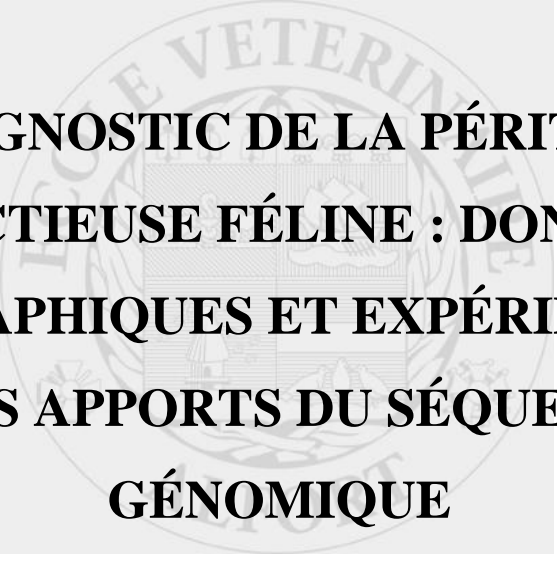


Année 2012



**LE DIAGNOSTIC DE LA PÉRITONITE  
INFECTIEUSE FÉLINE : DONNÉES  
BIBLIOGRAPHIQUES ET EXPÉRIMENTALES  
SUR LES APPORTS DU SÉQUENÇAGE  
GÉNOMIQUE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le.....

par

**Flora TOMAS**

Née le 4 octobre 1987 à Dreux (Eure-et-Loire)

JURY

**Président : Pr**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL**

**Membres**

**Directeur : Mme Sophie LE PODER**

**Maître de conférences à l'ENVA**

**Assesseur : Mme Christelle MAUREY-GUENEC**

**Maître de conférences à l'ENVA**



# **LE DIAGNOSTIC DE LA PÉRITONITE INFECTIEUSE FÉLINE : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES ET EXPÉRIMENTALES SUR LES APPORTS DU SÉQUENCAGE GÉNOMIQUE**

**NOM et Prénom :** TOMAS Flora

## **RÉSUMÉ :**

La péritonite infectieuse féline est une maladie mortelle du chat. Son diagnostic de certitude pose problème dans la mesure où, d'une part, sa présentation clinique est très variable en fonction des organes lésés et, d'autre part, les tests disponibles (par recherche directe du virus ou recherche des anticorps) sont incapables de différencier le biotype viral non pathogène (FECV) du biotype viral pathogène (FIPV) responsable de la maladie. Dans cette étude rétrospective, portant sur 15 chats morts de PIF, nous avons cherché à mettre en évidence des mutations sur 3 gènes : les gènes 3c, M et 7b. Nous avons comparé les séquences virales obtenues à des séquences provenant de chats sains et de chats malades de PIF de la littérature. Nous avons observé que 7 chats sur 10 morts de PIF inclus dans l'étude présentait une ou plusieurs mutations sur le gène 3c. Aucune des séquences provenant des chats sains de la littérature ne présentaient de mutation. En revanche, nous n'avons pas observé de différences sur les gènes 7b et M entre les souches FECV et FIPV.

Il semble ainsi pertinent de poursuivre les recherches ciblées sur les gènes viraux des coronavirus félines. Elles pourraient aboutir à la détermination de régions du génome particulières, permettant un diagnostic différentiel entre le FECV et le FIPV. Ceci en partant de l'hypothèse d'une ou de plusieurs mutation(s) participant à la virulence des souches mutées.

**MOTS CLÉS :** CORONAVIRUS FÉLIN, PÉRITONITE INFECTIEUSE FÉLINE, DIAGNOSTIC, BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, SÉROLOGIE, VIRULENCE, CARNIVORE, CHAT

## **JURY :**

Président : Pr.

Directeur : Dr.Sophie LE PODER

Assesseur : Dr.Christelle MAUREY-GUENEC



# **FELINE INFECTIOUS PERITONITIS DIAGNOSIS: BIBLIOGRAPHIC REVIEW AND EXPERIMENTAL DATA ON GENOMIC SEQUENCING**

**SURNAME:** TOMAS

**Given name:** Flora

## **SUMMARY:**

Feline infectious peritonitis (FIP) is a fatal disease in cats. Its diagnosis is complicated by the fact that first, clinical symptoms vary according to the infected organs, and second, available diagnosis tests are incapable of discriminating non pathogenic viral strains (FECV) from the pathogenic ones (FIPV) responsible for the disease. Based on 15 FIP-diagnosed dead cats, we have carried out our study in order to highlight mutations on 3 different genes: 3c, M and 7b. We compared our sequences with those of asymptomatic cats and FIP-cats retrieved from public database.

Our observations showed that out of 10 cats with readable results, 7 present at least one mutation in the 3c gene. None of the sequences coming from healthy cats of public database displayed any mutations on this gene. As for the M and 7b genes, we have not observed any mutation on the sequences between FECV strains and FIPV strains.

It seems therefore relevant to carry on researches targeting viral genes of Coronaviruses. They could lead to the determination of specific regions in the genome that would allow a differential diagnosis, as long as we admit the idea that mutations may be responsible for the virulence of certain strains.

**KEYWORDS:** FELINE CORONAVIRUS, FELINE INFECTIOUS PERITONITIS, DIAGNOSIS, MOLECULAR BIOLOGY, SEROLOGY, VIRULENCE, CARNIVOROUS, CAT

## **JURY :**

Président : Pr.

Director : Dr.Sophie LE PODER

Assessor : Dr.Christelle MAUREY-GUENEC



**LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard  
 Professeurs honoraires: Mme et MM. : BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard,  
 CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques

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

chef du département : M. POLACK Bruno, maître de conférences - adjoint : M. BLOT Stéphane, professeur

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

<p><b>- UNITE DE CARDIOLOGIE</b>                  Mme CHETBOUL Valérie, Professeur *                  Mme GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b>                  M. AUDIGIE Fabrice, Professeur                  M. DENOIX Jean-Marie, Professeur                  Mme DUPAYS Anne-Gaëlle, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel                  Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier *                  Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel                  Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE</b>                  Mme BEDU-LEPERLIER Anne-Sophie, Maître de conférences contractuel                  Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE DE MEDECINE</b>                  Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel                  M. BLOT Stéphane, Professeur*                  Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences                  M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT</b>                  M. GRANDJEAN Dominique, Professeur *                  Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</b>                  M. PARAGON Bernard, Professeur</p> <p><b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b>                  MME CHAHORY Sabine, maître de conférences *</p>	<p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b>                  M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP)                  M. CHERMETTE René, Professeur *                  M. GUILLOT Jacques, Professeur                  M. HUBERT Blaise, Professeur contractuel                  Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences                  M. POLACK Bruno, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b>                  M. FAYOLLE Pascal, Professeur                  M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences                  M. MOISSONNIER Pierre, Professeur*                  M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel                  Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérange, Maître de conférences (rattachée au DPASP)                  Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences                  M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b>                  Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP)                  M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences                  M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences                  Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)                  M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences                  M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)*                  M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, (rattaché au DPASP)</p> <p><b>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</b>                  MME ROUX Françoise, maître de conférences</p>
--	---

**Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur**

<p><b>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES</b>                  M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b>                  M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences                  M. BOLNOT François, Maître de conférences *                  M. CARLIER Vincent, Professeur                  Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b>                  M. BENET Jean-Jacques, Professeur                  Mme DUFOUR Barbara, Professeur*                  Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur                  MME PRAUD Anne, assistant d'enseignement et de recherche contractuel</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b>                  M. ADJOU Karim, Maître de conférences *                  M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel,                  M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel                  M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b>                  M. ARNE Pascal, Maître de conférences*                  M. BOSSE Philippe, Professeur                  M. COURREAU Jean-François, Professeur                  Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur                  Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences                  M. PONTER Andrew, professeur</p>
--	--

**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

**Chef du département : Mme COMBRISON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences**

<p><b>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b>                  M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*                  Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur                  M. DEGUEURCE Christophe, Professeur                  Mme ROBERT Céline, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : ANGLAIS</b>                  Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p><b>- UNITE DE BIOCHIMIE</b>                  M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences*                  M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</b>                  M. PHILIPS, Professeur certifié</p> <p><b>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b>                  Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences                  M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*</p> <p><b>-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b>                  Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences*                  M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur                  Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel                  M. REYES GOMEZ Edouard, assistant d'enseignement et de recherche contractuel</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b>                  M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur                  Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur*                  M. MAGNE Laurent, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b>                  Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur                  M. PERROT Sébastien, Maître de conférences                  M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b>                  Mme COMBRISON Hélène, Professeur                  Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences                  M. TIRET Laurent, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE VIROLOGIE</b>                  M. ELOIT Marc, Professeur                  Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *</p> <p><b>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b>                  Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences</p>
--	---

\* responsable d'unité





# REMERCIEMENTS

Au professeur de la faculté de médecine de Créteil  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse  
Hommage respectueux

À Madame Sophie Le Poder  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort  
Pour sa grande disponibilité, sa patience, son aide et pour m'avoir fait l'honneur d'être ma  
directrice de thèse  
Sincères remerciements

À Madame Christelle Maurey  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort  
Pour ses corrections et pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse  
Sincères remerciements



À mes parents, mes frère et sœur Manuel et Alice qui m'ont toujours encouragé et soutenu, je leur dois énormément. J'espère arriver à leur rendre tout le bonheur qu'ils m'apportent.

À mes collègues et amies de clinique avec qui j'ai lié une réelle amitié : Anne-Laure, Caroline, Cécile, Christina, Claire, Élisabeth, Hélène, Marion, Murielle et à qui je souhaite toute la réussite et le bonheur qu'elles méritent.

À mes amies de longue date, toujours à mes côtés pour les fous rires et les confidences : Marion, mon soleil de prépa et Florence, avec qui j'espère butiner encore une longue amitié.

À Florian, merci pour ta grande patience, ton soutien sans faille et ta disponibilité aux moments importants de ma vie.



# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	5
LISTE DES ABÉRVATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	9
PREMIÈRE PARTIE, BIBLIOGRAPHIQUE : LA PÉRITONITE INFECTIEUSE FÉLINE, PROPRIÉTÉS VIRALES, PHYSIOPATHOGÉNIE ET DIAGNOSTIC DE LA MALADIE.....	11
I PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES CORONAVIRUS FÉLINS.....	13
<b>A. La structure de la particule virale.....</b>	<b>13</b>
<b>B. Le génome .....</b>	<b>14</b>
<b>C. La classification.....</b>	<b>14</b>
1. Une classification en biotypes .....	15
2. Une autre classification en sérotypes .....	15
3. La classification des différentes souches de coronavirus félines caractérisées .....	16
<b>D. Les étapes du cycle viral .....</b>	<b>18</b>
II PRÉSENTATION DE LA PÉRITONITE INFECTIEUSE FÉLINE.....	19
<b>A. L'épidémiologie .....</b>	<b>19</b>
1. Épidémiologie descriptive .....	19
<b>a. Espèces sensibles .....</b>	<b>19</b>
<b>b. Distribution et fréquence .....</b>	<b>19</b>
2. Épidémiologie analytique .....	20
<b>B. La physiopathogénie.....</b>	<b>20</b>
1. Les différentes étapes de l'infection virale .....	21
2. De l'infection à l'apparition des lésions .....	21
<b>a. L'infection des macrophages .....</b>	<b>21</b>
<b>b. Les lésions de vascularite .....</b>	<b>22</b>
<b>c. La formation du liquide d'épanchement.....</b>	<b>22</b>
<b>d. La formation de lésions granulomateuses .....</b>	<b>23</b>
3. Le rôle de la réponse immunitaire .....	24
<b>a. La réponse immunitaire à médiation cellulaire .....</b>	<b>24</b>
<b>b. La réponse immunitaire à médiation humorale.....</b>	<b>24</b>
<b>c. Le rôle des cytokines .....</b>	<b>25</b>
4. Le déterminisme du pouvoir pathogène .....	25
<b>a. L'hypothèse de la mutation interne .....</b>	<b>25</b>
<b>b. L'hypothèse de coexistence de souches virulentes et non virulentes .....</b>	<b>27</b>
<b>c. Le rôle crucial de l'immunité de l'hôte et de facteurs propres au virus dans la pathogénie .....</b>	<b>28</b>
<b>C. Les symptômes .....</b>	<b>29</b>
1. La PIF humide .....	29
2. La PIF sèche.....	29
3. Les signes systémiques .....	30
4. Les manifestations nerveuses .....	30
5. Les manifestations oculaires.....	31
6. Les manifestations cutanées.....	31
<b>D. Les traitements.....</b>	<b>32</b>
<b>E. La prévention .....</b>	<b>33</b>
1. La vaccination.....	33
2. Les mesures hygiéniques et zootechniques de prévention .....	34

a.	Mesures générales d'hygiène .....	34
b.	Contrôle à l'introduction d'un chat dans un effectif indemne .....	34
c.	Séparation des chats en fonction de leur taux d'excrétion et de la sérologie .....	34
d.	Mesures de prophylaxie spécifiques aux chatons .....	35
III	MÉTHODES DIAGNOSTIQUES DE LA PÉRITONITE INFECTIEUSE FÉLINE.....	35
A.	Les éléments diagnostiques non spécifiques.....	35
1.	L'imagerie .....	35
a.	L'échographie abdominale .....	35
b.	L'imagerie par résonance magnétique (IRM) .....	36
c.	La tomodensitométrie.....	36
2.	Les outils hématologiques .....	36
a.	La numération leucocytaire.....	36
b.	Le nombre de globules rouges.....	37
3.	Les outils biochimiques.....	37
a.	La concentration en protéines totales .....	37
b.	La bilirubinémie .....	38
4.	L'étude du liquide d'épanchement.....	39
a.	Observation macroscopique.....	39
b.	Etude biochimique et cytologique .....	39
c.	Le test de Rivalta .....	39
5.	L'étude de l'humeur aqueuse et du liquide cérébrospinal .....	40
6.	Les autres tests non spécifiques.....	41
B.	Diagnostic par recherche d'anticorps.....	41
1.	La sérologie.....	41
a.	Les tests quantitatifs .....	41
b.	Les tests qualitatifs.....	42
2.	Dans le liquide d'épanchement.....	44
3.	Dans le liquide cérébro-spinal (LCS).....	44
C.	Diagnostic par biologie moléculaire .....	45
1.	Possibilités actuelles et perspectives offertes par l'outil PCR .....	45
a.	Généralités sur la RT-PCR .....	45
b.	Utilisation et limites de la RT-PCR pour le diagnostic de la PIF .....	46
c.	Perspectives permises par les récentes études.....	48
D.	L'immunohistochimie et l'immunofluorescence .....	49
E.	Le diagnostic post-mortem .....	49
1.	Les lésions abdominales .....	50
2.	Les lésions oculaires et du système nerveux central.....	50
3.	Les lésions des organes lymphoïdes.....	51
DEUXIÈME PARTIE, EXPÉRIMENTALE.....		53
INTRODUCTION.....		55
I MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		55
A.	Prélèvements étudiés .....	55
B.	Amorces sélectionnées .....	56
C.	Extraction de l'ARN viral contenu dans le liquide d'épanchement abdominal .....	60
D.	Protocole d'amplification génomique par RT-PCR .....	60
E.	Visualisation des amplicons sur gel d'agarose .....	62
F.	Séquençage .....	62
II RÉSULTATS.....		63

<b>A. Séquençage du gène 3c.....</b>	<b>64</b>
1. <i>Présentation des résultats de RT-PCR.....</i>	64
2. <i>Analyse des séquences de nucléotidiques.....</i>	66
3. <i>Analyse des séquences protéiques résultantes.....</i>	67
4. <i>Analyse phylogénétique.....</i>	70
<b>B. Séquençage du gène 7b .....</b>	<b>72</b>
1. <i>Présentation des résultats de RT-PCR.....</i>	72
2. <i>Analyse des séquences nucléotidiques .....</i>	73
3. <i>Analyse des séquences protéiques résultantes.....</i>	73
4. <i>Analyse phylogénétique.....</i>	77
<b>C. Séquençage du gène M.....</b>	<b>79</b>
1. <i>Présentation des résultats de RT-PCR.....</i>	79
2. <i>Analyse des séquences nucléotidiques .....</i>	79
3. <i>Analyse des séquences de protéines résultantes.....</i>	80
4. <i>Analyse phylogénétique.....</i>	83
III DISCUSSION.....	85
<b>A. Le gène M .....</b>	<b>85</b>
<b>B. Le gène 7b .....</b>	<b>86</b>
<b>C. Le gène 3c.....</b>	<b>86</b>
<b>D. Élaboration d'un test diagnostique.....</b>	<b>90</b>
<b>E. Hypothèse mutationnelle versus Hypothèse de souches pathogènes et non pathogènes distinctes..</b>	<b>91</b>
CONCLUSION.....	93
BIBLIOGRAPHIE.....	95





## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

<b>Figure 1</b> : Présentation schématique du virion des FCoV et des protéines structurales qui le constituent.....	13
<b>Figure 2</b> : Organisation du génome des coronavirus félins .....	14
<b>Figure 3</b> : Comparaison des génomes des sérotypes 1 et 2 de Coronavirus félins avec le coronavirus canin.....	16
<b>Figure 4</b> : La virulence des diverses souches de coronavirus félins.....	17
<b>Figure 5</b> : Cycle viral du coronavirus félin .....	18
<b>Figure 6</b> : Organisation schématique d'un pyogranulome .....	23
<b>Figure 7</b> : Profil d'électrophorèse illustrant une hypergammaglobulinémie polyclonale et un pic en $\alpha_2$ chez un chat atteint de péritonite infectieuse féline .....	38
<b>Figure 8</b> : Profil d'électrophorèse d'un chat sain .....	38
<b>Figure 9</b> : Panel des résultats observés suite à un test d'immunochromatographie Speed® F-Corona (Virbac) .....	43
<b>Figure 10</b> : Position des amorces utilisées pour amplifier le gène 3c.....	58
<b>Figure 11</b> : Position des amorces utilisées pour amplifier le gène 7b.....	59
<b>Figure 12</b> : Position des amorces utilisées pour amplifier le gène M .....	59
<b>Figure 13</b> : Alignement des séquences de protéines 3c obtenues à partir de notre étude, en comparaison avec les séquences de CHANG <i>et al.</i> (2010) .....	68
<b>Figure 14</b> : Arbre monophylétique de probabilité maximale pour la protéine issue du gène 3c.....	71
<b>Figure 15</b> : Alignement des séquences de protéines 7b obtenues à partir de notre étude, en comparaison avec l'étude de LIN <i>et al.</i> (2009) .....	75
<b>Figure 16</b> : Arbre monophylétique de probabilité maximale pour la protéine issue du gène 7b.....	78
<b>Figure 17</b> : Alignement des fragments de séquences de protéines M entre les acides aminés 115 et 238 .....	81
<b>Figure 18</b> : Arbre phylogénétique de probabilité maximale calculée sur le fragment de séquence du gène M compris entre les acides aminés 115 et 242.....	84
<b>Figure 19</b> : Positions des mutations et délétions sur le gène 3c .....	89
<b>Figure 20</b> : Nombre de nucléotides mutés (pour l'ensemble des chats) par groupe de 100 nucléotides sur le gène 3c.....	90
<b>Tableau 1</b> : Les différentes souches de coronavirus félin répertoriées .....	16
<b>Tableau 2</b> : Correspondance entre la nature des acides aminés et leurs positions possibles sur la protéine M.....	27
<b>Tableau 3</b> : Symptômes observés chez cent trente-six chats atteints de PIF.....	31
<b>Tableau 4</b> : Anomalies du LCS rencontrées chez un chat malade de PIF.....	40
<b>Tableau 5</b> : Position, orientation et séquence des amorces couramment utilisées pour le diagnostic de la PIF par RT-PCR .....	47

<b>Tableau 6</b> : Liste des chats faisant partie de l'étude et résultats des sérologies et RT-PCR réalisées respectivement à partir de leur sérum et de leur liquide d'épanchement .....	56
<b>Tableau 7</b> : Position, taille et détails de la séquence des amorces choisies pour l'étude.....	57
<b>Tableau 8</b> : Synthèse des résultats pour lesquels la RT-PCR puis le séquençage ont fourni des données exploitables.....	63
<b>Tableau 9</b> : Détail des résultats des RT-PCR et des séquençages du gène 3c pour chacun des chats.....	65
<b>Tableau 10</b> : Position et caractéristiques des mutations et délétions du gène 3c de l'ARN viral extrait du liquide d'épanchement abdominal des chats de l'étude.....	66
<b>Tableau 11</b> : Détail des résultats des RT-PCR et des séquençages du gène 7b pour chacun des chats.....	73
<b>Tableau 12</b> : Détail des RT-PCR et des séquençages du gène M réalisés pour chacun des chats.....	79
<b>Tableau 13</b> : Correspondance entre la nature des acides aminés et leurs positions possibles sur la protéine M .....	82
<b>Tableau 14</b> : Nature des acides aminés en position 120, 138, 163 et 199 pour les séquences obtenues de la protéine M.....	83
<b>Tableau 15</b> : Position et caractéristiques des mutations et délétions du gène 3c de l'ARN viral extrait du liquide d'ascite des chats de l'étude de CHANG <i>et al.</i> (2009).....	88
<b>Tableau 16</b> : Caractéristiques du test diagnostique virtuel basé sur le séquençage du gène 3c.....	91

## LISTE DES ABÉRVATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CCoV : Canine Coronavirus

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FCoV : Feline Coronavirus

FECV : Feline Enteritic Coronavirus

FeLV : Feline Leukemia Virus

FIPV : Feline Infectious Peritonitis Virus

FIV : Feline Immunodeficiency Virus

IL : Interleukine

IFN : Interféron

Kb : Kilo base

LCR : Liquide Céphalorachidien

ORF : Open Reading frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIF : Péritonite infectieuse féline

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

SNC : Système nerveux central

TGEV : Transmissible Gastroenteritis Virus

TNF : Tumor Necrosis Factor



## INTRODUCTION

Il a été établi pour la première fois par HOLZWORTH (1963) que la péritonite infectieuse féline (PIF) était une grave affection ayant pour cible l'espèce féline. L'agent responsable de la PIF est un coronavirus félin. C'est une maladie virale du chat particulièrement redoutable à plusieurs égards. En effet, aucun traitement n'a pu prouver une véritable efficacité et encore moins une guérison définitive des chats malades (HARTMANN et RITZ (2008)). Par ailleurs, cette maladie possède une évolution bien souvent fulgurante car elle aboutit à la mort de l'animal en quelques jours ou semaines. Enfin, son diagnostic est très difficile. En effet, cette affection est protéiforme car elle peut entraîner une déficience de divers organes ou appareils suivant la forme qu'elle prend : le foie, les reins, les yeux, le système nerveux central (SNC), les organes lymphoïdes, l'appareil digestif, l'appareil respiratoire, la peau. De plus, aucun test virologique ne permet à lui seul d'établir actuellement un diagnostic de certitude de cette affection. En effet, les tests disponibles (par recherche directe du virus ou recherche des anticorps) sont incapables de différencier le biotype viral non pathogène du biotype viral pathogène responsable de la maladie. Or, de récentes études centrées notamment sur les aspects génétiques de ces virus ont découvert l'existence de mutations sur certains gènes du biotype hébergé uniquement par les chats ayant une PIF avérée. Ces mutations pourraient être liées, d'une façon qui reste à éclaircir, à la virulence des souches de coronavirus entraînant la maladie mortelle que l'on connaît désormais. Notre intérêt s'est donc porté sur ces récentes découvertes qui non seulement apportent beaucoup à la compréhension de la pathogénie de la PIF mais qui pourraient aussi offrir de nouveaux outils diagnostiques plus spécifiques.

