, et dans le cas d'une atteinte modérée, il est possible qu'il puisse s'accommoder à ses troubles et vivre presque normalement (77).

Les symptômes sont d'autant plus graves que l'infection a lieu tôt au cours de la gestation ; on observe ainsi des avortements chez les femelles gestantes infectées, la présence de fœtus momifiés, ou encore la mort du fœtus avec résorption fœtale, souvent confondue avec de l'infertilité (77).

La maladie reste incurable chez les chatons ataxiques.

B. TABLEAU LESIONNEL

1. Lésions macroscopiques

❖ Intestins :

Les lésions macroscopiques visibles post-mortem sont fréquemment des anses intestinales moyennement ou très congestionnées, des intestins épaissis, avec une perte d'élasticité et une apparence granuleuse de la séreuse. Le contenu intestinal est liquide et peut présenter des débris muqueux, du sang, et la muqueuse est exsudative (77).

❖ Nœuds lymphatiques :

Les nœuds lymphatiques sont œdémateux ou congestionnés et de taille augmentée (77).

❖ Thymus :

Chez les chatons le thymus est fréquemment atrophié (77).

2. Lésions microscopiques

Les différentes lésions microscopiques provoquées par le FPV sont localisées au sein des tissus dont les cellules sont en division active. Dans le cas de l'infection du fœtus dans le premier ou le deuxième tiers de la gestation, la destruction cellulaire concerne tous les tissus en développement et entraîne généralement la mort du fœtus (tableau III).

Tissus cibles	Lésions	Clinique
Moelle osseuse	Réduction des lignées cellulaires myéloïdes puis érythroïdes	Neutropénie (puis thrombocytopénie, anémie)
Nœuds lymphatiques, thymus	Réduction du centre germinal, apoptose des lymphocytes, atrophie du thymus	Lymphopénie
Cryptes épithélium intestinal	Collapsus des villosités, nécrose de l'épithélium	Diarrhée
Cellules fœtales	Destruction cellulaire généralisée	Mort du fœtus, avortement, fœtus momifié
Cervelet fœtus/nouveau-né	Hypoplasie cérébelleuse	Ataxie

Tableau III : Tissus cibles du FPV, lésions et manifestations cliniques, d'après (1, 77)

❖ Intestins :

On observe un collapsus des villosités intestinales, une nécrose de l'épithélium (figure 9) (77, 1).

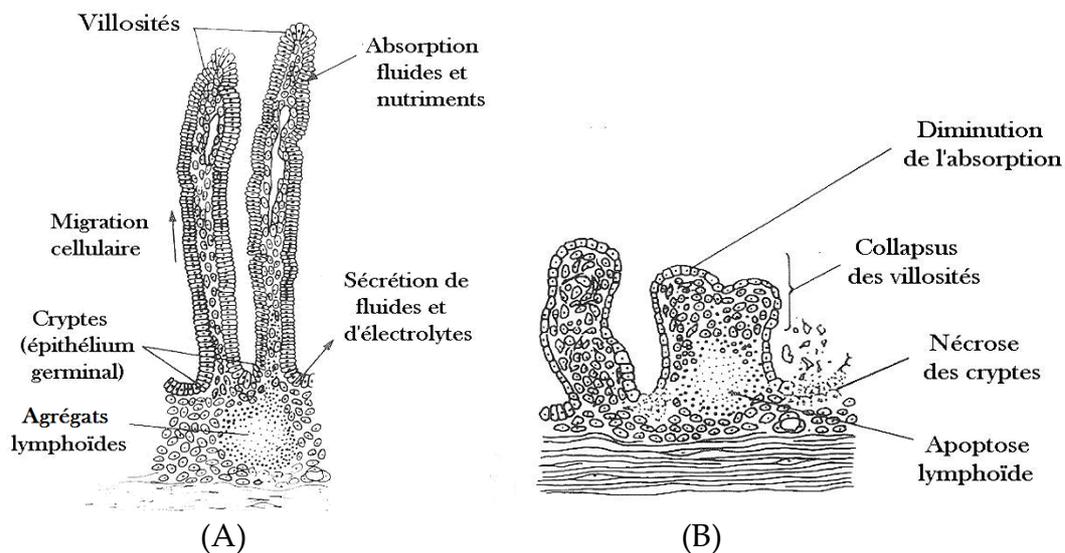


Figure 9 : Fonctions et aspect d'une villosité intestinale normale (A) et d'une villosité avec infection par le FPV (B), d'après (63)

❖ Nœuds lymphatiques :

On observe une réduction du centre germinal des nœuds lymphatiques et une apoptose des lymphocytes (1, 77, 38).

❖ Moelle osseuse :

On observe une réduction des lignées cellulaires myéloïdes puis érythroïdes (figure 10).

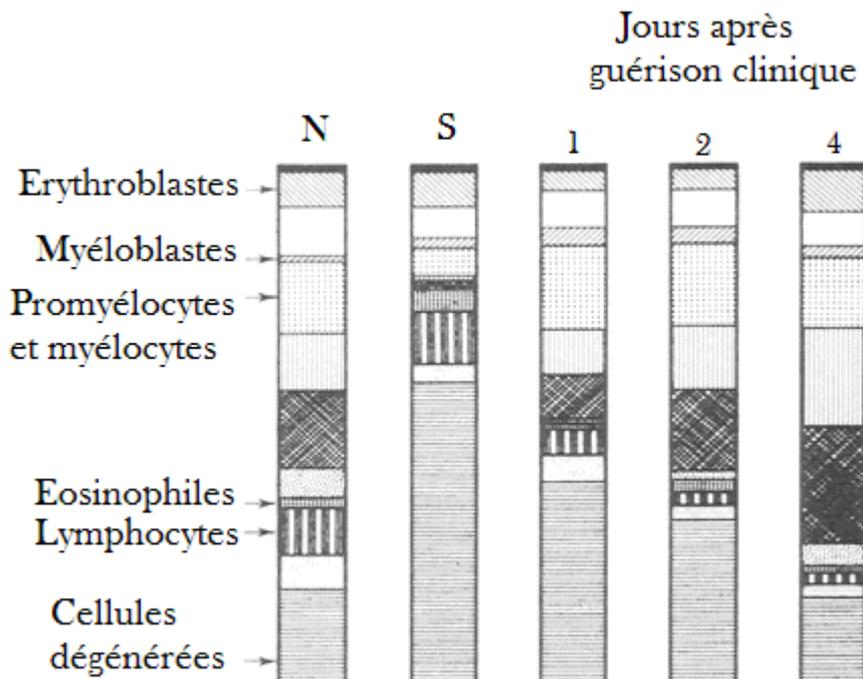


Figure 10 : Proportions des types cellulaires dans la moelle osseuse à divers stades de l'infection par le FPV, d'après (51)

N : Moelle osseuse normale

S : Moelle osseuse observée chez 31 chats infectés par le FPV

VI. DIAGNOSTIC

A. CLINIQUE

1. Diagnostic clinique et épidémiologique

Il s'agit généralement de chatons ou jeunes chats présentés chez le vétérinaire avec de l'hyperthermie, une déshydratation sévère, des vomissements accompagnés ou non de diarrhée ou dans un état grave avec des signes de choc endotoxémique (57).

Ce sont souvent des chatons provenant de collectivités et soumis à des situations stressantes, et plusieurs d'entre eux peuvent être atteints.

Il peut également s'agir de très jeunes chatons avec des signes d'ataxie, avec un ou plusieurs chatons de la portée atteints (77).

2. Diagnostic para-clinique

❖ Modifications hématologiques :

Une leucopénie est très souvent présente, causée principalement par une neutropénie (atteinte de la moelle osseuse) et par une lymphopénie (atteinte des tissus lymphoïdes). Le taux de leucocytes se situe entre 100 /mm³ et 7000 /mm³. Une anémie peut être présente lors d'atteinte sévère de la moelle osseuse (77, 57).

❖ Modifications biochimiques :

Les modifications des paramètres biochimiques sont généralement non spécifiques : on peut observer une augmentation de l'urée due à l'importante déshydratation, ainsi qu'une augmentation des paramètres hépatiques (Phosphatase Alcaline, ALanine AminoTransférase, bilirubine). L'hypoglycémie et l'hypokaliémie sont fréquentes (77).

❖ Radiographie/échographie abdominale :

On observe du gaz au sein des anses intestinales dont les parois semblent épaissies (77).

3. Diagnostic différentiel

❖ Concernant la diarrhée et les vomissements (77, 31, 54) :

- **Corps étrangers**, surtout les corps étrangers linéaires. Il convient de réaliser une radiographie et/ou une échographie.

- **Intussusception**, surtout chez les chatons, elle est observée à l'échographie.

Remarque : elle peut être la conséquence de l'hyperpéristaltisme de la diarrhée aiguë.

- **Entérite virale** à rotavirus ou coronavirus : ils sont peu pathogènes seuls mais peuvent aggraver les symptômes digestifs associés au FPV.

- **Diarrhée bactérienne** à Salmonella, Escherichia Coli (57), Campylobacter, Clostridium perfringens, ou diarrhée **parasitaire**. Ces deux types d'infection peuvent être associés à la panleucopénie et aggraver les symptômes. Un examen coprologique doit être entrepris pour exclure la diarrhée parasitaire.

- **Intoxications** par ingestion de produits irritants ou de poisons (surtout pour la forme suraigüe de la maladie).

- **Leucose féline (FeLV)** : des symptômes similaires à ceux de la panleucopénie peuvent être observés, un test diagnostique FeLV doit être systématiquement réalisé (57).

- **Insuffisance hépatique grave**

- **Néoplasie**

- **Ulcères gastriques ou duodénaux**

❖ Concernant l'atteinte du système immunitaire (54) :

- **Maladies à médiation immune**

- **Néoplasie**

B. EXPERIMENTAL

1. Diagnostic direct

❖ Tests utilisés aujourd'hui :

a) Tests utilisés en clinique vétérinaire

Ces tests sont indispensables dans la mesure où, même si ce ne sont pas les tests les plus sensibles et les plus spécifiques, ils permettent d'obtenir un résultat rapide en pratique et donc de réagir précocement face à un animal malade (traitement, isolation, information du propriétaire sur les risques...)

Cependant, ils ne donnent pas de diagnostic de certitude.

i. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

- ELISA « sandwich » (89, 4)

L'échantillon de fèces à tester est dilué dans un tampon. Dans le cas où l'antigène (Ag) du parvovirus est présent, il va se fixer sur un anticorps (Ac) anti-parvovirus, et ce complexe va à son tour accrocher un conjugué (Ac spécifique marqué par une peroxydase). Si l'apport du substrat de la peroxydase correspond à **une réaction colorée, le résultat est positif** (figure 11).

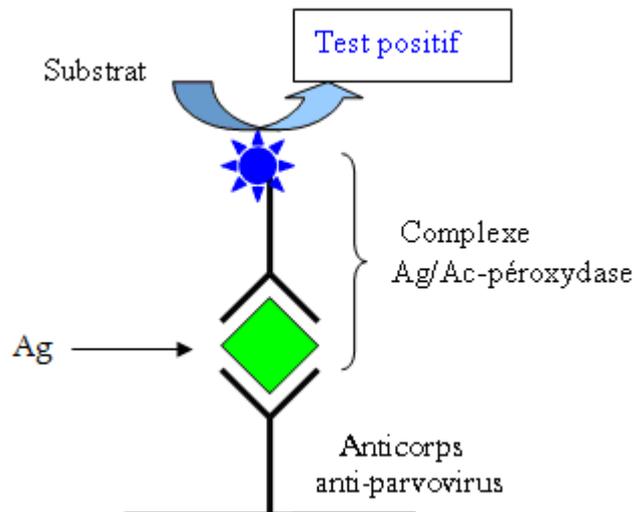


Figure 11 : Principe du test ELISA direct

- ELISA compétitif

L'échantillon de fèces est d'abord mélangé à une quantité suffisante de conjugué et incubé. S'il contient l'Ag viral, celui-ci se fixe au conjugué, et une fois le mélange déposé dans un puits contenant le parvovirus félin, le complexe Ag-conjugué ne s'y accroche pas et est éliminé avec la phase de lavage. Le dépôt du substrat de l'enzyme dans le puits ne révèle alors **aucune réaction colorée et le test est positif**.

- Sensibilité et spécificité

Ces tests possèdent une bonne sensibilité et une bonne spécificité supérieures à 95% (4), l'ELISA compétitif étant plus sensible et plus reproductible (89).

- Inconvénients

Le résultat du test ne peut être que positif ou négatif puisqu'il s'agit d'une méthode de diagnostic qualitative (89).

- Intérêt : kit disponible sur le marché

Cette technique peu onéreuse et facile à réaliser est à l'origine de la création de tests rapides de routine (4).

Le SNAP PARVO® (Idexx, Allemagne), est commercialisé en France pour le diagnostic de la parvovirose canine, mais peut être utilisé chez le chat. En effet, une étude réalisée par Neurerer *et al.* en 2008 (56) en Allemagne a montré son efficacité

dans la détection des antigènes (Ag) du parvovirus félin à partir de fèces de chats infectés.

Des essais ont cependant révélé qu'il pouvait aussi détecter les Ag du FPV provenant de l'administration chez le chat d'un vaccin vivant atténué une à deux semaines plus tôt (57).

Il doit être conservé de +2°C à +7°C.

ii. Immunofluorescence directe (IF)

Le principe est le même que celui décrit pour la technique ELISA, avec en plus la liaison du conjugué à une molécule fluorescente (89).

iii. Immunomigration rapide sur membrane

- Principe

Le prélèvement consiste en un échantillon de fèces (sur écouvillon), dilué dans une quantité de tampon d'extraction (précisée par le fabricant, souvent 1 mL). Le mélange est déposé sur une membrane pour être soumis à la migration.

Si l'Ag cherché est présent, il va se lier avec des anticorps (Ac) monoclonaux spécifiques marqués à l'or colloïdal. Sous l'effet du tampon, les complexes Ag-Ac migrent par capillarité et sont arrêtés par des Ac (monoclonaux ou polyclonaux) de capture fixés sur la membrane. Le résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée.

En l'absence d'Ag spécifiques, les conjugués (Ac-colloïde) s'accrochent sur la bande « témoin de migration » où sont fixés des Ag spécifiques, mais pas sur la bande « zone de lecture » : le test est négatif.

- Lecture du test

La lecture du test consiste en la visualisation de bandes colorées sur la fenêtre de lecture (figure 12) (56) :

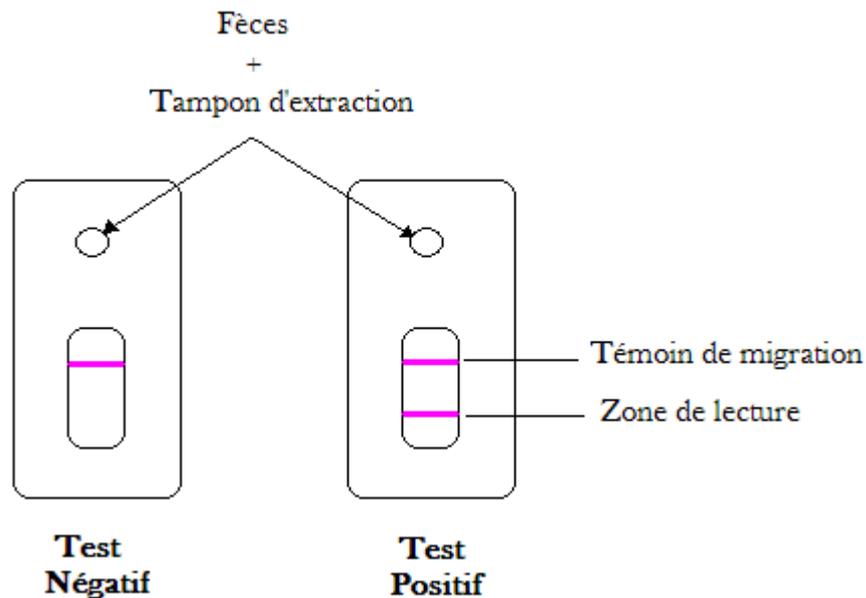


Figure 12 : Test d'immunochromatographie

La bande « témoin de migration » permet de mettre en évidence l'avancée du produit sur le support de migration et donc d'attester de la réussite du test.

La bande « zone de lecture » apparaît dans le cas d'un résultat positif.

- Inconvénients

Il n'existe pas de témoin négatif pour exclure l'hypothèse d'une contamination extérieure du test, ce qui peut compromettre la validité du test.

La présence d'anticorps (dans les fèces) se liant aux antigènes spécifiques peut altérer la sensibilité du test car ceux-ci deviennent inaccessibles aux Ac monoclonaux présents dans le support de migration (57).

- Intérêts

Les tests sont rapides et faciles d'utilisation pour le praticien (56).

- Kits disponibles sur le marché

Le WITNESS PARVO® (Synbiotics) et le SPEED PARVO® (Bio Veto Test) sont commercialisés en France pour le diagnostic de la parvovirose canine mais peuvent aussi être utilisés pour la détection des antigènes du FPV dans les fèces (56). Ils doivent être conservés à température ambiante.

iv. Comparaison des tests

L'étude de Neurer *et al.* (56) a permis de comparer cinq tests de diagnostic de routine utilisant la technique ELISA et la technique d'immunochromatographie (tableau IV).

Dans cette étude, 200 échantillons de fèces de chats sains et de chats présentant de la diarrhée sont testés et les résultats sont comparés à ceux de la microscopie électronique pour confirmation.

* *Remarque* : La sensibilité d'un test est la probabilité d'obtenir un résultat positif chez un animal infecté. La valeur prédictive positive ou VPP correspond au nombre de vrais positifs parmi les résultats positifs : elle prend en compte la sensibilité du test et la prévalence de la maladie.

De la même manière, la spécificité d'un test est la probabilité d'avoir un résultat négatif chez un animal sain, et la valeur prédictive négative ou VPN correspond à la probabilité qu'un résultat négatif le soit réellement.

	ELISA	Immunochromatographie			
	Snap Parvo®	Witness Parvo®	Speed Parvo®	SAS Parvo®	Fatest Parvo Strip®
VPP (%)	100	100	100	57,1	38,9
VPN (%)	97,9	97,4	97,4	98,9	98,4
Facilité d'utilisation	+++	+++	+++	-	++
Rapidité du test (mn)	8	5	5	10	5
Tests invalides (%)	0	0	0	0,5	0
Tests peu interprétables (%)	Faible	Faible	Faible	14	12

Tableau IV : Comparaison de 5 tests de diagnostic de routine pour la détection des antigènes du FPV dans les fèces de chat, d'après (56)

VPP : Valeur prédictive positive

VPN : Valeur prédictive négative

+++ : Très facile d'utilisation, notice simple, petit échantillon suffisant

++ : Facile d'utilisation, notice simple, mais grand volume d'échantillon nécessaire

- : Non utilisable en pratique car volume d'échantillon à prélever trop précis (30-50µl)

Le **Witness Parvo®** (Synbiotics, France), le **Speed Parvo®** (Bio Veto Test, France), et le **Snap Parvo®** (Idexx, Allemagne), sont les tests **les plus faciles d'utilisation** en pratique : ils présentent une notice d'instruction et une utilisation simples, le résultat est obtenu rapidement et la validité du test ne dépend pas de la quantité de fèces disponible, ce qui peut présenter un problème dans le cas de diarrhée très liquide ou d'absence de défécation.

Ils présentent également des valeurs prédictives négatives élevées, valeurs corrélées à la certitude qu'un chat est sain (pourcentage de vrais négatifs parmi les tests négatifs) et donc qu'il ne présente pas de risque d'excrétion et de contamination.

Le **SAS Parvo®** (SA Scientific, USA) et le **Fatest Parvo Strip®** (MegaCor, Australie) ont les valeurs prédictives négatives les plus élevées. Cependant, le SAS Parvo® ne peut être réalisé qu'en laboratoire par des personnes expérimentées (test invalide si quantité de l'échantillon > 50µL), et le Fatest Parvo Strip®, à l'inverse, nécessite pour être valide de grandes quantités de fèces. Ces deux tests, par ailleurs, ont présenté un nombre important de résultats peu interprétables (faible bande de contrôle par exemple).

b) Test de laboratoire : Polymerase Chain Reaction (PCR)

i. PCR conventionnelle

La PCR existe depuis 1980 : elle permet d'amplifier un fragment d'acide nucléique *in vitro* et d'obtenir de très grandes quantités de ce fragment (en théorie 2^n au bout de n cycles).

Les prélèvements réalisés en vue d'un diagnostic FPV peuvent être des échantillons de fèces (écouvillons) ou des échantillons de sang total (recommandé chez un animal sans diarrhée) (68).

L'extraction de l'ADN consiste en la lyse cellulaire et la digestion des protéines associées à l'ADN pour libérer l'acide nucléique. Des kits d'extraction sont utilisés aujourd'hui.

L'amplification par PCR repose sur la répétition de trois processus formant un cycle (figure 13) :

1. la **dénaturation** (destruction des liaisons hydrogènes) des deux brins d'ADN afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaïres, à température élevée (environ 95°C)

2. l'**hybridation** des amorces oligonucléotidiques complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (température d'hybridation entre 40°C et 65°C)

3. l'**élongation** (synthèse du brin complémentaire) par la Taq polymérase à partir des amorces (température de 72°C)

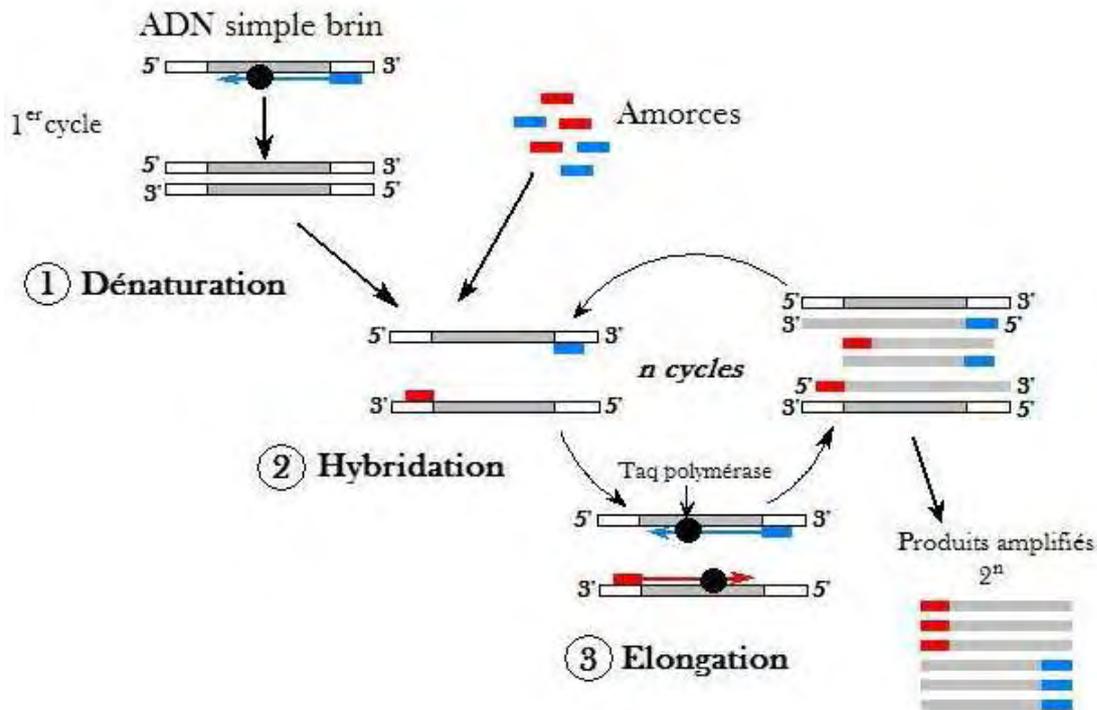


Figure 13 : Schéma d'amplification par PCR à partir d'un ADN monocaténaire, d'après (72)

La révélation des produits amplifiés (amplicons) se fait après électrophorèse sur gel d'agarose. La présence d'un marqueur de poids moléculaire ou d'un « ladder » permet d'évaluer la longueur (en paires de bases) de chaque amplicon.