Nous nous intéresserons dans un premier temps à une étude bibliographique des recherches déjà menées pour comprendre les différents aspects de cette maladie, de sa distribution parmi la population féline, à sa physiopathogénie avec les symptômes et les lésions causées. Nous nous arrêterons en particulier sur les possibilités diagnostiques actuelles et leurs perspectives.

Dans un second temps, nous avons réalisé un travail expérimental afin de retrouver puis de caractériser les mutations décrites par certains auteurs sur des gènes spécifiques.



PREMIÈRE PARTIE, BIBLIOGRAPHIQUE : LA PÉRITONITE  
INFECTIEUSE FÉLINE, PROPRIÉTÉS VIRALES,  
PHYSIOPATHOGÉNIE ET DIAGNOSTIC DE LA MALADIE





## I Présentation générale des coronavirus félins

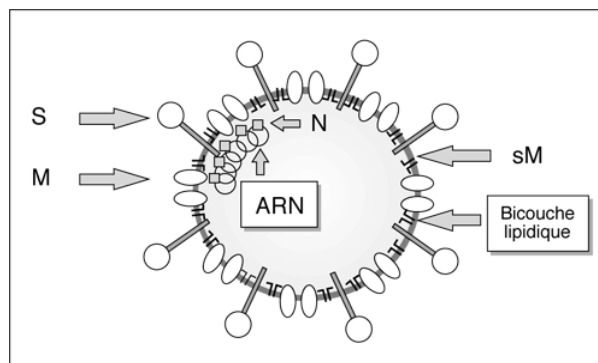
### A. La structure de la particule virale

Les coronavirus félins (FCoV) sont des virus enveloppés de grande taille, sphériques, à ARN simple brin (HORZINEK *et al.*, 2008). L'enveloppe provient de la cellule hôte et forme une bicouche lipidique dans laquelle s'enchaîne un certain nombre de glycoprotéines virales. Il s'agit des protéines S (ou E2), M (ou E1) et sM (ou E) (GONON, 1998) dont nous détaillons les propriétés ci-dessous :

- **La protéine S** (180-205 kDa) est responsable de la fixation des virions aux récepteurs et de l'induction de la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane de la cellule cible. La protéine S est également à l'origine d'une réponse immunitaire cytotoxique de l'hôte. Elle induit la production d'anticorps neutralisants,
- **La protéine N** (45-50 kDa) constitue la nucléocapside permettant la protection du génome viral. Elle permettrait aussi de réguler la transcription et la réplication de ce dernier grâce à son affinité pour les molécules d'ARN. Cette protéine est très conservée parmi tous les coronavirus,
- **La protéine M** (25-30 kDa) participe à la maturation du virus et peut fixer les facteurs du complément des anticorps neutralisants. Elle induit d'ailleurs la synthèse des anticorps qui n'ont de faculté neutralisante qu'en présence de complément,
- Enfin, **la protéine sM** (10 kDa) aurait un rôle régulateur dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales (GONON, 1998).

La figure 1 schématise la particule virale et ses protéines structurales.

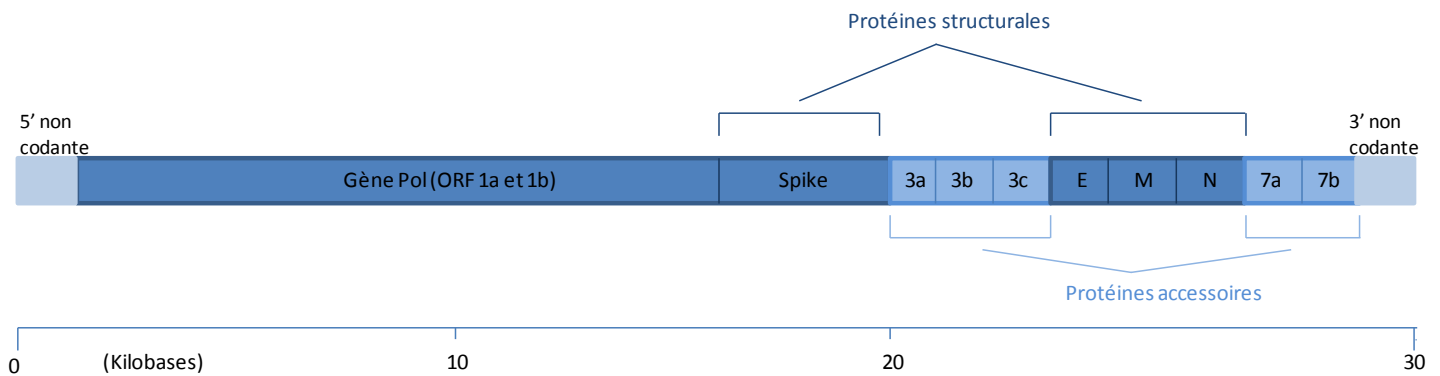
Figure 1 : Présentation schématique du virion des FCoV et des protéines structurales qui le constituent (GONON, 1998)



## B. Le génome

Le génome des coronavirus félines, de 27 à 32 kb, est de grande taille et comprend deux régions non codantes en 5' (de 200 nucléotides) et en 3' (de 400 nucléotides). Il comprend par ailleurs dix gènes, dont un codant pour le complexe de réplication et l'ARN polymérase virale. Ce gène appelé ORF 1 fait près de 20 kb à lui seul et conduit à la traduction d'une protéine de 700kDa qui sera ensuite clivée en plusieurs produits (GONON, 1998). Quatre autres gènes codent pour les quatre protéines de structure, à savoir la protéine M (pour membrane), la protéine N (nucléocapside), la protéine E (enveloppe) et la protéine S (spike ou pointe en français) et les cinq derniers gènes codent pour cinq protéines accessoires non structurales (3a-b-c et 7a-b). L'organisation du génome des FCoV est illustré dans la figure 2 (d'après BROWN *et al.*, 2009).

Figure 2 : Organisation du génome des coronavirus félines (BROWN *et al.*, 2009)



Ce type de virus, à ARN, est très sujet aux mutations ponctuelles car leur ARN polymérase n'a pas de fonction de correction des erreurs de réplication efficace. Les mutations à l'intérieur du génome viral semblent concentrées au niveau des neuf gènes structuraux et accessoires.

La grande variabilité génomique des coronavirus félines est assurée par un fort taux de recombinaison intergénomique ainsi que de nombreuses délétions et des recombinaisons homologues (GONON, 1998). Ainsi, les souches de coronavirus félines sont très variables dans leur caractère pathogène.

## C. La classification

Le coronavirus félin fait partie de la famille des *Coronaviridae* subdivisée en 2 sous-famille : les *Torovirinae* et *Coronavirinae*. Cette dernière est subdivisée en 3 genres : *Alpha*, *Beta* et *Gammacoronavirus*. Les coronavirus félines font partie du genre *Alphacoronavirus* et sont regroupés au sein de l'espèce virale *Alphacoronavirus 1* au même titre que le virus de la gastro-entérite transmissible porcine (TGEV) et le coronavirus canin (CCoV). Le FCoV, le TGEV

et le CCoV partagent au moins 80% de séquences nucléotidiques identiques (LEIBOWITZ, 2007).

## **1. Une classification en biotypes**

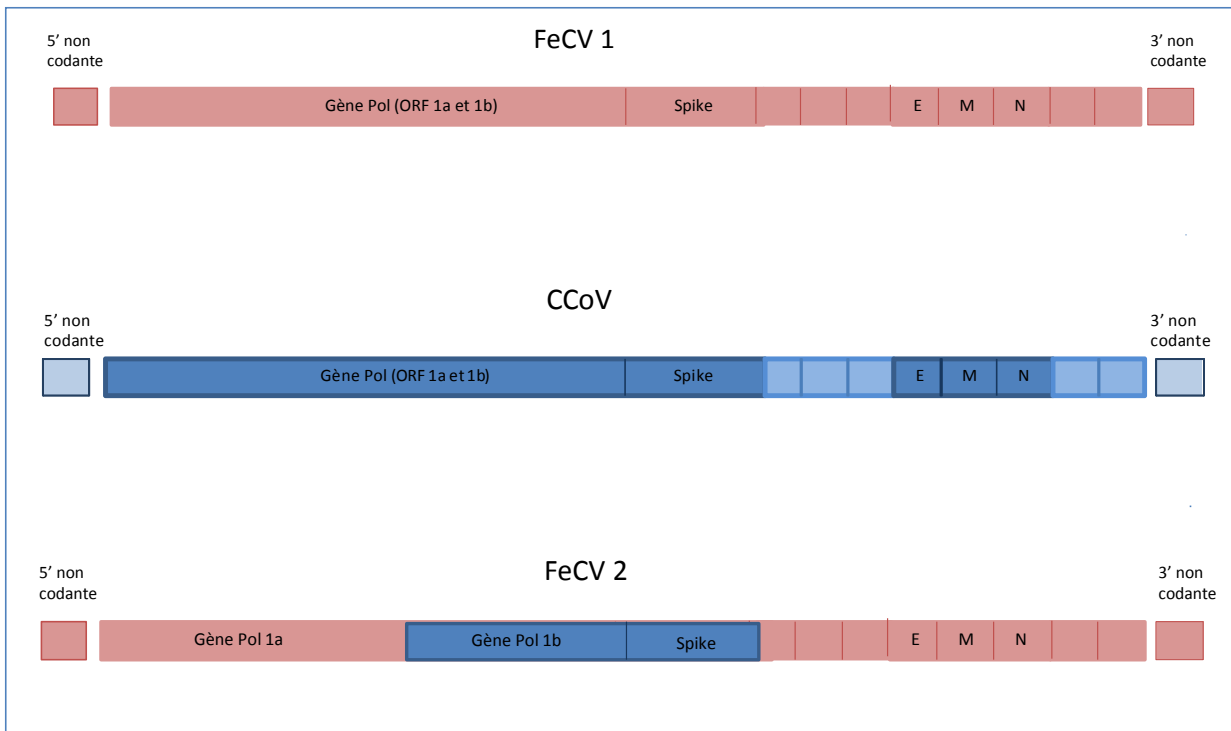
Il existe une classification des FCoV en 2 biotypes : le FECV (coronavirus entérique félin) et le FIPV (virus de la péritonite infectieuse féline). Le premier serait à tropisme exclusivement entérique, bénin et capable de se transmettre entre chats (PEDERSEN *et al.*, 2009). Il résiderait dans le tractus gastro-intestinal d'un chat infecté avant de subir une mutation dans ce même tractus donnant naissance au FIPV. Ce dernier serait capable de se propager de façon systémique et d'engendrer la PIF mais sa particularité est de ne se transmettre que de façon très exceptionnelle entre animaux (PEDERSEN, 2009). En effet, les souches FIPV ne sont que rarement excrétées dans les fèces contrairement aux souches FECV.

## **2. Une autre classification en sérotypes**

Les coronavirus félins se subdivisent aussi en fonction de leurs réactions sérologiques en deux sérotypes (HORZINEK *et al.*, 2008 et PEDERSEN, 2009).

Le sérotype 1 est le plus fréquemment retrouvé sur les chats en milieu naturel (dans 80 % des cas environ (LEIBOWITZ, 2007), alors que le sérotype 2 est de plus faible prévalence. Ce dernier résulte d'une recombinaison au niveau de la protéine Spike entre le coronavirus félin de sérotype 1 et le coronavirus canin (CCoV) comme l'illustre la figure 3. Il se propage facilement en culture cellulaire à l'opposé du sérotype 1 (HORZINEK, 2008). Il est pour cette raison majoritairement utilisé pour mener des recherches en laboratoire. Ce classement ne prend pas en compte la virulence du virus, de telle sorte que les deux types précédemment cités peuvent entraîner une PIF.

**Figure 3 : Comparaison des génomes des sérotypes 1 et 2 de Coronavirus félines avec le coronavirus canin**



### 3. La classification des différentes souches de coronavirus félines caractérisées

Il existe différentes souches de FCoV définies par des SNPs (Single Nucleotide polymorphisms) (PEDERSEN, 2009). Différentes souches ont été répertoriées et classées en fonction de leur virulence et sérotype comme le montre le tableau 1.

**Tableau 1 : Les différentes souches de coronavirus félin répertoriées (GONON, 1998 et HOHDATSU *et al.*, 1991)**

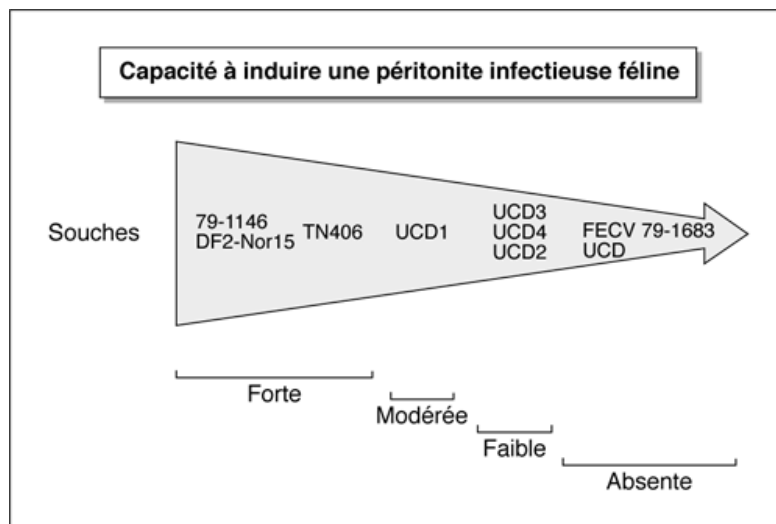
	FIPV	FeCV
Séroypes 1	UCD 1 UCD 2 UCD 3	RM
Sérotypes 2	79-1146 DF2 (Nor 15) TN 406 (black)	79-1683

- Les plus virulentes provoquent une PIF chez la plupart des chats inoculés par voie oronasale. Il s'agit des souches 79-1146 et DF2 et TN406,
- La souche UCD1 est responsable d'une PIF chez des chats soumis à des réinfections fréquentes,

- Les souches de faible virulence, comme UCD2, UCD3 et UCD4, peuvent provoquer une PIF expérimentalement mais dans des conditions naturelles, les chats exposés à ces souches développent très rarement la maladie. Cela dépendra surtout de leur réponse immunitaire,
- Les souches FECV 79-1683 et FECV UCD sont généralement asymptomatiques mais contagieuses chez l'adulte et peuvent provoquer des diarrhées, essentiellement chez le chaton. Elles ne provoquent jamais de PIF, même lors d'inoculation expérimentale.

La virulence est très différente selon la souche considérée, comme on le voit sur la figure 4, et dépendraient également de la voie d'inoculation (GONON, 1998). Ainsi, on peut classer les différentes souches FCoV selon leur degré de virulence.

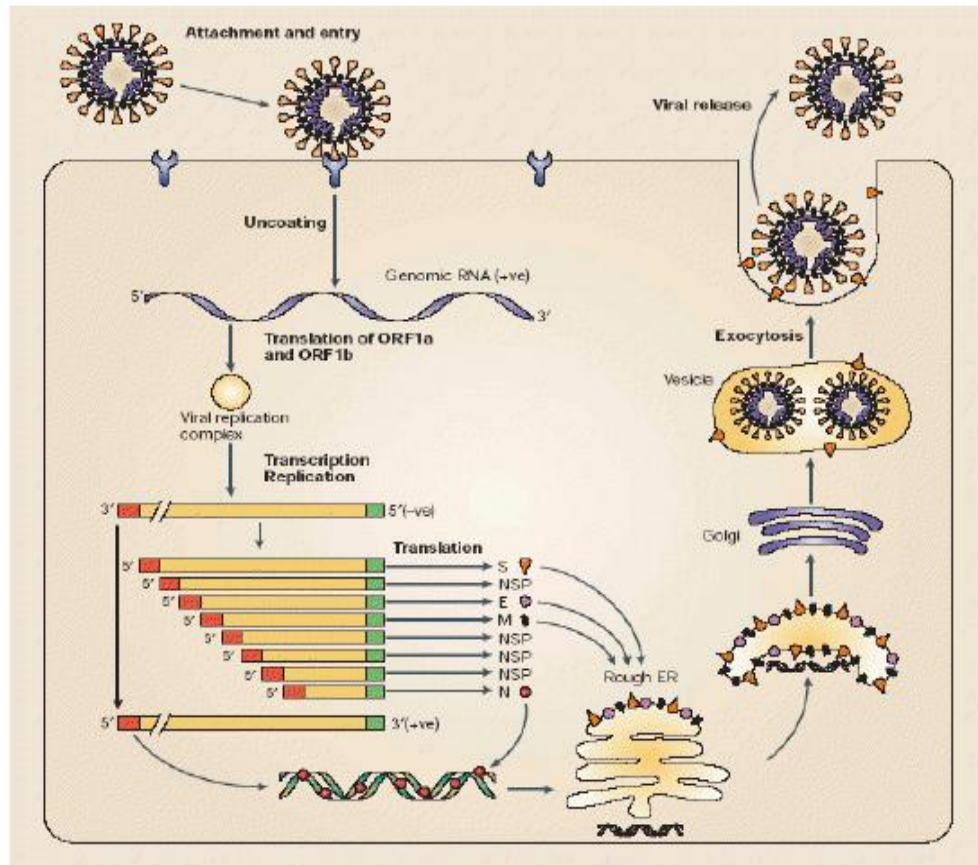
**Figure 4 : La virulence des diverses souches de coronavirus félines (GONON, 1998)**



## D. Les étapes du cycle viral

Le cycle s'effectue en huit à dix heures dans le cytoplasme des cellules infectées comme l'illustre la figure 5.

Figure 5 : Cycle viral du coronavirus félin (STADLER *et al.*, 2003)



- Les coronavirus félines sont capables d'infecter certaines cellules hôtes grâce à l'interaction des spicules viraux (protéine Spike) avec l'aminopeptidase N, enzyme protéolytique située entre autres sur la membrane apicale des entérocytes,
- Après pénétration du virus dans la cellule hôte (par fusion avec la membrane plasmique ou endocytose), l'ARN génomique est décapsidé et se comporte comme un ARNm puisque ORF 1 est traduit directement,
- L'ARN polymérase ARN dépendante, synthétise, une heure après l'infection, un brin d'ARN transcrit qui sert de matrice pour l'élaboration de six ARN sub-génomiques différents et d'ARN génomiques. Seule la partie 5' des ARNm sub-génomiques est traduite,
- Sont alors synthétisées les protéines S, N, M et sM des virus. Les ARN génomiques sont encapsidés puis les virions sont libérés par exocytose. L'infection peut

conduire à la mort des cellules infectées ou à la formation de syncytia. Ils peuvent aussi engendrer des infections persistantes *in vitro* comme *in vivo* qui s'accompagnent ou non de la production de nouveaux virions (GONON, 1998).

## II Présentation de la péritonite infectieuse féline

### A. L'épidémiologie

#### 1. Epidémiologie descriptive

##### a. Espèces sensibles

Les espèces sensibles sont en premier lieu le chat, mais aussi les félidés sauvages : le puma, le lion, le tigre, le léopard, le guépard, le lynx, le jaguar et le chat des sables (PEDERSEN, 2009).

##### b. Distribution et fréquence

La péritonite infectieuse féline a une répartition géographique mondiale.

Dans les élevages ou dans les maisons regroupant plusieurs chats, la séropositivité en FCoV peut atteindre 90% alors qu'elle est de l'ordre de 20 à 60% dans un effectif autre que la chatterie (LEIBOWITZ, 2007 et LE PODER et ELOIT, 2008-2009).

La plupart du temps, les chats infectés par le FCoV restent asymptomatiques ou éventuellement déclarent une discrète entérite. Seule une petite proportion de ces chats développera une PIF (moins de 10% selon BROWN *et al.*, 2009) qui est donc une affection rare mais avec un fort taux de mortalité (LEIBOWITZ, 2007).

Plusieurs études (BENETKA *et al.*, 2004, ROHRBACH *et al.*, 2001) montrent que les animaux de pure race sont plus fréquemment malades de PIF (jusqu'à deux fois plus par rapport à un groupe témoin). Une étude précise les races qui semblent les plus concernées par la maladie. Il s'agit des races birmane, Ragdoll, Bengale, Rex, Abyssinienne et Himalayenne. En revanche, les chats des autres races : Burmese, Exotic Shorthair, Manx, Persane, Russe, Bleu et siamoise ne semblent pas présenter un risque plus élevé d'être malades par rapport aux chats génétiquement croisés (PESTEANU-SOMOGYI *et al.*, 2006).

En revanche, aucun consensus n'existe quant à l'existence ou non d'une prédisposition liée au sexe. Effectivement, POTKAY *et al.* (1974), ROHRBACH *et al.* (2001), BENETKA *et al.* (2004), trouvent une incidence de la maladie plus grande parmi les mâles alors que FOLEY *et al.* (1997) et CAN-SXAHNA *et al.* (2007) concluent à l'absence d'une influence liée au genre.

Les chats atteints de PIF sont le plus souvent des jeunes chats de moins de deux ans et provenant de chatteries (PEDERSEN *et al.*, 2009). On peut même préciser que 80 % des cas de PIF concernent des animaux de moins de deux ans et 70 % des cas de PIF humides sont des chats de moins d'un an (ADDIE et GAGNON, 2010).

## **2. Epidémiologie analytique**

La contamination par le FCoV se fait probablement par voie orale. L'excrétion du virus se produit dans les selles et dans une moindre mesure dans les sécrétions oronasales (GONON, 1998). PEDERSEN et ALLEN (2008) ont montré que l'excrétion fécale du virus FCoV par des chatons d'âge compris entre 2 et 4 mois était significativement plus forte que chez des chats de 2 à 8 ans. Un contact étroit entre les chats semble nécessaire à la contamination mais une contamination indirecte n'est pas exclue (STODDART, BARLOUGH et SCOTT, 1984). En effet, le virus persiste environ sept semaines dans l'environnement, même s'il n'est présent en quantité suffisante pour permettre l'infection d'un animal que pendant les deux à trois premières semaines (CACHON et CHUZEL, 2005).

Une contamination des chatons après sevrage est possible mais aucune contamination placentaire de la mère au fœtus n'est décrite. Les chatons sont souvent infectés par leur mère, en général après cinq à six semaines de vie (au moment où l'immunité maternelle décline) mais des infections précoces à deux semaines ont été observées (HORZINEK *et al.*, 2008).

Le virus FCoV a une capacité importante de persistance au sein des effectifs à bas bruit, via des chats porteurs asymptomatiques chroniquement infectés (LEIBOWITZ, 2007). Une étude a montré que cette persistance pouvait subsister au moins 300 jours chez des chats infectés naturellement puis isolés (HERREWEGH *et al.*, 1997). Les porteurs asymptomatiques chroniquement infectés présentent une virémie faible à modérée, avec une réponse en anticorps modérée. En revanche, ils excrètent une grande quantité de virus dans leurs selles et sont pour cette raison fortement contagieux. Cette excrétion débute dans la semaine suivant l'infection.

L'animal porteur sain peut déclarer une PIF quelques semaines à quelques mois après l'infection. Ceci notamment à la faveur d'un stress : chirurgie, déménagement, visite en chatterie ou co-infection par le FeLV ou le FIV. Il devient alors faiblement excréteur et peu contagieux mais présente une virémie importante (HORZINEK *et al.*, 2008 et LE PODER et ELOIT, 2008-2009).

### ***B. La physiopathogénie***

La PIF peut se manifester sous deux formes distinctes, à savoir la forme humide et la forme sèche.

La PIF dite humide est caractérisée par la formation d'un épanchement thoracique ou plus souvent abdominal ainsi qu'une vascularite conséquence d'un endommagement de la paroi des vaisseaux sanguins par l'extravasation des macrophages.



La PIF sèche se caractérise notamment par des lésions granulomateuses sur les organes abdominaux le plus fréquemment : le foie et les reins mais également au niveau du cerveau et de l'œil.

## **1. Les différentes étapes de l'infection virale**

Le coronavirus félin sous la forme du biotype FECV pénètre dans l'organisme par voie oro-nasale. Il est capable de franchir la barrière gastrique en résistant au pH faible qui y règne puis d'infecter directement les entérocytes. Il peut aussi parfois infecter ces derniers dans un second temps après un passage par les amygdales et diffusion par virémie. Une fois les entérocytes infectés, on peut observer une virémie mineure au bout de cinq à six jours (LE PODER et ELOIT, 2008-2009), une excrétion fécale majeure (pour les porteurs sains) et une réponse humorale une semaine après environ. Lors de cette première virémie, les symptômes sont très frustes et peu spécifiques (anorexie, hyperthermie persistante, muqueuses pâles). Une étude de PEDERSEN et ALLEN (2008) aboutit à la conclusion que l'excrétion fécale subsiste à un niveau élevé avant d'évoluer selon trois possibilités :

- L'excrétion peut persister 9 à 24 mois,
- Elle peut être intermittente au gré de réinfections ou de variations dans la réponse immunitaire,
- Elle peut cesser au bout 5 à 19 mois.

Lorsqu'une PIF se déclare, une seconde virémie apparaît, de grande ampleur, un à plusieurs mois après l'infection. Le virus diffuse alors dans de nombreux organes : le foie, la rate, les reins, les yeux, les poumons, l'encéphale entre autres, provoquant des lésions à médiation immune de type granulomes ou pyogranulomes.

## **2. De l'infection à l'apparition des lésions**

### **a. L'infection des macrophages**

Il semblerait d'après différentes études que la virulence des FCoV soit directement corrélée à leur capacité à infecter la lignée des monocytes et macrophages. DYE et SIDDELL (2007) précisent que l'on retrouve en effet chez les chats atteints de PIF de nombreux macrophages et monocytes infectés par le virus. Ils sont le plus souvent situés dans les petites veines des leptoméninges, du cortex rénal, des yeux, mais aussi des poumons, du foie, de la pulpe rouge splénique et des nœuds lymphatiques.

ROTTIER *et al.* (2005) ont mis en évidence qu'une mutation de la protéine S Spike sur les souches virulentes serait à l'origine de la capacité du virus à infecter les macrophages. Cette mutation serait en particulier située en région C-carboxy terminale de la protéine S, qui joue un rôle dans la fusion membranaire. Il est tout de même important de noter que ces recherches ont été effectuées *in vitro* sur des souches FIPV et FECV de sérotype II, rarement retrouvées sur le terrain.

## **b. Les lésions de vascularite**

Il semblerait (DYE et SIDDELL, 2007 et TAKANO *et al.*, 2011) que les particules virales forment avec les anticorps anti-FCoV des immuns complexes qui avec l'aide du complément, activent les monocytes. Cette activation est accompagnée de l'expression des CD18 à la surface des monocytes, d'un relargage de médiateurs de l'inflammation (notamment les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ), d'une réplication accrue du FIPV dans les monocytes/macrophages et de la libération de métalloprotéinases-9 (MPN-9). Les médiateurs de l'inflammation vont recruter de nombreux autres macrophages qui vont être à leur tour infectés et libérer des substances cytotoxiques et autres médiateurs, d'où une amplification du phénomène. Les MPN-9 vont participer à la désorganisation voire à la destruction de la lame basale des cellules de la paroi des vaisseaux (perte du collagène IV) qui aboutit à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Ce processus de désorganisation des cellules endothéliales composant la paroi est appelé vascularite. Les monocytes vont alors pouvoir sortir des vaisseaux par des brèches et former des infiltrats et agrégats périveineux et veineux. La vascularite n'est pas à médiation cellulaire (en effet, on n'observe quasiment pas de lymphocytes T dans les infiltrats) mais elle serait plutôt la conséquence d'un phénomène d'hypersensibilité de type III par formation d'immuns complexes.

La vascularite provoque, enfin, une consommation des plaquettes et des facteurs de coagulation, ce qui explique les phénomènes de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), les thrombopénies et la diminution des facteurs de coagulation rencontrés lors de PIF (RIGODY, 2009).

## **c. La formation du liquide d'épanchement**

TAKANO *et al.* (2011) ont cherché à explorer le mécanisme de production du liquide d'épanchement lors de formes humides de PIF. Ils se sont intéressés à une protéine particulière appelée « vascular endothelial growth factor » (VEGF) qui est connue en médecine humaine comme étant corrélée à la présence d'un plus grand volume d'épanchement lors de cancers ovariens ou de maladies inflammatoires. Le VEGF est un facteur de perméabilité vasculaire produit par les monocytes, les macrophages, les fibroblastes et les kératinocytes. Il a été montré que les chats malades de PIF présentaient une concentration plasmatique de VEGF significativement plus élevée que les chats sains. Chez les chats malades, l'expression d'ARNm VEGF est d'ailleurs plus élevée. De plus, une augmentation de la concentration en VEGF est associée à une augmentation du volume de liquide d'épanchement abdominal. Enfin, en mettant en présence des cellules endothéliales félines formant la paroi des vaisseaux sanguins avec le facteur VEGF d'une part, et avec des macrophages et monocytes infectés par une souche FIPV d'autre part, on constate une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales dans les deux cas. Ainsi, ce facteur de croissance semble bien être impliqué dans la formation du liquide d'ascite chez les chats malades de PIF. Cependant, le mécanisme d'induction du facteur VEGF par les cellules infectées par le FIPV demeure inconnu.

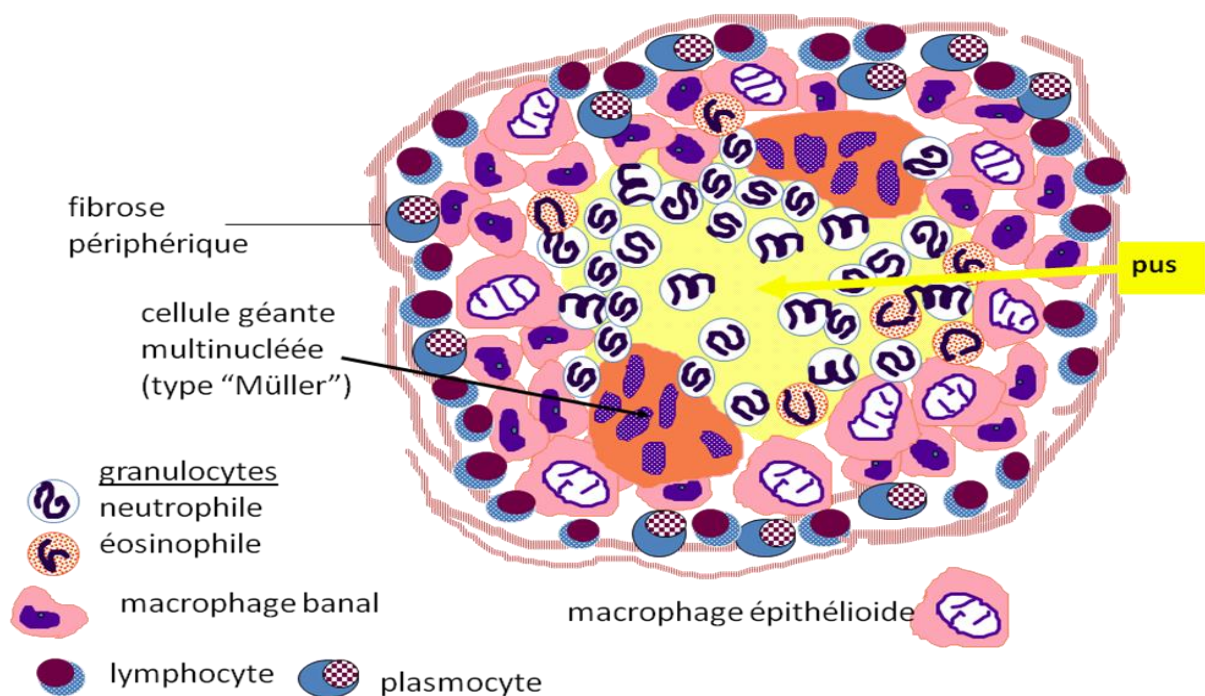
De plus, le VEGF n'est pas le seul facteur participant à la perméabilité vasculaire, le TNF $\alpha$  serait aussi impliqué d'après une étude de STATHOPOULOS *et al.* (2007). En effet, dans

cette étude, la neutralisation du TNF $\alpha$  permet aussi bien de réduire la formation du liquide d'épanchement pleurale que de diminuer la perméabilité vasculaire excessive, conséquences dans cette étude d'adénocarcinomes pulmonaires induits expérimentalement chez des souris.

#### d. La formation de lésions granulomateuses

L'incapacité du système immunitaire à éliminer les macrophages et les monocytes infectés conduit à la formation de nombreux infiltrats granulomateux ainsi qu'à des pyogranulomes dans divers organes : Les reins, le foie, le pancréas, l'omentum, les yeux, les nœuds lymphatiques mésentériques, l'estomac, les poumons, le myocarde et les leptoméninges peuvent être touchés (KIPAR *et al*, 2005). Ces lésions inflammatoires granulomateuses se forment généralement en région périvasculaire suite à la diapédèse et à l'accumulation des cellules inflammatoires mononucléées. Les lésions peuvent être circonscrites (sous forme de granulomes) ou diffuses (sous forme d'infiltrats inflammatoires). Il arrive parfois que les cellules inflammatoires se substituent entièrement aux cellules endothéliales formant normalement la paroi des vaisseaux (KIPAR *et al*. 2005). Les macrophages et monocytes constituant ces lésions sont très fortement infectés par les coronavirus. La figure 6 schématise la constitution de tels pyogranulomes.

Figure 6 : Organisation schématique d'un pyogranulome (CRESPEAU, 2012)



### **3. Le rôle de la réponse immunitaire**

#### **a. La réponse immunitaire à médiation cellulaire**

Dans les cas de PIF, il semble que ce soit la réponse immunitaire à médiation cellulaire en lymphocytes T qui soit déficiente et qui est donc cruciale pour la progression de la maladie (DE GROOT-MIJNES *et al.*, 2005). Plusieurs observations vont dans ce sens, à savoir le fait que les phases de réplication du FIPV (correspondant à une hyperthermie et une perte de poids de l'animal) coïncident exactement avec les périodes de déplétion en lymphocytes T (LT). De plus, la lymphopénie apparaît dès la première semaine post infection dans le sang périphérique puis dans les organes lymphoïdes. Il s'agit plus particulièrement d'une déplétion en LTCD4+ et LTCD8+, dont les taux restent bas durant toute l'infection. Les mécanismes d'induction d'une lymphopénie par le FIPV ne sont pas encore bien élucidés à ce jour mais cette chute des LT serait due à leur apoptose. Des hypothèses sont émises pour tenter d'expliquer l'origine de cette apoptose (TAKANO *et al.*, 2007, DE GROOT-MIJNES *et al.*, 2005). Il se pourrait notamment qu'elle soit induite par les TNF $\alpha$  produits par les macrophages infectés. On constate d'ailleurs une augmentation de l'expression des récepteurs au TNF $\alpha$  (TNFR1 et TNFR2) dans les LTCD8+, ce qui rend les lymphocytes plus sensibles à l'action des TNF $\alpha$ .

Il y aurait un conflit permanent entre d'un côté l'induction par le virus de la chute en LT et de l'autre la réponse immunitaire cellulaire antivirale. Ceci pourrait expliquer les périodes d'infection intermittentes déjà décrites.

#### **b. La réponse immunitaire à médiation humorale**

Le rôle de la réponse immunitaire à médiation humorale reste encore mal connu et controversé.

La réponse à médiation humorale n'est pas considérée par certains auteurs comme protectrice vis à vis de l'infection (on observerait en effet la même cinétique pour les anticorps neutralisants chez les animaux finalement morts de PIF et ceux qui ont éliminé le virus). De plus, il semble qu'ils font leur apparition trop tardivement lors de l'infection pour avoir une réelle action. Certains pensent qu'ils favoriseraient même l'avancée de l'infection virale (PEDERSEN NC, BOYLE JF, 1980 et HOHDATSU *et al.*, 1991).

En effet, la protéine S serait capable expérimentalement sur les souches de FCoV de types 2 de favoriser le phénomène de facilitation, c'est-à-dire l'internalisation du virus dans les macrophages grâce à la fixation des anticorps facilitants sur la protéine S. Ce phénomène pourrait expliquer la virulence de souches particulières. Or, il semblerait que ce processus ne soit pas retrouvé, ou alors rarement, pour les souches virales de type 1, qui représentent pourtant plus de 80% des souches infectant les chats naturellement.

Cette dernière hypothèse tend d'ailleurs à être abandonnée. D'autres études, comme celle de GONON *et al.* (1999), montrent que la production d'anticorps anti glycoprotéine S est corrélée à l'élimination du coronavirus chez des chats naturellement infectés. En effet, l'étude inclut trois groupes de chats : un groupe comprenant des chats infectés par le FCoV

ayant éliminés le virus, un second groupe comprenant des chats porteurs chroniques asymptomatiques et un dernier constitué de chats malades. La mesure de la réponse en anticorps dirigés contre la protéine S dans chaque groupe montre que cette dernière est trente fois plus importante chez les chats ayant éliminé le virus que chez les autres. Ceci illustre que la production de tels anticorps ne constitue pas un facteur de risque pour la progression de l'infection virale mais serait plutôt protectrice.

### **c. Le rôle des cytokines**

Une étude portant sur l'influence des cytokines dans la pathogénie (KIPAR *et al.*, 2006), conclut à l'implication particulière des IL-12 et des IL-10. En évaluant la transcription de différentes cytokines (IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  notamment) dans les organes lymphopoiétiques de chats PIF et de chats porteurs asymptomatiques du FCoV, KIPAR *et al.* (2006) ont établi que le déficit en IL-12 chez les chats PIF pourrait être lié à l'échec de la réponse immunitaire cellulaire à contenir l'infection par le FIPV. Au contraire, l'IL-10 retrouvé en plus grande quantité dans la rate des chats sains, s'opposerait à la déplétion en lymphocytes T et participerait à l'inhibition de l'activation des macrophages et monocytes.

## **4. Le déterminisme du pouvoir pathogène**

Il existe trois principales hypothèses expliquant l'apparition de la PIF.

### **a. L'hypothèse de la mutation interne**

Selon cette hypothèse, une mutation se produirait au sein du virus FECV chez les chats infectés et conduirait à une souche virulente FIPV. Cette souche se répliquerait alors particulièrement au sein des monocytes et des macrophages. (HORZINEK *et al.*, 2008).

De nombreuses études tendent à conforter cette hypothèse (VENNEMA *et al.*, 1998 et PEDERSEN *et al.*, 2009), et ont cherché à identifier le gène qui pourrait être muté en particulier. Ainsi, PEDERSEN *et al.* (2009) ont proposé de vérifier cette hypothèse principale, ainsi que ses trois corollaires qui sont :

- Chaque chat malade de PIF doit avoir son propre virus muté sur un gène identifié (en effet, il n'y a pas de transmission horizontale d'une mutation),
- On doit retrouver une compartimentalisation des deux biotypes : le FECV possédant un tropisme entérique et le virus de la PIF une distribution systémique dans divers organes,
- Une diversité génétique plus réduite entre les souches FECV et FIPV provenant d'une même région que celles en provenance des régions éloignées.

Ainsi, dans cette étude, le virus de la PIF isolé de l'omentum d'un chat malade a été inoculé à des chats provenant de la même portée et vivant dans la même chatterie que ce chat. Dans un second temps, ce virus a été inoculé à des chats issus d'autres portées et d'autres régions des États-Unis. Chez chacun des animaux ayant développé une PIF (confirmée par l'autopsie), des prélèvements d'omentum et de fèces ont été effectués dans

le but d'extraire l'ARN viral et de synthétiser l'ADNc correspondant. Ensuite, l'amplification par PCR de séquences virales choisies (gènes structuraux et accessoires) a été réalisée pour en faire le séquençage. Ces travaux expérimentaux ont abouti aux conclusions suivantes :

- Seules les mutations identifiées sur un gène particulier, le gène accessoire 3c, rendent ce dernier non fonctionnel,
- Les coronavirus avec cette mutation (conduisant toujours soit à une délétion soit à un codon stop) sont retrouvés uniquement dans les tissus lésés internes chez des chats morts de PIF, alors que le gène 3c est intact dans le virus excrété par les fèces,
- L'inoculation de virus avec le gène 3c muté à des chats de laboratoire provoque une PIF chez ces chats,
- Le même virus avec le gène 3c intact ne provoque pas de symptômes et il est rapidement transmis entre chats,
- Les mutations sur ce gène sont distinctes d'un chat à l'autre : elles se produisent donc indépendamment dans chaque hôte sans transmission horizontale de la souche virale avec le gène muté,
- Il existe des variants minoritaires de ce gène pouvant coexister aussi bien dans les fèces que les tissus. Après leur inoculation, un seul prend le dessus chez un même chat,
- Enfin, on constate peu de différences génétiques pour le gène 3c entre des chats d'une même zone géographique alors qu'il existe de grandes différences entre chats de régions éloignées,
- Il reste à approfondir nos connaissances quant au rôle du gène 3c dans la pathogénie et la physiopathologie du virus de la PIF et dans la réponse immunitaire de l'hôte.

Une seconde étude, celle de CHANG *et al.* (2010), appuie également cette hypothèse. En séquençant le gène viral 3c chez 27 chats infectés par la souche FECV (porteurs asymptomatiques) et 28 chats infectés par la souche FIPV (PIF confirmée par l'anatomopathologie), l'étude montre que le gène 3c est intact dans toutes les souches FECV et muté dans la majorité des souches FIPV (71 %). De plus, la majorité des chats malades de PIF n'excrète pas de coronavirus dans leurs selles. Parmi les rares chats présentant du FCoV dans leurs selles, tous sont porteurs dans les fèces d'une souche virale dont le gène 3c est intact.

Cette étude corrobore par ses différentes conclusions l'hypothèse de la mutation interne.

Si cette hypothèse est avérée (notamment grâce à l'identification précise du rôle du gène 3c), il serait alors possible d'améliorer de façon considérable le diagnostic de la PIF dont la difficulté émane de la grande similarité génétique des deux types de virus (FECV bénin et FIPV pathogène).

Cependant, l'hypothèse décrite fait l'objet d'une controverse et il existe plusieurs études la remettant en question.

## b. L'hypothèse de coexistence de souches virulentes et non virulentes

Une étude récemment menée (BROWN *et al.*, 2009) cherche à appuyer une seconde hypothèse selon laquelle il existerait des souches virulentes FIPV et d'autres non virulentes FECV circulant dans la population féline. Seuls les chats porteurs de la souche virulente seraient atteints de PIF.

Il s'agit d'une étude cas/témoins dans laquelle les cas sont des chats porteurs d'un coronavirus (FCoV) et présentant des signes cliniques de PIF, et les témoins sont des chats porteurs de ce même virus mais sans symptôme. Des prélèvements ont été réalisés chez ces chats (fèces et ascite) afin de pratiquer une analyse phylogénétique des séquences virales obtenues à partir des gènes suivants : ORF 1, M, 7b.

L'analyse a abouti à la construction d'un arbre phylogénétique de probabilité maximale pour chacune des séquences étudiées. On y observe que pour 2 des gènes choisis (*M* et *7b*), les séquences virales obtenues chez des chats malades forment un grand groupe monophylétique (découlant d'un ancêtre commun) qui est distinct de celui formé par les séquences de FECV obtenues chez des chats asymptomatiques. Cette étude va donc fortement dans le sens de la coexistence de souches virulentes et non virulentes et réfutent apparemment l'hypothèse de mutation interne.