La révélation se fait sous rayons Ultra Violet (UV) grâce à la présence de bromure d'éthidium contenu dans le tampon de migration et le gel d'agarose, et qui est capable, après s'être glissé entre les bases de l'ADN, d'absorber la lumière sous UV et d'émettre une fluorescence rose orangée.

PEREIRA *et al.* (61) ont recherché les souches différentes du CPV (CPV2, CPV2a, et CPV2b) présentes au Brésil en utilisant la méthode PCR conventionnelle et 3 couples d'amorces spécifiques du gène codant pour les protéines de capsid VP1 et VP2 (tableau V).

Ils ont utilisé un programme d'amplification de 30 cycles avec :

- une dénaturation initiale de 30 secondes à 94°C,
- une hybridation de 2 min à 55°C,
- une élongation de 2 min à 72°C.

Le nom des amorces utilisées dans cette étude, leurs séquences, la longueur du fragment amplifié et leur référence sont indiqués dans le tableau V :

PCR	Nom de l'amorce sens et anti-sens	Séquence de l'amorce sens et anti-sens (5' vers 3')	Longueur du fragment amplifié	Réf.
CPV2	P2s <i>P2as</i>	GAA GAG TGG TTG TAA ATA ATA <i>CCT ATA TCA CCA AAG TTA GTA G</i>	681 pb	61
CPV2a/ b	Pabs <i>Pabas</i>	GAA GAG TGG TTG TAA ATA ATT <i>CCT ATA TAA CCA AAG TTA GTA C</i>	681 pb	73
CPV2b	Pbs <i>Pbas</i>	CTT TAA CCT TCC TGT AAC AG <i>CAT AGT TAA ATT GGT TAT CTA C</i>	427 pb	61

Tableau V : Amorces utilisées pour l'étude de PEREIRA *et al.* (61)

pb : paires de bases

Réf. : référence

Nucléotides soulignés : indiquent une variation de séquence entre les souches de CPV.

Dans cette étude, 38 échantillons de fèces de chiens atteints de parvovirose ont été testés (confirmation de l'infection par HA, isolement sur culture cellulaire, microscopie électronique ou ELISA).

Une souche de FPV isolée à partir d'un vaccin vivant atténué commercialisé au Brésil et dont la séquence du génome ne diffère que de 2 nucléotides avec la séquence du CPV2 (figure 14) est utilisée pour vérifier la spécificité des tests, ainsi qu'une souche de parvovirus porcine et une souche de parvovirus humain.

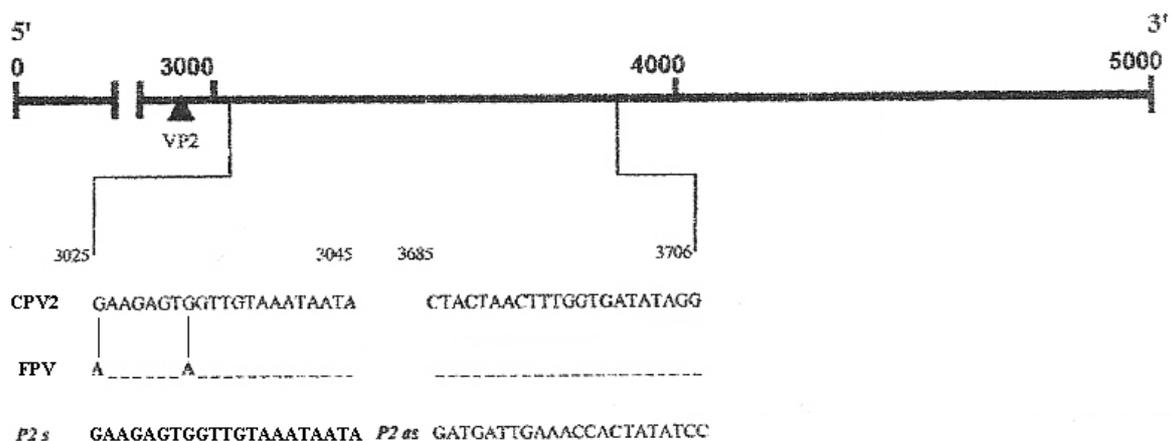


Figure 14 : Séquences nucléotidiques du CPV2, du FPV, et du couple d'amorces P2s/P2as, d'après (61)

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les amorces Pb et Pab sont très spécifiques puisque seuls les fragments attendus de 681 pb et de 427 pb sont révélés.

Le résultat de la PCR utilisant les amorces P2 montre un signal attendu à 681 pb dans le puits n°1 (CPV2) et aussi dans le puits n°5 (FPV) (figure 15).

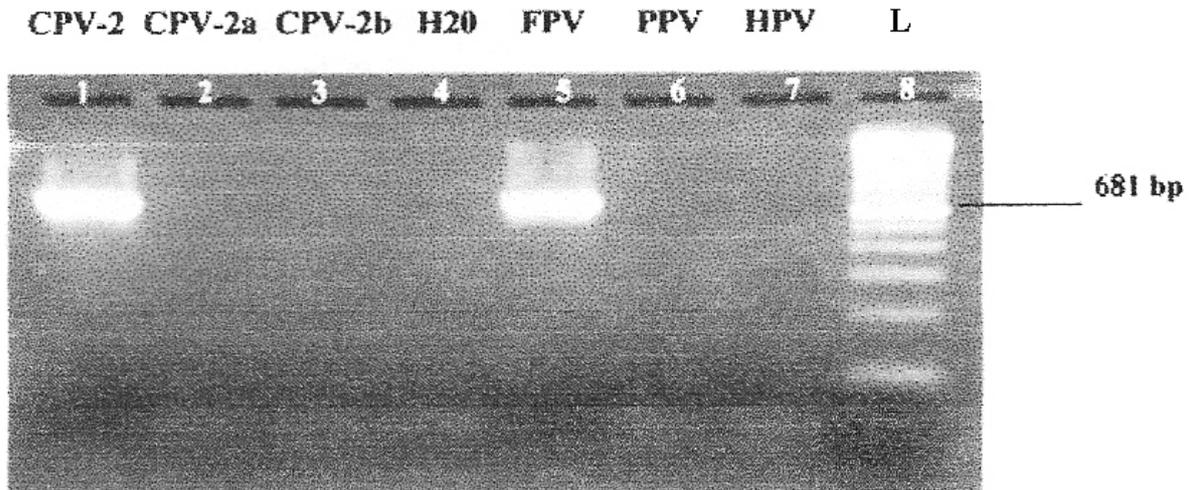


Figure 15 : Résultats de la PCR montrant la spécificité du couple d’amorces P2 pour le CPV2 et le FPV, d’après (61)

L : « Ladder » ou marqueur de poids moléculaire

H2O : témoin négatif

FPV, PPV (parvovirus du porc) et HPV (parvovirus humain) : souches utilisées pour tester la spécificité de la PCR CPV

Le couple d’amorces **P2s/P2as** est donc **capable d’amplifier l’ADN du FPV aussi bien que l’ADN du CPV2**, et nous l’avons utilisé pour la mise au point d’un test PCR de diagnostic de la panleucopénie féline dans la partie expérimentale de notre travail.

ii. PCR quantitative

La PCR quantitative ou PCR en temps réel est très spécifique, sensible et reproductible (17). Elle permet d’établir une relation entre la quantité de virus présents au départ dans l’échantillon et la quantité de produits amplifiés.

iii. PCR-RFLP

Couplé avec la méthode de PCR, la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP peut permettre de vérifier la spécificité d’un fragment amplifié en utilisant une enzyme de restriction connue qui va cliver l’amplicon en deux fragments de poids moléculaires attendus (89).

Les produits de restriction correspondent à des fragments de différentes longueurs car il existe un polymorphisme dans la séquence nucléotidique d'une molécule d'ADN par rapport à une autre (78).

Les produits sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un marqueur de poids moléculaire.

Les fragments sont visualisés après passage sous UV.

HORIUCHI *et al.* (33) ont utilisé la PCR-RFLP lors d'une étude visant à différencier une souche vaccinale de FPV (PLI IV) provenant d'un vaccin vivant atténué, d'une souche de FPV isolée sur le terrain au Japon.

iv. Caractéristiques du test PCR

- **Sensibilité et spécificité de la PCR :** le seuil de détection de la PCR conventionnelle est de 10^3 PFU/mL (Unité de Formation de Plaque/mL) de selles (68), et elle est 10 à 100 fois plus sensible que la microscopie électronique. La PCR en temps réel est encore plus sensible.

Le principe même de cette technique qui consiste en l'amplification des génomes lui confère une spécificité élevée.

- **Intérêts de la PCR :** elle est devenue une méthode de choix pour un diagnostic de certitude grâce à sa sensibilité et sa spécificité élevées et à sa réalisation rapide par rapport à la microscopie électronique.

c) Conclusion

Aujourd'hui et en pratique, il convient de réaliser un test rapide (ELISA et immunochromatographie) à l'aide des kits commercialisés afin de prendre au plus vite des mesures médicales et sanitaires, et de faire confirmer le diagnostic dans un laboratoire avec la méthode PCR.

❖ Tests moins utilisés de nos jours :

a) Hémagglutination

- Principe

Les propriétés d'hémagglutination (HA) du virus FPV sont utilisées, c'est-à-dire une HA optimale à 4°C et nécessitant un pH compris entre 5,6 et 6 (*cf. II. C. 2.*).

Elle est réalisée à partir de globules rouges de porc (60, 77). L'inconvénient des érythrocytes de porc est qu'ils doivent être conservés dans des conditions particulières : ils ont en effet tendance à s'agglutiner pour des pH inférieurs à 6,5 et à s'hémolyser s'ils sont conservés plus d'une semaine (89).

La méthode consiste à incuber pendant 4 heures à 4°C un mélange de la suspension de globules rouges de porc avec le surnageant de l'échantillon de fèces préalablement traité et centrifugé. Le test est réalisé par des dilutions en série de la solution virale initiale, et le résultat est exprimé en titre hémagglutinant (89).

- Sensibilité, spécificité, et valeur diagnostique

L'hémagglutination a une bonne sensibilité mais reste cependant moins sensible que la PCR, la microscopie électronique, les tests ELISA et d'immuno-migration rapide, principalement lors de faible contamination virale de l'échantillon. En effet, des anticorps fécaux peuvent lier les récepteurs des érythrocytes de porc (89).

La spécificité de l'HA est moyenne. Cette méthode possède cependant une bonne valeur prédictive négative et permet donc un diagnostic d'exclusion satisfaisant (89).

b) Microscopie électronique

Les prélèvements sont des échantillons de fèces ou d'intestins. La microscopie électronique repose sur l'observation de la taille et de la morphologie des particules virales de l'échantillon. Le parvovirus apparaît rond voire polygonal et souvent sous forme d'agrégats (9).

Cette technique est **assez fiable**. Cependant, elle dépend de la quantité de particules virales présentes dans l'échantillon (56) : de faux-négatifs peuvent apparaître si le titre viral est trop faible, si l'excrétion virale dans les fèces du malade est intermittente, si le prélèvement de fèces est réalisé trop tôt et que le virus n'est pas encore excrété. La fiabilité de la technique dépend également de l'intégrité des particules virales, car elles sédimentent avec les fèces lors de la centrifugation initiale si elles sont liées à des récepteurs cellulaires, neutralisées, ou agrégées par des anticorps fécaux (9). Elle présente néanmoins une bonne spécificité si elle est réalisée **par des experts**.

La microscopie électronique n'est pas utilisable en pratique, elle nécessite des équipements coûteux et doit être réalisée par du personnel expérimenté. Elle présente l'utilité supplémentaire de pouvoir éventuellement mettre en évidence la présence d'autres virus dans les échantillons (coronavirus, rotavirus). Cependant, elle est moins utilisée aujourd'hui car elle fait face à des méthodes plus rapides, automatisées (50).

c) Culture cellulaire

L'isolation du virus à partir de sang ou de fèces se fait sur culture cellulaire CRFK (Crandell Feline Kidney) ou Mya 1 (50).

L'étude de IKEDA *et al.* (38) a montré que la lignée cellulaire FL74 pouvait être utilisée pour obtenir des titres viraux élevés et pour les tests de séroneutralisation.

Cette technique d'isolation du virus est longue et n'est donc pas utilisée en dehors des études expérimentales (89).

d) Histologie

L'histologie est aujourd'hui abandonnée en tant que méthode diagnostique face au développement de techniques plus rapides et plus sensibles et spécifiques (9).

❖ Sensibilité et spécificité des tests directs :

La sensibilité de ces tests peut être affectée si les prélèvements sont réalisés à un moment où le virus n'est pas excrété dans les fèces.

La spécificité peut être affectée dans le cas où les prélèvements sont réalisés peu après une vaccination et qu'il existe une sécrétion d'Ag post-vaccinaux.

La méthode PCR reste la plus sensible et la plus spécifique des méthodes diagnostiques, la PCR en temps réel étant encore plus sensible que la PCR conventionnelle (89).

2. Diagnostic indirect : sérologie

La recherche d'anticorps spécifiques dans le sérum n'est pas vraiment utilisable pour un diagnostic de parvovirose chez le chat car nombreux sont ceux qui en possèdent déjà grâce à la vaccination ou suite à une infection inapparente, situation qui reste assez fréquente au sein de la population féline (56, 77).

❖ Séroneutralisation :

La séroneutralisation en culture de cellules consiste à mettre en contact une dose donnée de virus avec des dilutions de sérum à tester. Le mélange virus-sérum est ensuite dilué et déposé sur tapis cellulaire : dans les jours suivants, les cultures sont observées au microscope à la recherche d'un éventuel effet cytopathogène (ECP). Deux témoins (cellules sans virus ni sérum et cellules avec virus mais sans sérum) sont réalisés parallèlement (22).

On détermine la dernière solution de sérum qui protège les cellules de l'ECP.

L'infection des lignées cellulaires FL74 provoque un ECP rapide et important, ce qui en fait une lignée adaptée pour la réalisation des tests de neutralisation (38).

C'est une technique spécifique et sensible, mais la manipulation est délicate, longue et onéreuse.

Cependant, elle peut permettre d'évaluer la réaction immunitaire et donc l'efficacité des vaccins utilisés contre le FPV (38).

❖ Inhibition de l'hémagglutination (IHA) :

Le sérum du chat à tester est mélangé avec une quantité d'antigènes viraux connue, et après incubation on ajoute une suspension d'érythrocytes de porc, le tout de nouveau incubé. Le titre IHA est l'inverse de la dernière dilution du sérum qui permet l'inhibition complète de l'hémagglutination attendue (89).

L'IHA est moins sensible que la séroneutralisation, mais elle est utile lors de hauts titres en Ac anti-FPV. Un titre IHA inférieur à 1 :100 doit être interprété avec précaution (9).

VII. TRAITEMENT

Le traitement précoce et adapté ainsi que le nursing quotidien de l'animal sont des facteurs essentiels à la lutte contre les symptômes de la maladie.

A. TRAITEMENT SYMPTOMATIQUE

Il a pour but de corriger la déshydratation et limiter les signes cliniques dus à la diarrhée et aux vomissements.

1. Diète hydrique et réalimentation

Une diète hydrique de 24-48 heures est nécessaire afin de laisser l'appareil digestif au repos, et il est impératif de remplacer l'abreuvement par une réhydratation parentérale dans le cas de vomissements.

L'alimentation sera reprise très progressivement mais le plus tôt possible (arrêt des vomissements) grâce à une alimentation hyperdigestible et pauvre en graisses donnée en petites quantités et de façon fractionnée au cours de la journée (57).

Cependant, la reprise de l'alimentation est essentielle et il reste toujours préférable si le chat n'accepte pas cette alimentation de lui donner des aliments plus appétents.

Un supplément en vitamines peut être envisagé pour prévenir en particulier la carence en thiamine (vitamine B1), qui arrive néanmoins rarement (50).

Dans des cas sévères avec de l'anorexie prolongée, de la diarrhée et des vomissements très importants, il devient nécessaire de mettre en place une

alimentation parentérale totale ou partielle, préférentiellement grâce à un cathéter veineux central dans la veine jugulaire (50).

2. Fluidothérapie et équilibre hydro-électrolytique

La réhydratation est essentielle à la survie de l'animal, elle est établie en fonction de l'état de déshydratation lui-même évalué par la persistance du pli de peau, la sécheresse des muqueuses buccales, l'enfoncement des globes oculaires et le pouls (tableau VI) (54).

L'augmentation de l'hématocrite est également corrélée à la sévérité de la déshydratation (normes chez le chat 24% à 45%).

	Pourcentage de déshydratation		
	4%	6-8%	10-12%
Persistance pli cutané	+	++	+++
Enfoncement globe oculaire	-	++	Cornée sèche
Humidité muqueuses	Normales	Collantes	Sèches
Pouls	Normal	Peu frappé	Filant

Tableau VI : Pourcentage de déshydratation en fonction des signes cliniques, d'après (54)

La fluidothérapie peut être ajustée en fonction des désordres électrolytiques mis en évidence grâce au ionogramme ; ainsi, le soluté choisi, que ce soit du NaCl 0,9% ou du Ringer Lactate, pourra être complété en potassium et en glucose si besoin (57).

Le débit de perfusion comprend les besoins d'entretien chez un chat qui sont de 60 mL/kg/24h, auxquels il faut ajouter la déshydratation et les besoins dus aux pertes liquidiennes de la diarrhée et des vomissements. On considère en général une perte de 4 mL/kg pour les vomissements et de 12 mL/kg pour la diarrhée, et on utilise la formule suivante (54) :

$$\text{Volume à perfuser (mL/24h)} = (\text{Poids (kg)} \times \% \text{ déshydratation} \times 1000) + \text{besoins entretien} + \text{pertes en cours}$$

La fluidothérapie chez les nouveau-nés est délicate et peut être réalisée par voie intra osseuse. Les besoins sont bien plus élevés que chez l'adulte (80 à 120 mL/kg/jour), mais la fluidothérapie doit être lente (2-3 mL/heure) (77).

3. Antiémétiques

L'utilisation d'antiémétiques dans le cas de vomissements est importante dans la mesure où leur arrêt limite les pertes hydriques et permet le début d'une réalimentation progressive nécessaire au rétablissement de l'animal.

On peut utiliser les molécules suivantes (62) :

- **métoclopramide** (anti-vomitif central), IntraVeineuse (**IV**) à 0,02 mg/kg/h ou 1-2 mg/kg/j en perfusion ; IntraMusculaire (**IM**), Sous-Cutané (**SC**) et Per Os (**PO**) à 0,1 à 0,5 mg/kg trois fois par jour (**TID**) : PRIMPERID®Injectable, PRIMPERID®Comprimés.

- **bromure de prifinium** (anti-vomitif périphérique et anti-spasmodique), IV, IM et SC à 1 mg/kg/jour (soit 1 mL/7,5 kg), et PO à 5 mg/kg/jour (PRIFINIAL®Solution, PRIFINIAL®Comprimés chats et chiens nains). Néanmoins, l'action anti-diarrhéique (antispasmodique) de cette molécule n'est pas indiquée dans le cas d'une diarrhée virale exsudative.

4. Pansements digestifs et cytoprotecteurs

Les pansements digestifs sont souvent associés au traitement symptomatique, même si leur efficacité thérapeutique n'est pas prouvée. De plus, l'intérêt d'un pansement digestif donné par voie orale est limité en cas de vomissements et ne peut être administré qu'une fois l'arrêt de ceux-ci.

Les molécules suivantes peuvent être utilisées (62) :

- **kaolin-pectine** (KAOPECTATE®), 3 à 5 mL BID PO : adsorption des toxines bactériennes par le kaolin et protection de la muqueuse intestinale par la pectine.

- **smectite** (SMECTIVET®, 1 cuillère à café /10kg BID PO, SMECTA®, 1 sachet /12kg BID PO) : adsorption des toxines bactériennes, absorption des liquides et pansement.

- **hydroxyde d'aluminium** (PHOSPHALUVET®, 145 mg/kg TID) : lutte contre la douleur gastrique due à l'inflammation, souvent associé à un anti-sécrétoire.

- **sucralfate** (ULCAR®, 0,25-0,5 g TID PO, soit ¼ - ½ sachet TID d'ULCAR®Suspension buvable 1g) : effet cytoprotecteur.

5. Transfusion

Dans des cas sévères avec hypoprotéïnémie persistante, il convient de mettre en œuvre une transfusion de plasma ou de sang total afin de restaurer la pression oncotique. La transfusion de plasma et donc l'apport de facteurs de la coagulation

(dont l'anti-thrombine III) combinée à un traitement à base d'héparine, permet de lutter contre l'apparition d'une CIVD (50).

B. PREVENTION DES COMPLICATIONS

1. Antibiothérapie

L'antibiothérapie est indiquée dans la prévention des complications bactériennes lors de l'infection par le FPV (13). En effet, elle permet de limiter le passage des bactéries à travers la muqueuse intestinale lésée (89, 50).

Parmi les nombreuses molécules antibiotiques disponibles, certaines sont plus adaptées à l'espèce féline et à la clinique (déshydratation et risque d'insuffisance rénale) accompagnant l'infection par le FPV. On choisit en général des antibiotiques à spectre large, efficaces contre les bactéries gram- et les bactéries anaérobies (50). Ils doivent être préférentiellement administrés par voie intraveineuse.

Les molécules suivantes peuvent être utilisées (50, 13) :

- les pénicillines A : **amoxicilline** seule, 10 mg/kg deux fois par jour (**BID**) IV, IM, ou PO (AMOXIVAL®félin, VETRIMOXIN®, CLAMOXYL®), ou associée à l'**acide clavulanique** à 12,5 mg/kg BID IV, IM ou PO (SYNULOX®)

- les céphalosporines : **céfalexine**, 15 mg/kg IV, IM ou PO (RILEXINE®, THERIOS®, CEFASEPTIN®)

- les aminosides : la **gentamicine**, indiquée dans les septicémies d'origine intestinale lors de lésions sévères de la muqueuse (13), mais dont la néphrotoxicité élevée n'en fait pas un antibiotique de première intention. Son utilisation doit impérativement être accompagnée d'une fluidothérapie adaptée. Elle s'utilise à la posologie de 2-4 mg/kg BID IV, IM ou SC (GENTACAT®).