Dans un second temps, ce même projet a montré qu'il semble exister des haplotypes associés à la maladie. En effet, il est décrit dans l'étude de BROWN *et al.* (2009) que certaines associations d'acides aminés dans la protéine M correspondent à des phénotypes distincts : malade ou sain. Les cinq acides aminés concernés sont ceux situés en positions 108, 120, 138, 163 et 199. Les haplotypes « YIVAL » ou « YIAL » semblent être associés à la PIF alors que les séquences de la protéine M des chats asymptomatiques présentent les haplotypes suivants : « HIIVI », « HIIVL », « HVIAL », « YVVAL » ou « YIVAL ». La correspondance entre les lettres H, Y, V, A et I et la nature des acides aminés est donnée dans le tableau 2, ainsi que la position à laquelle ces acides aminés sont susceptibles d'être localisés sur la protéine M.

**Tableau 2 : Correspondance entre la nature des acides aminés et leurs positions possibles sur la protéine M (BROWN *et al.* (2010))**

Position	Symbole	Acide aminé
108	H	Histidine
108	Y	Tyrosine
120	V	Valine
120	I	Isoleucine
138	I	Isoleucine
138	V	Valine
163	V	Valine
163	A	Alanine
199	I	Isoleucine
199	L	Leucine

Notons que seuls 3 chats asymptomatiques sur 19 avaient la combinaison « YIVAL » dans cette étude. L'un d'eux a été testé à nouveau deux ans après et on a pu constater chez lui le « passage » du génotype « YIVAL » au génotype « HIIVI ». Ainsi, on peut supposer qu'en plus de la souche virale, la capacité immunitaire de l'animal est un point important à prendre en compte et à explorer dans l'apparition d'une PIF.

Cependant, CHANG *et al.* (2011) émettent des doutes quant à l'hypothèse précédemment citée. Leur étude s'est principalement concentrée sur l'analyse et l'amplification du gène M de différents chats asymptomatiques ou morts de PIF. Elle conclut à un regroupement phylogénétique des séquences du gène M amplifiées selon la chatterie de laquelle ils sont originaires, indépendamment du caractère virulent ou non de la souche. Leur étude reste donc en faveur de l'hypothèse de la mutation interne d'après laquelle la souche virulente (FIPV) et la non virulente (FECV) dont elle est issue seraient proches en terme de phylogénie pour une même chatterie.

### **c. Le rôle crucial de l'immunité de l'hôte et de facteurs propres au virus dans la pathogénie**

Une autre hypothèse expliquant le développement d'une PIF repose sur le fait que tout FCoV est capable d'entraîner une PIF mais que celle-ci aura effectivement lieu si l'immunité de l'animal et la souche virale le permettent.

#### **- Théorie des quasiespèces**

Il existerait un fort taux d'erreurs lors de la réplication du génome viral, conduisant à une population virale possédant des séquences hétérogènes mais assez proches. On parle alors de quasiespèces. Chez un même chat, la nature des quasiespèces peut varier en fonction des différents organes. D'après certaines études (BATTILAN *et al.*, 2003), il semblerait que l'hétérogénéité des génomes FCoV soit liée à la sévérité de l'affection, aux lésions d'organes et à la forme clinique observées.

#### **- Immunité de l'hôte**

Pour ce qui est de l'immunité de l'hôte, selon certains auteurs, une réponse humorale trop forte jouerait un rôle dans le développement de la PIF. Des études déjà menées ont établi que les anticorps ne sont pas efficaces pour éliminer le virus (WANDERLEY MYRRHA *et al.*, 2011). On parle même de facilitation de l'infection par les anticorps ou en anglais d'ADE (antibody dependent enhancement), qui expliquerait l'accélération du développement de la PIF en présence d'anticorps (PEDERSEN, BOYLE, 1980 et HOHDATSU *et al.*, 1991). En effet, les anticorps faciliteraient la propagation du virus chez un chat infecté en favorisant sa prise en charge par les monocytes et les macrophages via la formation d'un complexe virus/anticorps qui pourrait se fixer au récepteur du fragment constant de l'anticorps présent sur les monocytes. On constate aussi qu'en présence d'une forte réponse immunitaire cellulaire, le phénomène ADE n'aurait pas lieu. L'ADE est cependant très



controversée aujourd'hui et ce modèle tend à être abandonné car il repose sur des recherches menées sur des souches virales de type 2 qui ne correspondent pas à la réalité des souches retrouvées chez les chats infectés naturellement. En effet, 80% des souches retrouvées sont de type 1 (voir 3.a)

### ***C. Les symptômes***

Ils apparaissent après une période d'incubation dont la durée n'est pas connue dans les conditions naturelles mais qui est approximativement de deux à trois semaines dans les études expérimentales. Il existe deux formes de péritonite infectieuse féline décrites. Cependant, un même animal peut tout à fait présenter des symptômes compatibles avec ces deux formes.

#### **1. La PIF humide**

Elle représente 58 à 80% des cas de PIF. Elle est caractérisée par la présence d'un épanchement jaunâtre, visqueux et coagulant à l'air libre, dans une des cavités corporelles (le thorax ou l'abdomen). Les symptômes varient alors en fonction de la cavité concernée. Le liquide s'accumule dans l'abdomen dans 63% des cas entraînant une distension progressive de celui-ci, éventuellement associée à des désordres digestifs. L'épanchement, s'il s'accumule en région thoracique, peut créer une dyspnée et une discordance. L'épanchement peut aussi concerner les deux cavités dans 15% des cas (CACHON et CHUZEL, 2005).

#### **2. La PIF sèche**

Ses manifestations sont souvent discrètes en début d'évolution et varient en fonction des organes lésés. On peut ainsi observer un ictère, une polyuropolydipsie ou des troubles digestifs lors de l'atteinte du foie, du pancréas ou des reins. Des atteintes nerveuses et oculaires se surajoutent fréquemment. Enfin, les nœuds lymphatiques, notamment mésentériques, sont hypertrophiés. C'est le système nerveux central qui est le plus fréquemment en cause (dans 87% des cas environ contre 13% pour le système nerveux périphérique). On peut observer une ataxie, une hyperesthésie, une baisse de vigilance, une diminution des réflexes médullaires, une parésie, un déficit des nerfs crâniens, un syndrome vestibulaire ou cérébelleux entre autres (MACREYNOLDS et MACY (1997)).

### **3. Les signes systémiques**

Il peut s'agir d'une perte de poids, une léthargie, de la fièvre, du pica et une anorexie. À la palpation abdominale, on peut sentir des nœuds lymphatiques mésentériques de taille augmentée, des reins et une rate irréguliers lors de PIF sèche (DIAZ et POMA, 2009). Si du liquide d'épanchement s'est accumulé dans la cavité abdominale, il est possible d'observer un abdomen distendu. Des troubles digestifs peuvent être associés à la maladie, avec une alternance de diarrhées et de constipations. Des atteintes digestives seraient répertoriées dans près de 16% des cas de PIF (MACREYNOLDS et MACY, 1997).

Lors de PIF humide, l'accumulation de liquide dans la cavité pleurale peut entraîner une diminution des bruits cardiaques et respiratoires à l'auscultation ainsi qu'une dyspnée.

Une atteinte plus rare est celle du parenchyme pulmonaire. Lors des formes sèches, une pneumonie pyogranulomateuse peut engendrer une détresse respiratoire marquée. La radiographie montre alors une opacification interstitielle diffuse peu spécifique.

On peut parfois, notamment lors des formes sèches, observer un ictère et/ou une polyuropolydipsie lors d'une atteinte du foie, du pancréas ou des reins.

### **4. Les manifestations nerveuses**

Les manifestations nerveuses sont dues d'une part au dépôt de cellules mononucléées infectées par le virus et au dépôt de complexes immuns virus/anticorps sur les vaisseaux sanguins conduisant à l'atteinte inflammatoire du parenchyme nerveux. D'autre part, on constate la formation de granulomes diffus dans le système nerveux à cause de l'incapacité de la réaction immune à médiation cellulaire à détruire le virus.

Moins d'un tiers des chats atteints de PIF présente une forme nerveuse (FOLEY *et al.*, 1998). Elles sont le plus souvent associées à la forme sèche de péritonite infectieuse féline mais existent aussi dans la forme humide. La PIF est la cause la plus courante d'affections du système nerveux central chez les chats âgés de moins de 4 ans. Elle représente aussi 50 % des cas de maladie nerveuse d'origine inflammatoire ou infectieuse (DIAZ et POMA, 2009). Les signes cliniques sont fonction de la zone d'atteinte primaire. Ils peuvent être multifocaux ou focaux. En cas d'atteinte médullaire, il peut s'agir d'ataxie troncale pouvant évoluer vers une tétraparésie voire jusqu'à un décubitus latéral. L'examen peut révéler un déficit proprioceptif sur un ou plusieurs membres et une diminution des réflexes sur tous les membres. On peut aussi relever une hyperesthésie et des réactions posturales anormales. En cas d'atteinte de l'encéphale, on peut constater un comportement anormal, un déficit des nerfs crâniens, des symptômes d'origine vestibulaire (tête inclinée, nystagmus), une altération de l'état de conscience, une démarche compulsive en cercle ou des manifestations épileptiformes.

## 5. Les manifestations oculaires

Elles sont le plus souvent associées aux formes sèches de PIF. Elles sont en effet présentes dans 35 % des cas de PIF sèche contre 5 % des cas de PIF humide (ADDIE et GAGNON, 2010).

Dans certains cas, l'atteinte oculaire est la seule présente. Le FIPV traverse la barrière hémato-oculaire causant une uvéite pyogranulomateuse et une exsudation fibrineuse dans la chambre antérieure de l'œil. La manifestation la plus fréquente est l'iridocyclite (ou uvéite antérieure) bilatérale et exsudative avec des précipités rétrocornéens qui sont la conséquence de la vascularite pyogranulomateuse de l'uvée antérieure. Une atteinte du segment postérieur est aussi possible avec des chorioretinites pyogranulomateuses, accompagnées d'hémorragie rétinienne, d'œdèmes périvasculaire et sous-rétinien et d'une névrite optique (COLITZ, 2005).

## 6. Les manifestations cutanées

On retrouve les lésions cutanées principalement sur la face, les pavillons auriculaires, le cou et l'anus. Elles sont à relier à une vascularite (causée par les dépôts d'immunocomplexes et l'activation du complément). On rapporte habituellement des ulcères à l'emporte-pièce, des lésions nécrotiques ovales ou linéaires délimitées, non prurigineuses et indolores. D'autres lésions, nodulaires alopeciques sont parfois retrouvées sur le cou ou les membres antérieurs (DECLERCQ *et al.*, 2008 et CANNON *et al.*, 2005).

Dans le tableau 3 figurent les principaux signes cliniques rencontrés, ainsi que leur fréquence dans une étude menée sur 136 chats morts de PIF.

Tableau 3 : Symptômes observés chez cent trente-six chats atteints de PIF, d'après CACHON et CHUZEL (2005)

Signes cliniques	Fréquence en %
Fièvre	63,3
Apathie	58,1
émaciation	55,9
Déshydratation	41,9
Anémie	37,5
Distension abdominale	36
Ictère	26,5
Anomalies ophtalmologiques	15,4
Dyspnée	11,5
Anomalies neurologiques	10,3
Lymphadénopathie	8,1

#### **D. Les traitements**

Le pronostic est très sombre et la PIF est systématiquement mortelle. On considère que la médiane de survie suite au diagnostic établi de PIF est d'environ neuf jours. Un certain nombre de facteurs indique une espérance de vie particulièrement courte, à savoir un faible taux de lymphocytes circulants, une bilirubinémie élevée et un grand volume de liquide d'épanchement en cas de PIF humide.

Dans un premier temps, un traitement d'urgence peut être mis en place : fluidothérapie, oxygénothérapie, abdominocentèse voire thoracocentèse le cas échéant.

Dans les cas de PIF, on constate une réaction inflammatoire et une réponse du système immunitaire exacerbées. Le principe du traitement repose donc sur l'administration de corticostéroïdes à dose immunosuppressive, soit de la prednisolone à la dose de 2 à 4 mg/kg toutes les 24 heures à diminuer tous les 10-15 jours jusqu'à trouver la dose optimale. Cependant, aucune étude véritable ne démontre l'effet bénéfique de l'usage de ces molécules (HORZINEK *et al.*, 2008). Des antibiotiques peuvent y être associés pour éviter les infections secondaires et opportunistes. On peut également évoquer l'usage de la cyclophosphamide qui est un immunosuppresseur, à la dose de 2,5 mg/kg PO 4 jours consécutifs par semaine (POINDESSAULT SANTA-CROCE, 2006).

D'autres molécules sont décrites (des immunosuppresseurs : cyclosporine A, azathioprine, acide salicylique et plusieurs antiviraux) mais une seule a fait l'objet d'études publiées, il s'agit de l'interféron qui est une molécule antivirale.

Il existe l'interféron- $\alpha$  qui est un interféron humain à effet antiviral « général ». Une seule étude (incluant des cas témoins et une confirmation du diagnostic de PIF par histologie) a montré l'efficacité *in vitro* de cette molécule. En effet, chez les chats traités avec  $10^6$  UI/kg d'interféron- $\alpha$  et pour lesquels la PIF avait été induite expérimentalement, l'étude a permis de montrer que la moyenne de survie est significativement plus élevée de quelques jours que chez les chats non traités (RITZ, EGBERINK et HARTMANN, 2007).

Par ailleurs, l'interféron- $\omega$  félin a fait l'objet d'une étude « double-aveugle » dans laquelle le diagnostic de PIF a ensuite été confirmé pour tous les chats par un examen nécropsique. Les chats bénéficiant d'un traitement à base d'interféron- $\omega$  ( $10^6$  UI/kg en sous-cutané toutes les 24 heures pendant 8 jours puis une fois par semaine) et de glucocorticoïdes ne présentaient pas une durée de survie significativement supérieure à ceux traités par un placebo associé à des glucocorticoïdes (HARTMANN et RITZ, 2008).

Un traitement plus spécifique peut être mis en place en cas d'atteinte oculaire. Ainsi, en cas d'uvéite du segment antérieur, on peut utiliser un traitement topique à base d'acétate de prednisolone 1% ou de dexaméthasone en suspensions à usage ophtalmologique instillé toutes les 4 à 6 heures au départ puis diminué progressivement lorsque les signes cliniques réduisent. En cas d'atteinte du segment postérieur, ce type de traitement sera inefficace. Il faudra opter pour un traitement systémique. L'atropine ou le tropicamide (cycloplégiques parasympatholytiques) sont utilisés pour dilater la pupille et réduire la douleur (par la paralysie des muscles du corps ciliaire). Il faut enfin surveiller les risques de glaucome secondaire à l'uvéite (COLITZ, 2005).

Si l'animal ne présente aucune amélioration de son état général trois jours après le début du traitement, il est préférable d'opter pour une euthanasie.

Il a été parfois observé en cas de PIF sèche des possibilités de rémission pendant quelques mois avant une rechute. En effet, le virus serait capable de subsister dans l'organisme plusieurs mois tant que la réponse immunitaire contrôle la cinétique de réplication.

## ***E. La prévention***

### **1. La vaccination**

Plusieurs essais de vaccinations ont été réalisés mais la plupart ont échoué au stade expérimental car le phénomène d'ADE s'est produit, accélérant ainsi une issue fatale. Un seul vaccin est disponible aujourd'hui aux États-Unis et dans certains pays européens. Il s'agit du Primucell de chez Pfizer (HORZINEK *et al.*, 2008)

Ce vaccin contient un virus mutant FCoV thermosensible de sérotype 2, la souche DF2. Sa voie d'administration est nasale et son mode d'action consiste en l'induction dans la muqueuse d'une réponse immunitaire locale à médiation cellulaire et humorale en IgA.

De nombreuses études aux résultats contradictoires ont cherché à évaluer l'efficacité et l'innocuité de ce vaccin dans des conditions naturelles et des conditions de laboratoire. L'efficacité est remise en question d'emblée car ce vaccin est constitué d'une souche FCoV de type 2 alors que c'est le type 1 qui circule largement parmi la population féline.

Pour certaines études de terrain (FEHR *et al.*, 1997), le vaccin n'a montré aucune protection particulière vis-à-vis de la maladie par rapport à un groupe témoin de chats auxquels on avait administré un placebo. Pour d'autres, les chats vaccinés et les « chats placebo » ne présentaient pas de différence jusqu'au 150<sup>ème</sup> jour après l'administration du vaccin, mais après ce délai, les chats vaccinés semblaient plus souvent malades que les autres (un pour sept). Enfin, une autre étude de POSTORINO REEVES (1995) suggère que le vaccin permet une protection à hauteur de 75 % des chatons vaccinés. Or, dans cette étude, les chatons sélectionnés étaient tous séronégatifs. Ceci permet de conclure que la séronégativité des individus vaccinés conditionne l'efficacité du vaccin dont il est question. Cependant, les animaux, notamment en chatteries, sont fréquemment séropositifs, ce qui limiterait grandement l'utilisation d'un tel vaccin. Par ailleurs, ce vaccin ne montre une efficacité qu'à partir de 16 semaines de vie. Or, les chatons sont fréquemment infectés avant cette date.

Quant à l'innocuité du vaccin, les études de terrain, contrairement aux études expérimentales, ne rapportent pas d'effet ADE.

Ainsi, on peut déterminer un protocole de vaccination : une primo vaccination effectuée sur des chats encore jamais exposés au FCoV (issus d'un sevrage précoce par exemple), à partir de 16 semaines et en deux injections à 3 semaines d'intervalle. Des

rappels annuels sont conseillés même si peu d'études ont pu juger de la durée d'immunité instaurée par la vaccination.

## **2. Les mesures hygiéniques et zootechniques de prévention**

### **a. Mesures générales d'hygiène**

Etant donné le type de transmission, oro-fécale, du virus FCoV, les principales mesures de prévention sont des mesures hygiéniques : baisser la pression infectieuse en réduisant le nombre de chats à trois par pièce (dans les chatteries), offrir un accès à l'extérieur si possible pour permettre aux animaux d'enterrer leur fèces et sinon bien nettoyer la litière fréquemment et la mettre dans une pièce différente de celle où se trouve la nourriture.

### **b. Contrôle à l'introduction d'un chat dans un effectif indemne**

Il convient de réaliser une quarantaine de deux mois avant d'introduire un chat dans une chatterie où le FCoV n'est pas endémique. On pratique alors un test sérologique au début et à la fin de la quarantaine. Ces tests ne peuvent être faits que sur un chat de plus de 12 semaines (date de disparition des anticorps maternels) (POINDESSAULT SANTA-CROCE, 2006).

### **c. Séparation des chats en fonction de leur taux d'excrétion et de la sérologie**

Certaines techniques sont décrites pour réduire les transmissions de FCoV en chatteries. On peut par exemple envisager de séparer les chats fortement excréteurs de ceux qui ne le sont pas ou peu. Cependant, ces mesures sont contraignantes et difficiles à mettre en œuvre car elles nécessitent de faire quatre prélèvements fécaux étalés sur plus de trois semaines (étant donnée l'irrégularité de l'excrétion) puis une RT PCR quantitative. Il faut cependant être prudent car un résultat négatif n'apporte pas la certitude que le chat n'excrètera pas à un autre moment.

Des techniques similaires se basent sur la corrélation qui existe entre une forte probabilité d'excrétion et une forte concentration en anticorps dans le sang (PEDERSEN et ALLEN, 2008). Ainsi, la mesure du titre en anticorps de chaque chat par IF permettrait une séparation en deux groupes : les chats peu ou pas excréteurs (titre < 1/25) et les autres (>1/100). Ceci est très compliqué à mettre en œuvre car cela nécessite de grande capacité de quarantaine et des prises de sang fréquentes. On peut utiliser ce système de façon plus générale, pour savoir si une chatterie héberge globalement des individus plutôt fortement ou faiblement excréteurs. Or on sait qu'un élevage où de nombreux chats excrètent beaucoup de FECV (ce qui correspond à des titres en anticorps élevés pour ces chats) sera un élevage dans lequel les cas de PIF seront plus fréquents (FOLEY *et al.*, 1997).

#### **d. Mesures de prophylaxie spécifiques aux chatons**

Par ailleurs, les chatons développent la maladie après le sevrage, lorsque les anticorps maternels ne les protègent plus. PEDERSEN et ALLEN (2008) ne détectent une excrétion du virus chez les chatons qu'à partir de 9 à 10 semaines d'âge. Ces animaux ne déclarent donc la PIF qu'une fois arrivés chez leurs nouveaux propriétaires. L'élevage d'origine n'est en conséquent pas forcément informé de la circulation endémique du virus. Des mesures tendent à préserver les chatons au mieux : la mère encore gestante peut être isolée deux semaines avant la mise-bas et les chatons sevrés précocement et isolés aux alentours de cinq à six semaines de façon à réduire la probabilité qu'ils soient infectés. Cependant, les résultats de cette pratique sont controversés. En effet, certains chatons sont infectés précocement, entre deux et cinq semaines (HARPOLD *et al.*, 1999). De plus, malgré de bonnes mesures et conditions d'élevage, la grande facilité de transmission de ce virus d'une pièce à l'autre et via le personnel de l'élevage rend très difficile de maintenir un statut naïf pour les chatons sevrés et isolés. Pourtant, le principe de telles mesures est théoriquement très intéressant. Il permet en effet de retarder la première infection des chats à un âge plus avancé (>16 semaines). Un âge auquel il est prouvé que la réplication virale du FECV est moins intense, donc les chances de mutations FECV vers FIPV amoindries. De plus, le système immunitaire du chat est alors plus apte à contenir l'éventuel développement d'une PIF. (HORZINEK *et al.*, 2008 et PEDERSEN et ALLEN, 2008).

### **III Méthodes diagnostiques de la péritonite infectieuse féline**

#### **A. Les éléments diagnostiques non spécifiques**

Aucun de ces éléments diagnostiques ne permettra de fournir un diagnostic définitif de PIF mais c'est la conjoncture de ces éléments avec d'autres, à savoir les signes cliniques, les commémoratifs, les sérologies, histologies ou cytologies réalisées qui permettront de statuer en faveur d'une hypothèse forte.

#### **1. L'imagerie**

##### **a. L'échographie abdominale**

Afin d'aider au diagnostic ante mortem de la maladie, une étude rétrospective de LEWIS et O'BRIEN (2010) a cherché à mettre en lumière l'ensemble des modifications échographiques abdominales qui étaient fréquemment associées à la PIF. L'étude portait sur seize chats dont le diagnostic de PIF avait été rendu positif par les analyses histologiques et cytologiques des tissus lésés, associées à une clinique favorable.

L'étude a abouti au fait que l'échographie n'était ni sensible ni spécifique en ce qui concerne les potentielles anomalies spléniques ou hépatiques associées à la PIF. En revanche, chez de nombreux chats, on retrouve une néphromégalie avec des contours de reins irréguliers et une hypoéchogénéité de la capsule rénale (n=5). On note également souvent une

lymphadénopathie abdominale (n=9), la présence d'un épanchement péritonéal ou rétropéritonéal (n=8) et enfin une échostructure des anses intestinales modifiée (n= 3) avec un épaissement diffus voire une perte de la structure en couche.