2. Anti-sécrétoires gastriques

L'apparition possible d'ulcères gastro-intestinaux, qui peuvent être la conséquence de vomissements profus (23), et la gastrite associée à une hyperacidité de l'estomac, peuvent motiver l'administration d'anti-sécrétoires. On peut utiliser (13):

- la **cimétidine** (TAGAMET®Injectable, TAGAMET®Comprimés 200 mg), IV à 10 mg/kg quatre fois par jour (**QID**), soit à 0,1 mL/kg trois à quatre fois par jour (**TID-QID**) ou SC, IM, PO à 5-10 mg/kg TID-QID (soit ¼- ½ comprimé/10kg)

- la **ranitidine** (AZANTAC®Injectable, AZANTAC®Comprimés 75 mg), IV, SC et PO à 0,5 mg/kg BID (soit en injectable 1 mL/15-25kg BID, et par voie orale 1 comprimé/40kg BID)

C. TRAITEMENT ETIOLOGIQUE

L'efficacité thérapeutique d'un sérum anti-CPV a été démontrée chez le chien (50, 89), et on peut espérer avoir des effets bénéfiques similaires chez le chat. On l'utilise surtout pour prévenir l'infection suite à l'exposition de chats non immuns à un animal ou à des locaux contaminés.

Il peut être administré par voie sous-cutanée ou intra péritonéale, et protège en général entre 2 à 4 semaines (28).

D. TRAITEMENT ANTIVIRAL, l'interféron ω

L'efficacité de l'interféron ω dans le traitement de la parvovirose chez le chien a été prouvée (18, 51) : il permet une amélioration des signes cliniques et une réduction évidente de la mortalité chez les chiens traités. L'interféron ω détruit l'ARNm des cellules infectées et inactive les protéines nécessaires à la traduction inhibant ainsi la réplication virale au sein de la cellule (62).

PALTRINIERI *et al.* (58) ont réalisé une étude en administrant l'interféron ω (rFeIFN) à la dose de 1MU/kg une fois par jour pendant 3 jours, à 23 chatons infectés expérimentalement par le FPV quelques jours auparavant. En réalisant une comparaison avec 17 chats infectés mais non traités, ils se sont rendu compte que l'interféron ω n'a pas d'influence sur l'intensité des signes cliniques, ni sur l'intensité des lésions observées post-mortem (sur la moelle osseuse et les organes lymphoïdes), ni sur le taux de survie.

Néanmoins, ils notent une influence de l'interféron ω sur le développement de l'inflammation et de la réponse immunitaire. En effet, les chats survivants ont été vaccinés, et on observe des taux significativement plus élevés de γ globuline, d'IgG et d'IgG spécifiques (anti-FPV) chez les chats traités il y a un mois avec l'interféron ω par rapport aux non traités.

Ils préconisent donc d'administrer l'interféron ω aux chattes gestantes pour améliorer l'immunité maternelle passive transmise aux chatons, et à ceux-ci avant l'introduction dans un environnement potentiellement contaminé (58, 71).

VIII. PREVENTION

A. PROPHYLAXIE SANITAIRE

1. Mesures d'hygiène

Etant donné l'extrême contagiosité et la gravité de la maladie, un chaton présentant des signes cliniques de panleucopénie doit être isolé en attendant les résultats diagnostiques du laboratoire, que ce soit dans une clinique vétérinaire ou une collectivité (chatteries, élevages, refuges..).

Les personnes entrant en contact avec le malade doivent être munies de surchaussures, de gants et blouses à usage unique (57).

Le matériel utilisé doit être désinfecté après chaque utilisation (Javel dilution 1/30^e), ainsi que les locaux une fois l'animal guéri.

2. Cas particuliers des refuges

Ce sont des lieux où l'origine et le statut vaccinal des populations de chats accueillis sont inconnus, et le risque d'infection par des maladies contagieuses comme la panleucopénie y est élevé. La mise en quarantaine pendant 6 jours (durée moyenne d'incubation de la maladie) d'un animal nouvellement introduit doit être systématiquement réalisée.

3. Précautions avant la vaccination

Malgré les mesures d'hygiène et d'isolement mis en place, il existe tout de même des cas de panleucopénie dans les collectivités, et il convient de prendre des précautions concernant les chatons avant qu'ils n'aient acquis une protection vaccinale solide. Il faut éviter de les mettre en contact avec l'extérieur (foires, expositions) (89).

B. PROPHYLAXIE MEDICALE

Jusque dans les années 1970, la prophylaxie était réalisée avec l'immunisation active par des vaccins préparés avec des broyats d'organes virulents (rate et foie), et inactivés par le formol. Cette vaccination a protégé efficacement les jeunes chats contre l'infection (20).

Par la suite, les travaux d'isolement et de propagation du virus *in vitro* ont permis de mettre au point d'une part des vaccins à virus inactivés, d'autre part des vaccins à virus vivants modifiés (48), largement utilisés aujourd'hui.

1. Immunité passive et vaccination

❖ Transmission de l'immunité maternelle :

L'immunité passive est transmise en grande majorité par le colostrum. L'absorption est importante jusqu'à la 8^{ème} heure après la naissance. En effet, les propriétés des cellules intestinales du chaton sont modifiées après la 8^{ème} heure et elles ne peuvent plus absorber et transporter les anticorps (71).

L'absorption d'une quantité suffisante de colostrum est essentielle pour que le taux d'anticorps neutralisants maternels soit protecteur. Il doit être pris rapidement, car le taux d'immunoglobulines G (IgG) est élevé mais décroît rapidement après la parturition (figure 16).

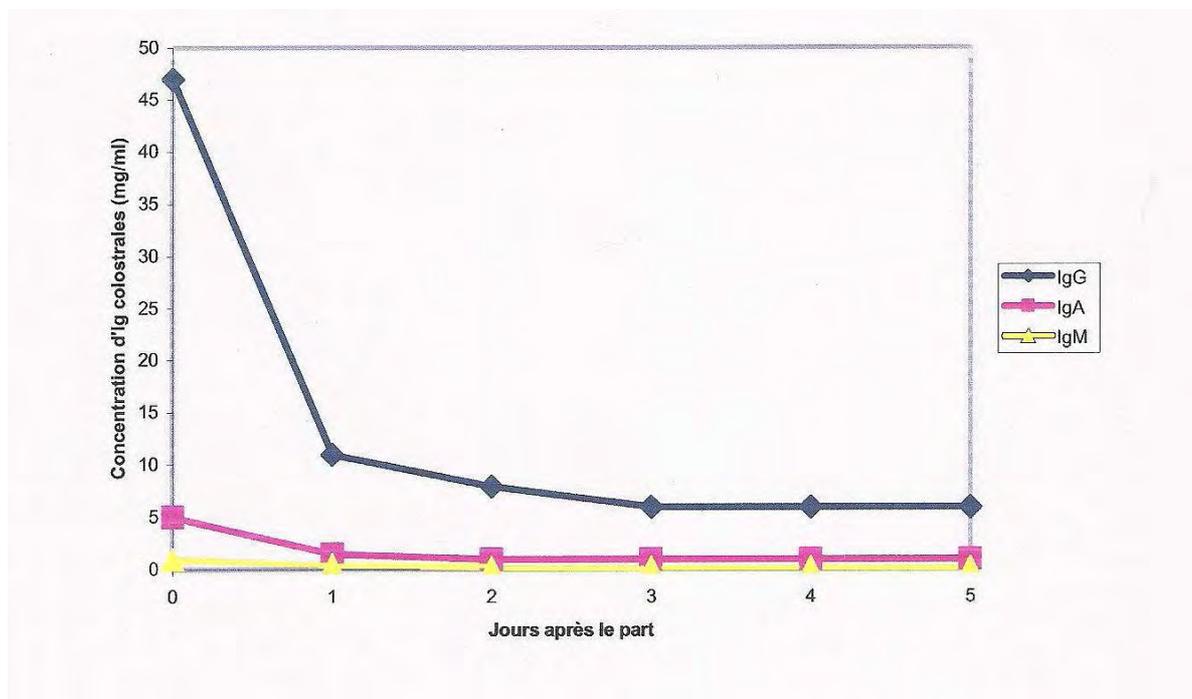


Figure 16 : Taux d'Ig colostrales les premiers jours après la parturition,
d'après (71) ; Ig : immunoglobuline

Le passage des IgG maternels vers le fœtus ne se fait que lors du dernier tiers de gestation, et ne représente que 10% de l'immunité d'origine maternelle (50). La prise de colostrum est donc une étape très importante pour protéger le chaton.

❖ Durée et efficacité de la protection :

Les anticorps maternels ont une demi-vie d'environ 10 jours (50, 71).

Tous les chatons d'une même portée ne bénéficient pas de la même protection, cela dépend du moment et de la quantité de colostrum absorbée (26). Les chatons qui ne reçoivent pas de colostrum sont sensibles à l'infection par le FPV dès la naissance,

ceux qui reçoivent un taux bas d'anticorps sont sensibles à l'infection dès 4 à 8 semaines, et ceux recevant un taux d'anticorps suffisant sont sensibles dès 12 à 16 semaines (26, 71).

D'une manière générale, la plupart des chatons ont un titre en anticorps maternels protecteur (titre IHA de 80) jusqu'à l'âge de 6 à 8 semaines (50).

Les titres en anticorps maternels chez le chaton diminuent durant les premières semaines de vie, et il existe une période critique entre la 8^{ème} et la 12^{ème} semaine, pendant laquelle le taux d'anticorps est trop bas pour protéger efficacement le chaton, mais assez élevé pour interférer avec la vaccination (figure 17) (79, 26).

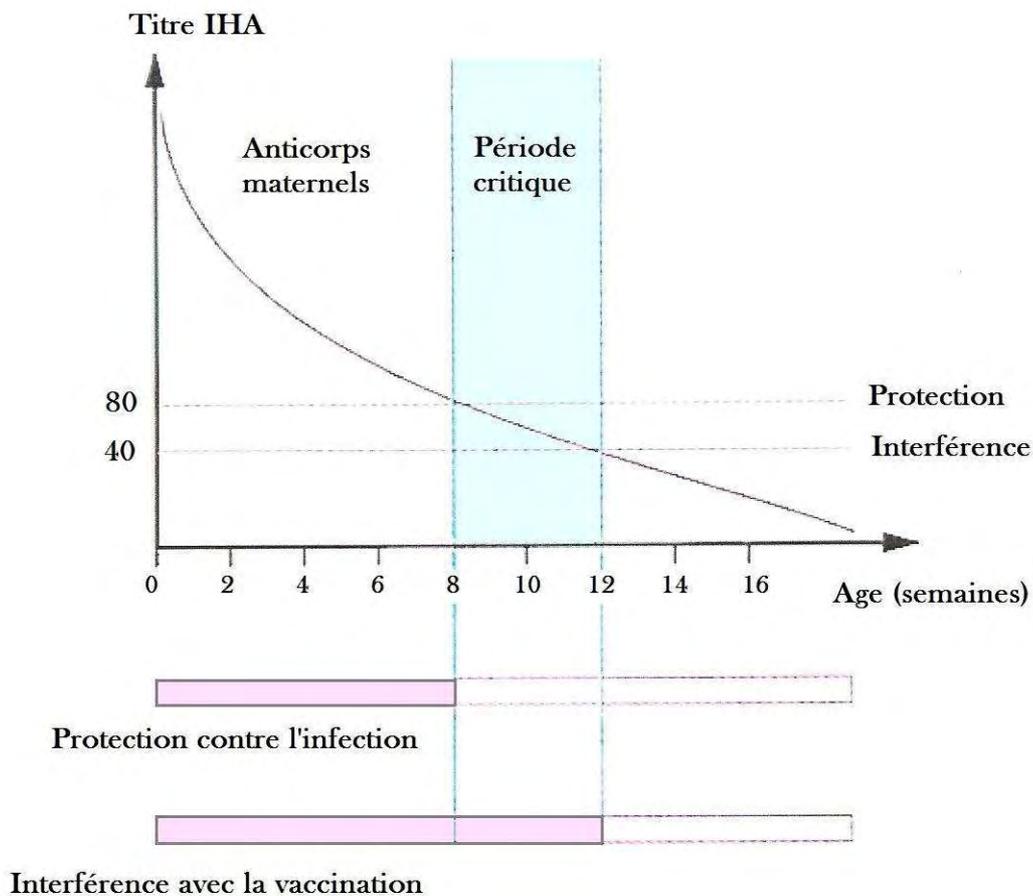


Figure 17 : Evolution de l'immunité passive et interférence avec la vaccination,
d'après (79)

Titre IHA : titre en anticorps inhibant l'hémagglutination

La vaccination ne peut être totalement efficace qu'à partir de l'âge de 12 semaines (50, 16).

❖ Immunité passive et sérum anti-FPV:

Un sérum anti-FPV peut être utilisé chez des chatons pour essayer d'obtenir une immunité passive, dans le cadre de situations à risque (chatons n'ayant pas reçu de colostrum) et en attendant de pouvoir commencer un protocole vaccinal à l'origine d'une immunité active (50).

Le sérum anti-FPV peut également être utilisé chez les adultes non immuns pour les protéger dans une situation à risque. Il faut cependant savoir que comme les immunoglobulines se fixent aux épitopes antigéniques du FPV, la prochaine vaccination ne doit pas être réalisée dans les trois semaines suivant l'administration du sérum (50).

2. Types de vaccins

Il existe deux grands types de vaccins utilisés en pratique contre la panleucopénie féline qui sont les vaccins vivants atténués et les vaccins inactivés avec adjuvant, administrés généralement en sous-cutané (tableau VII) (26).

Les vaccins vivants sont atténués ou altérés afin de réduire leur virulence. L'atténuation peut être réalisée de plusieurs façons différentes, incluant la méthode de passages sur culture cellulaire en séries dans un laboratoire ou par manipulation génétique (26).

Dans les vaccins tués, l'agent a été inactivé chimiquement. Ils contiennent des adjuvants pour augmenter leur pouvoir immunogène (26).

Fabricant	Nom du vaccin	Valence	Type
Merial	Eurifel P	FPV	Vivant atténué
	Eurifel RCPFeLV	FPV, FHV, FCV, FeLV	Vivant atténué
Virbac	Feligen RCP	FPV, FHV, FCV	Vivant atténué
Pfizer	Felocell CVR	FPV, FHV, FCV	Vivant atténué
Fort Dodge	Fevaxyn iCHPChlam	FPV, FHV, FCV, Chlamydia	Inactivé avec adjuvant
	Fevaxyn Pentofel	FPV, FHV, FCV, FeLV, Chlamydia	Inactivé avec adjuvant
	Katavac CHP	FPV, FHV, FCV	Vivant atténué
	Katavac Eclipse	FPV, FHV, FCV, FeLV	Vivant atténué
Intervet UK Ltd	Nobivac Tricat	FPV, FHV, FCV	Vivant atténué
Schering-Plough	Quantum Cat CVRP	FPV, FHV, FCV	Vivant atténué

Tableau VII : Exemples de vaccins existant aujourd’hui contre la panleucopénie féline, d’après (26)

FPV : parvovirus félin ; **FHV** : herpesvirus félin ; **FCV** : calicivirus félin

Les vaccins couramment utilisés contre la panleucopénie féline sont pour la plupart des vaccins plurivalents : ils protègent également contre le calicivirus (FCV) et contre l’herpèsvirus de type 1 (FHV1), deux agents pathogènes du « coryza » du chat. D’autres valences comme celle de la leucose féline (FeLV) ou Chlamydia (bactérie pouvant être présente dans le « coryza » du chat) peuvent être ajoutées (26, 57).

3. Efficacité comparée des vaccins

Les vaccins vivants et les vaccins atténués sont utilisables dans les protocoles de vaccination et entraînent une protection solide contre la panleucopénie.

L’immunité active induite par les vaccins vivants atténués protège un peu plus vite que celle induite par les vaccins inactivés (28).

Cependant une dose unique d’un vaccin inactivé donne rapidement une très bonne protection, et aucune réelle différence d’efficacité entre les deux types de vaccin n’a encore été observée (50).

Il n'y a donc pas de raison de préférer un type de vaccin par rapport à l'autre dans la plupart des situations. En pratique, le vaccin vivant atténué est plus souvent utilisé, du fait de la protection rapide qu'il induit et de sa meilleure résistance aux Ac maternels (50).

Cependant, il ne doit pas être utilisé dans certaines conditions, comme chez les **femelles gestantes**, car il existe un risque de transmission du virus au fœtus et donc un risque de dommages lors du développement du cervelet. Il ne doit pas être utilisé non plus chez les **chatons de moins de 4 semaines** pour la même raison, le cervelet étant toujours en développement chez les nouveau-nés (63).

4. Protocole de vaccination

❖ Protocole de départ :

La période critique chez les chatons ne peut être déterminée avec certitude et il existe des différences individuelles.

Il n'existe pas de protocole de vaccination qui protège efficacement tous les cas de figures existant ; certaines règles doivent être respectées pour protéger au maximum les chatons (50) :

- tous les chatons doivent être vaccinés
- deux doses vaccinales doivent être au minimum administrées, l'une à 8-9 semaines d'âge, la seconde 3-4 semaines plus tard (au minimum à 12 semaines d'âge) (26)
- un programme de vaccination précoce est recommandé pour les chatons n'ayant pas reçu de colostrum à la naissance ou pour ceux issus d'une mère non vaccinée, et préconise une primo-vaccination avec vaccin inactivé dès leur troisième semaine de vie, et ce toutes les 3 à 4 semaines jusqu'à l'âge de 12 semaines (50, 71). Cependant, l'autorisation de mise sur le marché des vaccins ne prend pas en compte cette situation ; le vétérinaire fera donc un choix en informant le propriétaire et en évaluant les bénéfices de cette vaccination par rapport aux risques de la situation (26).
- les chats de chatteries, animaleries ou de refuges peuvent recevoir une injection vaccinale supplémentaire à 16-20 semaines, étant donné que ces lieux de collectivité sont des milieux à risque (16)
- les chats adultes dont le statut vaccinal est inconnu doivent recevoir une primo-injection de vaccin vivant atténué et un rappel est nécessaire un an après.

Etant donné la gravité de la maladie et l'extrême résistance du virus, tous les chats doivent être vaccinés contre le FPV pour être protégés. En effet, le virus peut même infecter des chats qui ne sortent pas en étant transporté par les objets ou chaussures des propriétaires (63).

❖ Rappels de vaccination :

La vaccination actuelle contre le FPV protège les chats pendant une durée de 7 ans et plus (69). Cependant, le protocole général de vaccination prévoit certaines recommandations (50) :

- un rappel de vaccination doit être effectué un an après la primo-vaccination, afin de s'assurer d'une bonne stimulation du système immunitaire, étant donné les incertitudes existant sur l'efficacité du premier vaccin.

- les rappels se font ensuite tous les trois ans ou plus selon l'appréciation du vétérinaire, et la question sur la réalisation de tests sérologiques pour adapter le protocole vaccinal peut être étudiée (34).

❖ Vaccins FPV et infection par le CPV :

Les vaccins vivants et les vaccins inactivés utilisés actuellement contre le FPV semblent protéger les chats contre l'infection par le CPV2b (24). D'après NAKAMURA *et al* (55), il existe une réaction croisée entre les anticorps neutralisants produits chez des chats infectés expérimentalement par des souches de FPV ou vaccinés avec un vaccin inactivé contre le FPV et les virus CPV2a, 2b, et 2c.

Des études supplémentaires sur ce sujet sont néanmoins nécessaires, afin de déterminer si les vaccins couramment utilisés aujourd'hui contre le FPV sont suffisamment protecteurs contre l'infection par les parvovirus canins.

5. Vaccination d'animaux immunodéprimés

Le système immunitaire des animaux immunodéprimés ne peut pas répondre correctement à la vaccination et protéger efficacement l'animal.

Certaines conditions peuvent compromettre la réponse vaccinale chez des individus en sous-nutrition, stressés, génétiquement immunodéficients, traités avec des immunosuppresseurs, ou atteints d'une maladie systémique (50).

❖ Chats sous corticoïdes :

Il semble que le traitement à base de corticoïdes, à forte dose et de longue durée surtout, peut engendrer une défaillance du système immunitaire, notamment concernant la réponse immunitaire cellulaire.

Il est conseillé d'éviter de traiter l'animal avec des corticoïdes pendant la période de vaccination (50).

❖ Chats présentant une maladie chronique :

Les fabricants de vaccins précisent que les vaccins ne doivent être administrés que chez des individus en bonne santé. Néanmoins, les chats présentant une pathologie chronique stable, comme une insuffisance rénale chronique, un diabète ou une hyperthyroïdie, doivent être vaccinés à la même fréquence qu'un animal sain.

Il est par contre déconseillé de vacciner des animaux débilités ou présentant une pathologie aiguë et de la fièvre (50).

❖ Chats infectés par un rétrovirus :

Les chats infectés par le FeLV doivent être isolés pour éviter qu'ils transmettent leur maladie mais aussi pour éviter la rencontre avec d'autres agents pathogènes. Ces chats doivent être vaccinés, avec un vaccin inactivé de préférence, même si la certitude de l'efficacité de la réponse immunitaire n'est pas établie (50).

Les chats infectés par le FIV sont capables de produire une réponse immunitaire à la vaccination sauf dans le dernier stade de l'infection. Cependant, des études ont montré que la réponse immunitaire suite à l'administration d'antigènes entraîne une multiplication accrue du virus FIV et une diminution de certaines cellules de défense (diminution du ratio CD4+/CD8+) (50). De plus, il a également été démontré qu'il existait une panleucopénie induite par la vaccination avec un vaccin vivant FPV chez les chats FIV positifs (6).

Il n'est donc pas recommandé de vacciner les chats infectés par le FIV, sauf en cas de risque très élevé d'infection par le FPV, et seulement avec un vaccin inactivé (50).

6. Echecs de la vaccination (26)

❖ Réactions défavorables :

- **Erreur de l'opérateur :** il peut s'agir d'une erreur lors de l'administration du vaccin.

- **Vaccin :** il est possible que des souches vaccinales aient été incorrectement atténuées ou inactivées.

- **Facteurs externes :** l'animal est trop jeune, ou immunodéprimé, ou en incubation d'une maladie lors de l'injection vaccinale.

❖ Efficacité diminuée :

- **Erreur de l'opérateur :** il peut s'agir là encore d'une erreur d'administration ou de stockage du vaccin.

- **Vaccin :** il peut survenir certaines erreurs dans la chaîne de fabrication malgré des contrôles de qualité rigoureux.

- **Réponse inappropriée :** on peut observer des effets secondaires comme un abattement ou une fièvre transitoires. Certains excipients et adjuvants (surtout ceux à base d'aluminium) peuvent provoquer des réactions inflammatoires inappropriées au site d'injection.

- **Facteurs externes :** il s'agit des différences biologiques individuelles, de l'interférence des anticorps maternels avec la vaccination, de l'état du système immunitaire de l'animal (immunosuppression, maladie intercurrente), du portage chronique de la maladie associé à des signes cliniques persistants.

7. Conclusion

La panleucopénie féline est devenue rare de nos jours grâce à la mise en place de programmes de vaccination à l'aide de vaccins très efficaces. Cependant, il faut rappeler aux propriétaires de chats à quel point cette maladie est contagieuse et dangereuse, car la tendance à ne plus les vacciner ou à les vacciner irrégulièrement dès qu'ils ont un certain âge entraîne la réapparition de foyers d'infection dans les populations félines (77).

IX. LEGISLATION

Selon l'article 285.1 du Code Rural, et d'après la loi du 22 juin 1989, la leucopénie infectieuse ou panleucopénie fait partie de la liste des vices rédhibitoires pour l'espèce féline (74).

A. SUSPICION CLINIQUE

Le délai de suspicion clinique pour la panleucopénie est de cinq jours à compter de la livraison de l'animal. Un certificat de suspicion doit être rédigé par le vétérinaire, sans quoi aucune action en garantie ne pourra être effectuée par le propriétaire.

Ce certificat doit présenter les informations suivantes : identification du vétérinaire, date et lieu de rédaction, identification précise de l'animal (nom, espèce, race, date de naissance, numéro d'identification électronique ou numéro de tatouage), coordonnées du propriétaire, date d'acquisition et/ou date de livraison de

l'animal, les critères du diagnostic de suspicion et la ou les hypothèses diagnostiques associées, et enfin la signature du vétérinaire (74).

Le délai de cinq jours est basé sur la rapidité de la période d'incubation (entre deux et dix jours (20)). L'apparition rapide et la gravité des symptômes permettent au propriétaire de consulter un vétérinaire dans un délai bref. Le vendeur est également protégé contre une plainte abusive en cas de contamination après la livraison.

B. LES CRITERES DU DIAGNOSTIC DE SUSPICION

Les critères de suspicion sont fixés par l'arrêté du 2 août 1990 (version consolidée au 21 septembre 2000) (29), il s'agit de symptômes cliniques et/ou biologiques révélés par la pathogénie de la panleucopénie :

- Prostration
- Anorexie
- Gastro-entérite avec déshydratation
- Leucopénie

Le vétérinaire reste libre de prendre en compte d'autres critères, s'ils sont fondés, comme par exemple l'âge de l'animal (de 2 mois à 1 an), la rapidité d'évolution, une forte hyperthermie (supérieure à 40°C)...

Les prélèvements sont également fixés par l'arrêté du 2 août 1990 fixant les critères d'établissement d'un diagnostic de suspicion pour les maladies du chien et du chat visées à l'article 285-1 du code rural (29) :

« A chaque fois qu'un examen de laboratoire peut confirmer la suspicion clinique, le vétérinaire ou docteur vétérinaire doit effectuer, identifier et conserver dans les meilleures conditions tous les prélèvements nécessaires en vue de pratiquer ou faire pratiquer les examens complémentaires adaptés.

Il en va de même en cas de mort de l'animal dans les délais de garantie. »

Ces prélèvements demeurent les seuls éléments de conclusion en cas de décès de l'animal avant l'intervention de l'expert. Ils doivent être identifiés, datés, et conservés à la bonne température en vue d'une utilisation ultérieure.

Concernant la panleucopénie, il est judicieux aujourd'hui de garder des échantillons sanguins et de fèces, ou tout autre organe infecté par le FPV en cas de décès de l'animal (intestins, rate, ganglions lymphatiques) qui pourront être testés par PCR ultérieurement, afin d'obtenir un diagnostic de certitude très sensible et spécifique.

C. PROCEDURE DE REDHIBITION

Dans le cas où le certificat de suspicion est rédigé par le vétérinaire dans les 5 jours à compter de la date de transaction, il s'en suit un délai de rédhibition de 30 jours (article 281.1 du Code Rural) à partir de cette même date. Durant ce délai le propriétaire peut déposer une requête gratuite auprès du tribunal d'instance rattaché au domicile de l'animal et ainsi engager un expert. Après l'établissement d'un rapport d'expertise, il s'en suit soit un accord amiable entre l'acheteur et le vendeur (reprise de l'animal, remboursement partiel...), soit un dépôt d'assignation par l'acheteur au tribunal d'instance rattaché au domicile du vendeur (74).

La panleucopénie féline reste une maladie importante tant par sa contagiosité que par sa mortalité élevées. Cela justifie son maintien dans la liste des vices rédhibitoires de l'espèce féline, même si la protection vaccinale a diminué très significativement l'incidence de cette maladie.

Partie Expérimentale

I. INTRODUCTION

Le diagnostic moléculaire par PCR est aujourd'hui largement plus utilisé que la microscopie électronique, méthode assez sensible et spécifique lorsqu'elle est réalisée par des experts, mais qui demande beaucoup de temps et du matériel coûteux.

La méthode PCR, même si elle nécessite du matériel perfectionné, est très sensible et spécifique, et s'est fortement développée ces dernières années. Elle a gagné en rapidité, surtout grâce à l'automatisation des manipulations.

L'objectif de ce travail est de mettre au point un test PCR de détection du parvovirus félin (PCR-PLI) dans les selles de chats suspects de panleucopénie, et ainsi de mettre à disposition des vétérinaires patriciens un test de laboratoire de certitude rapide et efficace.

Pour cela, nous nous sommes basés sur l'étude de PEREIRA *et al.* (61) décrivant des amorces capables de s'hybrider au gène de la protéine de capsid VP2 du parvovirus canin CPV2, mais également du FPV.

La mise au point de la technique a d'abord été effectuée sur une souche vaccinale, puis sur des fèces de chats suspects de panleucopénie.

En parallèle a été réalisée la mise au point d'une PCR ayant pour cible le gène GAPDH et le gène HPRT afin d'obtenir un contrôle interne d'extraction et d'absence d'inhibiteur de PCR pour chacun des échantillons testés.

L'objectif final est l'obtention d'un test permettant en une seule PCR de visualiser l'éventuel signal du FPV et celui du contrôle interne (PCR duplex). La difficulté réside dans la détermination de conditions communes (concentration en MgCl₂ et température d'hybridation des amorces) permettant l'amplification des deux séquences : ADN du FPV et ADN du gène contrôle interne.

II. MATERIEL

A. ANIMAUX

Quatorze échantillons de fèces provenant de chats suspects de panleucopénie ont été recueillis afin de réaliser cette étude expérimentale. La majorité des échantillons ont été prélevés par des vétérinaires et envoyés au LVD69 (Laboratoire vétérinaire départemental du Rhône) en vue d'un diagnostic PCR, quelques-uns des échantillons ont été récoltés sur des chats suspects suite à une consultation dans les cliniques de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL).

Les commémoratifs, c'est-à-dire l'âge de l'animal, son sexe, sa race, son historique vaccinal, ainsi que l'anamnèse, ont été en partie recueillis (annexe 1).

B. SOUCHES VACCINALES

Deux vaccins ont servi à la mise au point de la technique, il s'agit :

- d'un vaccin utilisé chez le chat : **FELIGEN® (VIRBAC) CRP**. C'est un vaccin vivant atténué polyvalent destiné à protéger les chats contre le calicivirus félin et l'herpèsvirus félin, deux agents pathogènes à l'origine du « coryza » du chat, et contre le parvovirus félin.

Ce vaccin contient donc le parvovirus félin atténué, souche MR 72, titrée à $10^{3,7}$ - $10^{4,5}$ TCID₅₀, et il a servi de témoin positif pour les tests PCR effectués.

- d'un vaccin utilisé chez le chien **VANGUARD® (PFIZER) type CPV2**, contenant la souche NL-35D titrée à 10^7 TCID₅₀. Il a servi de témoin positif pour la PCR testant le vaccin FELIGEN® (VIRBAC) CRP.

C. AMORCES SPECIFIQUES DU VIRUS FPV

Chaque PCR est réalisée grâce à un couple d'amorces sens et anti-sens s'hybridant spécifiquement à une séquence d'ADN viral cible.

Dans cette étude, nous nous sommes servis du couple d'amorces P2s/P2as dont les séquences ont été publiées en 2000 dans l'article sur la parvovirose canine de PEREIRA *et al.* (61) (tableau VIII).

PCR	Nom de l'amorce sens et anti-sens	Séquence de l'amorce sens et anti-sens (5' vers 3')	Longueur du fragment amplifié
PLI	CPV _{p2s1} CPV _{p2as2}	GAA GAG TGG TTG TAA ATA ATA <i>CCT ATA TCA CCA AAG TTA GTA G</i>	681 pb

Tableau VIII : Amorces utilisées pour le diagnostic PLI (panleucopénie infectieuse)

pb : paires de bases

D. CONTROLE INTERNE

Le contrôle interne est réalisé grâce à un couple d'amorces amplifiant une séquence d'ADN du génome du chat qui n'est pas présente dans la séquence d'ADN virale recherchée.

Nous nous sommes servis dans cette étude de deux couples d'amorces (dont les séquences sont confidentielles) couramment utilisées pour d'autres tests diagnostiques dans le LVD69 :

- le couple **HPRTs1/HPRTas2** : amorces sens (s1) et anti-sens (as2) s'hybridant au gène HPRT (Hypoxantine PhosphoRibosyl Transférase)

- le couple **GAPDHs1/ GAPDHas2** : amorces sens (s1) et anti-sens (as2) s'hybridant au gène GAPDH (GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase)

E. REACTIFS ET MATERIEL

Les réactifs et le matériel utilisés sont indiqués dans les annexes 2 et 3.

III. METHODE

A. PRELEVEMENTS

Les 14 prélèvements de fèces ont été recueillis par écouvillonnage rectal et conservés à +4°C avant l'étape d'extraction de l'ADN.

B. EXTRACTION DE L'ADN

1. Extraction de l'ADN viral à partir des vaccins

L'extraction manuelle de l'ADN à partir des souches vaccinales a été réalisée grâce au kit *NucleoSpin® Blood Quick Pure* (annexe 4).

Cette méthode d'extraction passe par une étape de lyse cellulaire grâce à la protéinase K, ce qui permet la libération du matériel génétique, et par une étape de dégradation des protéines susceptibles d'inhiber l'enzyme Red Taq DNA polymérase.

Ensuite se déroule l'adsorption de l'ADN sur gel de silice, celui-ci possède effectivement une forte affinité pour les acides nucléiques. Une série de lavages permet alors d'éliminer les contaminants, l'ADN est purifié. Celui-ci subit enfin une étape d'éluion afin d'être solubilisé.

2. Extraction de l'ADN à partir des échantillons à tester

L'extraction manuelle de l'ADN à partir des échantillons de fèces à tester a été réalisée à partir du kit *QIAamp® DNA Mini Kit* (annexe 5).

Le principe d'extraction reste le même que celui défini précédemment avec le kit *NucleoSpin® Blood Quick Pure*. La quantité d'ADN extrait est de 200µL.

L'extraction d'ADN pour chaque échantillon est validée par le contrôle interne.

C. PROTOCOLE PCR

1. Préparation du mélange réactionnel pour la PCR

❖ Principe :

Le mélange réactionnel ou « mix » correspond au mélange précis de réactifs qui vont permettre l'amplification de l'ADN. Il s'agit d'une eau tamponnée dans laquelle sont ajoutés les composants nécessaires à la synthèse nucléotidique : les **dNTPs**, les **amorces** sens et anti-sens spécifiques, l'enzyme thermostable **Red Taq DNA Polymerase**.

Le « mix » contient également du **MgCl₂**, dont la concentration va participer à établir le degré de stringence du milieu. Le MgCl₂ permet de former des complexes solubles avec l'ADN qui sont reconnus par l'enzyme de polymérisation.

Plus la concentration en MgCl₂ augmente, plus les hybridations non spécifiques sont susceptibles de se produire.

Une mise au point se justifie donc. La gamme de concentrations en MgCl₂ varie de 1 mM à 1,5 mM.

→ Ce mélange est préparé sous une hotte à flux laminaire, dans un même tube Eppendorf puis réparti dans chaque tube PCR. Les volumes des réactifs sont calculés en fonction de la concentration des solutions mères et de la concentration finale souhaitée dans le mélange.

❖ Conditions expérimentales :

a) PCR PLI et souche vaccinale

- Concentration en MgCl₂ de **1 mM** :

Les volumes et concentrations utilisés sont résumés dans le tableau IX.

Concentration solution mère	Concentration solution finale	Volume pour 1 échantillon en µL
H ₂ O	qsp 49 µL	37,1
Tampon 10x	1x	5
MgCl ₂ 25 mM	1 mM	3
dNTP 10 mM	200 µM	1
CPVp2 s1 10 µM	0,2 µM	1
CPVp2 as2 10 µM	0,2 µM	1
Taq Poly. 1U/µL	0,03 U/µL	0,9

Tableau IX : Concentrations et volumes des réactifs du « mix » PLI pour une concentration en MgCl₂ de 1 mM et un volume final de 49 µL

- Concentration en MgCl₂ de **1,5 mM** :

Les volumes et concentrations utilisés sont résumés dans le tableau X.

Concentration solution mère	Concentration solution finale	Volume pour 1 échantillon en µL
H ₂ O	qsp 29 µL	20,3
Tampon 10x	1x	3
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,8
dNTP 10 mM	200 µM	0,6
CPVp2 s1 10 µM	0,4 µM	1,2
CPV2p as2 10 µM	0,4 µM	1,2
Taq Poly. 1U/µL	0,03 U/µL	0,9

Tableau X : Concentrations et volumes des réactifs du « mix » PLI pour une concentration en MgCl₂ de 1,5 mM et un volume final de 29 µL

b) PCR contrôle interne

- PCR HPRT et concentration en MgCl₂ de **1 mM** :

Les concentrations et volumes des produits du « mix » sont strictement les mêmes que ceux indiqués dans le tableau IX, mais avec les amorces HPRTs1/HPRTas2.

- PCR GAPDH et concentration en MgCl₂ de **1,5 mM** :

Les concentrations et volumes des produits du « mix » sont strictement les mêmes que ceux indiqués dans le tableau X, mais le couple d'amorces ajouté est GAPDHs1/GAPDHas2.

c) PCR PLI sur ADN extrait d'écouvillons rectaux de chats suspects de panleucopénie

Les concentrations et volumes du « mix » sont identiques à ceux du tableau IX, c'est à dire un volume final de « mix » de 49 µL, une concentration en MgCl₂ de **1 mM** et une concentration en amorces CPVp2 s1/CPV2p as2 de **0,2 µM**.

d) PCR PLI et PCR GAPDH sur le même échantillon de fèces

Les volumes et concentrations utilisés sont résumés dans le tableau XI.

CSM	CSF		Volume/tube (µL)	
	PLI	GAPDH	PLI	GAPDH
H ₂ O	qsp 29µL	qsp 29µL	22,1	21,5
Tampon 10x	1x	1x	3	3
MgCl ₂ 25 mM	1 mM	1,5 mM	1,2	1,8
dNTP 10 mM	200 µM	200 µM	0,6	0,6
CPVp2 s1 10µM	0,2 µM		0,6	
CPVp2 as2 10µM	0,2 µM		0,6	
GAPDH s1 10µM		0,2 µM		0,6
GAPDH as2 10µM		0,2 µM		0,6
Taq 1U/µL	0,03 U/µL	0,03 U/µL	0,9	0,9

Tableau XI : Concentrations et volumes des « mix » utilisés pour les PCR PLI et GAPDH sur le même échantillon

CSM : Concentrations solutions mères

CSF : Concentrations solutions finales

Le volume final est de 29 µL de « mix ».

e) PCR duplex PLI/GAPDH

Les volumes et concentrations utilisés sont résumés dans le tableau XII.

CSM	CSF	Volume/tube (µL)
H ₂ O	qsp 29 µL	19,1
Tampon 10x	1x	3
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,8
dNTP 10 mM	200 µM	0,6
CPVp2 s1 10µM	0,4 µM	1,2
CPVp2 as2 10µM	0,4 µM	1,2
GAPDH s1 10µM	0,2 µM	0,6
GAPDH as2 10µM	0,2 µM	0,6
Taq 1U/µL	0,03 U/µL	0,9

Tableau XII : Concentrations et volumes des « mix » utilisés pour l'essai de la PCR duplex PLI/GAPDH

CSM : Concentrations solutions mères

CSF : Concentrations solutions finales

Le volume final est de 29 µL de « mix ».

2. Répartition du mélange réactionnel

Chaque tube est identifié et le « mix » est réparti dans :

- le tube servant de témoin positif
- le(s) tube(s) contenant l' (les) échantillon(s)
- le tube servant de témoin négatif, rempli en dernier, afin d'être sûr d'avoir la quantité nécessaire dans les deux tubes précédents, et afin de garantir qu'aucune contamination n'a eu lieu au cours des manipulations précédentes.

3. Addition de l'ADN

Les extraits d'ADN sont les derniers à être ajoutés au mélange réactionnel.

Cette étape se déroule en dehors de la hotte à flux laminaire, un jeu de pipettes différent est utilisé. Les extraits d'ADN préalablement congelés dans le cas où l'analyse PCR ne se fait pas immédiatement après l'étape d'extraction, sont décongelés.

Dans le tube servant de **témoin positif** est incorporé 1 µL d'ADN extrait :

- à partir du vaccin utilisé chez le chien **VANGUARD® (PFIZER) type CPV2** : celui-ci sert de témoin positif pour la PCR testant la souche vaccinale du vaccin « chat » **FELIGEN® (VIRBAC) CRP**, et est appelé **TP**,

- à partir du vaccin utilisé chez le chat **FELIGEN® (VIRBAC) CRP** : celui-ci devient le témoin positif des PCR PLI ou **TP1**,

- à partir d'un échantillon de sang de chat : il sert de témoin positif pour la PCR contrôle interne et est appelé **TP2**.

Nous ajoutons 1 µL d'ADN extrait à partir des **échantillons à tester** dans le ou les tubes destiné(s) à révéler la présence éventuelle du FPV.

Enfin, seul le tube servant de **témoin négatif** ne reçoit pas d'extrait d'ADN mais 1 µL d'eau extra pure afin d'arriver à un volume et à des concentrations des différents réactifs équivalents aux autres tubes. L'absence de contamination des milieux réactionnels peut ainsi être vérifiée.

Chacune des PCR est ainsi validée par la présence du témoin positif et du témoin négatif.

Chaque tube est finalement homogénéisé par centrifugation.

4. Amplification

❖ Détermination de la température d'hybridation :

Tout d'abord, il faut déterminer la **température de fusion (T_f)** des amorces : celle-ci dépend de la séquence nucléotidique, chaque base guanine (G) et cytosine (C) apporte 4°C, et chaque base adénine (A) et thymine (T) apporte 2°C. On utilise la formule :

$$T_f = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Puis la **température d'hybridation (T_H)** est déterminée à partir de T_f : elle est en général inférieure de 5°C à 10°C à la température de fusion moyenne des amorces.

❖ Stringence :

Plus la température d'hybridation est haute, plus le risque d'obtenir des hybridations non spécifiques est faible. La stringence du milieu augmente avec la température.

Un ajustement de la température d'hybridation pour trouver la température optimale est nécessaire : il se fait en fonction des résultats obtenus, c'est-à-dire de la présence ou non d'hybridation non spécifique.

❖ Programme d'amplification :

Chaque programme d'amplification est défini par une succession de cycles avec des températures de dénaturation, d'hybridation, et d'élongation prédéfinies.

Le nombre de fragments amplifiés augmente avec le nombre de cycles programmés, mais l'amplification suit une croissance exponentielle qui s'achève donc sur un plateau, atteint vers 40 à 50 cycles. Il n'est alors plus possible d'augmenter le nombre de fragments amplifiés, car l'enzyme Red Taq DNA Polymerase n'arrive plus à polymériser.

Nous nous sommes basés pour cette étude sur les conditions expérimentales déterminées par PEREIRA *et al.* (61). Nous avons ensuite modifié ces conditions en augmentant le nombre de cycles de 30 à **40 et 50 cycles**. La sensibilité de l'amplification est ainsi augmentée, mais également le temps d'analyse, ce qui a été compensé par une diminution du temps d'hybridation et d'élongation de 2 min à **1 min**.

Les échantillons sont donc déposés dans le **thermocycleur**, dont le programme consiste en :

1. Une étape « **hot start** » durant laquelle est réalisée la dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes.
2. 40 ou généralement **50 cycles** de 3 étapes :
 - une première étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes,
 - une deuxième étape à la température d'hybridation choisie (54°C, 55°C, ou 56°C) pendant 1 minute,
 - une troisième étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute.
3. Une étape finale d'**élongation** à 72°C pendant 10 minutes.
4. Une étape de **conservation** à 8°C si l'électrophorèse est décalée dans le temps.

5. Analyse des produits amplifiés

Elle se fait grâce à la méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose.

❖ Préparation du gel d'électrophorèse :

Le support de migration utilisé est un gel d'agarose à 1,5% en TBE (Tris borate EDTA). La préparation du gel se fait par dissolution d'agarose (livré sous forme de poudre) dans une solution de tampon TBE, puis addition de bromure d'éthidium (BET) pour obtenir une concentration finale à 0,5 µg/mL.

Le bromure d'éthidium est un agent capable de se fixer sur la molécule d'ADN et qui, une fois exposé à des rayonnements UV, révèle les produits amplifiés grâce à ses propriétés de fluorescence.

La solution d'agarose contenant le BET est versée dans un support spécifique contenant un « peigne » qui va permettre la formation de puits dans lesquels vont être déposés les produits amplifiés. La taille du support, et donc celle du « peigne » qui détermine le nombre de puits, est choisie en fonction du nombre d'échantillons à tester : il existe des grands supports pour gel 17 puits, et des petits supports pour gel 8 puits (figure 18).

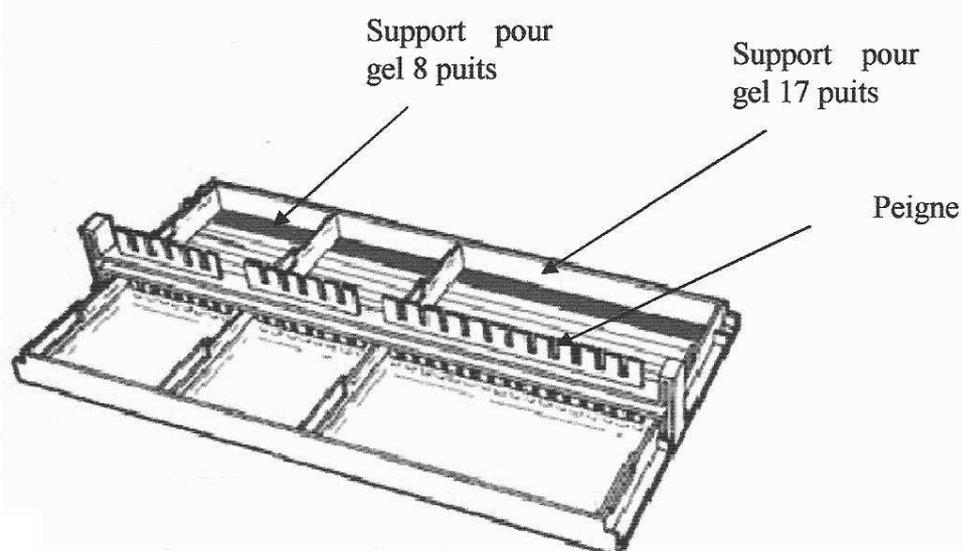


Figure 18 : Représentation des petits et grands supports pour gel d'électrophorèse,
d'après (89)

La polymérisation du gel dure environ 40 mn, et une fois solidifié, on retire le peigne et le gel est déposé grâce à une pince dans la cuve d'électrophorèse, et recouvert par la solution de tampon de migration TBE 0,5x- BET 0,5 µg/mL.