### **b. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)**

Elle s'utilise en cas d'atteinte du système nerveux uniquement. Elle permet d'informer sur la localisation d'une lésion même si la sensibilité est moins bonne que lors de l'analyse directe du LCS (par biochimie ou comptage cellulaire). En effet, des études ont été menées sur de petits effectifs de chats pour déterminer la sensibilité de l'IRM vis-à-vis des maladies inflammatoires (FOLEY *et al.*, 1998 et NEGRIN *et al.*, 2007). Des anomalies, notamment des dilatations ventriculaires, souvent associés à une hernie du cervelet, étaient visibles sur 3 chats sur 8 malades de PIF dans une première étude, 4 sur 8 dans une autre et 3 sur 4 dans une dernière.

L'absence de lésion ne permet donc pas d'exclure la PIF (dans deux études, la moitié des chats ayant une PIF confirmée ne présentait pas de lésions à l'IRM). L'IRM apporte en fait une valeur ajoutée principalement pour différencier les maladies inflammatoires des affections tumorales (DIAZ et POMA, 2009).

### **c. La tomодensitométrie**

La technique est décrite pour le diagnostic de PIF lors d'une atteinte du système nerveux mais cette méthode est moins sensible que l'IRM (ADDIE et GAGNON, 2010).

## **2. Les outils hématologiques**

De nombreux paramètres sanguins sont souvent modifiés par rapport aux valeurs usuellement rencontrées lors de cas avérés de PIF. Il est donc intéressant de mesurer et de surveiller ces paramètres lors de la suspicion de cette maladie.

On portera en particulier notre attention sur :

### **a. La numération leucocytaire**

En effet, les animaux atteints de PIF présentent très fréquemment une **leucocytose**. On constate de plus très souvent une **lymphopénie** (dans 77% des cas selon une étude de SPARKES *et al.*, (1991) portant sur 65 chats malades de PIF) et une **neutrophilie** (45% des cas selon SPARKES *et al.*, 1991). La lymphopénie peut être interprétée comme une diminution de la réponse à médiation cellulaire mais cette lymphopénie accompagnée d'une neutrophilie et éosinopénie peut être aussi le signe d'une formule de stress (PALTRINIERI *et al.*, 1998).



## b. Le nombre de globules rouges

Des **anémies non régénératives** légères à modérées sont rapportées lors de PIF (dans 37% des cas selon SPARKES *et al.*, 1991), comme lors de nombreuses autres maladies chroniques félines (HORZINEK *et al.*, 2008). On peut l'expliquer par la malnutrition et la consommation d'énergie importante sur une longue période associées à la maladie (TSAI *et al.*, 2011). Dans l'étude de TSAI *et al.* (2011) portant sur 45 chats atteints de PIF, 40% des chats sont anémiés lors de la découverte de la maladie et 97% le sont lors d'un contrôle en fin d'évolution de la PIF (quelques jours avant la mort).

## 3. Les outils biochimiques

### a. La concentration en protéines totales

Une **hyperprotéinémie** globale pouvant atteindre 120 g/L avec une forte augmentation des globulines (50% des formes humides et 70% des formes sèches) et une **hypoalbuminémie** sont très souvent associées à une PIF. L'hypoalbuminémie est indicatrice d'une maladie chronique sous-jacente mais n'est en rien spécifique de la maladie étudiée ici.

L'électrophorèse est aussi un moyen pertinent d'apporter de nouveaux éléments en faveur ou non de l'hypothèse de PIF. On observe en effet souvent une **hypergammaglobulinémie**, le plus souvent polyclonale qui témoigne d'une stimulation antigénique chronique, puisque ce pic comprend notamment les IgG. On observe aussi parfois une hyper $\alpha$ 2globulinémie, plus précoce que les gammaglobulines, et témoignant d'une inflammation aiguë puisque ce pic comprend les protéines dites de phase aiguë (ou « acute phase proteine » : APP, en anglais) sur le profil d'électrophorèse (HORZINEK *et al.*, 2008), comme celui présenté en exemple dans la figure 7.

Une étude de TAYLOR *et al.* (2010), montre que sur 41 chats pour lesquels une PIF a été soit confirmée soit fortement suspectée, 39 présentaient un profil d'électrophorèse anormal (soit 95,1%). 35 chats avaient un pic en gamma globulines (85,4%), 33 une hypoalbuminémie (80,5%) et 5 un pic en alpha 2-globulines (12,2%). Une autre étude (SPARKES *et al.*, 1991), montrait que 71% des chats malades de PIF présentaient un pic en alpha 2-globulines.

La figure 7 illustre un profil d'électrophorèse fréquemment retrouvé chez les chats atteints de PIF, en comparaison avec un profil retrouvé chez des chats sains témoins sur la figure 8.

Figure 7 : Profil d'électrophorèse illustrant une hypergammaglobulinémie polyclonale et un pic en  $\alpha_2$  chez un chat atteint de péritonite infectieuse féline (TAYLOR *et al.*, 2010)

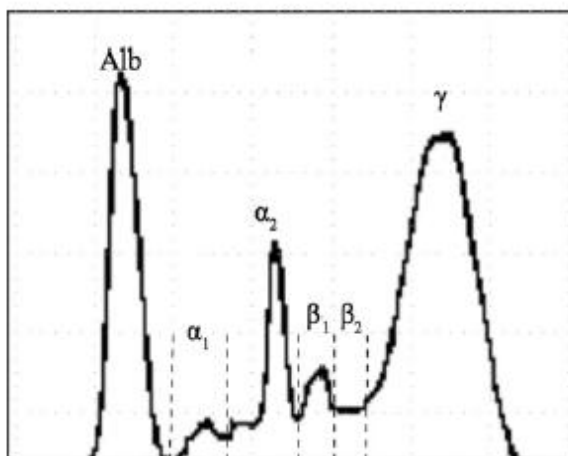
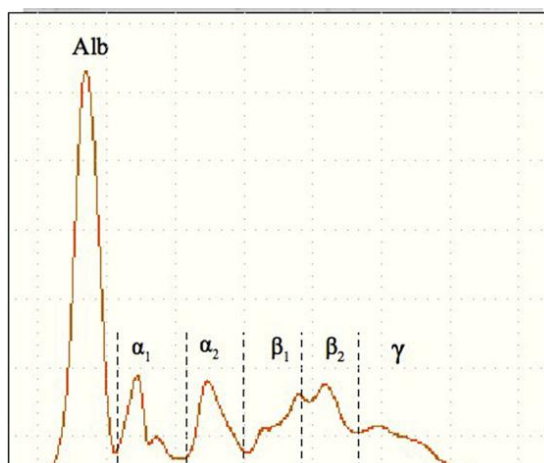


Figure 8 : Profil d'électrophorèse d'un chat sain (TAYLOR *et al.*, 2010)



Enfin, le ratio (**albumine / globuline**)  $< 0,6$  même s'il n'indique qu'un processus inflammatoire, aurait une meilleure valeur diagnostique que la concentration en protéines totales et en gammaglobulines (HORZINEK *et al.*, 2008). Dans l'étude de TSAI *et al.* (2011) portant sur 45 chats atteints de PIF, 95,6% des chats présentaient un ratio albumine / globuline bas en faveur d'une PIF alors que seuls 57,8% présentaient une hyperglobulinémie.

## b. La bilirubinémie

En effectuant des analyses biochimiques sanguines, on constatera fréquemment une **hyperbilirubinémie** (et parfois une hyperbiliverdinémie) avec ou sans ictère associé, à relier aux dommages hépatiques (nécrose hépatique) causés par l'infection (PEDERSEN, 2008). D'autres auteurs avancent que l'hyperbilirubinémie pourrait être causée par une hémolyse, conséquence d'une anémie hémolytique à médiation immune (TSAI *et al.*, 2011).

#### 4. L'étude du liquide d'épanchement

Elle offre en général une meilleure valeur diagnostique que l'étude des paramètres sanguins (HORZINEK *et al.*, 2008).

##### a. Observation macroscopique

L'observation seule du liquide d'ascite recueilli par ponction peut conforter ou non l'hypothèse de péritonite infectieuse féline. Son aspect le plus classiquement rencontré est celui d'un liquide jaunâtre voire verdâtre (car il peut contenir respectivement de la bilirubine voire de la biliverdine) dans lequel il n'est pas rare d'observer de la fibrine et que l'on peut qualifier d'exsudat.

##### b. Etude biochimique et cytologique

Son analyse plus poussée réunit généralement les caractéristiques suivantes :

- La concentration protéique est comprise entre 3,9 et 9,8 mg/ $\mu$ L dont 50 à 80% de globulines. La densité est supérieure à 1,017 (SPARKES, 1991),
- Quant aux cellules, elles sont environ 1600 à 25000/ $\mu$ L, et la cytologie révèle qu'il s'agit en majorité de macrophages, neutrophiles et lymphocytes,
- Le profil d'électrophorèse de ce liquide d'épanchement est très similaire à celui décrit précédemment pour le sang,
- Le résultat d'électrophorèse réalisée sur l'épanchement possède une valeur prédictive positive élevée quand le rapport albumine/globuline est inférieur à 0,4 et une valeur prédictive négative élevée quand le même rapport est supérieur à 0,8.

##### c. Le test de Rivalta

Par ailleurs, on peut réaliser un test simple sur le liquide d'épanchement : il s'agit du test de Rivalta. Il ne s'agit pas, là encore, d'un test spécifique. En effet son principe est fondé sur la dénaturation des protéines en milieu acide et s'applique donc à tout exsudat, produit ou non dans un contexte de PIF. Pour le réaliser, on remplit un tube à essai d'environ 7 à 8 mL d'eau distillée auxquels est ajoutée une goutte d'acide acétique (98 %). La solution obtenue est passée au vortex puis on y dépose une goutte du liquide d'épanchement à la surface. Si la goutte disparaît en laissant la solution transparente, le test est dit négatif. Dans le cas contraire, c'est-à-dire si la goutte reste visible, soit en restant à la surface du liquide, soit en tombant lentement au fond du tube, le test est dit positif.

Ce test a une valeur prédictive positive ainsi qu'une valeur prédictive négative élevées (respectivement 86% et 96%) d'après une étude menée par HARTMANN *et al.* (2003). Il faut

rester prudent dans la mesure où le test de Rivalta peut être positif dans des cas de lymphome ou de péritonite bactérienne. Un examen cytologique, bactériologique ou même macroscopique du liquide d'épanchement pourra permettre de faire la différence.

## 5. L'étude de l'humeur aqueuse et du liquide cérébrospinal

L'analyse de ces liquides biologiques n'a d'intérêt que si l'animal présente des symptômes oculaires ou nerveux.

Les études réalisées ont montré une augmentation de la concentration en protéines, pathognomonique, à plus de 2 g/L (contre 0,25 à 0,30 g/L en temps normal) et une pléocytose neutrophilique à plus de 100 cellules/ $\mu$ L dans le LCS alors qu'il contient physiologiquement un maximum de 5 cellules par microlitre (PEDERSEN, 2009 et DIAZ et POMA, 2009).

Mais ces constatations sont moins systématiques que lors de l'analyse de la composition du sang ou du liquide d'épanchement et sont très peu spécifiques. D'autre part, de nombreux chats avec des signes neurologiques associés à une PIF ont un LCS normal. Le tableau 4 répertorie les anomalies possiblement retrouvées dans le LCS des chats malades.

**Tableau 4 : Anomalies du LCS rencontrées chez un chat malade de PIF (DENISET, 2007)**

Protéines	Nombre de cellules	Type cellulaire	Tests spécifiques	Autres
0,56 à 3,48 g/L, souvent > 2 g/L	Pléocytose, souvent > 500 cellules/mm <sup>3</sup>	Mixte ou dominante neutrophilique (jusqu'à 70%-80%)	Sérologie et PCR	Test de Pandy +

**Remarque :** Le test de Pandy permet d'estimer la concentration en globulines. Quelques gouttes de LCS sont ajoutées à 1mL de réactif PANDY. La lecture du test s'effectue après agitation. En présence de globulines, il y a apparition d'une turbidité blanchâtre permanente notée de manière semi-quantitative de « + à ++++ ». Le LCS normal a une faible turbidité.

OLIN (1977) a mené une étude afin d'analyser les caractéristiques cytologiques et biochimiques de l'humeur aqueuse de 20 chats présentant une uvéite antérieure. Parmi ces chats, huit étaient atteints de PIF (confirmée à l'analyse histologique). Les caractéristiques de l'humeur aqueuse de ces chats sont celles rencontrées lors d'uvéite antérieure aiguë quelque soit la durée de la maladie. En effet, la cytologie révèle un très grand nombre de polynucléaires et macrophages, ainsi qu'une concentration en protéines élevée, en moyenne 4,6 g/100 mL pour ces huit chats. En revanche, la cytologie comme la mesure de la concentration en protéines de ce liquide biologique ne sont pas assez spécifiques pour offrir une réelle aide au diagnostic de PIF. Une recherche directe du virus par PCR est possible comme c'est fréquemment le cas dans d'autres affections, par exemple la toxoplasmose (BENZ *et al.*, 2011).

## 6. Les autres tests non spécifiques

Lors de tout processus inflammatoire, il y a chez l'animal une libération d'un certain nombre de molécules pro-inflammatoires, à savoir IL-1, TNF-alpha, IL-6. Ces dernières vont engendrer une hyperthermie, une leucocytose, ainsi que la libération de protéines dites de phase aiguë telles que l'AGP (alpha 1 acide glycoprotéine) et la SAA (Serum amyloid A) synthétisées par le foie (PALTRINIERI, 2008 et WANDERLEY MYRRHA, 2011). La concentration en SAA augmente assez précocement lors d'un phénomène inflammatoire chez le chat. Cependant, il existe d'autres contextes dans lesquels les SAA peuvent augmenter en termes de concentration, en particulier lors d'une insuffisance rénale, d'un cancer, d'un diabète ou d'une hépatopathie.

Chez le chat, les recherches sont principalement axées sur l'implication diagnostique des variations de la concentration en AGP dans le domaine des maladies infectieuses et en particulier de la PIF. Cette protéine se trouve en effet en plus grande quantité chez les chats infectés par la PIF. On constate que dans les tissus prélevés sur des chats ayant la PIF, l'AGP semble associée physiquement aux antigènes viraux et semble présente en grande quantité. Des concentrations élevées en AGP dans le liquide d'épanchement ou le sérum (>1.5 g/L d'après SHARIF *et al.*, 2008) peuvent aussi permettre de confirmer une suspicion clinique de PIF. Cependant, cette élévation de la concentration en AGP dans le sérum est également rapportée lors d'infections par le FIV et le FeLV. De plus, la prudence reste de mise car des animaux non symptomatiques excréant le coronavirus félin peuvent aussi présenter des fluctuations de l'AGP présente dans leur sérum, probablement due aux réinfections continues qui se produisent dans des chatteries ou autres regroupements de chats (PALTRINIERI, 2008).

Enfin, on peut noter l'absence de valeur pronostique du titre d'AGP mesuré chez le chat.

### ***B. Diagnostic par recherche d'anticorps***

#### **1. La sérologie**

Différents tests sont répertoriés pour détecter les anticorps anti FCoV : le test ELISA, le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) et celui de neutralisation virale. L'inconvénient majeur de tous les tests sérologiques est l'absence de distinction connue entre les anticorps des différents coronavirus et en particulier entre les anticorps spécifiques des FECV et FIPV.

##### **a. Les tests quantitatifs**

- Le test d'immunofluorescence indirect

Le test le plus couramment utilisé en laboratoire est celui d'IFI. C'est la méthode de référence et elle consiste à détecter les anticorps dirigés contre le FCoV dans un sérum de chat suspect. On utilise alors comme substrat des cellules de reins de chats (CrFK) infectées par le virus de la PIF ou plus couramment, du virus porcin TGEV. Le sérum à tester dont on a

préalablement fait plusieurs dilutions est mis à incuber sur les cellules infectées. Les anticorps de chats sont révélés par des anticorps secondaires anti-chat conjugués à de la fluorescéine isothiocyanate. Le titre en anticorps est la plus grande dilution de sérum pour laquelle une fluorescence reste détectable au niveau des cellules infectées (PEDERSEN, 2009 et PRATELLI, 2008).

- Le test de neutralisation virale

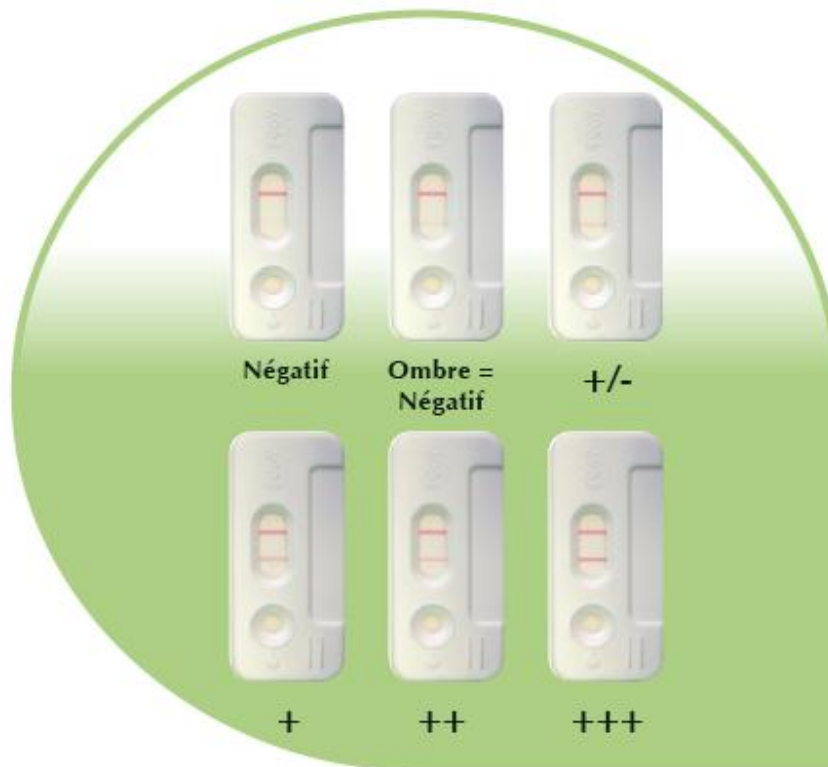
On peut aussi citer les tests de neutralisation virale. Réalisés en laboratoire, ils consistent à mettre en présence du virus FCoV type II et le sérum testé. Le principe est fondé sur la formation d'un complexe anticorps-antigène (si le sérum contient en effet des anticorps) empêchant l'infection des cellules sensibles. Le titre en anticorps neutralisant du sérum testé est alors l'inverse de la plus grande dilution du sérum ayant permis l'inhibition complète de l'effet cytopathique du virus. Ce test ne détecte que les anticorps neutralisants, d'où un possible manque de sensibilité (PRATELLI, 2008). De plus, ce test n'est efficace qu'avec les virus FCoV de type II qui ne sont pas prépondérants.

#### **b. Les tests qualitatifs**

- Le test d'immunochromatographie

Il existe un autre test, rapide celui-ci, facilement utilisable en clinique vétérinaire (Par exemple le Speed® F-Corona (virbac)). Il s'agit d'un test d'immunochromatographie qui permet de mettre en évidence les anticorps anti-Coronavirus présents dans un échantillon de sérum, de plasma, de sang total ou de liquide d'ascite. Il utilise une protéine N (voir plus haut) recombinante purifiée et synthétisée par génie génétique. Cette protéine, très stable, permet la détection des anticorps dirigés contre les différentes souches de Coronavirus retrouvées en milieu naturel. Sont présentés sur la figure 9 les résultats éventuellement rencontrés suite à un tel test. En comparaison avec la méthode de référence d'immunofluorescence TGEV, le test aurait une spécificité de 100% et une sensibilité de 94% (ADDIE, 2008).

Figure 9 : Panel des résultats observés suite à un test d'immunochromatographie Speed® F-Corona (Virbac)  
(ADDIE, 2008)



- Le test Elisa

On peut aussi évoquer le test Elisa qui est un dosage immunoenzymatique sur support solide (FCoV immunocomb Biogal Galed Laboratories, Israël). Il s'agit là aussi d'un test rapide que l'on peut aisément utiliser en clinique vétérinaire. Il utilise des antigènes liés à un support solide sur lesquels viennent se fixer, s'ils sont présents, les Ig G spécifiques du FCoV du sérum testé. Une seconde étape consiste en la fixation d'un anticorps anti chat conjugué à une phosphatase alcaline au complexe anticorps-antigène éventuellement formé. Enfin, après deux lavages successifs, une réaction enzymatique permet de révéler ce complexe. L'intensité de la réaction colorée donne une indication sur la concentration en anticorps présents. Une étude (ADDIE *et al.*, 2004a) cherchant à comparer ce test rapide à la méthode de référence a trouvé une sensibilité de 95 % et une spécificité de 83 % pour ce test.

Étant donnée l'absence de distinction connue entre les anticorps des différents coronavirus et en particulier entre les anticorps spécifiques des FECV et FIPV, seul un titre très élevé,  $\geq 1/1600$ , peut conforter l'hypothèse de PIF et au contraire, un titre nul permet de l'éloigner (PEDERSEN, 1976). Mais il faut être conscient que la présence seule d'anticorps n'implique en aucune façon un diagnostic de certitude de PIF et à l'inverse, l'absence d'anticorps ne peut annuler à elle seule la possibilité d'une PIF (HIRSCHBERGER *et al.*, 1995).

D'après l'étude de SPARKES (1991), plus le titre en anticorps est élevé, plus la spécificité du test sérologique augmente. On passe d'une spécificité de 63 à une spécificité de 92% lorsque le titre en anticorps passe de 1/160 à 1/640.

On peut noter qu'un suivi de la concentration en anticorps pourrait avoir un intérêt certain. En effet, des études ont constaté une augmentation progressive de cette concentration chez les chats passant d'un état asymptomatique à une forme clinique de PIF (PEDERSEN, 1976). En revanche, on constate une chute très importante de la concentration en anticorps lors du stade terminal de la maladie ou lors de PIF humide foudroyante. Cela est en partie lié au nombre important de liaison virus-anticorps dans ces cas de figure, empêchant la détection des anticorps par les tests sérologiques et en partie au fait que les anticorps passent dans le liquide d'épanchement par extravasation suite à l'inflammation des vaisseaux sanguins alors devenus plus perméables.

Aux vues de ces différentes informations, cette technique n'est donc pas à utiliser seule.

Cependant, les tests sérologiques rapides présentent un intérêt dans certaines situations définies, (ADDIE et GAGNON, 2010) notamment pour le dépistage avant la saillie, la détection du FCoV dans une chatterie voire sa recherche avant l'introduction d'un chat dans une collectivité, la détermination du statut d'un chat en contact d'un autre chat suspect de PIF ou excréteur du coronavirus.

## **2. Dans le liquide d'épanchement**

Il est également possible de déterminer le titre en anticorps présent dans le liquide d'épanchement abdominal lors de PIF humide. Il est en général plus élevé que le titre en anticorps mesuré dans le sérum (PALTRINIERI *et al.*, 1998).

## **3. Dans le liquide cérébro-spinal (LCS)**

On peut aussi déterminer la présence d'anticorps anti-FCoV dans le liquide cérébro-spinal (DIAZ et POMA, 2009). Ceci montre simplement que l'animal a été exposé au coronavirus dans le passé. Il faut donc interpréter une fois de plus les résultats avec prudence en les comparant aux commémoratifs, aux signes cliniques et autres examens complémentaires. Lors d'une étude menée sur 67 chats, la détection d'IgG anti-FCoV avait une sensibilité de 60% et une spécificité de 90%. La valeur prédictive positive étant de 50% et la VPN de 93%. Les valeurs de ce test étaient meilleures lorsque les animaux avaient d'abord été sélectionnés sur des critères cliniques (affection neurologique diagnostiquée).

Enfin, les IgG n'ont été détectées que sur les chats ayant par ailleurs un titre sérologique élevé (de 1/4096 à /16384). Des études cherchant à savoir si les IgG du LCS étaient produites localement ou provenaient du sang ont pu mettre en évidence qu'a priori, ces IgG pénétraient dans le système nerveux central (SNC) depuis le réseau sanguin périphérique à la condition que leur concentration dans le sang soit très élevée (STEINBERG *et al.*, 2008 et BOETTCHER *et al.*, 2007). Cependant, certains auteurs (FOLEY *et al.*, 1998)



constatent qu'au contraire il n'existerait pas de corrélation statistique entre le titre en anticorps dans le LCS et celui dans le sérum. De plus, le titre en IgG serait proportionnellement plus important dans le LCS que dans le sérum, suggérant une production d'IgG dans le cerveau en réponse à une réplication locale du virus.

En général, c'est dans les formes sèches de PIF que le titre sérologique est le plus élevé. C'est aussi dans ces formes de PIF que l'on rencontre la très grande majorité des affections du SNC (PEDERSEN, 2008).

### ***C. Diagnostic par biologie moléculaire***

#### **1. Possibilités actuelles et perspectives offertes par l'outil PCR**

##### **a. Généralités sur la RT-PCR**

L'acronyme RT-PCR signifie *Reverse Transcriptase* Polymerase Chain Reaction. C'est un procédé par lequel un acide ribonucléique (ARN) monocaténaire est transcrit « à l'envers » en ADN complémentaire (ADNc) pour être ensuite amplifié de façon à le détecter puis à l'étudier. On utilise pour cela une enzyme « transcriptase inverse » qui est une ADN polymérase ARN dépendante thermorésistante (initialement la Taq polymérase qui désigne l'enzyme *Thermus aquaticus*) et qui permet la transcription d'ARN en ADNc. On utilise de plus des nucléotides pour la synthèse d'ADN, mais aussi un couple d'amorces (c'est une série de quelques nucléotides). Ce couple peut initier la synthèse à l'endroit souhaité sur le brin d'ARN (au niveau d'un gène particulier par exemple). Et enfin une enzyme RNase inhibitrice qui évite la dégradation de l'ARN. On y ajoute évidemment l'échantillon d'ARN à analyser.

On peut utiliser trois types d'amorces pour réaliser une telle RT-PCR :

1. Des amorces oligo (dT) constituées d'une succession de désoxythymidines lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylés en 3' (ARNm eucaryotes par exemple). Dans ce cas, tous les ARNm sont *a priori* copiés en ADNc (VOGE, 2002),
2. On peut aussi utiliser des « random (hexamer) primers » c'est-à-dire des hexamères de nucléotides choisis aléatoirement pour amplifier là-aussi tout l'ARNm,
3. Et, dernière possibilité, on peut choisir des amorces spécifiques de gènes d'intérêt.

Ce choix se fait en fonction des méthodes employées et du but recherché.

Les principales étapes d'une RT-PCR sont les suivantes (QIAGEN, 2010 et VOGÉ, 2002) :

1. La transcriptase inverse « transcrit » l'ARN en ADNc à partir de l'amorce choisie,
2. Selon les protocoles, il est ensuite recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse et de dénaturer l'hybride ARN/ADNc,
3. Puis, l'ADN polymérase catalyse la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice,

4. Enfin, la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc, c'est-à-dire de le synthétiser en de nombreux exemplaires. Pour cela, les trois étapes classiques d'une PCR sont répétées lors de nombreux cycles (une quarantaine). Il faut premièrement dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin. Deuxièmement, on amorce la réplication de la séquence à amplifier à l'aide des amorces nucléotidiques. Et troisièmement, on réalise la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits obtenus sont sous forme d'ADN double brin. Ils servent de matrice pour le cycle suivant permettant donc une amplification exponentielle (BORDE, 2006).

Chaque étape se produit à une température précise et dure un temps défini qui sont déterminés préalablement grâce à la programmation d'une machine appelée thermocycleur dans laquelle on place nos tubes contenant les éléments décrits précédemment (enzymes, nucléotides, ARN et amorces notamment).

La RT-PCR est certainement la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier) les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule. Dans ce but elle est souvent réalisée *in situ* c'est à dire sur du matériel biologique fixé. Elle est également utilisée pour la construction de banques d'ADNc, le tri d'ARNm (*Differential Display* RT-PCR) ainsi que la construction de sondes d'ADN.

L'une des difficultés de cette méthode concerne la préparation des ARN qui peuvent être très facilement dégradés et contaminés par de l'ADN génomique (PEDERSEN, 2009).

#### **b. Utilisation et limites de la RT-PCR pour le diagnostic de la PIF**

- Les principes généraux de la RT-PCR pour le diagnostic de la PIF

Une technique de RT-PCR a été mise au point (HERREWEGH *et al.*, 1995) afin de détecter les coronavirus félines issus de nombreuses souches différentes. Cette technique est réalisable sur des chats pour lesquels on veut établir un diagnostic de PIF ou que l'on veut identifier comme étant ou non porteur sain du FCoV. La RT-PCR peut se faire à partir de divers prélèvements, à savoir du plasma, du liquide d'épanchement (une forte concentration en ARN y a été retrouvée, PEDERSEN, (2009)), des fèces. Les amorces utilisées se situent dans une région très conservée du génome viral nommée 3'-UTR (97% à 100% de similitudes en comparant huit souches de FCoV distinctes (HERREWEGH *et al.*, 1995). La séquence de cette région est également très conservée si l'on compare le FCoV, le TGEV et le CCV (coronavirus canin). Les amorces ont donc été choisies au sein de cette zone en confrontant plusieurs coronavirus félines, porcins et canins. Davantage de détails au sujet de ces amorces figurent dans le tableau 5.

**Tableau 5 : Position, orientation et séquence des amorces couramment utilisées pour le diagnostic de la PIF par RT-PCR (HERREWEGH *et al.*, 1995)**

Amorces utilisées	séquence (5'→3')	Position par rapport au gène 7b	Orientation
P 204	GCTCTTCCATTGTTGGCTCGTC	205-184	contre-sens
p 205	GGCAACCCGATGTTTAAACTGG	1-23	sens
p 211	CACTAGATCCAGACGTTAGCTC	213-192	contre-sens
p 276	CCGAGGAATTACTGGTCATCGCG	25-51	sens

- L'intérêt de la méthode

La RT-PCR a l'avantage, par rapport aux méthodes sérologiques, de détecter une infection patente plutôt que d'informer sur une réponse immunitaire éventuellement passée en réaction à la présence d'un coronavirus.

Cette méthode offre une bonne sensibilité avec la possibilité d'une détection du virus dès deux jours post-infection. De plus, dans l'étude de HERREWEGH *et al.* (1995), 14 chats sur 18 atteints de PIF avaient été détectés, soit 78%. On peut ajouter que la sensibilité était plus grande sur un échantillon de plasma que sur du sérum. Par ailleurs, un chat sur huit atteints d'une autre affection que la PIF était positif car cette RT-PCR ne distingue pas les souches FIPV et FECV.

- Les limites de la RT-PCR pour le diagnostic de la PIF

Cependant, la faiblesse majeure de la méthode de RT-PCR réside dans le fait qu'elle ne permet pas plus que la sérologie de différencier FECV et FIPV. De plus, de par le choix des couples d'amorces, très consensus, elle ne permet pas de différencier FCoV, TGEV et CCV. Or, on ne peut pas exclure qu'il existe une infection naturelle des chats par les deux derniers virus cités même si rien n'a été démontré dans ce sens (HERREWEGH *et al.*, 1995).

D'autre part, une des difficultés techniques est le danger de contamination du prélèvement lors de la phase d'amplification. Un laboratoire consciencieux et une haute technicité sont donc requis (PEDERSEN, 2009).

Enfin, des RT-PCR peuvent être réalisées à partir des fèces, mais il faut être très prudent quant aux inhibiteurs de RT-PCR présents dans les excréments. Pour cette raison, une purification préalable du prélèvement est nécessaire mais coûteuse.

### c. Perspectives permises par les récentes études

Un certain nombre d'études (SIMONSA *et al.*, 2005, CAN-SXAHNA *et al.*, 2007 et GUNN-MOORE *et al.*, 1998) ont cherché à améliorer la technique de RT-PCR pour le diagnostic de la PIF, notamment en cherchant à augmenter sa sensibilité et sa spécificité.

En particulier, Rottier et son équipe (SIMONSA *et al.*, 2005) se sont basés sur la pathogénie de la maladie afin d'élaborer une méthode plus pertinente et plus spécifique du FIPV. Elle s'appuie sur une étape clé caractérisant la pathogénie du virus engendrant la PIF ; il s'agit de la faculté supposée propre au FIPV d'infecter les macrophages et les monocytes sanguins et de s'y répliquer. En réalité, le FCoV peut lui aussi être retrouvé dans les cellules mononucléaires du sang périphérique et ne pas seulement être confiné au tube digestif comme on le pensait auparavant. Cependant, d'après Rottier *et al.*(2005) sa faculté de réplication dans les macrophages et les monocytes est bien moindre que celle du FIPV. Par conséquent, cette étude pose l'hypothèse qu'une RT-PCR détectant l'ARNm du gène M des coronavirus félines dans les cellules sanguines précédemment citées est en fait capable de détecter les souches virulentes uniquement en écartant les non virulentes. Ainsi, sur 81 chats dont le diagnostic de PIF a été confirmé par une analyse histologique suite à une autopsie, 75 avaient été positifs au test de RT-PCR mis au point par l'équipe de chercheurs, soit 93%. De plus, sur un nombre total de 424 chats en bonne santé ayant vécu en collectivité (dans des chatteries ou des maisons comptant plusieurs chats) avec parfois des chats atteints de PIF, seuls 23 ont présenté un résultat positif à l'issue de la RT-PCR, soit 5%.

Ces résultats semblaient encourageants mais une seconde étude, de CAN-SXAHNA *et al.* (2007), revient sur ce protocole de RT-PCR et remet en cause son principe et ses bons résultats. En effet, dans cette dernière étude, 26 chats dont 25 sans symptôme et un présentant de forte suspicion de PIF ont fait l'objet de prélèvements sanguins pour réaliser une RT-PCR comme décrite plus haut : 14 chats dont celui malade étaient positifs soit 54% ! Ceci remet sérieusement en question la bonne spécificité de la méthode utilisée, ainsi que son principe de base qui reposait sur la réplication quasi-exclusive des « souches virulentes » dans les macrophages et monocytes.

D'autre part, on peut améliorer la sensibilité de la RT-PCR en ciblant l'amplification sur le gène codant pour le domaine N-terminal de la protéine spike (BENETKA *et al.*, 2004). Ceci permet de différencier les types I et II des coronavirus félines. On utilise alors des couples d'amorces spécifiques de chacun des deux types. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les recherches décrites dans cet article ont permis de conclure que les chats suspects de PIF présentent en grande majorité le type I seul (86%), 7% le type II et 7 autres % les types I et II. Une précédente étude (POSCH *et al.*, 2001) avait montré que 55% des chats porteurs sains possédaient le type I seul et 28% le type II seul. Ainsi, ces études concordent pour dire que les deux types peuvent engendrer la maladie mais que le type I est le plus fréquemment retrouvé à la fois chez les individus sains et les individus malades.

Une dernière étude menée par DYE, HELPS et SIDDELL (2008) cherche à améliorer la technique quantitative de real time RT-PCR réalisée sur des prélèvements fécaux. Elle part de l'observation que les fèces contiennent des facteurs enzymatiques inhibiteurs de l'étape de transcription inverse de la RT-PCR, qui réduit de façon artificielle la quantité d'ARN obtenue. Cette même étude teste de plus trois protocoles différents d'extraction de l'ARN contenu dans les fèces et statue que l'un d'entre eux peut réduire ce problème d'inhibition

(il s'agit du protocole utilisant la mini trousse d'extraction d'ARN viral QIAGEN). Enfin, elle pose l'hypothèse que la nature de l'enzyme transcriptase inverse utilisée dans la trousse de RT-PCR en temps réel pourrait être plus ou moins sensible à ces facteurs inhibiteurs. L'article met donc en garde sur de possibles sous-estimation du niveau d'excrétion des chats testés par la méthode quantitative de RT-PCR.

Enfin, comme on l'a vu précédemment, il se pourrait qu'une RT-PCR ciblée sur les gènes dits de virulence (3c ou 7b notamment) permette d'affiner de façon considérable le diagnostic de la PIF. En effet, si l'on considère qu'une mutation sur ces gènes est à l'origine de la virulence du virus, il suffirait de réaliser l'amplification de la ou des région(s) mutée(s) en élaborant des amorces spécifiques... Mais il reste beaucoup à faire dans cette voie : parvenir à un consensus au sujet de la théorie de la mutation interne, et le cas échéant identifier la mutation en question, la localiser, comprendre son impact sur la transcription et la traduction.

#### ***D. L'immunohistochimie et l'immunofluorescence***

Ces techniques sont réalisées respectivement sur les tissus contenant les lésions et le liquide d'épanchement. On recherche alors du FCoV au sein des macrophages infectés. On utilise des anticorps très spécifiques du FCoV. On peut noter que la détection de coronavirus dans le liquide d'épanchement (abdominal ou pleural) par immunofluorescence est très spécifique avec une VPP de 100% mais moins sensible (la VPN est de 57%) que dans les tissus où se loge le FIPV en général. L'immunohistochimie présente l'inconvénient de nécessiter une laparotomie invasive voire une laparoscopie pour obtenir des échantillons de tissus de bonne qualité et d'assez grande taille. Il faut de plus savoir qu'il peut exister des virus dans les macrophages sans que l'animal ne soit atteint de PIF. Cependant, on ne peut détecter les virus que s'ils sont assez nombreux, et c'est le cas seulement en cas de PIF avérée. Il est d'ailleurs préférable d'utiliser la méthode d'immunofluorescence plutôt que la RT-PCR sur un prélèvement de liquide d'épanchement pour diagnostiquer une PIF (ADDIE D, PALTRINIERI S et PEDERSEN NC, 2004b). En effet, la technique de RT PCR est très sensible et détectera donc la moindre petite quantité de virus sortie du territoire sanguin suite à un quelconque processus inflammatoire chez un chat porteur du FCoV. Au contraire, l'immunocytologie ne détecte que de grandes quantités de virus et identifie clairement les macrophages comme infectés du FCoV. Il y a d'importants risques de faux négatifs et cette technique est difficile à mettre en œuvre en routine. Elle présente cependant une bonne spécificité.

#### ***E. Le diagnostic post-mortem***

À l'examen post-mortem, les lésions sont souvent caractéristiques et permettent d'orienter fortement le diagnostic. L'autopsie et l'histologie sont les seuls outils offrant un diagnostic de certitude de la péritonite infectieuse féline.

## 1. Les lésions abdominales

Lors de formes humides, la lésion très fréquemment retrouvée est la présence de pyogranulomes, qui sont surtout visibles en région abdominale, à la surface de la séreuse des différents organes. L'omentum est tout particulièrement atteint avec un aspect épaissi, œdémateux et une infiltration de cellules inflammatoires et nécrotiques. Suite à une observation sur lame d'histologie, on constate que ces pyogranulomes sont construits de la manière suivante : au centre, un agrégat de macrophages près de petites veines, et en périphérie, un exsudat inflammatoire contenant de nombreux neutrophiles et macrophages dans lequel sont dispersées des cellules sanguines et des lymphocytes T. Les macrophages retrouvés dans ces pyogranulomes contiennent quasiment tous une forte concentration de coronavirus. Les lésions thoraciques sont beaucoup moins fréquentes et principalement retrouvées dans la plèvre et le péricarde.

En ce qui concerne la PIF sèche, les lésions sont en général plus focales, avec des granulomes centrés sur quelques macrophages bordant des vaisseaux sanguins et entourés d'une trame dense de lymphocytes B et cellules sanguines s'étendant aux tissus voisins comme on l'observe dans les formes habituelles de granulomes.

La taille des granulomes peut varier de l'échelle microscopique à quelques centimètres de diamètre, Les pyogranulomes de la forme humide peuvent eux atteindre quelques millimètres voire finir par confluer. Les granulomes tout comme les pyogranulomes sont majoritairement localisés dans la cavité abdominale et plus précisément dans les reins, les nœuds lymphatiques mésentériques, le foie, le caecum et le colon, mais plus rarement observés en région thoracique.

## 2. Les lésions oculaires et du système nerveux central

On peut recenser des lésions au niveau de l'œil et du système nerveux central, dans les cas de PIF sèches pour la grande majorité. Il s'agit de lésions en général plus petites que celles retrouvées dans l'abdomen.

Pour ce qui est du SNC, les lésions sont en général situées dans la partie ventrale et postérieure du cerveau, les leptoméninges, les plexus choroïdes, la moelle épinière et les nerfs spinaux (PEDERSEN, 2008 et DENISET, 2007). On retrouve des lésions granulomateuses ou pyogranulomateuses. À l'autopsie, les méninges apparaissent légèrement voilées ou opaques, plus ou moins nécrosées et le LCS a une coloration anormale, en particulier dans les ventricules. Une hydrocéphalie secondaire à l'obstruction de l'aqueduc de Sylvius par inflammation granulomateuse peut apparaître (DENISET, 2007).

Les lésions oculaires quant à elles, sont localisées à l'uvée antérieure suite à une infiltration de cellules plasmocytaires et lymphocytaires. Elles se manifestent par la décoloration et le gonflement de l'iris. On peut aussi observer des précipités à l'arrière de la cornée causés par la production de cellules inflammatoires (macrophages) et de fibrine par l'uvée enflammée.

### **3. Les lésions des organes lymphoïdes**

Enfin, des lésions des tissus lymphoïdes peuvent être recherchées, dans la rate notamment, qui s'hypertrophie à la suite d'une infiltration de cellules histiocytaires et plasmocytaires et de l'hyperplasie des follicules lymphoïdes de la pulpe blanche. On peut aussi noter des dépôts de fibrine, des infiltrats de cellules polynucléées et parfois une organisation des lésions en véritables pyogranulomes. Les nœuds lymphatiques (thoraciques ou abdominaux) peuvent présenter le même type de lésions que la rate.





## DEUXIÈME PARTIE, EXPÉRIMENTALE



# INTRODUCTION

La péritonite infectieuse féline est une maladie virale mortelle dont le diagnostic de certitude reste difficile à poser. En effet, il existe *a priori* des souches pathogènes de FCoV que l'on nomme FIPV, entraînant une maladie létale et d'autres peu pathogènes que l'on nomme FECV, qui aboutissent à un portage asymptomatique ou à des entérites modérées. Or, nos méthodes actuelles de diagnostic (recherche d'anticorps ou de virus dans le matériel biologique) sont incapables de distinguer ces différentes souches. Nous nous sommes proposés dans l'étude rétrospective qui suit, de vérifier l'hypothèse selon laquelle les gènes 3c, 7b et M seraient distincts entre les souches FECV et FIPV. Nous avons donc cherché à amplifier et séquencer ces 3 gènes à partir d'extrait de liquide d'épanchement abdominal de 15 chats morts de PIF. Nous avons comparé nos résultats à ceux de la littérature pour les gènes 3c, 7b et M amplifiés chez des chats sains et des chats morts de PIF.

Nous avons observé que 7 chats sur 10 morts de PIF présentaient une ou plusieurs mutations sur le gène 3c. Nous n'avons pas observé de différences sur les gènes 7b et M entre les souches FECV et FIPV.

## I Matériel et méthodes

### A. Prélèvements étudiés

Nous avons étudié 15 liquides d'épanchement abdominal de chats, décédés d'une forme humide de PIF, collectées soit à l'école vétérinaire d'Alfort, soit référés par un vétérinaire extérieur soit provenant de l'école vétérinaire de Roumanie. L'âge des chats n'est pas connu en règle générale. Ils sont tous morts à la suite d'une PIF confirmée par leur autopsie. Les épanchements ont fait l'objet d'une recherche par sérologie d'anticorps anti-coronavirus félines. Le tableau 6 résume les titres en anticorps de chacune des liquides d'épanchement étudiés. La présence de coronavirus avait aussi été démontrée par RT-PCR par amplification d'une séquence consensus située dans la région 3' du génome viral (HERREWEGH *et al.*, 1995). Les liquides d'épanchement ont été conservés à -80°C.

**Tableau 6 : Liste des chats faisant partie de l'étude et résultats des sérologies et RT-PCR réalisées respectivement à partir de leur sérum et de leur liquide d'épanchement**

Identification du chat	Age du chat	Sérologie	RT PCR sur liquide d'épanchement 205-211	Date du prélèvement
32		?	Positive	Octobre 2004
34		?	Positive	Octobre 2004
41		?	Positive	Mars 2005
163	9 mois	625	Positive	Juillet 2007
165		625	Positive	Mai 2008
167		3 125	Positive	Septembre 2008
176	1 an	16 000	Positive	Octobre 2008
180		3 125	Positive	Octobre 2008
184	1 an	625	Positive	Mai 2009
185		625	Positive	Mai 2009
194		625	Positive	Juin 2009
196		625	Positive	Septembre 2009
198		625	Positive	Septembre 2009
6 662		3 125	Positive	Novembre 2003
6 832		16 000	Positive	

### ***B. Amorces sélectionnées***

L'objectif est de séquencer les deux gènes accessoires 3c et 7b vraisemblablement impliqués dans la virulence associée au FCov ainsi que le gène M codant pour la protéine d'enveloppe correspondante.