❖ Dépôt des échantillons :

Nous avons défini un ordre de distribution des échantillons dans les puits. D'une manière générale, pour cette étude, le témoin négatif est déposé dans le puits n° 1, le témoin positif dans le puits n° 2, les échantillons à tester dans les puits suivants, et le Ladder 100 (avec double bande à 800 pb et coloré au bleu de bromophénol) dans le dernier puits. Celui-ci permet d'obtenir un étalonnage du gel toutes les 100 pb et ainsi de connaître la taille des fragments obtenus après l'étape de migration.

Dans chaque puits, 9 μ L d'échantillon sont déposés, et 5 μ L de Ladder 100.

❖ Migration :

Elle se réalise en 30 minutes : un courant électrique de 100 Volts alimente la cuve d'électrophorèse et traverse le gel. L'ADN étant chargé négativement, il va migrer du pôle négatif vers le pôle positif (figure 19). Les fragments de petite taille migrent plus loin que les fragments de grosse taille (poids moléculaire plus élevé).

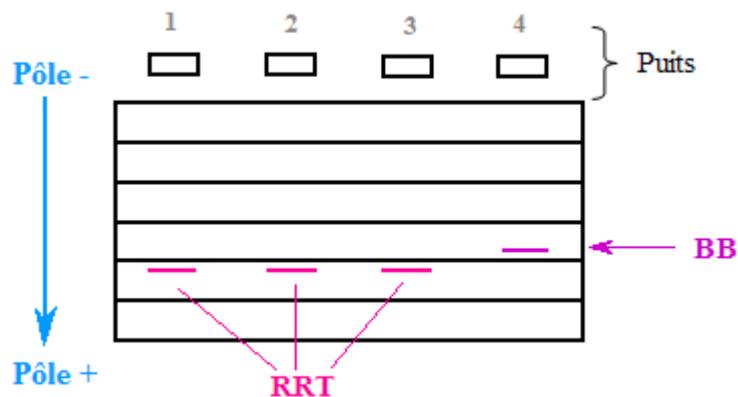


Figure 19 : Electrophorèse des produits amplifiés et marqueurs du front de migration

- | | |
|--------------------------|------------------------------------|
| 1 : Témoin négatif | Marqueurs du front de migration : |
| 2 : Témoin positif | BB : Bleu de bromophénol |
| 3 : Echantillon à tester | RRT : Colorant rouge de la Red Taq |
| 4 : Ladder 100 | |

Le mélange de la Taq Polymérase avec un colorant rouge inerte permet de s'assurer que l'enzyme a bien été ajoutée dans chaque tube, et ce colorant rouge constitue également un marqueur du front de migration, tout comme le bleu de bromophénol associé au Ladder 100.

Ces marqueurs permettent de visualiser l'avancée de la migration et de couper l'alimentation quand le colorant a parcouru la distance requise.

❖ Révélation des fragments amplifiés :

Elle se réalise dans une chambre noire : le gel d'électrophorèse est placé sous un rayonnement UV. Les fragments amplifiés sont alors révélés grâce au BET sous forme de bandes fluorescentes rose-orangé.

Enfin, une photographie du gel est prise afin de pouvoir analyser ultérieurement les résultats obtenus.

D. PRECAUTIONS

1. **Eviter les contaminations**

Il s'agit essentiellement d'éviter d'obtenir des résultats faussement positifs.

❖ Séparation des locaux :

Il est nécessaire d'utiliser plusieurs pièces distinctes : une première pièce sert à l'extraction de l'ADN, puis une deuxième pièce sert à la préparation du « mix ».

Les tubes préparés sont ensuite transférés dans une troisième pièce pour être placés dans le thermocycleur.

La révélation des fragments amplifiés se déroule dans une quatrième pièce, avec une chambre noire contenant le transilluminateur.

L'ADN amplifié, qui est la principale source de contamination, peut être en suspension dans l'air. L'étape de révélation des produits amplifiés est celle où l'on retrouve le plus de contaminants dans l'air ambiant.

Le matériel et les manipulateurs restent néanmoins les principaux vecteurs de contamination.

→ Il est donc impératif de respecter la « marche en avant » imposée par la séparation et la disposition des pièces : tout matériel biologique quittant un local ne peut revenir dans ce local ou dans les précédents.

❖ Matériel et manipulateurs :

Concernant le matériel de laboratoire, plusieurs jeux de pipettes et des cônes à filtres sont utilisés pour chacune des étapes consistant à ajouter l'ADN et à préparer le « mix ». Cette dernière étape se déroule d'ailleurs sous une hotte à flux laminaire.

Chaque pièce possède son propre matériel.

Il existe un sas entre la pièce où se réalise l'extraction et la pièce où est préparé le mélange réactionnel : cela permet aux manipulateurs de changer de blouse et de

chaussures entre ces deux étapes, de se coiffer d'une « charlotte » et d'enfiler des manchettes.

Les mêmes mesures de précaution sont prises pour entrer dans la pièce d'analyse des produits amplifiés.

❖ Nettoyage et désinfection :

Il est impératif de réaliser le nettoyage minutieux des paillasse avec un produit qui détruit les acides nucléiques, car comme expliqué précédemment, l'ADN amplifié est la principale source de contamination.

2. Précautions de sécurité

Certains produits nécessitent de prendre des précautions particulières car ils peuvent être irritants, comme les tampons des kits d'extraction. Le manipulateur porte donc des gants pour chaque manipulation.

Le bromure d'éthidium utilisé lors de la préparation du gel d'électrophorèse possède des propriétés cancérigènes qui justifient le port de gants spéciaux et une manipulation sous hotte chimique, ainsi qu'une élimination particulière des déchets liquides (tampon d'électrophorèse) et solides (gel).

IV. RESULTATS

A. RESULTATS DE LA PCR SUR LA SOUCHE VACCINALE FELIGEN® CRP

1. Conditions initiales

Les volumes et concentrations utilisés sont résumés dans le tableau IX.

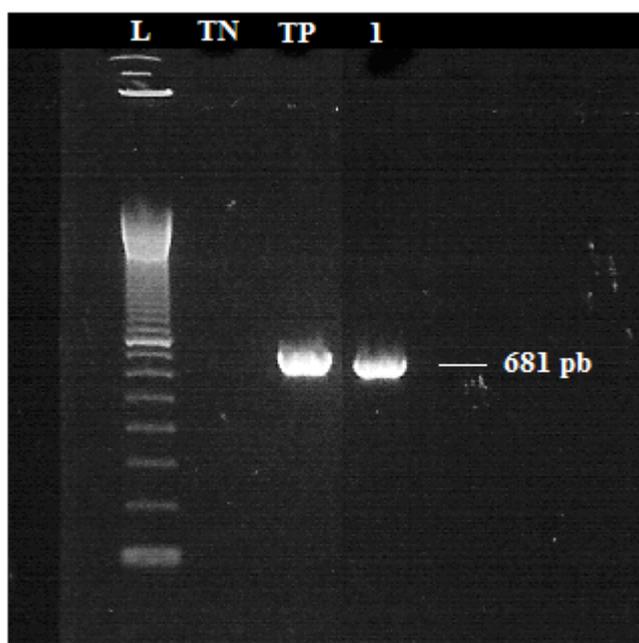


Figure 20 : Résultats de la PCR PLI sur le vaccin FELIGEN® CRP
[MgCL₂] 1 mM ; T_H 55°c ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [CPVp2] 0,2 μM

L : Ladder 100

TN : Témoin négatif

TP : Témoin positif : vaccin VANGUARD® CPV2

1 : Vaccin FELIGEN® CRP

On observe un signal révélateur d'un fragment de 681 pb pour le puits correspondant au vaccin FELIGEN® CRP : il s'agit de la taille de fragment attendue d'après (61).

Les amorces CPVp2 amplifient donc bien le FPV, et le vaccin FELIGEN® CRP peut être utilisé par la suite comme témoin positif pour les PCR sur échantillons de terrain. Nous l'appelons TP₁.

2. Variation de température

Les volumes et concentrations utilisés sont résumés dans le tableau X.

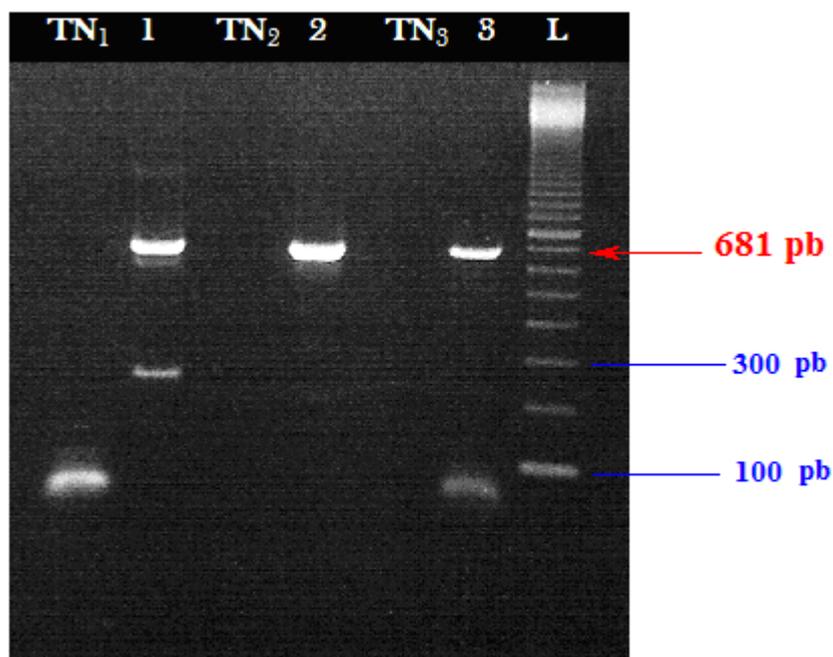


Figure 21 : Résultats de la PCR PLI sur le vaccin FELIGEN®
à différentes températures d'hybridation (T_H)
[MgCL₂] 1,5 mM; 40 cycles; gel d'agarose 1,5% ; [CPVp2] 0,4 μM

TN₁, TN₂, TN₃ : Témoins négatifs pour les températures respectivement de 54°C, 55°C, et 56°C

L : Ladder 100

1: Vaccin FELIGEN®, T_H 54°C

2: Vaccin FELIGEN®, T_H 55°C

3: Vaccin FELIGEN®, T_H 56°C

On observe un signal fort correspondant au fragment de 681 pb attendu pour les températures de 54°C, 55°C et 56°C.

On observe également un signal non attendu de faible intensité d'environ 300 pb pour l'essai à 54°C. Celui-ci qui correspond à un phénomène d'hybridation non spécifique.

Enfin, le signal observé à moins de 100 pb pour le TN₁ et pour l'essai 3 correspond aux amorces (non hybridées), qui sont des petits fragments d'une vingtaine de nucléotides qui migrent plus vite et plus loin.

D'après la qualité du résultat obtenu pour la T_H de 55°C, celle-ci est retenue et utilisée par la suite.

B. RESULTATS DE LA PCR CONTROLE INTERNE HPRT

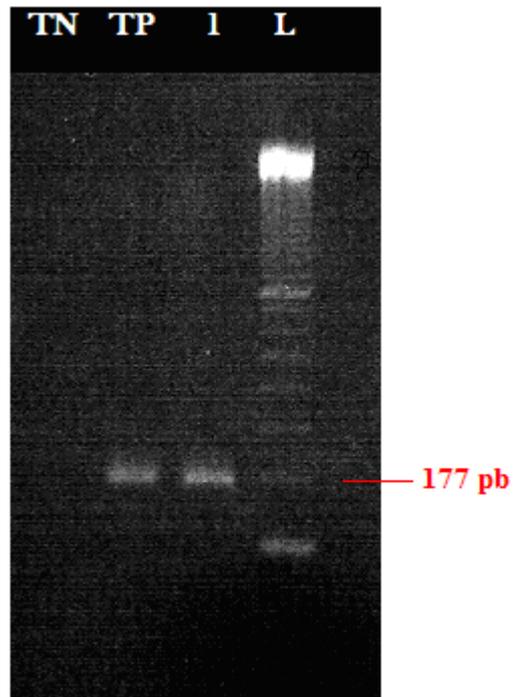


Figure 22 : Résultats de la PCR HPRT
sur un échantillon de fèces de chat

[MgCL₂] 1 mM ; T_H 55°C ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [HPRT] 0,2 μM

TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100 ;

TP : Témoin positif (extrait d'ADN provenant de sang de chat)

1 : Echantillon 06/907 (extrait d'ADN à partir d'un écouvillon rectal)

On observe un signal faiblement positif, correspondant au fragment attendu de 177 pb : les amorces HPRTs1/HPRTas2 permettent une amplification moyenne du gène endogène HPRT.

C. RESULTATS DE LA PCR CONTROLE INTERNE GAPDH

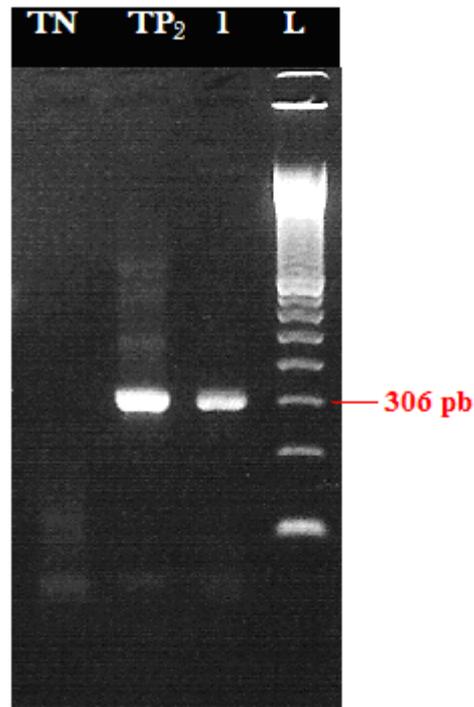


Figure 23 : Résultats de la PCR GAPDH
sur un échantillon de fèces de chat

[MgCL₂] 1,5 mM ; T_H 55°C ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [GAPDH] 0,4 μM

TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100

TP₂ : Témoin positif (extrait d'ADN provenant de sang de chat)

1 : Echantillon 07/136 (extrait d'ADN à partir d'un écouvillon rectal)

On observe un signal fortement positif correspondant au fragment attendu de 306 pb. L'amplification du gène endogène GAPDH marche bien avec le couple d'amorces choisi GAPDHs1/GAPDHs2, et celui-ci est donc conservé par la suite pour réaliser le contrôle interne, ainsi que son témoin positif que nous appelons TP₂.

D. RESULTATS DES PCR SUR LES FECES DE 6 CHATS SUSPECTS DE PANLEUCOPENIE

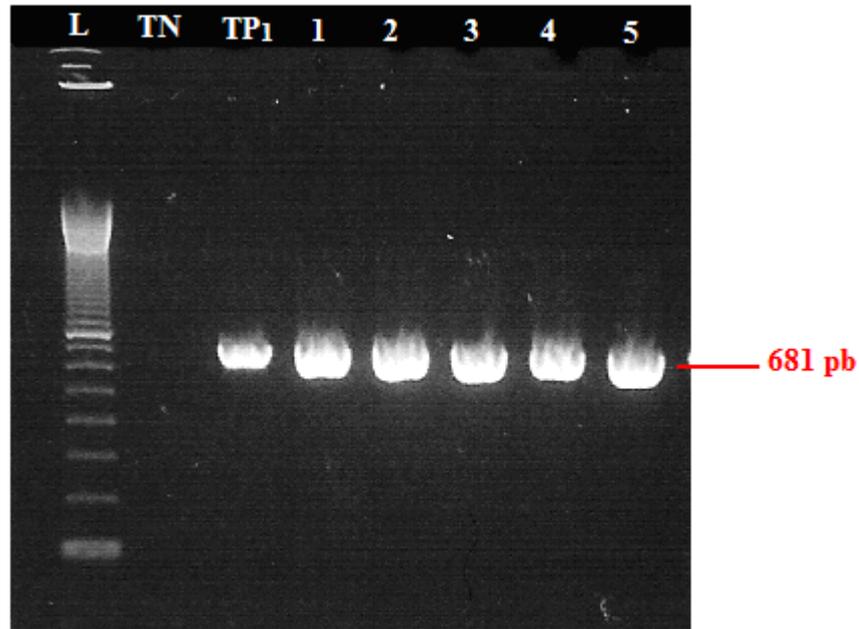


Figure 24 : Résultats de la PCR PLI1 sur 5 des 14 échantillons de fèces de chats suspects de panleucopénie

[MgCL₂] 1 mM ; T_H 55°c ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [CPVp2] 0,2 µM

TN : Témoin négatif, L : Ladder 100

TP1 : Témoin positif

1 : Echantillon 06/88

2 : Echantillon 06/89 ; 3 : Echantillon 06/90

4 : Echantillon 06/91 ; 5 : Echantillon 06/92

Les échantillons 06/88, 06/89, 06/90, 06/91, et 06/92 sont tous fortement positifs.

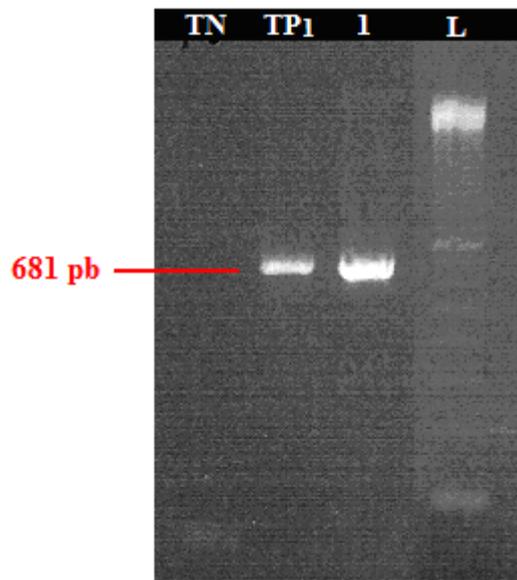


Figure 25 : Résultats de la PCR PLI2 sur un échantillon de fèces de chat suspect de panleucopénie

[MgCL₂] **1 mM** ; T_H **55°c** ; **50 cycles**; gel d'agarose **1,5%**; [CPVp2] **0,2 μM**

TN : Témoin négatif ; **L** : Ladder 100

TP1 : Témoin positif

1 : Echantillon 06/907

L'échantillon 06/907 est positif.

E. PCR PLI ET PCR GAPDH SUR LE MEME ECHANTILLON

Les conditions expérimentales sont résumées dans le tableau XI.

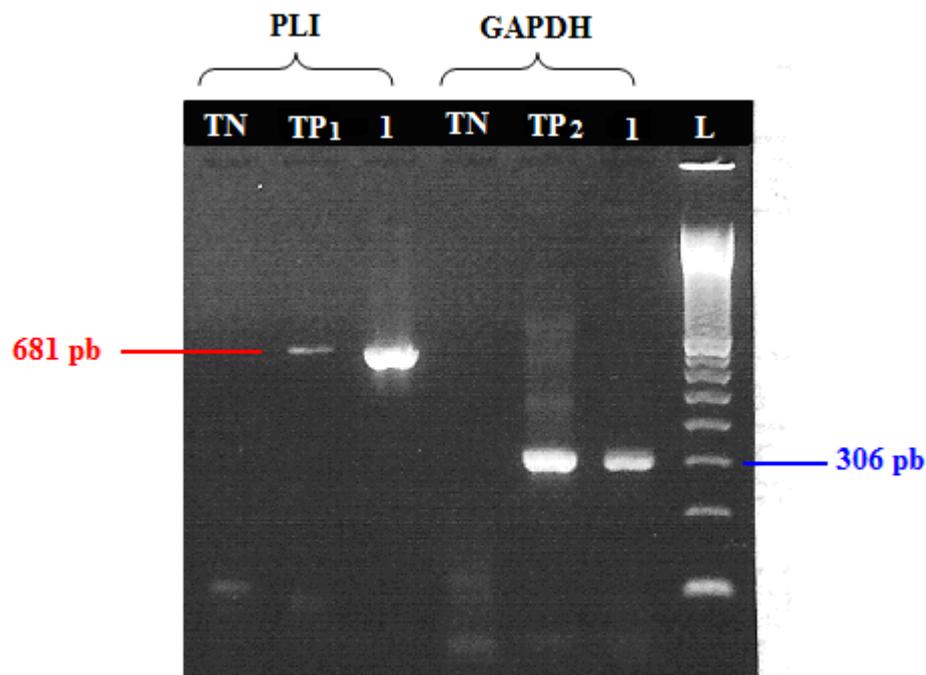


Figure 26 : Résultats de la PCR PLI3 sur un échantillon de fèces de chat suspect de panleucopénie

[MgCL₂] 1 mM ; T_H 55°C ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [Amorces] 0,2 μM

TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100

TP1 : Témoin positif PCR PLI

TP2 : Témoin positif PCR GAPDH

1 : Echantillon 07/136

L'échantillon 07/136 est positif.

Le signal à 681 pb du témoin positif de la PCR PLI est faiblement positif.

F. ECHANTILLON TESTE AVEC CONTROLE INTERNE GAPDH EN PCR DUPLEX

Les conditions expérimentales sont résumées dans le tableau XI pour la PCR PLI et la PCR GAPDH, et dans le tableau XII pour la PCR duplex.