Il a été décidé d'utiliser dans un premier temps un couple d'amorces pour chacun des gènes (3c, 7b et M). Les amorces choisies pour 7b et 3c avaient déjà été utilisées dans

des études préalables citées dans le tableau ci-dessous. Quant au couple d'amorces choisi pour amplifier le gène M, il est habituellement utilisé au laboratoire de virologie de l'ENVA.

Dans un second temps, il a été prévu d'utiliser des amorces supplémentaires pour les gènes 3c et 7b dans les cas où la RT-PCR échouerait à amplifier les gènes 3c et 7b complets. Ceci est illustré dans les tableaux et figures qui suivent.

Le tableau 7 précise la nature des amorces et leur position par rapport à une séquence virale de référence.

**Tableau 7 : Position, taille et détails de la séquence des amorces choisies pour l'étude**

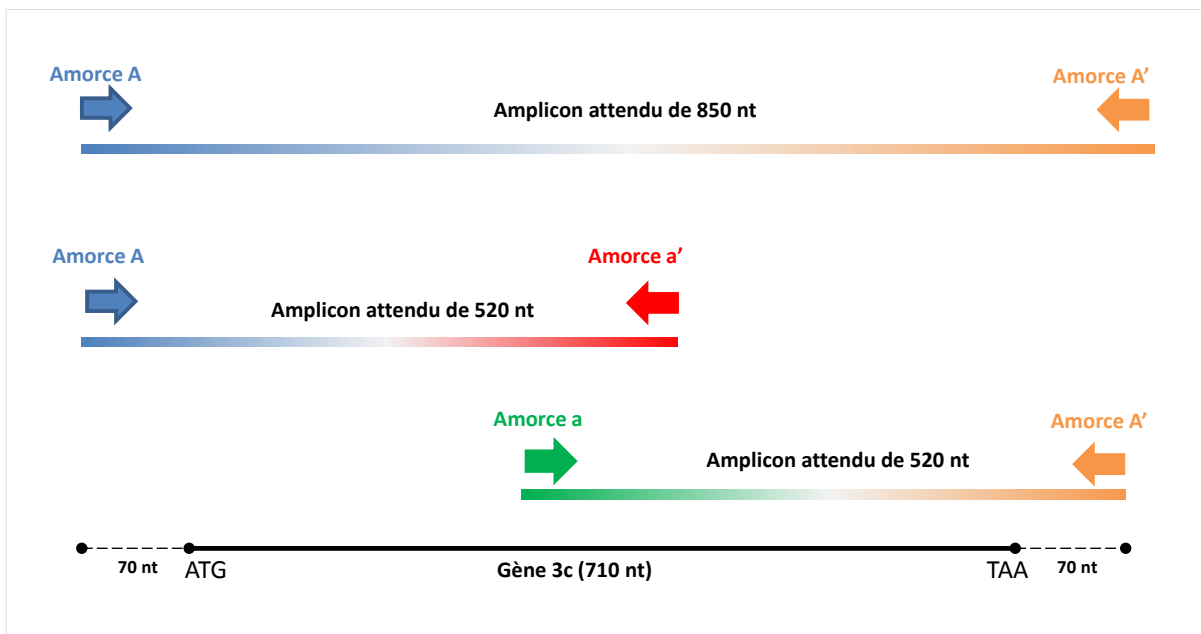
Nom de l'amorce	Séquence (sens 5'→3')	Nombre de paires de bases	Position sur le gène (numérotation en nucléotides)* <sup>1</sup>
ORF3cFw = A* <sup>2</sup>	CAAGTACTATAAA ACGTAGAAGMAG (CHANG et al., 2007)	25	25 095-25 120
ORF3cRv = A'	CAGGAGCCAGAAG AAGACACTAA (CHANG et al., 2007)	23	25 878-25 855
ORF3c-intFw = a	ATGGCATTGTGACA GCAACTG	21	25 358-25 379
ORF3c-intRv = a'	GAGCCGTGAGAAC TTCTCAT	20	25 615-25 595
ORF7bFw = B	GGGTTTTCTGCTA TACATTG (BROWN et al., 2009)	21	28 336-28 357
ORF7bRv = B'	CACTAGATCCAGA CGTTAGCTC (BROWN et al., 2009)	22	29 196-29 174
ORF7b-intFw = b	TCCTTTYTATTCCTT TGTAGATAA	24	28 676-28 700
ORF7b-intRv = b'	ATGACAACCAACA TTAATCTCTT	24	28 756-28 732
MFw	TCCAGATATGTAAT GTTCCG	20	26 454-26 474
MRv	TCTGTTGAGTAATC ACCAGCT	21	26 845-26 824

\*<sup>1</sup> La position est déterminée par rapport à une souche de coronavirus félin nommée UU18 par l'université d'Utrecht et dont la séquence de 29 252 nucléotides figure sur le site d'EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk))

\*<sup>2</sup> Pour simplifier, chaque amorce est nommée par une lettre : A, A', a, a', B, B', b et b'.

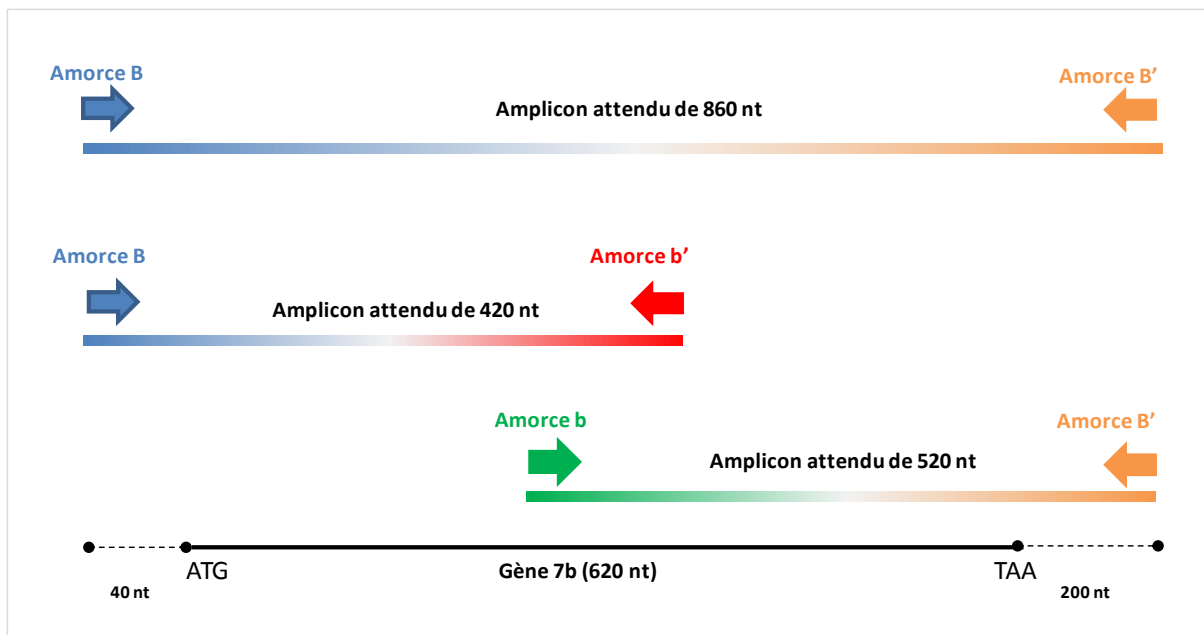
Sur la figure 10, est illustrée la position des amorces pour le gène 3c. On réalise les RT-PCR avec le couple A/A' dans un premier temps. En cas d'échec, les couples A/a' et A'/a sont utilisés. On a choisi les amorces a' et a de manière à obtenir des portions du gène plus faciles à amplifier car de plus petite taille que le gène complet. Ainsi, l'amplicon attendu avec le couple d'amorces A/A' a pour taille 850 nt. Les amplicons attendus avec les couples A/a' et A'/a ont pour taille 520 nt chacun

Figure 10 : Position des amorces utilisées pour amplifier le gène 3c



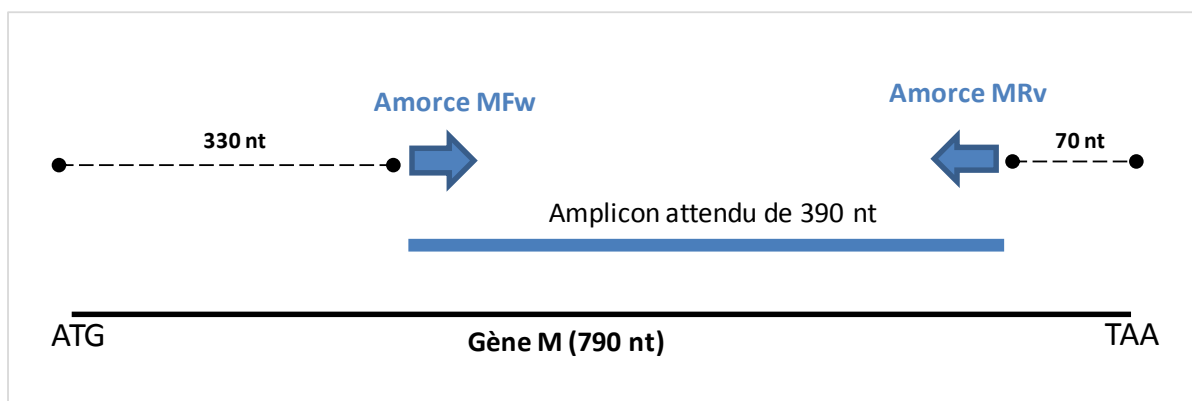
Sur la figure 11, est illustrée la position des amorces pour le gène 7b. Les amorces b' et b ont été choisies dans le même but que les amorces a' et a pour le gène 3c (comme expliqué précédemment). L'amplicon attendu avec le couple d'amorces B/B' a pour taille 860 nt. Les amplicons attendus avec les couples B/b' et B'/b ont pour taille respectivement 420 nt et 520 nt.

Figure 11 : Position des amorces utilisées pour amplifier le gène 7b



Sur la figure 12 qui suit, est illustrée la position des amorces pour le gène M. Pour notre étude, nous n'avons besoin d'amplifier qu'une partie du gène (voir plus loin dans l'exposé : I D. Protocole d'amplification génomique par RT-PCR). Nous avons donc choisi les amorces MFw et MRv de façon à obtenir une portion de 390 nt.

Figure 12 : Position des amorces utilisées pour amplifier le gène M



### ***C. Extraction de l'ARN viral contenu dans le liquide d'épanchement abdominal***

L'ARN viral a été extrait des liquides d'ascite prélevés sur les chats cités ci-dessus grâce à une trousse nommée « QIAAMP Viral RNA » du laboratoire Qiagen. La purification se fait grâce à des colonnes qui fixent préférentiellement les acides nucléiques. Le protocole est le suivant :

- Prélèvement de 140 µL de chaque échantillon d'épanchement abdominal,
- Ajout de 560 µL de tampon « AVL » contenant du ligand d'ARN ,
- Homogénéisation au vortex,
- Repos pendant 15 minutes permettant la lyse des particules virales,
- Centrifugation brève,
- Ajout de 560 µL d'éthanol avant de mélanger au vortex,
- 630 µL de ce mélange est placé sur les colonnes de purification,
- Centrifugation à 8000 tours pendant 1 minute,
- Ajout de 500 µL de tampon « AW1 » dans de nouveaux tubes collecteurs puis centrifugation,
- Ajout à nouveau de 500 µL de tampon « AW2 » puis centrifugation à 14000 tours pendant 3 minutes,
- Une autre centrifugation du filtrat seul permet de sécher la colonne,
- La colonne est placée dans un tube conique (1,5 mL) avant d'y ajouter 60µL d'eau stérile,
- Repos pendant 1 minute puis centrifugation une dernière fois à 8000 tours pendant 1 minute. L'ARN extrait peut être récupéré au fond du tube conique.

### ***D. Protocole d'amplification génomique par RT-PCR***

On a ensuite réalisé des RT-PCR pour amplifier les gènes 3c, 7b et M de l'ARN viral extrait du liquide d'épanchement abdominal de chaque chat identifié précédemment.



On utilise en référents un tube témoin négatif pour lequel l'ARN viral est remplacé par de l'eau et un tube témoin positif où l'ARN issu des liquides d'ascite de chats est remplacé par de l'ARN provenant de cellules infectées de coronavirus félin.

La trousse de RT-PCR utilisé est une trousse « one step » (QIAGEN NB) qui contient les dNTP (nucléotides qui permettront la polymérisation d'ADN), le tampon (qui permet de conserver un pH stable favorable au fonctionnement correct de l'ADN polymérase) et l'enzyme permettant la polymérisation de l'ADN à partir d'ARN.

Le mélange réactionnel de chaque RT-PCR est composé ainsi :

- 2 µL de dNTP,
- 10 µL de tampon,
- 2 µL d'un mélange d'enzymes,
- 1,5 µL d'amorce sens,
- 1,5 µL d'amorce anti-sens,
- 28 µL d'eau,
- 5 µL d'ARN viral extrait préalablement.

L'ensemble des tubes est déposé dans le thermocycleur où se déroulent les étapes suivantes (QIAGEN, 2010) :

1. Transcription inverse : 30 minutes à 50 °C ou 55°C en fonction des amorces utilisées,
2. Étape d'activation de la PCR : 15 minutes à 95 °C. Cette étape consiste en l'activation (grâce au gradient de température) de l'ADN polymerase de la trousse qui synthétisera les nouveaux brins d'ADN à partir d'une matrice d'ADN. Cette étape associe de plus l'inhibition des transcriptases inverse de la trousse (Omniscript and Sensiscript Reverse Transcriptases) à la dénaturation de la molécule hybride ARN/ADNc,
3. Dénaturation : 30 secondes à 94 °C. Elle sépare les deux brins d'ADN formés à partir d'un ARN, afin d'obtenir deux matrices d'ADN distinctes,
4. Hybridation des amorces : 1 minute à une température spécifique des amorces choisies,
5. Élongation des brins d'ADN : 1 minute à 72 °C,
6. Extension finale.

Les étapes 3 à 5 sont répétées 44 fois.

### ***E. Visualisation des amplicons sur gel d'agarose***

Les amplicons sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. La première étape consiste à fabriquer le gel :

1. On prépare une solution de TBE (triborate d'EDTA) avec 0,1 % d'agarose : 60 mL de TBE dans lesquels sont dissouts 0,6 g d'agarose après chauffage aux micro-ondes pendant deux minutes. On y ajoute une goutte de BET (bromure d'éthidium) qui est un agent intercalant des molécules d'ADN couramment utilisé comme marqueur d'acides nucléiques,
2. La solution de BET et d'agarose obtenue est déposée dans un support. Elle se solidifie en un gel par refroidissement,
3. 20 µL de chaque solution de RT-PCR sont enfin déposés dans les puits du gel coulé avec 5 µL de bleu de bromophénol qui est un marqueur coloré chargé négativement permettant de suivre le bon déroulement de l'électrophorèse. Un dépôt de 25 µL d'un marqueur de poids moléculaire est systématiquement ajouté. Tous ces dépôts migrent alors pendant une heure de la cathode vers l'anode (borne positive) exposés à un courant de 80 Volt et 200 milli Ampère,
4. Après migration, les amplicons sont enfin visualisés avec un appareil émettant des ultra-violets (UV).

### ***F. Séquençage***

Les dépôts pour lesquels une bande ADN est visible aux UV, sont envoyés à séquencer à la société Eurofins.

Les séquences ainsi obtenues ont été analysées de la manière suivante :

- Il a été d'abord vérifié qu'elles couvraient bien le gène analysé dans son ensemble. (c'est-à-dire que tout le gène a pu être séquencé, depuis le codon initial jusqu'au codon terminal) et correspondaient bien au gène félin recherché, en les comparant à des séquençages déjà existants dans la littérature (PUBMED : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>),
- Le cas échéant, les séquences de nucléotides ont été comparées entre elles et avec celles de la littérature grâce au logiciel MEGA version 5.0 afin de mettre en évidence des mutations et délétions éventuelles sur certaines d'entre elles,

- Une traduction virtuelle a ensuite été simulée sur le site European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) en séquences de protéines grâce à l'outil transeq. Ceci permet de mettre en évidence la conséquence des éventuelles mutations du gène sur la traduction de la protéine correspondante,
- Enfin, un arbre phylogénétique de probabilité maximale a été construit à l'aide du logiciel MEGA pour comparer les séquences entre elles mais aussi à des séquences de la littérature.

## II Résultats

À l'issu des manipulations précédemment décrites, à la fois la RT-PCR et le séquençage, nous avons finalement obtenu des données exploitables pour les cas répertoriés dans le tableau 8 (le détail des résultats pour chaque gène est fourni dans des tableaux situés plus loin dans l'exposé) :

**Tableau 8 : Synthèse des résultats pour lesquels la RT-PCR puis le séquençage ont fourni des données exploitables**

Identification du chat	gène 3C	gène 7b	gène M
32	X	X	X
34	X	X	X
41	X		
163	X		X
165	X	X	X
167			
176	X	X	
180	X		X
184	X	X	X
185			
194		X	X
196			X
198	X		X
6 662			
6 832	X	X	X

## ***A. Séquençage du gène 3c***

### **1. Présentation des résultats de RT-PCR**

Le tableau 9 regroupe les résultats de RT-PCR pour les 15 chats étudiés. Pour chaque prélèvement, on a dans un premier temps utilisé le couple d'amorces A/A', cité dans la littérature, afin d'amplifier d'emblée le gène 3c complet. Parmi les 15 chats étudiés, nous avons obtenu 10 amplifications génomiques de taille compatible avec celle du gène 3c.

En cas d'échec de la RT-PCR, on a dans un second temps utilisé les 2 couples A/a' et A'/a afin d'obtenir deux portions chevauchantes du gène 3c de plus petite taille que le gène 3c complet, donc en principe plus facile à amplifier. Ceci a été nécessaire pour l'ARN extrait du liquide d'ascite des 5 chats restants : les n° 167, 185, 194, 196 et 6 662. Le tableau 9 offre une vision détaillée des manipulations ayant abouti à un succès et celles ayant échoué.

Pour l'ARN extrait du liquide d'ascite des chats 167, 185 et 194, la RT-PCR réalisée avec le couple d'amorces A/a' a permis d'obtenir des amplicons dont la taille était compatible avec la portion du gène 3c recherchée mais la RT-PCR réalisée avec les amorces A'/a a échoué. Nous n'avons donc pu séquencer qu'une portion du gène 3c. On peut supposer qu'une variabilité dans la séquence du gène 3c de l'ARN viral extrait du liquide d'ascite de ces 3 chats empêche l'amplification à partir des amorces choisies.

Pour l'ARN extrait du liquide d'épanchement du chat 196, nous avons obtenu des amplicons suite aux deux RT-PCR réalisées respectivement avec les couples d'amorces A/a' et A'/a. Cependant, le séquençage a échoué sur les amplicons obtenus à partir du couple d'amorces A'/a. Nous n'avons donc pu séquencer qu'une portion du gène 3c. On peut par exemple supposer que la quantité d'amplicons obtenue n'était pas suffisante pour permettre le séquençage.

Enfin, pour l'ARN extrait du liquide d'épanchement du chat 6 662, les RT-PCR réalisées avec les deux couples d'amorces A/a' et A'/a ont échoué : nous n'avons pas obtenu d'amplicons. On peut supposer que le liquide d'ascite dont on a été extrait l'ARN du chat 6 662 était trop ancienne et l'ARN viral qu'elle contenait s'est en partie dégradé.

**Tableau 9 : Détail des résultats des RT-PCR et des séquençages du gène 3c pour chacun des chats**

Identification du chat	RT- PCR réalisées avec les amorces A et A'	RT- PCR réalisées avec les amorces A et a'	RT- PCR réalisées avec les amorces A' et a	Séquençage du gène 3c complet
32	succès			<b>succès</b>
34	succès			<b>succès</b>
41	succès			<b>succès</b>
163	succès			<b>succès</b>
165	succès			<b>succès</b>
167	échec	succès	échec	échec
176	succès			<b>succès</b>
180	succès			<b>succès</b>
184	succès			<b>succès</b>
185	échec	succès	échec	échec
194	échec	succès	échec	échec
196	échec	succès	succès	échec
198	succès			<b>succès</b>
6 662	échec	échec	échec	
6 832	succès			<b>succès</b>

## 2. Analyse des séquences de nucléotidiques

Dans le tableau 10 sont détaillées la nature et les caractéristiques des mutations répertoriées sur le gène 3c de l'ARN viral extrait du liquide d'ascite des chats de notre étude. Parmi les 10 séquences du gène 3c obtenues, 5 présentent des délétions et 2 des mutations non-sens. La position de ces délétions et mutations sur le gène 3c est en général différente en fonction du chat étudié. De plus, le nombre de nucléotides délétés est très variable : il va de 1 (chat 32) à 124 (chat 184) nucléotides délétés.

On observe dans le tableau 11 que 7 chats sur 10 soit 70% des chats pour lesquels nous avons obtenu une séquence du gène 3c présentent une mutation ou une délétion qui sont réparties à différents loci sur le gène.

**Tableau 10 : Position et caractéristiques des mutations et délétions du gène 3c de l'ARN viral extrait du liquide d'épanchement abdominal des chats de l'étude**

Identification du chat	Présence de délétions (D) ou mutations (M)	* Nombre de nucléotides délétés ou mutés	Position de la délétion ou mutation
32	oui (D)	1	36
34	oui (M)	1 (TAT→TAA)	286
41	non	0	
163	non	0	
165	oui (D)	27	512-539
176	oui (D)	28	254-282
180	oui (D)	2	613-614
184	oui (D)	124	207-331
		29	511-540
198	non	0	
6 832	oui (M)	1 (GGA→TGA)	637

\* Entre parenthèse est précisée la mutation lorsque celle-ci ne concerne qu'un nucléotide et qu'elle induit prématurément un codon terminal. Le nucléotide muté est indiqué en rouge.

### **3. Analyse des séquences protéiques résultantes**

Nous avons ensuite cherché à déterminer qu'elles étaient les conséquences des mutations et délétions observées précédemment sur les protéines correspondantes.