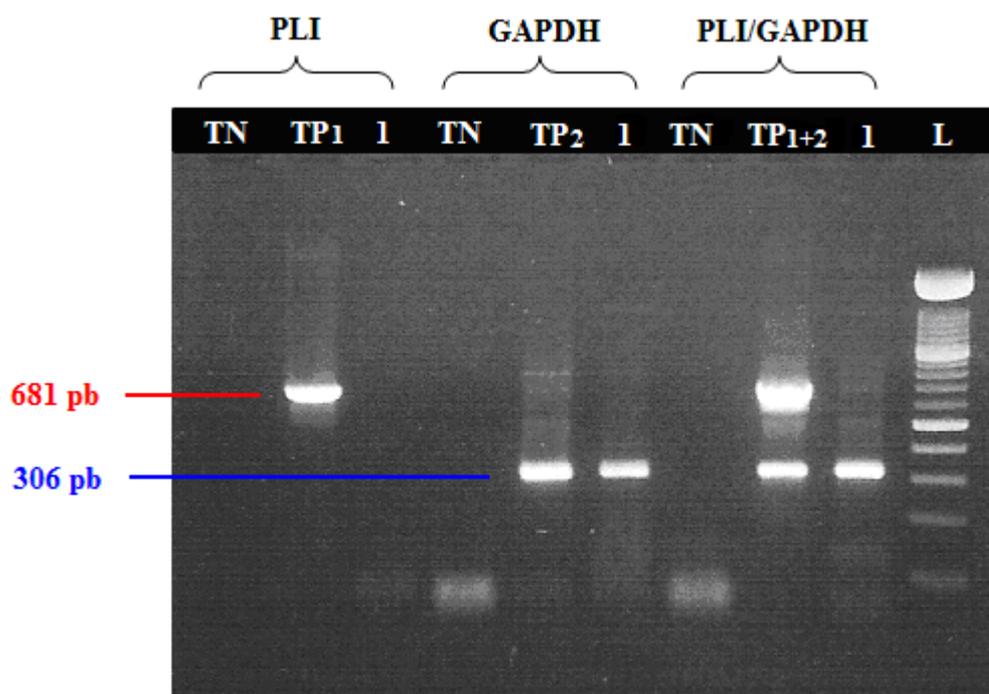


Figure 27 : Résultats des PCR PLI4 sur un échantillon de fèces de chat suspect de panleucopénie

T_H 55°C ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%

[MgCl₂] 1 mM PCR PLI; [MgCl₂] 1,5 mM PCR GAPDH et duplex

1 : Echantillon 07/217 ; TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100

TP1 : Témoin positif PCR PLI ; TP2 : Témoin positif PCR GAPDH

TP1+2 : Mélange de TP1 et de TP2

L'échantillon 07/217 est négatif pour la PCR simplex PLI et positif pour le contrôle interne GAPDH.

Pour la PCR duplex, l'échantillon 07/217 est négatif pour PLI et positif pour GAPDH, le mélange des témoins positifs fonctionne bien puisqu'on observe deux signaux correspondant aux fragments attendus de 681 pb et de 306 pb sur la piste TP1+2.

La PCR duplex PLI/GAPDH est donc réutilisée par la suite.

G. AUTRES ECHANTILLONS TESTES EN DUPLEX PLI/GAPDH

Les conditions expérimentales restent les mêmes que celles choisies pour l'essai de la PCR duplex (tableau XII), avec une concentration en MgCl₂ de 1,5 mM et une T_H de 55°C.

- Echantillons 07/941, 07/942, et 07/943 :

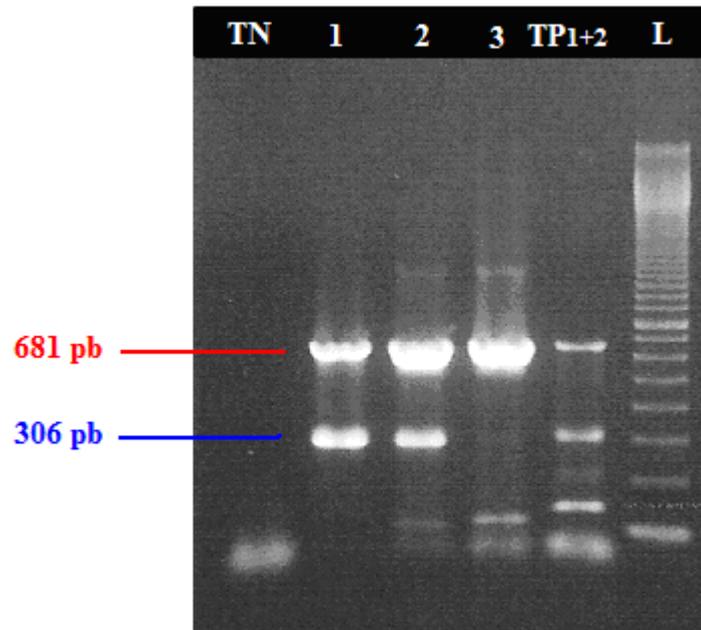


Figure 28 : Résultats de la PCR duplex PLI5 sur trois échantillons de chats suspects de panleucopénie.

[MgCL₂] 1,5 mM ; T_H 55°c ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%

TN : Témoin négatif ; L :Ladder 100

TP1+2 : Témoin positif PLI/GAPDH dilué au 1/10^e

1: Echantillon 07/941 ; 2: Echantillon 07/942 ; 3: Echantillon 07/943

Les échantillons 07/941, 07/942, et 07/943 sont positifs.

Les signaux correspondant aux fragments de 681 pb sont très forts sur les pistes 2 et 3.

On remarque que le contrôle interne est très faible sur la piste 3.

Enfin, les signaux de 681 pb et 306 pb du témoin positif (dilué au 1/10^e) sont faiblement positifs, et on observe une bande non spécifique à environ 150 pb sur la piste TP1+2.

- Echantillons 07/1022, 07/1244, 07/1485 :

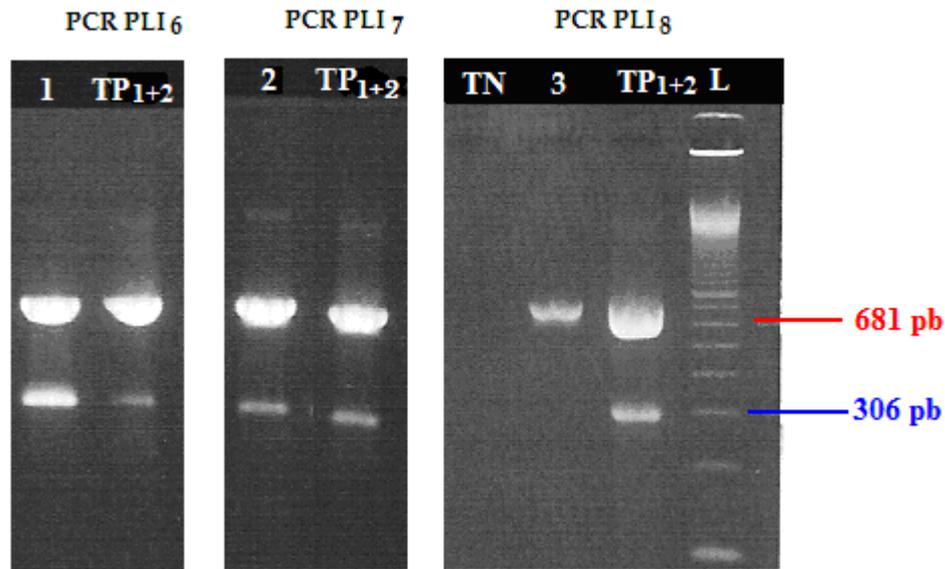


Figure 29 : Résultats des PCR PLI6, PLI7, et PLI8 sur échantillons de fèces provenant de 3 chats suspects de panleucopénie
 [MgCL₂] 1,5 mM ; T_H 55°c ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%

TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100

TP1+2 : Témoin positif PLI/GAPDH

1: Echantillon 07/1022 ; 2 : Echantillon 07/1244 ; 3 : Echantillon 07/1485

Les échantillons 07/1022, 07/1244, et 07/1485 sont positifs.

On remarque que le signal spécifique du témoin positif GAPDH est absent sur la piste 3.

H. TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS

Les résultats PCR obtenus sur les 14 échantillons de fèces de chats suspects de panleucopénie sont résumés dans le tableau XIII.

N° échantillon	Résultats des tests PCR
07/1485	+
07/1244	+
07/1022	+
07/941	+
07/942	+
07/943	+
07/217	-
07/136	+
06/907	+
06/92	+
06/91	+
06/90	+
06/89	+
06/88	+

Tableau XIII : Récapitulatif des résultats des PCR sur les 14 échantillons de fèces de chats suspects de panleucopénie

V. DISCUSSION

A. TEST PCR

1. Extraction de l'ADN

❖ Contrôle interne :

L'extraction manuelle de l'ADN viral à partir des écouvillons rectaux a toujours été réalisée grâce au kit *QIAmp® DNA minikit*.

La mise au point d'un contrôle interne a été effectuée dans le but de vérifier que l'étape d'extraction a correctement fonctionné. Il permet de s'affranchir de **faux-négatifs** : la révélation de son amplification nous assure que l'étape d'extraction de l'ADN a réussi et qu'il n'y a pas d'inhibiteurs de l'enzyme Red Taq DNA Polymerase dans l'extrait empêchant l'amplification.

Lorsque le résultat du test PCR est négatif pour l'ADN viral recherché et pour le contrôle interne, on ne peut pas conclure à un test PCR négatif et il faut recommencer la manipulation.

L'essai avec le couple d'amorces HPRTs1/HPRTas2 a donné des résultats faiblement positifs, alors que l'essai avec le couple GAPDHs1/GAPDHs2 a donné des résultats positifs satisfaisants et a donc été retenu pour le test diagnostique (figure 30).

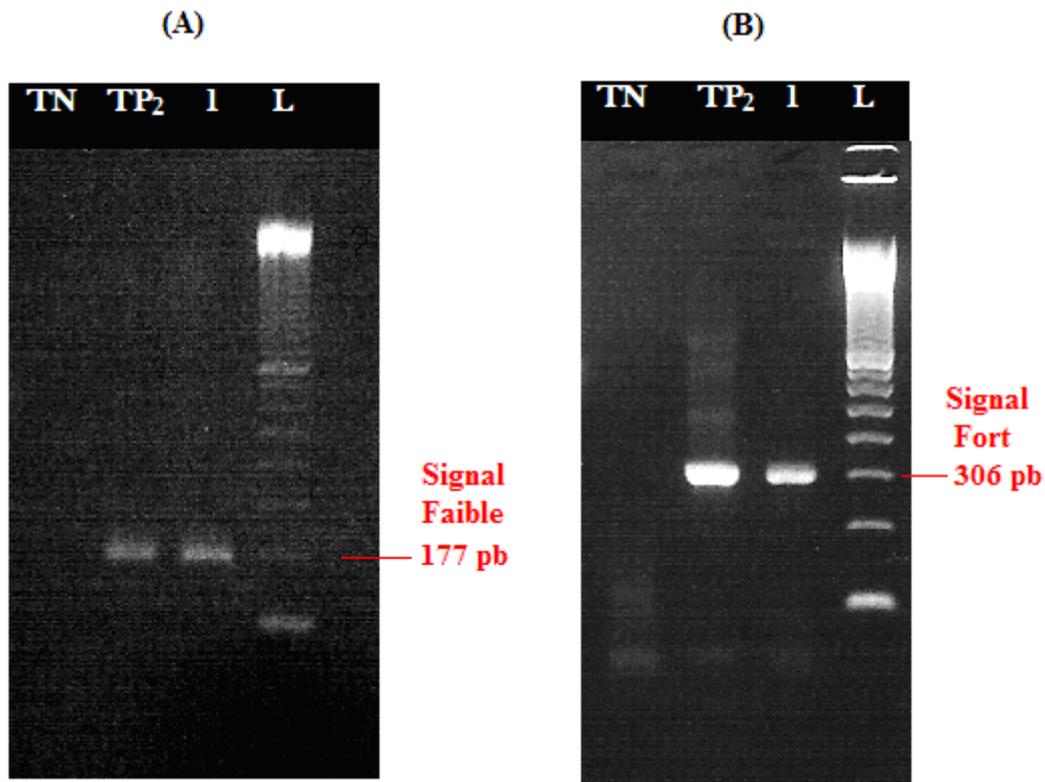


Figure 30 : Essais PCR avec contrôle interne HPRT (A) et GAPDH (B)
(A): [MgCL₂] 1 mM ; T_H 55°C ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [HPRT] 0,2 µM
(B): [MgCL₂] 1,5 mM ; T_H 55°C ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [GAPDH] 0,4 µM

TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100
 TP : Témoin positif (ADN extrait de sang de chat)
 1 : Echantillon de fèces 06/907 (A) et 07/136 (B)

Le même témoin positif a été utilisé pour les deux essais, à savoir l'échantillon de sang de chat 06/65 (TP2). Chaque PCR a permis de tester le contrôle interne sur un échantillon de fèces de chat, l'échantillon 06/907 pour la PCR HPRT, et l'échantillon 07/136 pour la PCR GAPDH.

Les conditions expérimentales de mise au point du contrôle interne sont les mêmes mise à part le choix de concentration en MgCl₂ qui a été de 1 mM pour la PCR HPRT et de 1,5 mM pour la PCR GAPDH. Les conditions de la PCR GAPDH avaient été préalablement optimisées pour d'autres tests diagnostiques mis au point au LVD69.

❖ Echantillons testés avec contrôle interne :

Huit échantillons ont été testés avec contrôle interne.

Le seul résultat négatif a été observé sur l'échantillon 07/217 (figure 27) : ce résultat est confirmé par le contrôle interne GAPDH (signal visible à 306 pb), il ne s'agit donc pas d'un faux-négatif.

❖ Echantillons testés sans contrôle interne :

Il n'y a pas eu de doute sur les résultats des 6 échantillons testés sans contrôle interne car ils se sont tous révélés positifs (figures 24 et 25).

2. Les paramètres de la PCR

❖ Les amorces et la mise au point sur le vaccin :

La mise au point sur le vaccin FELIGEN® CRP a confirmé que les amorces CPVp2 s1/CPVp2 as2 amplifient bien l'ADN du FPV, comme décrit dans l'étude de PEREIRA *et al.* (61).

❖ La stringence :

La stringence dépend de la concentration en $MgCl_2$ d'une part, et de la température d'hybridation des amorces d'autre part : il est nécessaire de trouver les conditions optimales pour la combinaison de ces deux paramètres.

En effet, la diminution de la stringence, qui correspond soit à une augmentation de la concentration en $MgCl_2$, soit à une diminution de la température d'hybridation, est associée à une augmentation de la capacité d'hybridation des amorces. Elle peut entraîner des phénomènes d'hybridation non spécifique.

A l'inverse, l'augmentation de la stringence peut permettre d'éviter ces phénomènes, comme elle peut être à l'origine de la diminution voire de la disparition des signaux correspondant aux hybridations spécifiques recherchées.

- *Concentration en $MgCl_2$*

Il ne semble pas y avoir de différences majeures entre les PCR réalisées avec une concentration de 1 mM et celles réalisées avec une concentration de 1,5 mM.

En effet, l'intensité des signaux obtenus n'est pas plus faible avec une concentration en $MgCl_2$ de 1 mM et aucune bande non spécifique n'est observée avec $MgCl_2$ à 1,5 mM sauf sur la PCR duplex PLI5 (figure 28) et sur la PCR de mise au point sur vaccin à la T_H de 54°C (figure 21).

Il aurait été intéressant de tester la PCR duplex PLI5 avec une concentration en $MgCl_2$ de 1 mM afin d'essayer de réduire l'apparition de bandes non spécifiques dues à la compétition entre les amorces CPVp2 et GAPDH.

De même, l'intensité du signal du fragment spécifique de 681 pb étant satisfaisante pour une T_H de 54°C lors de la mise au point sur le vaccin, nous aurions pu faire un essai avec une concentration en $MgCl_2$ de 1 mM et tenter de limiter la formation d'hybridation non spécifique à la même température.

- *Température d'hybridation*

La mise au point de la technique sur le vaccin FELIGEN® CRP a été réalisée à 3 températures d'hybridation différentes, avec une concentration en $MgCl_2$ définie à 1,5 mM (figure 21).

L'essai à $T_H = 54^\circ C$ a permis de visualiser un signal correspondant au fragment attendu de 681 pb d'intensité satisfaisante, mais également un signal non attendu à environ 300 pb correspondant à une bande non spécifique.

Il a donc été décidé d'augmenter la T_H à 55°C, ce qui a permis d'éliminer la présence du fragment non spécifique de 300 pb, tout en gardant un signal spécifique à 681 pb satisfaisant.

Enfin, l'essai à la T_H de 56°C a également donné de bons résultats, avec la présence d'un signal attendu à 681 pb d'une intensité comparable à celle obtenue avec la T_H de 55°C, et l'absence de bandes non spécifiques.

La T_H de 55°C est gardée pour la réalisation des PCR sur écouvillons rectaux, c'est également celle qui a été retenue dans l'étude de PEREIRA *et al.* (61).

❖ Concentration des amorces :

- *PCR simplex :*

On visualise sur la PCR PLI3 des signaux au niveau du front de migration de l'électrophorèse, correspondant à un surplus d'amorces ou à des dimères d'amorces (amorces hybridées entre elles) qui ont migré (figure 31).

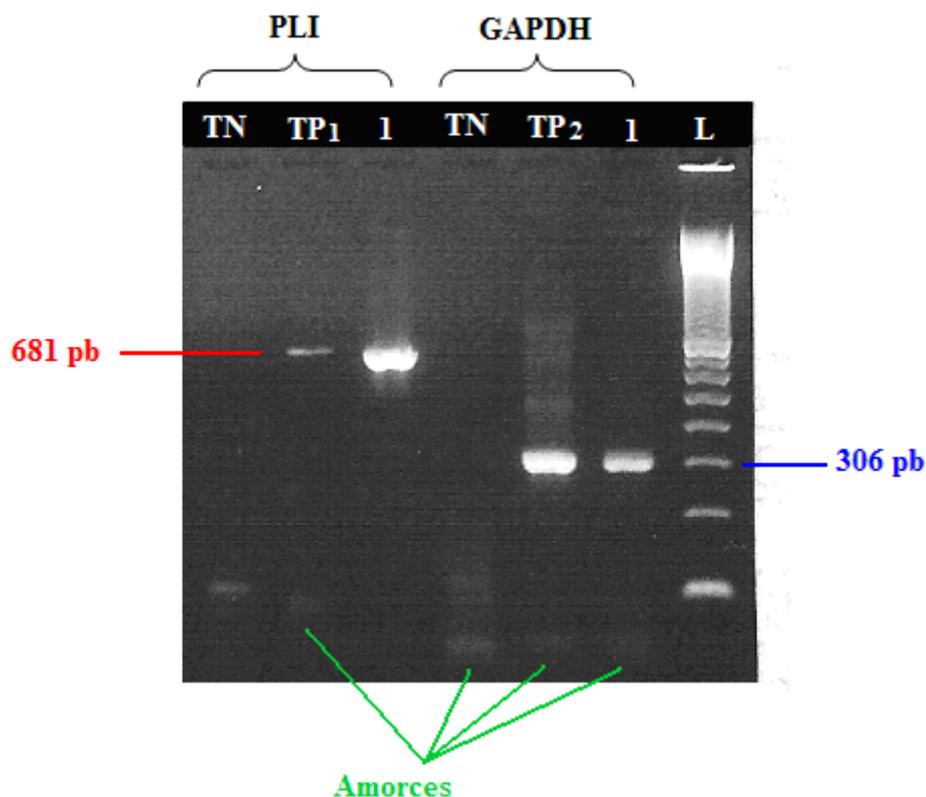


Figure 31 : Amorces du « mix » visibles à la révélation sur gel d'électrophorèse pour la PCR PLI3

[MgCL₂] 1 mM ; T_H 55°C ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%; [Amorces] 0,2 μM

TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100

TP1 : Témoin positif PCR PLI

TP2 : Témoin positif PCR GAPDH

1 : Echantillon 07/136

Les amorces peuvent être détectables car elles sont utilisées à des concentrations élevées de 0,2 μM à 0,4 μM par amorce et par tube, selon les PCR, et sont donc en surplus. Néanmoins, les traces restent faiblement visibles et ne gênent en rien la lecture des résultats.

- PCR duplex :

La concentration en amorces GAPDH est fixée à 0,2 μM et celle des amorces CPVp2 à 0,4 μM.

Afin d'éviter la compétition entre l'amplification du gène viral FPV et l'amplification du gène endogène GAPDH, il semble nécessaire d'établir une concentration en amorces CPVp2 plus élevée que celle des amorces GAPDH, pour favoriser l'amplification de l'ADN viral, principale cible recherchée.

On remarque que sur la plupart des PCR duplex le signal obtenu à 681 pb est plus fort par rapport à celui obtenu à 306 pb.

La compétition entre les amorces est bien visible sur la PCR duplex PLI5 (figure 28). En effet, on observe que plus le signal à 681 pb est fort, plus celui à 306 pb est faible, et des bandes non spécifiques correspondant probablement à des dimères d'amorces sont retrouvées en bas du gel (entre 100 et 200 pb).

Nous n'avons cependant pas testé la PCR duplex avec une concentration plus faible en amorces CPVp2, étant donné que les deux signaux restent tout de même bien visibles et que cela n'affecte pas la lecture définitive des résultats.

L'optimisation de la PCR duplex est plus délicate que celle de la PCR simplex, mais son utilisation représente un intérêt certain dans la simplification de la méthode et le coût de la PCR.

3. Caractéristiques du test

❖ Sensibilité :

La sensibilité des tests PCR dépend de plusieurs paramètres :

- la qualité de l'extraction : cette étape ne doit pas être négligée sous peine de diminuer la sensibilité intrinsèque du test par l'obtention de faux-négatifs.

L'utilisation du contrôle interne GAPDH a permis de vérifier son bon fonctionnement.

- les conditions de l'amplification sont elles aussi essentielles : elles sont optimisées par un nombre de cycles d'amplification élevé fixé à 50 et par la présence du contrôle interne GAPDH nous assurant de l'absence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les « mix ».

- les limites de détection de la PCR PLI n'ont pas réellement été déterminées, une seule dilution au 1/10^e dans de l'eau stérile du vaccin FELIGEN® CRP a été réalisée et a donné un résultat plus faible mais encore visible (figure 32).

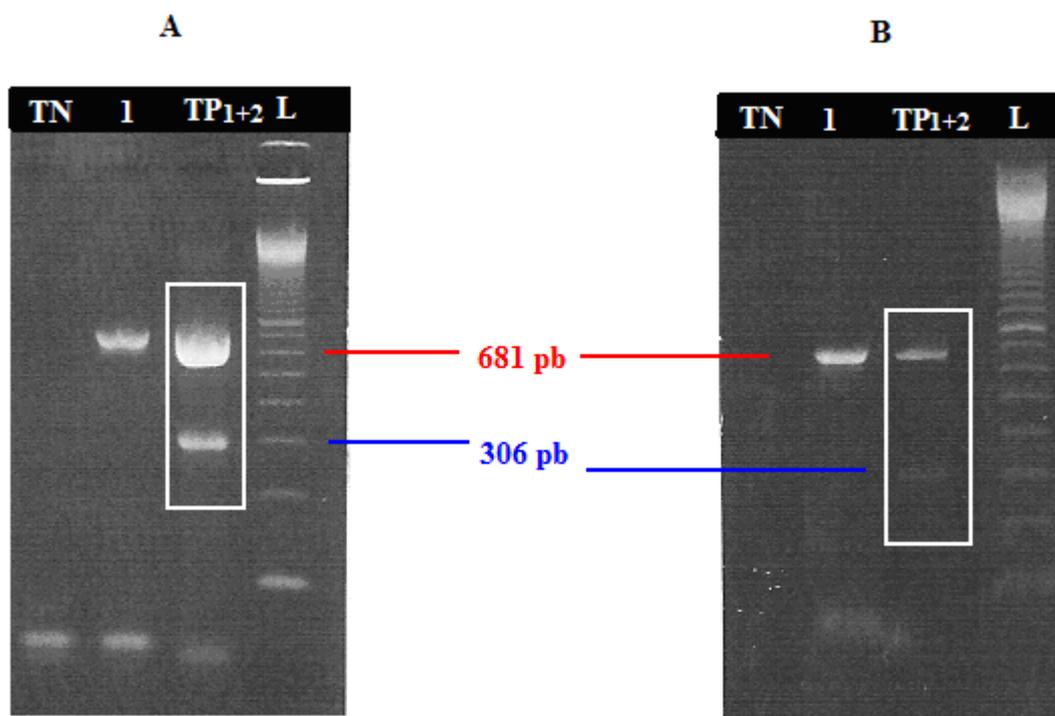


Figure 32 : Résultats de la PCR PLI sur un échantillon de fèces de chat suspect de parvovirose (A), et essai après dilution au 1/10^e du témoin positif (B) [MgCL₂] 1,5 mM ; T_H 55°c ; 50 cycles; gel d'agarose 1,5%

TN : Témoin négatif ; L : Ladder 100
 TP1+2 : Témoin positif PLI/GAPDH
 1: Echantillon 07/1485

Cependant, aucun autre test n'a été réalisé pour comparer la sensibilité du test PCR PLI avec celle des tests diagnostiques disponibles en pratique aujourd'hui.

D'après de nombreuses études, la PCR reste néanmoins une méthode de diagnostic très sensible : lors de l'étude réalisée par VOLLMER H. (89) sur le diagnostic PCR des souches de CPV chez le chien, l'auteur utilise les amorces CPVp2 pour détecter la souche CPV2, et montre qu'aucun animal détecté CPV2 positif avec les tests d'immunochromatographie et les tests sérologiques n'a été détecté négatif avec la PCR.

❖ Spécificité :

La spécificité du test dépend totalement du choix des amorces et donc de leur capacité à s'hybrider à la séquence cible.

Dans l'étude de PEREIRA *et al.* (61), les amorces P2 (appelées CPVp2 dans notre étude), sont capables de s'hybrider avec l'ADN du gène de la protéine de capsid VP2 de la souche CPV2 autant qu'avec celui de la souche FPV.

La souche CPV2 n'est pas capable de se répliquer chez le chat (36, 53, 81), un résultat positif sur des fèces de chats avec la PCR PLI devrait donc être le signe d'une infection par le FPV, d'autant plus que la souche CPV2 a presque disparue car elle a été remplacée par de nouveaux variants (figure 33).

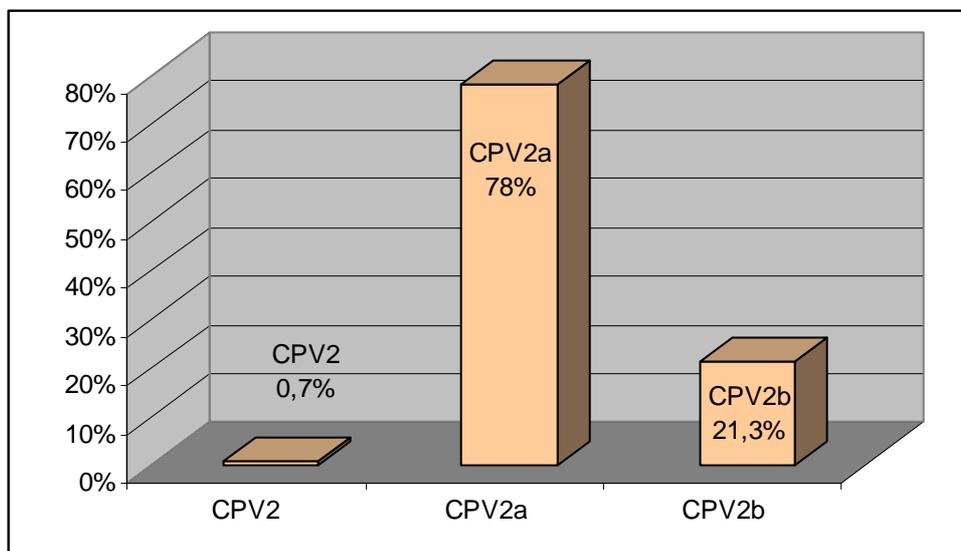


Figure 33 : Proportions des types de parvovirus canin en France entre 1986 et 1997, d'après (25).

Or ces nouveaux variants CPV2a et CPV2b sont capables de se répliquer chez le chat et dans certains cas de provoquer une maladie similaire à la panleucopénie (36, 53, 84, 81, 46).

L'étude de VOLLMER H. (89) a montré que les amorces CPVp2 que nous utilisons n'amplifient pas la souche CPV2b, mais aucune souche de CPV2a n'était disponible durant l'étude aussi la possibilité d'hybridation des amorces CPVp2 avec cette souche n'a pas été testée.

Cependant, la séquence du gène VP2 ciblé par les amorces CPVp2 diffère de 5 nucléotides entre FPV et CPV2a (61), alors qu'elle ne diffère que de 2 nucléotides entre FPV et CPV2, et les amorces CPVp2 ne présentent pas de séquences complémentaires des séquences de l'ADN de CPV2a (LVD69, communication personnelle).

De plus, l'étude de VOLLMER H. (89) en 2005 montre que la souche CPV2b est dominante en France et qu'elle a suppléé la souche CPV2a (figure 34).

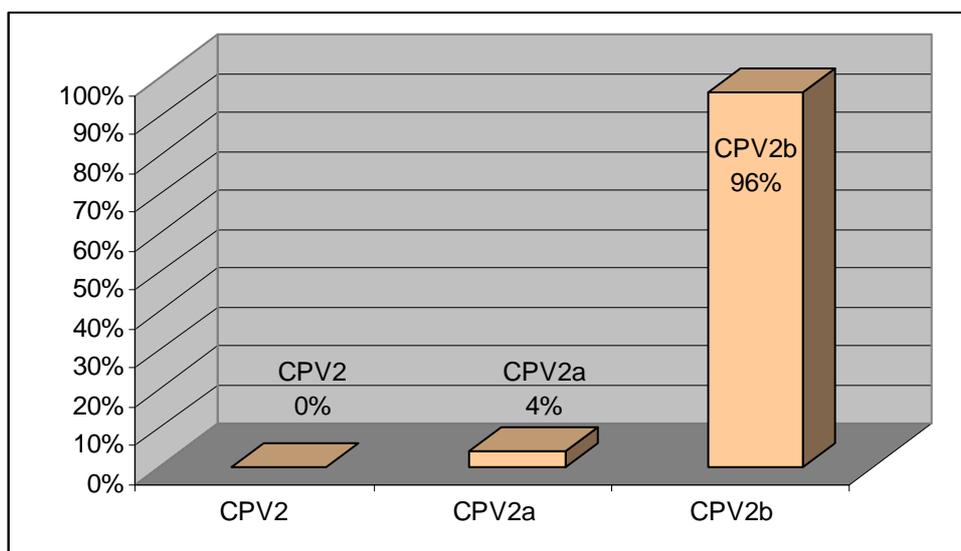


Figure 34 : Proportion des souches de CPV en France en 2004-2005 déterminée par PCR, d'après (89)

Enfin, un nouveau variant nommé CPV2c, isolé en Italie en 2001 et dispersé aujourd'hui en Europe, Asie, Amérique du Sud et récemment Etats-Unis (46), est capable de se répliquer dans l'espèce canine et dans l'espèce féline. Les amorces CPVp2 n'ont pas de séquences complémentaires de la séquence nucléotidique de CPV2c (LVD69, communication personnelle) : le couple d'amorces CPVp2 n'amplifie pas la souche CPV2c.

On peut donc conclure qu'un test PCR PLI positif révèle la présence exclusivement du FPV puisque les amorces CPVp2 ne s'hybrident pas à l'ADN du gène des protéines de capsid des souches CPV2a, CPV2b, et CPV2c.

❖ Limites de la PCR:

- **Contamination** : la source majeure est l'ADN amplifié (quantité énorme de produits amplifiés dans les tubes). La préparation du mélange réactionnel doit être réalisée dans une pièce différente.
- **Hybridation non spécifique** : le nombre d'hybridations non spécifiques diminue quand la stringence augmente, c'est-à-dire en diminuant la concentration en $MgCl_2$ ou en élevant la température d'hybridation.

Ces deux phénomènes peuvent être à l'origine de **faux-positifs**. Un témoin négatif est inclus dans les manipulations : il correspond au mélange réactionnel sans ADN et contrôle l'absence de contamination.

B. RESULTATS

1. Positivité des résultats

13 échantillons sur 14 se sont révélés positifs.

La prévalence de la panleucopénie reste faible aujourd'hui grâce à l'efficacité de la vaccination, et la grande proportion de positivité observée dans cette étude peut s'expliquer de plusieurs façons :

- un **biais dans le recrutement des échantillons** : ce sont des chats présentant un tableau clinique avec forte suspicion de panleucopénie et non des échantillons pris au hasard.

Le diagnostic de la panleucopénie féline est avant tout un diagnostic clinique (signes assez constants de diarrhée, vomissements et de déshydratation sévère), épidémiologique (âge, provenance de l'animal), et paraclinique avec une leucopénie très importante. Le prélèvement est souvent envoyé au laboratoire pour confirmer un diagnostic déjà fortement suspecté.

L'établissement du diagnostic de certitude d'une infection par le FPV est important car il entraîne d'une part la mise en place de mesures sanitaires complexes pendant une durée conséquente, et il permet au vétérinaire d'informer les propriétaires sur la dangerosité et la contagiosité de la maladie pour les congénères.

- le **faible nombre d'échantillons testés** dans cette étude ne peut pas refléter la prévalence de l'infection par le FPV en France, même si les échantillons proviennent de régions différentes.

- **l'interférence avec la vaccination** : sur 14 échantillons, le statut vaccinal n'est connu que sur 8 chats, dont 7 ne sont pas vaccinés.

L'échantillon 07/941 provient d'un chat vacciné contre la panleucopénie, mais nous ne possédons pas l'information sur le type du vaccin (vivant atténué ou inactivé).

Le test PCR est positif pour cet échantillon, et nous ne pouvons pas exclure totalement le fait que la souche FPV détectée par la PCR PLI5 (figure 28) ne soit une souche vaccinale. Néanmoins, plusieurs arguments sont en faveur d'une réelle positivité du test :

- le chaton est mort brutalement en quelques heures
- il vient d'une collectivité où 7 chatons sont morts depuis un mois avec des signes de panleucopénie ; et les deux autres échantillons testés (07/942 et 07/943) provenant de chats du même lieu sont également positifs.

Il serait intéressant, comme réalisé dans l'étude de HORIUCHI *et al.* au Japon (33), de mettre au point une technique couplant PCR et RFLP pour distinguer les souches vaccinales des souches virales de terrain. La technique de PCR quantitative, basée sur le fait que l'excrétion vaccinale est plus faible que l'excrétion virale d'un animal infecté, est également intéressante.

- enfin, un test PCR PLI positif peut correspondre à un chat **porteur du FPV et présentant des signes cliniques semblables à la panleucopénie** mais dus à une autre affection (31, 54, 77).

La PCR quantitative peut être informative mais des études épidémiologiques doivent être réalisées.

2. Négativité des résultats

Un seul résultat s'est révélé négatif sur les 14 échantillons : l'échantillon 07/217.

La présence du contrôle interne atteste qu'il ne s'agit pas d'un faux-négatif. Cependant, on ne peut pas conclure à 100% que le chat à l'origine du prélèvement n'est pas contaminé par le FVP, car l'excrétion du FPV dans les fèces peut être intermittente et un seul prélèvement rectal sur écouvillon peut ne pas être représentatif de l'excrétion virale.

En général, l'excrétion du virus dans les selles est concomitante des signes digestifs et les titres viraux excrétés sont importants (22). Dans ce cas l'écouvillon rectal a été réalisé chez un chat présentant de la diarrhée depuis 5 jours.

Cet échantillon est donc très probablement négatif.

Le parvovirus canin peut infecter le chat et provoquer des signes cliniques semblables à la panleucopénie (36, 53, 84, 81, 46) : au LVD69, il existe des tests de détection en espèce canine des souches CPV2a, CPV2b et CPV2c. Les échantillons de fèces provenant de chats suspects de panleucopénie et négatifs à la PCR PLI peuvent être soumis à un deuxième test PCR détectant ces souches de parvovirus canin.

3. Significativité des résultats

Le faible échantillonnage utilisé pour notre étude ne permet pas d'étudier l'épidémiologie et la sémiologie actuelle de la panleucopénie.

On peut cependant noter malgré des commémoratifs recueillis incomplets, que l'âge moyen des chatons à l'origine des prélèvements se situe entre 1 et 6 mois, que le signe clinique le plus récurrent est la présence de diarrhée (aucune donnée sur les analyses sanguines réalisées), qu'au moins 8 prélèvements sur 14 (données incomplètes) proviennent de lieux où l'effectif est supérieur ou égal à 4 chats, avec

plusieurs chatons atteints et dont au moins un succombe à la maladie quasi-systématiquement et rapidement (entre quelques heures à 2-3 jours).

VI. CONCLUSION DE LA PARTIE EXPERIMENTALE

La PCR PLI mise au point dans cette étude permet donc bien de diagnostiquer l'infection par le FPV chez le chat à partir de prélèvements de fèces.

La PCR représente aujourd'hui la méthode la plus sensible et la plus spécifique pour diagnostiquer avec certitude une infection virale, et elle est réalisée en moins de 48h, ce qui représente un avantage considérable pour les vétérinaires praticiens face à des maladies aussi contagieuses et dangereuses que la panleucopénie.

La PCR PLI, après le succès de son diagnostic FPV sur des échantillons de fèces, peut être testée sur d'autres types d'échantillons comme des échantillons sanguins, qui peuvent être utiles chez un animal dont les selles sont très liquides ou chez un animal sans défécation ; ou sur des échantillons prélevés post-mortem (intestins surtout, rate, ganglions lymphatiques), notamment dans le cas de la forme suraiguë de la panleucopénie qui est à l'origine de morts subites.

Suite à notre étude, il a semblé judicieux d'utiliser les tests de détection du parvovirus canin disponible pour l'espèce canine au LVD69 sur les échantillons de fèces de chats négatifs à la PCR PLI. Ce procédé mis en place permet à la fois de savoir si les signes cliniques de panleucopénie observés chez le chat à l'origine du prélèvement sont associés à la présence du parvovirus canin et de surveiller l'épidémiologie de ce virus dans l'espèce féline.

La prévalence de la panleucopénie est mal connue aujourd'hui, car les études se font plus rares étant donné le succès de la vaccination face à cette maladie. Cependant, elle n'est pas pour autant éradiquée et il serait intéressant grâce au test PCR de réaliser une étude épidémiologique sur un échantillonnage représentatif de la population féline en France.

CONCLUSION

La panleucopénie est apparue au début du siècle dernier, et après que le parvovirus félin ait été identifié, il a fait l'objet de nombreuses études étant donné l'extrême contagiosité et les taux de mortalité importants qui lui étaient associés. Aujourd'hui, la prévalence de la maladie est très bien contrôlée grâce à l'efficacité des vaccins utilisés.

La panleucopénie n'a pas pour autant disparu et il existe encore des foyers d'infection, surtout dans les collectivités et principalement les refuges où l'historique vaccinal des animaux accueillis est souvent méconnue.

Le diagnostic de cette maladie est, pour les vétérinaires praticiens, avant tout basé sur une suspicion clinique et épidémiologique. Cependant, un diagnostic de certitude semble tout aussi important en pratique afin de mettre en œuvre des mesures protectrices adaptées à la gravité et la contagiosité d'une telle infection.

La méthode PCR est plus sensible et spécifique que les tests d'immunomigration rapide ou les tests sérologiques, et son automatisation la rend réalisable en moins de 48 heures. Le test PCR mis au point dans cette étude pour détecter le parvovirus félin dans les fèces de chats présente donc un intérêt considérable.

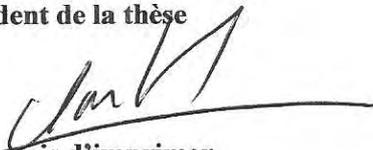
La protection vaccinale contre la panleucopénie est très efficace, et afin de réduire au maximum les foyers d'infection encore existants, il semble très important de rappeler systématiquement aux propriétaires de chats les risques liés à la maladie, et ainsi de les convaincre de respecter le protocole vaccinal, et cela jusqu'à la fin de la vie de l'animal.

L'existence aujourd'hui des souches de parvovirus canin CPV2a, 2b, et 2c, capables de se répliquer chez le chat et parfois d'entraîner une maladie semblable à la panleucopénie, a été prouvée. Même si les vaccins actuels contre le FPV semblent protéger les chats contre les infections à parvovirus canin, il semble important lors de symptômes évocateurs de panleucopénie, de rechercher par PCR la présence du CPV, et ainsi de surveiller l'adaptation de ces nouvelles souches et l'évolution de leur pouvoir pathogène chez le chat.

**Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
Lyon**



Le Président de la thèse



**Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 19 2 JAN. 2009**

**Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY**



**Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de**

LE DIRECTEUR

Stéphane MARTINOT



BIBLIOGRAPHIE

- (1) ADDIE D. D., THOMPSON H. (2004)
Feline panleucopenia/ Feline parvovirus infection. In Feline medicine and therapeutics. 3rd edition
Blackwell Publishing, (21) 571-575
- (2) AGBANDJE M., PARRISH C. R., ROSSMANN M. G. (1995)
The recognition of parvovirus capsid by antibodies
Seminars in Virology, 6, 219-231
- (3) AGBANDJE M., PARRISH C. R., ROSSMANN M. G. (1995)
The structure of parvoviruses
Seminars in Virology, 6, 299-309
- (4) AUGUST J. R. (2006)
Consultations in feline internal medicine, Vol. 5
Elsevier Saunders, 771p
- (5) BRION A., BERTRAND D. M. (1947)
Les maladies infectieuses du chat. Démembrement du typhus
Encyclop. Vét. Périod., Fasc. II « B et C », 123
- (6) BUONAVOGLIA C., MARSILIO F., TEMPESTA M., BUONAVOGLIA D., TISCAR P. G., CAVALLI A., COMPAGNUCCI M. (1993)
Use of a feline panleukopenia modified live virus vaccine in cats in the primary-stage of feline immunodeficiency virus infection
Journal of Vet. Med., 40 (5) 343-346
- (7) CARLSON J., RUSHLOW K., MAXWELL I., MAXWELL F., WINSTON S., HAHN W. (1985)
Cloning and sequence of DNA encoding structural proteins of the autonomous parvovirus feline panleukopenia virus
J Virol., 55 (3), 574-582
- (8) CARMICHAEL L. E., (2005)
An annotated historical account of canine parvovirus
Journal of Vet. Med., 52 (7-8) 303-311
- (9) CASTRO A. E., HEUSCHELE W. P. (1992)
Veterinary Diagnostic Virology. A practitioner's guide
Mosby Year Book, 285p

- (10) CAVE T. A., THOMPSON H., REID S. W., HODGSON D. R., ADDIE D. D. (2002)
Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000)
Vet. Rec., 151 (17) 497-501
- (11) CHANG S. F., SGRO J. Y., PARRISH C. R. (1992)
Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties.
J Virol., 66 (12), 6858–6867
- (12) CLEMENS D. L., CARLSON J. O. (1989)
Regulated expression of the feline panleukopenia virus P38 promoter on extrachromosomal FPV/EBV chimeric plasmids
J. Virol., 63 (6) 2737–2745
- (13) COUTURIER J. (2004)
Index thérapeutique en gastroentérologie des carnivores domestiques
Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 141p
- (14) CSIZA K., DE LAHUNTA A., SCOTT F. W., GILLESPIE J. H. (1971)
Pathogenesis of Feline Panleukopenia Virus in susceptible newborn kittens. II. Pathology and immunofluorescence
Infect. Immun., 3(6) 838–846
- (15) DAI WANG, PARRISH C. R. (1999)
A heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-related protein binds to single-stranded DNA near the 5' end or within the genome of feline parvovirus and can modify virus replication
J Virol., 73 (9), 7761-7768
- (16) DAWSON S., WILLOUGHBY K., GASKELL R. M., WOOD G. and CHALMERS W. S. K. (2001)
A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens
J. Feline Med. Surg., 3 (1) 17-22
- (17) DECARO N., DESARIO C., LUCENTE M. S., AMORISCO F., CAMPOLO M., ELIA G., CAVALLI A., MARTELLA V., BUONAVOGLIA C. (2008)
Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvoviruses using minor groove binder probes
J. Virol. Methods., 147 (1) 67-71

- (18) DE MARI K., MAYNARD L., EUN H. M., LEBREUX B. (2003)
Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial
The Veterinary Record, 152 (4) 105-108
- (19) DOERIG C., HIRT B., BEARD P., ANTINIETTI J.-P. (1988)
Minute Virus of Mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter
J. Gen. Virol., 69, 2563-2573
- (20) DURIEZ J. L. (1974)
Les viroses du chat, la leucopénie infectieuse feline.
Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 125p
- (21) FERREOL R. (page consultée le 3 novembre 2008)
Encyclopédie des formes remarquables, courbes, surfaces, fractals, polyèdres.
www.mathcurve.com
- (22) FLEURY H. J. A. (2002)
Virologie humaine, 4^e Ed.
Elsevier Masson, Coll. Abrégés connaissances et pratique, 264p
- (23) FOLLIOT C. (2003)
Affections digestives nécessitant l'emploi de médicaments humains chez les carnivores domestiques
Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 138p
- (24) GAMOH K. *et al.* (2005)
Efficacy of an inactivated feline panleucopenia virus vaccine against a canine parvovirus isolated from a domestic cat
The Veterinary Record, 157 (10) 285-287
- (25) GANIERE J. P. *et al.* (2000)
Identification des types de parvovirus canin circulant en France
Red. Méd. Vét., 151 (1) 43-46
- (26) GASKELL R. M., RADFORD A. D., DAWSON S. (2004)
Vaccination. In Feline Medicine and Therapeutics, 3rd Ed., Chap. 2
Blackwell Publishing, (13-18) 724 p
- (27) GOVINDASAMY L., HUEFFER K., PARRISH C. R., AGBANDJE M. (2003)
Structures of host range-controlling regions of capsids of canine and feline parvoviruses and mutants
J Virol., 77 (22), 12211-12221

(28) GREENE C. E., ADDIE D. D. (2006)

Feline panleukopenia. Infectious diseases of the dog and cat, 3rd Ed.

Ed. C.E. Greene, W.B. Saunders Compagny, 1387 pages

(29) GUTHMANN J. - F., pour le Ministre de l'agriculture et de la forêt et par délégation (page consultée le 16 décembre 2008)

Arrêté du 2 août 1990 fixant les critères d'établissement d'un diagnostic de suspicion pour les maladies du chien et du chat visées à l'article 285-1 du code rural, version consolidée au 21 septembre 2000

www.legifrance.gouv.fr

(30) HAMMON W. D., ENDERS J. F. (1939)

A virus disease of cats, principally characterized by aleucocytosis, enteritis lesions and the presence of intranuclear inclusion body

J. Exp.Med., (69) 327

(31) HEBERT F. (2006)

Guide pratique de médecine interne canine et feline, 2^{ème} Ed.

Editions Med'Com, 576 p

(32) HORIUCHI M., YAMAGUCHI Y., GOJOBORI T., MOCHIZUKI M., NAGASAWA H., TOYODA Y., ISHIGURO N., SHINAGAWA N., (1998)

Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus

Virology, 249, 440-452

(33) HORIUCHI M., YURI K., SOMA T., KATAE H., NAGASAWA H., SHINAGAWA M. (1996)

Differentiation of vaccine virus from field isolates of feline panleukopenia virus by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis

Veterinary microbiology, 53 (3-4) 283-293

(34) HORZINEK M. C. (2006)

Vaccine use and disease prevalence in dogs and cats

Veterinary Microbiology, 117 (2-8)

(35) HUEFFER K., GOVINDASAMY L., AGBANDJE M., PARRISH C. R. (2003)

Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses

J Virol., 77 (18), 10099-10105

- (36) HUEFFER K., PARRISH R. C. (2003)
Parvovirus host range, cell tropism and evolution
Current Opinion in Microbiology, 6, 392-398
- (37) HU L., ESPOSITO J. J., SCOTT F. W. (1996)
Raccoon poxvirus feline panleukopenia virus VP2 recombinant protects cats against FPV challenge
Virology, 218, 248-252
- (38) IKEDA Y., MIYAZAWA T., KUROSAWA K., NAITO R., HATAMA S., KAI C., MIKAMI T. (1998)
New quantitative methods for detection of feline parvovirus (FPV) and virus neutralizing antibody against FPV using a feline T lymphoid cell line
J. Vet. Med. Sci., 60 (8) 973-974
- (39) IKEDA Y., MOCHIZUKI M., NAITO R., NAKAMURA K., MIYAZAWA T., MIKAMI T., TAKAHASHI E. (2000)
Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats
Virology, 278 (1) 13-19
- (40) JOHNSON R. H. (1964)
Isolation of a virus from a condition simulating feline panleucopenia in a leopard
Vet. Rec., (76) 1008-1023
- (41) JOHNSON R. H. (1965)
Feline panleucopenia.
I. Identification of a virus associated with the syndrome. II. Some features of the cytopathic effects in feline kidney monolayers.
Res. Vet. Sci., (6) 466-481
- (42) JOHNSON R. H. (1967)
Feline panleucopenia virus. *In vitro* comparison of strains with a mink enteritis virus.
J. Small anim. Pract., (8) 319-324
- (43) JOHNSON R. H. (1969)
Feline panleucopenia
Vet. Rec., (84) 338-340
- (44) JOHNSON R. H., MARGOLIS G., KILHAM L. (1967)
Identity of feline ataxia virus with feline panleucopenia virus
Nature, (214) 175-177

(45) JUN TSAO, CHAPMAN M. S., AGBANDJE M., KELLER W., SMITH K., HAO WU, MING LUO, SMITH T. J., ROSSMANN M. G., COMPANS R. W., PARRISH C. R. (1991)

The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications

Science, 251 (5000), 1456-1464

(46) KAPIL S. *et al.* (2007)

Notes (JCM01300-07, Version 2): Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American Dogs: 2006-2007

J. Clin. Microbiol., 12p

(47) LAWRENCE J. S., SYVERTON J. T. (1932)

Spontaneous agranulocytosis in the cat

Proc. Exp. Biol. Med., (38) 914

(48) LEPRAT R. (1973)

Contribution à l'étude de l'étiologie de la panleucopénie feline (typhus du chat)

Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 107p

(49) LUTZ H., CASTELLI I., EHRENSPERGER F., POSPISCHIL A., ROSSKOPF M., SIEGL G., GROB M., MARTINOD S. (1995)

Panleukopenia-like syndrome of FeLV caused by co-infection with FeLV and feline panleukopenia virus

Veterinary immunology and immunopathology, 46 (1-2) 21-33

(50) Members of the European Advisory Board on Cat Diseases (2006)

ABCD guidelines on feline panleukopenia virus

ABCD guidelines (www.abcd-vets.org), 15p

(51) MARTIN V., NAJBAR W., GUEGUEN S., GROUSSON D., EUN H. M., LEBREUX B., AUBERT A. (2002)

Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial

Veterinary microbiology, 89 (2-3) 115-127

(52) MARTYN J. C., DAVIDSON B. E., STUDDERT M. J. (1990)

Nucleotide sequence of feline panleukopenia virus: comparison with canine parvovirus identifies host-specific differences

J. Gen. Virol., 71, 2747-2753

- (53) MOCHIZUKI M., HORIUCHI M., HIRAGI H., SAN GABRIEL M. C., YASUDA N., UNO T. (1996)
Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia
J. Clin. Microbiol., 34 (9) 2101-2105
- (54) MORAILLON R., LEGEAY Y., BOUSSARIE D. (2007)
Dictionnaire pratique de thérapeutique chien, chat et NAC, 6^{ème} Ed.
Elsevier Masson, 913 p
- (55) NAKAMURA K., IKEDA Y., MIYAZAWA T., TOHYA Y., TAKAHASHI E., MOCHIZUKI M. (2001)
Characterisation of cross-reactivity of virus neutralising antibodies induced by feline panleukopenia virus and canine parvoviruses
Res. Vet. Sci., 71(3) 219-22
- (56) NEUERER F., HORLACHER K., TRUYEN U., HARTMANN K. F. (2008)
Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats
J. Feline Med. Surg., 10 (3) 247- 251
- (57) NORSWORTHY G. D., CRYSTAL M. A., GRACE S. F., TILLEY L. P., (2006)
Panleukopenia (Feline Parvovirus Infection). In The Feline Patient, 3rd Ed.
Blackwell Publishing, 776p
- (58) PALTRINIERI S., CRIPPA A., COMERIO T., ANGIOLETTI A., ROCCABIANCA P., (2007)
Evaluation of inflammation and immunity in cats with spontaneous parvovirus infection: consequences of recombinant feline interferon ω administration
Vet. Immunology and Immunopathology, 118, 68-74
- (59) PARRISH C. R. (1995)
Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus
Ballière's Clinical Haematology ,8 (1) 57-71
- (60) PARRISH C. R. (1999)
Host range relationships and the evolution of canine parvovirus
Vet. Microbiol., 69 (1-2) 29-40
- (61) PEREIRA C. A., MONEZI T. A., MEHNERT D. U., D'ANGELO M., DURIGON E. L. (2000)
Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay
Vet. Microbiol., 75 (2) 127-133

- (62) PETIT S. (2005)
Dictionnaire des médicaments vétérinaires et des produits de santé animale (DMV) commercialisés en France, 13^{ème} édition
Les Editions du Point vétérinaire, Maison-Alfort, 1765 pages
- (63) POLLOCK R. V. H., POSTORINO M. C. (1994)
Feline panleukopenia and other enteric viral diseases
The Cat. Diseases and clinical management, 2nd Ed.
Ed. R. G. Sherding, Churchill Livingstone, N. Y., 479-487
- (64) REED A. P., JONES E. V., MILLER T. J. (1988)
Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus
J Virol., 62 (1), 266-276
- (65) REICHEL J., MUMMA E. W. (1913)
A paracolonic infection of cats
Amer. Vet. Rev., (43) 514
- (66) RIMMELZWAAN G. F., VAN DER HEIJDEN R. W. J., TIJHAAR E., POELEN M. C. M., CARLSON J., OSTERHAUS A. D. M. E., UYTDEHAAG F. G. C. M. (1990)
Establishment and characterization of canine parvovirus-specific murine CD4⁺ T cell clones and their use for the delineation of T cell epitopes
Journal of general virology, 71 (5) 1095-1102
- (67) ROHOVSKY M. W., GRIESEMER R. A. (1967)
Experimental feline infectious enteritis in the germ-free cat
Path. Vet., (4) 391-410
- (68) SCHUNCK B., KRAFT W., TRUYEN U. (1995)
A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces
Journal of virological methods, 55 (3) 427-433
- (69) SCOTT F. W., GEISSINGER C. M. (1999)
Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine
Am. J. Vet. Res., 60 (5) 652-658
- (70) SEDLIK C., DADAGLIO G., SARON M. F., DERIAUD E., ROJAS M., CASAL S. I., LECLERC C. (2000)
In vivo induction of a high-avidity, high-frequency cytotoxic T-lymphocyte response is associated with antiviral protective immunity
J. Virol., 74 (13) 5769-5775

(71) SEGALINI V. (2007)

Le colostrum des carnivores domestiques

Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 127p

(72) SEIGNEURIN J-M, MORAND P. (1997)

Virologie moléculaire médicale. Ed. Médicales Internationales

Lavoisier Tec And Doc, 486p

(73) SENDA M., YAMAMOTO H., HIRAYAMA N., ITOH O. (1988)

Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity

J. Gen. Virol., (69) 349-354

(74) SERVONNET M. (1999)

Loi du 22 juin 1989: quatre maladies infectieuses félines, nouveaux vices rédhibitoires

Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes, 69p

(75) SIMPSON A. A., CHANDRASEKAR V., HEBERT B., SULLIVAN G. M., ROSSMANN M. G. PARRISH C. R. (2000)

Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses

J. Biol. Mol., 300, 597-610

(76) STEINEL A., PARRISH C. R., BLOOM M. E. TRUYEN U. (2001)

Parvovirus infections in wild carnivores

Journal of Wildlife Diseases, 37 (3), 594-607

(77) STURGESS K. (2003)

Feline parvovirus (FPV). Notes on feline internal medicine.

Blackwell Science Ltd, 286-290

(78) TAGU D., MOUSSARD C. (2003)

Principes des techniques de biologie moléculaire, 2nd Ed. revue et augmentée

INRA Editions, 176 p

(79) THIRY E. (2002)

Panleucopénie féline. Virologie clinique du chien et du chat

Ed. du Point Vétérinaire, 202p

(80) TRUYEN U., PARRISH C. R. (1992)

Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo

J. Virol., 66 (9), 5399-5408

- (81) TRUYEN U., EVERMANN J. F., VIELER E., PARRISH C. R. (1996)
Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range
Virology, 215 (2) 186-189
- (82) TRUYEN U., PARRISH C. R., HARDER T. C., KAADEN O.-R. (1995)
There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases
Veterinary microbiology, 43 (2-3) 103-122
- (83) TRUYEN U., GEISLER K., PARRISH C. R., HERMANNNS W., SIEGL G. (1998)
No evidence for a role of modified live virus vaccine in the emergence of canine parvovirus
J. Gen. Virol., 79 (5) 1153-1158
- (84) TRUYEN U., GRUENBERG A., CHANG S. F., OBERMAIER B., VEIJALAINEN P., PARRISH C. R. (1995)
Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo
J. Virol., 69 (8), 4702-4710
- (85) URBAIN A., NOUVEL J. (1950)
Un cas de leucopénie infectieuse chez une panthère
Bull. Acad. Vét. France, (23) 271
- (86) UTTENTHAL A., LUND E., HANSEN M. (1999)
Mink enteritis parvovirus: stability of virus kept under outdoor conditions
APMIS, 107 (3) 353-358
- (87) VEIJALAINEN P. M., SMEDS E. (1988)
Pathogenesis of blue fox parvovirus on blue fox kits and pregnant vixens
Am. J. Vet. Res., 49 (11) 1941-1944
- (88) VERGE J., CRISTOFORINI N. (1928)
La gastro-entérite infectieuse des chats est-elle due à un virus filtrable?
C. R. Soc. Biol., (99) 312
- (89) VOLLMER H. (2005)
Parvovirose canine: étude épidémiologique et diagnostic moléculaire
Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 260p
- (90) WEICHERT W. S., PARKER J. S. L., WAHID A. T. M., CHANG S.-F., MEIER E., PARRISH C. R. (1998)
Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection
Virology, 250 (1) 106-117

Annexes

ANNEXE 1 : Tableau récapitulatif des commémoratifs et des résultats PCR des animaux testés

DP	N° échant.	Sexe	Race	Age	Vaccin	Evolution	Anamnèse	PCR PLI
12.10.07	07/1485	M	Européen	1 mois	N	7 jours	Di, H, MB, tous les chatons d'une portée	+
06.09.07	07/1244	?	Européen	2 mois	N	3 jours	Di, H, anorexie, collectivité	+
24.07.07	07/1022	M	Européen	3 mois	N	4-5 jours	Di, Vo, MB, collectivité	+
05.07.07	07/941	?	?	?	O	?	Prélèvement sur animaux sains, en contact avec un malade : Di, MB sur 7 chats depuis 1 mois, collectivité	+
	07/942	M	Européen	2 mois	N	?		+
	07/943	?	?	?	?	?		+
06.02.07	07/217	M	Européen	1,5 an	N	5 jours	Di, MB, Vo, abattement, collectivité	-
25.01.07	07/136	M	Européen	7 ans	N	2 jours	MB de 4 chats en 48h, collectivité	+
14.02.06	06/92	M	?	1,5 mois	?	< 5 jours	Di, Vo, mort	+
23.01.06	06/907	F	Européen	6 mois	N	< 5 jours	MB, collectivité	+

DP: Date de prélèvement ; ? : donnée non recueillie

Di: Diarrhée ; **H:** Hyperthermie

Vaccin: vacciné contre la panleucopénie, **O** : Oui, **N** : Non

MB: Mort brutale

Vo: Vomissements

Collectivité: à partir d'un effectif ≥ 4 chats

ANNEXE 2 : Matériel et réactifs utilisés pour la réalisation de la PCR PLI

1. Matériel et réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN :

- Le kit *NucleoSpin® Blood Quick Pure* (Macherey-Nagel) permet la réalisation de 50 extractions et comprend :
 - 12,5 mL de tampon BQ1
 - 7 mL de tampon BQ2
 - 13 mL de tampon BE (tampon d'élution)
 - 30 mg de Protéinase K présentée sous forme lyophilisée
- Kit *QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen) permet la réalisation de 50 extractions et comprend :
 - 12 mL de tampon AL
 - 19 mL de tampon AW1 concentré
 - 13 mL de tampon AW2 concentré
 - 22 mL de tampon d'élution AE
 - 1,25 mL de Protéinase K

2. Réactifs utilisés pour la préparation du mélange réactionnel :

- *REDTaq™ DNA polymerase without MgCl₂*, SIGMA® contenant:
 - RED Taq DNA Polymerase 1 U/μl: mélange de la Taq Polymérase avec un colorant rouge inerte, qui permet de s'assurer que l'enzyme a bien été ajoutée dans chaque tube et qui constitue également un marqueur du front de migration.
 - Tampon PCR 10x
 - MgCl₂ 25 mM
- *dNTP Set, 100 mM Solutions*, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®, contenant:
 - 100 mM de dATP (2'-déoxyadénosine 5'-triphosphate)
 - 100 mM de dGTP (2'-déoxyguanosine 5'-triphosphate)
 - 100 mM de dCTP (2'-déoxycytidine 5'-triphosphate)
 - 100 mM de dTTP (2'-déoxythymidine 5'-triphosphate)
- *Amorces*, EUROGENTEC®
- *Eau ultra pure et sterile*, AGUETTANT®

3. Réactifs utilisés pour l'électrophorèse :

- *100 Base Pair Ladder*, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH® , tube de 100 µL
- *Agar*, SIGMA®, sous forme de poudre
- *TBE 10x* (Tris Borate EDTA), EUROMEDEX®
- « Lester » : *Glycérol*, SIGMA®
- Marqueurs de front de migration :
 - *Bleu de bromophénol*, SIGMA®, pot de 5 g de poudre
 - *Bromure d'éthidium*, SIGMA®, solution 10 mg/mL

ANNEXE 3 : Modalités de préparation des réactifs de la PCR PLI

1. Préparation des réactifs pour l'extraction de l'ADN :

- Utilisation du Kit *NucleoSpin® Blood Quick Pure* :
 - *Tampon d'éluion BE* : ajouter 28ml d'éthanol à la solution concentrée fournie
 - *Protéinase K* : ajouter 1,35 mL de tampon au 30 mg de protéinase K fournis
- Utilisation du Kit *QIAmp® DNA Minikit* :
 - *Tampon AW1* : ajouter 25 mL d'éthanol absolu aux 19 mL de la solution concentrée fournie
 - *Tampon AW2* : ajouter 30 mL d'éthanol absolu aux 13 mL de la solution concentrée fournie

2. Préparation des réactifs pour la PCR :

- *Les amorces* : livrées lyophilisées, elles sont remises en suspension dans de l'eau ultra pure stérile. On obtient une solution mère à 0,5 mM, puis une solution fille à 10 μ M en réalisant une dilution au 1/50^{ème} (2 μ L de la solution mère dans 98 μ L d'eau).
- *Les dNTPs* : une solution fille à 10 mM est préparée à partir d'une solution mère à 100 mM (dilution au 1/10^{ème} : 50 μ L de la solution mère dilués dans 300 μ L d'eau).

3. Préparation des réactifs pour l'électrophorèse :

- *Solution de TBE à 0,5x* : on réalise une dilution au 1/20^{ème} à partir de la solution mère concentrée 10 fois (10x). 25 mL de la solution mère sont dilués dans 475 mL d'eau.
- *Tampon de migration* : 25 μ L de la solution mère de bromure d'éthidium (BET) à 10 mg/mL sont ajoutés à 500 mL de la solution de TBE 0,5x. On obtient la solution de TBE à 0,5x + BET 0,5 μ g/mL.
- *Tampon de charge type III* :
 - Bleu de bromophénol, SIGMA®, pot de 5 g de poudre

- Bromure d'éthidium, SIGMA®, 10 mg/mL

Le bleu de bromophénol est un **marqueur du front de migration**.

Le glycérol « alourdit » l'ADN et empêche sa dissolution dans le tampon de migration : on parle de « **lester** ».

Pour obtenir 20 mL de tampon de charge, il faut mélanger :

- 50 mg de bleu de bromophénol,

- 6 mL de glycérol,

Et compléter à 20 mL avec de l'eau.

- *Ladder 100* : solution initiale à 1 µg/µL dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM d'EDTA) à pH 7,5. Une solution de travail à 0,1 µg/µL est préparée en diluant au 1/10^{ème}, et il faut mélanger :

- 13 µL de la solution mère

- 22 µL du tampon de charge III

- 95 µL d'eau stérile

Le volume total de 130 µL est réparti dans 4 tubes Eppendorf (32,5 µL/tube).

ANNEXE 4 : Protocole d'extraction avec le kit *NucleoSpin® Blood Quick Pure*

Le protocole d'extraction de l'ADN à partir des souches vaccinale et grâce au kit *NucleoSpin® Blood Quick Pure* nécessite 4 étapes successives :

- ***Etape 1 : la lyse cellulaire.***

Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL :

- déposer 200 µL de l'échantillon
- ajouter 25 µL de protéinase K
- ajouter 200 µL de tampon BQ1

→ Agiter fortement le mélange pendant 10 secondes, puis incubé pendant 10 à 15 minutes à 70°C.

- ***Etape 2 : l'adsorption sur colonne.***

Préalablement, 200 µL d'éthanol absolu (96-100%) sont ajoutés au mélange, puis l'ensemble est homogénéisé au vortex pendant 10 à 15 secondes. Ensuite :

- placer la colonne dans un tube collecteur
- déposer le mélange précédent sur la colonne
- centrifuger 1 mn à 11000g
- éliminer l'éluate et le tube collecteur

- ***Etape 3 : les lavages.***

La colonne doit être placée sur un tube collecteur neuf, et :

- ajouter 350 µL de tampon BQ2
- centrifuger de nouveau 1 mn à 11000g
- éliminer l'éluate et le tube collecteur

- ***Etape 4 : l'élution.***

Afin de mettre en solution l'ADN purifié, il faut :

- placer la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 mL
- ajouter 50 µL de tampon BE préalablement chauffé à 70°C
- laisser incubé 1 mn à température ambiante
- centrifuger 1 mn à 11000g

ANNEXE 5 : Protocole d'extraction avec le kit QIAmp® DNA Minikit

Le protocole d'extraction de l'ADN à partir des écouvillons rectaux et grâce au kit QIAmp® DNA Minikit nécessite 4 étapes successives :

Allumer le Thermoblock à 56°C.

- **Etape 1 : la lyse cellulaire.**

Traitement des écouvillons de fèces : l'extrémité de l'écouvillon est coupée et déposée dans un tube Eppendorf de 2 mL, et à cela est ajouté :

- 200 µL d'eau stérile
- le tampon de lyse AL (200 µL) et la protéinase K (20 µL)

→ Le mélange est vortexé puis incubé à température ambiante pendant 5 minutes, l'écouvillon est pressé contre les parois avec une pince et retiré.

On agite de nouveau le mélange 10 secondes au vortex puis on laisse incuber 10 à 15 minutes à 56°C. L'ensemble est ensuite centrifugé.

- **Etape 2 : l'adsorption sur colonne.**

Préalablement, 200 µL d'éthanol absolu (96-100%) sont ajoutés au mélange, puis l'ensemble est homogénéisé au vortex pendant 15 secondes et brièvement centrifugé. Ensuite :

- placer la colonne dans un tube collecteur
- déposer le mélange précédent sur la colonne
- centrifuger 1 mn à 6000g
- éliminer l'éluât et le tube collecteur

→ A la fin de cette étape l'ADN est extrait, il faut maintenant le purifier.

- **Etape 3 : les lavages.**

La colonne doit être placée sur un tube collecteur neuf, et :

- ajouter 500 µL de tampon AW1
- centrifuger 1 mn à 6000g
- éliminer l'éluât, changer de tube collecteur, et ajouter cette fois 500 µL de tampon AW2
- centrifuger 3 mn à 20000g
- jeter l'éluât et placer la colonne sur un tube collecteur neuf
- centrifuger une dernière fois à 6000g pendant 1 mn, jeter le tube collecteur.

- *Etape 4 : l'élu*

Afin de mettre en solution l'ADN purifié, il faut :

- placer la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 mL
- ajouter 200 µL de tampon d'élu
- laisser incuber 1 mn à température ambiante : l'ADN extrait se solubilise
- centrifuger 1 mn à 6000g

→ L'extrait final sera conservé à -20°C.

ALCARAZ Céline

La panleucopénie féline: données actuelles et diagnostic moléculaire

Thèse Vétérinaire : Lyon , le 30 janvier 2009

RESUME :

La panleucopénie est une maladie très contagieuse et potentiellement mortelle s'exprimant par une gastro-entérite aiguë associée à une leucopénie, ou par une ataxie chez des chatons nés d'une mère contaminée. L'agent responsable, le FPV, est un parvovirus et il est extrêmement résistant dans l'environnement. La panleucopénie est aujourd'hui contrôlée grâce à la vaccination, mais il existe encore des foyers d'infection, notamment dans les collectivités.

Le test PCR mis au point dans cette étude permet de détecter le FPV dans les fèces de chats, et correspond donc à un outil de diagnostic de certitude indispensable aux praticiens pour prendre des mesures adaptées face à cette maladie dont la contagiosité et le taux de mortalité restent très élevés.

MOTS CLES :

- **Panleucopénie**
- **Diagnostic**
- **PCR**
- **Typhus**

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur GHARIB
1er Assesseur :	Madame le Professeur GRAIN
2ème Assesseur :	Madame le Professeur LAMBERT

DATE DE SOUTENANCE :

30 janvier 2009

ADRESSE DE L'AUTEUR :

7 rue Carnot
69500 BRON