Nous avons pour cela utilisé l'outil transeq du site EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) afin de simuler une traduction à partir de chacune de nos différentes séquences nucléotidiques.

Cette étape nous a permis de montrer que les protéines issues des gènes délétés ou mutés ne sont en général pas intègres mais tronquées prématurément, et probablement non fonctionnelles.

Voici sur la figure 13 les séquences protéiques obtenues après séquençage puis traduction sur les chats faisant partie de la présente étude, avec 8 séquences de chats sains et 8 séquences de chats PIF de la littérature. Les étoiles figurant parfois au sein même d'une séquence (intercalées entre deux acides aminés) illustrent l'introduction prématurée d'un codon stop, mettant fin à la traduction.

Figure 13 : Alignement des séquences de protéines 3c obtenues à partir de notre étude, en comparaison avec les séquences de CHANG *et al.* (2010) : GU053614 à GU053621 : chats sains de la littérature ; GU053640 à GU053647 : chats PIF de la littérature

1. GU053614 sain	MI G G L F L L F I V R H V V A I S S H L F I A A L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F V L A Y F V V
2. GU053615 Sain	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I I M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F V L A Y F V V
3. GU053616 Sain	MI G G L F L L F I V R H V V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
4. GU053617 Sain	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F V L A Y F V V
5. GU053618 Sain	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
6. GU053619 Sain	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I L R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
7. GU053620 Sain	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I L R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
8. GU053621 Sain	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I A R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F M C V G V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
9. GU053640 PIF	MI G G L F L L F I V R V V V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V I V L A L F I L A Y F V V
10. GU053641 PIF	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I L * V I M L L V L I I V S * A L L F L F L * L E V V L C A V * E L * V * F L * L E * L V I * M A L * L * L * F * F * F M L
11. GU053642 PIF	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
12. GU053643 PIF	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y V V G M * L * L * F * F * F M L
13. GU053644 PIF	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F V L A Y F V V
14. GU053645 PIF	MI G G L F L L F K V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I I M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F V L A Y F V V
15. GU053646 PIF	MI G G L F L L F I V R H V I A S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L V A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y V V V
16. GU053647 PIF	MI G G L F L L F I A R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
17. chat 34	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
18. Chat 41	MI G G L F L L F I V R H V A V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F V L A Y F V A
19. chat 163	MI G G L F L L F I V R H V V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
20. chat 165	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F M C V G V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F V L A Y F V A
21. chat 176	MI G G L F L L F I V R H V I V S S F I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L L - - - - - F I I L L I L L V C * * * I
22. chat 180	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I A R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L V G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
23. chat 184	MI G G L F L L F I V R H V I V S S V I V R H V V A V S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F - - - - - I L I L L V C * * * V
24. chat 198	MI G G L F L L F I V R H V V S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y I I G I V V L A L F I L A Y F V V
25. chat 6832	MI G G L F L L F I V R H V A S S V I V R H V V A I S S H L F I A V L E V L F L A L Y S F V C V V L M F I V M L I G M L I A F G Y V V G I V V L A L F I L A Y F V V

NB : Les étoiles figurant parfois au sein même d’une séquence (intercalées entre deux acides aminés) illustrent l’introduction prématurée d’un codon stop, mettant fin à la traduction.

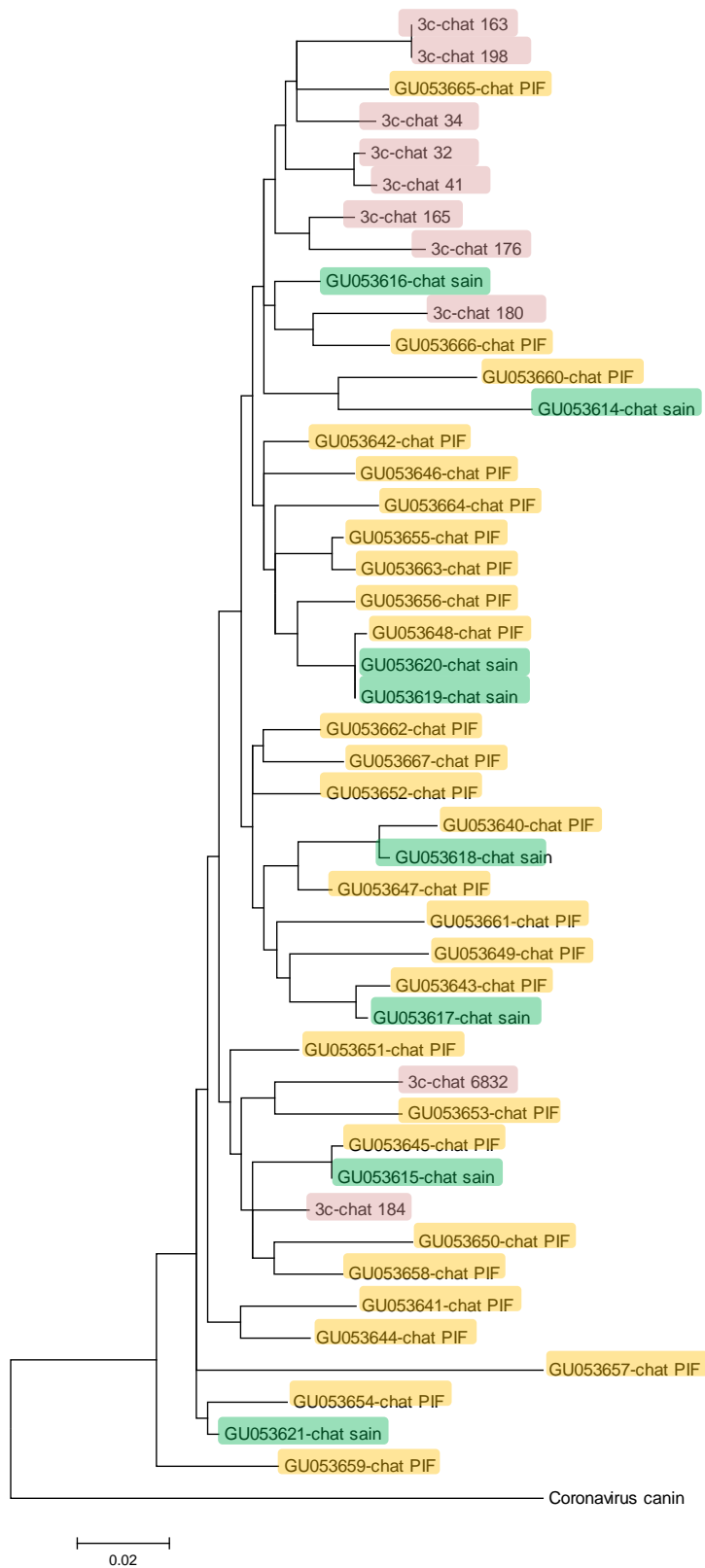




#### **4. Analyse phylogénétique**

Un arbre phylogénétique de probabilité maximale a été construit à l'aide du logiciel MEGA version 5.0. Ceci a été réalisé afin de voir le type de parenté entre les chats sains et les chats malades d'un point de vue phylogénétique. Dans cet arbre figurent les 10 séquences du gène 3c provenant des chats morts de PIF de notre étude, celles des 27 chats PIF de l'article de CHANG *et al.* (2010) et celles des 8 chats sains pris aléatoirement dans cette même étude.

Figure 14 : Arbre monophylétique de probabilité maximale pour la protéine issue du gène 3c



- Chats PIF de notre étude
- Chats sains de la littérature
- Chats PIF de la littérature

Il ne semble pas y avoir de ségrégation dans le gène 3c entre les chats infectés par le FECV d'une part et les chats malades d'autre part (FIPV). Il n'y a donc visiblement pas deux groupes monophylétiques descendant chacun d'un ancêtre commun comme figurant dans les travaux de Meredith Brown et regroupant d'un côté le biotype FECV et de l'autre le biotype FIPV.

## ***B. Séquençage du gène 7b***

### **1. Présentation des résultats de RT-PCR**

Le tableau 11 regroupe les résultats de RT-PCR pour les 15 chats étudiés. Pour chaque prélèvement, on a dans un premier temps utilisé le couple d'amorces B/B', cité dans la littérature, afin d'amplifier le gène 7b complet. Parmi les 15 chats étudiés, nous avons obtenu 7 amplifications génomiques de taille compatible avec celle du gène 7b.

En cas d'échec de la RT-PCR, on a dans un second temps utilisé les 2 couples d'amorces B/b' et B'/b afin d'obtenir deux portions chevauchantes du gène 7b de plus petite taille que le gène 7b complet, donc en principe plus facile à amplifier. Ceci a été nécessaire pour l'ARN extrait du liquide d'ascite de 8 chats : les n° 41, 163, 167, 180, 185, 196, 198 et 6 662.

Pour l'ARN extrait du liquide d'épanchement de ces 8 chats, la RT-PCR réalisée avec le couple d'amorces B/b' a échoué : aucun amplicon de taille compatible avec celle de la portion du gène 7b recherchée n'a été obtenu. De plus, la RT-PCR réalisée avec le couple B'/b a permis d'obtenir des amplicons de la taille recherchée pour l'ARN extrait du liquide d'épanchement des chats 185, 198 et 6 662 uniquement.

Pour aucun des 8 chats nous n'avons finalement obtenu de séquence du gène 7b complet.

On peut supposer qu'une variabilité dans la séquence du gène 7b de l'ARN viral extrait du liquide d'ascite de ces 8 chats empêche l'amplification à partir des amorces choisies.

**Tableau 11 : Détail des résultats des RT-PCR et des séquençages du gène 7b pour chacun des chats**

Identification du chat	RT-PCR réalisées avec les amorces B et B'	RT-PCR réalisées avec les amorces B et b'	RT-PCR réalisées avec les amorces B' et b	Séquençage du gène 7b complet
32	succès	échec		<b>succès</b>
34	succès			<b>succès</b>
41	échec		échec	
163	échec		échec	
165	succès			<b>succès</b>
167	échec		échec	
176	succès			<b>succès</b>
180	échec		échec	
184	succès			<b>succès</b>
185	échec		succès	échec
194	succès			<b>succès</b>
196	échec		succès	échec
198	échec		échec	
6 662	échec		succès	échec
6 832	succès			<b>succès</b>

## 2. Analyse des séquences nucléotidiques

Sur les 7 séquences finalement obtenues, seule une (celle du chat 194) présente une délétion de 3 nucléotides en positions 27, 28, 29.

Nos séquences ont été comparées (alignement sur MEGA 5.0) à 30 autres de la littérature obtenues à partir de l'ARN viral extrait du liquide d'épanchement abdominal de 20 chats atteints de PIF et des fèces de 10 chats sains (LIN *et al.*, 2009). Dans cette étude, il est ressorti que seules 8 séquences 7b sur 40 présentaient des mutations. Parmi elles, 3 provenaient de chats malades de PIF et 5 de chats sains. Les mutations répertoriées n'étaient que de 2 types : 7 consistaient en une délétion de 12 nucléotides située entre les positions 53 et 64 et l'autre était une délétion de 3 nucléotides entre les positions 30 et 32, très similaire à celle observée chez le chat 194 faisant partie de notre échantillonnage.

## 3. Analyse des séquences protéiques résultantes

La simulation par informatique, grâce au logiciel Transeq, de la traduction en acides aminés des séquences nucléotidiques obtenues montrent que toutes ont un cadre de lecture ouvert laissant la possibilité de synthèse d'une protéine 7b fonctionnelle. Les séquences présentant des délétions (celle obtenue pour le chat 194 et les 20 autres de la littérature) sont amputées d'un ou de 4 acides aminés sans introduire de codon terminal prématuré

comme on l'observe sur la figure 15. Le fait de trouver des mutations dans les gènes 7b à la fois chez les chats ayant des symptômes de PIF et chez les chats sains laisse supposer que le séquençage de ce gène ne sera pas un bon candidat pour le diagnostic différentiel des souches FECV et FIPV.

Figure 15 : Aligement des séquences de protéines 7b obtenues à partir de notre étude, en comparaison avec l'étude de LIN *et al.* (2009) dans laquelle les chats sont identifiés par la nomenclature DQ6754\*\*

1. 7b-chat 32	MIVVLLVCLFLA	GI	A	A	A	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D			
2. 7b-chat 34	MIVVFLVCVFLA	GI	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		
3. 7b-chat 165	MIAVLLVCVFLA	GI	A	I	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		
4. 7b-chat 176	MIVAFLLVCFLLA	GI	A	A	V	H	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
5. 7b-chat 184	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		
6. 7b-chat 194	MIVVFLVCIV-A	GI	A	A	D	V	H	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
7. 7b-chat 6832	MIAVFLVCILLA	GI	A	A	V	H	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
8. DQ648122 PIF	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		
9. DQ675414 PIF	MIVVILVCIFLA	GI	A	A	I	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
10. DQ675415 PIF	MIVVFLVCI-LA	GI	A	A	---	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		
11. DQ675416 PIF	MIVVFLVCI-LA	GI	A	A	---	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		
12. DQ675417 PIF	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
13. DQ675418 PIF	MIVVILVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
14. DQ675419 PIF	MIVVLLACVFLA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
15. DQ675428 PIF	MIVVILVCIFLA	GI	A	A	I	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
16. DQ675429 PIF	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	V	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
17. DQ675430 PIF	MIVVFLVCVFLA	GI	A	A	V	F	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
18. DQ675431 PIF	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
19. DQ675432 PIF	MIVVLLVCV-LA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
20. DQ675436 PIF	MIVVFLVCVFLA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
21. DQ675440 PIF	MIVALLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
22. DQ675445 PIF	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
23. DQ675446 PIF	MIVVLLVCI-LA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
24. DQ675448 PIF	MIVVLLVCI FLA	GI	A	A	D	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D
25. DQ675449 PIF	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
26. DQ675450 PIF	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
27. DQ675452 PIF	MIAVILVCIFL	GI	A	I	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		
28. DQ675441 sain	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
29. DQ675442 sain	MIVVILVCIFLA	GI	A	A	G	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
30. DQ675443 sain	MIVVILVCIFLA	GI	A	A	G	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
31. DQ675444 sain	MIVVILVCIFLA	GI	A	A	G	V	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
32. DQ675451 sain	MIVVLLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
33. DQ675420 sain	MIVVLLACVFLA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
34. DQ675421 Sain	MIVVLLACVFLA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
35. DQ675422 Sain	MIVALLVCVFLA	GI	A	A	A	A	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
36. DQ675423 Sain	MIVALLACVFLA	GI	A	A	V	L	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D	
37. DQ675424 Sain	MIVVFLVCI-LA	GI	A	A	---	D	L	H	H	V	L	E	L	L	F	V	G	H	L	V	I	T	H	I	L	L	L	L	G	S	V	E	E	V	G	F	C	T	G	G	F	A	A	D	H	I	D		

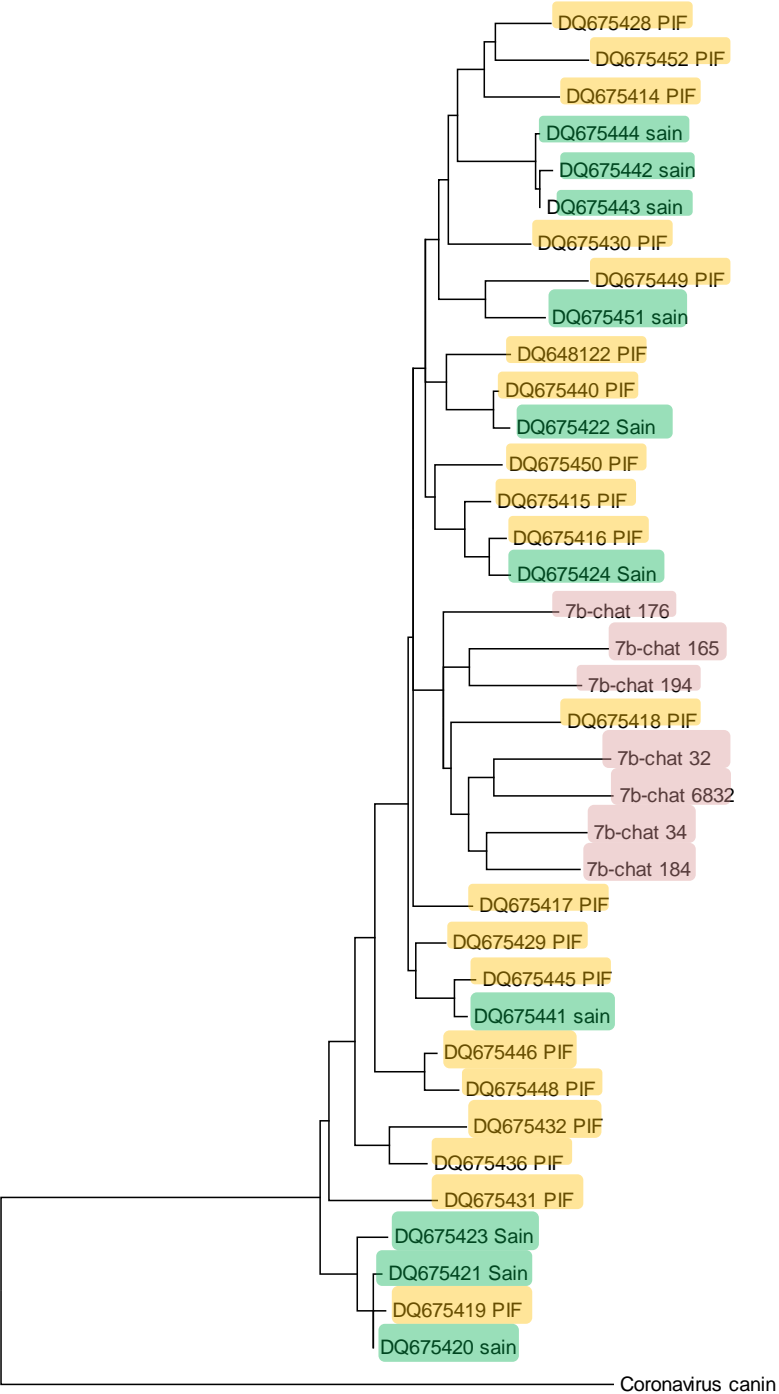




#### **4. Analyse phylogénétique**

Dans l'arbre phylogénétique qui suit, construit comme pour le gène 3c, figurent les 7 séquences du gène 7b que nous avons obtenues, ainsi que les séquences obtenues à partir des 20 chats PIF et de 10 chats sains de l'étude de LIN *et al.* (2009).

Figure 16 : Arbre monophylétique de probabilité maximale pour la protéine issue du gène 7b



- Chats PIF de notre étude
- Chats sains de la littérature
- Chats PIF de la littérature

Comme pour le gène 3c, on ne retrouve pas de répartition particulière entre les séquences des chats infectés par le FIPV et celles des chats infectés par le FECV.

### ***C. Séquençage du gène M***

#### **1. Présentation des résultats de RT-PCR**

Parmi les 15 chats étudiés, nous avons obtenu 10 amplifications génomiques de taille compatible avec celle de la partie du gène M que nous avons ciblée, comme l'illustre le tableau 12. Les échecs à l'issue de la RT-PCR peuvent être dus aux variabilités génomiques rencontrées au sein du gène M. L'échec de séquençage concernant le produit de RT-PCR obtenu à partir du chat 176 peut être corrélé à une faible quantité d'amplicons lors de la RT-PCR.

**Tableau 12: Détail des RT-PCR et des séquençages du gène M réalisés pour chacun des chats**

Identification du chat	RT-PCR sur le gène M	Séquençage
32	succès	<b>succès</b>
34	succès	<b>succès</b>
41	échec	
163	succès	<b>succès</b>
165	succès	<b>succès</b>
167	échec	
176	succès	échec
180	succès	<b>succès</b>
184	succès	<b>succès</b>
185	échec	
194	succès	<b>succès</b>
196	succès	<b>succès</b>
198	succès	<b>succès</b>
6 662	échec	
6 832	succès	<b>succès</b>

#### **2. Analyse des séquences nucléotidiques**

Etant donné notre choix d'amorces pour le gène M (voir Figure 12), nous ne pouvions séquencer l'entièreté de ce gène. Nous n'en avons en effet pas nécessairement besoin. Ici, notre objectif était double :

- Réaliser un arbre phylogénétique de probabilité maximale en intégrant les séquences du gène M de nos chats malades de PIF et des séquences de la littérature de chats sains porteurs asymptomatiques. Ceci dans le but de confronter nos résultats à ceux

de BROWN *et al.* (2009) qui émet l'hypothèse de l'existence d'un premier ancêtre commun aux séquences FIPV d'une part et d'un second bien distinct commun aux séquences issues du FECV,

- Comparer nos séquences de protéines à celles de BROWN *et al.* (2009) pour la protéine M. En effet, elle a montré au cours de ses recherches qu'il existerait des haplotypes associés à la maladie (voir partie précédente de l'exposé). Or ces haplotypes seraient localisés sur une portion restreinte du gène M et auraient une conséquence sur les acides aminés en positions 108, 120, 138, 163 et 199 uniquement. Les amorces que nous avons choisies devraient permettre d'amplifier cette zone du gène où les différences entre FECV et FIPV apparaissent.

Nous avons obtenu 10 séquences de 392 nucléotides du gène M entre le nucléotide n° 339 et le 730 (Le gène M du TGEV a été pris comme référence pour décompter les nucléotides dans l'étude de BROWN *et al.*, 2009) et n'y avons pas remarqué de délétion nucléotidiques contrairement à nos observations sur les gènes 3c et 7b.

### **3. Analyse des séquences de protéines résultantes**

Après simulation de la traduction comme précédemment, nous avons comparé les séquences obtenues à celles de BROWN *et al.* (2009) par alignement grâce au logiciel MEGA. Les résultats obtenus à partir de nos séquences sont présentés dans la figure 17 :



Comme évoqué précédemment, nous avons cherché à comparer les acides aminés en position 108, 120, 138, 163 et 199 à ceux trouvés aux mêmes positions par l'équipe de BROWN *et al.* (2009). En effet, il est décrit dans son étude que certaines associations d'acides aminés à ces positions correspondent à des phénotypes distincts : malade ou sain. Les haplotypes YIVAL ou YIAL semblent être associés à la PIF alors que les séquences de la protéine M des chats asymptotiques présentent les haplotypes suivants : HIIVI, HIIVL, HVIAl, YVVAL ou YIVAL. La correspondance entre les lettres H, Y, V, A et I et la nature des acides aminés est donnée dans le tableau 13, ainsi que la position à laquelle ces acides aminés sont susceptibles d'être localisés sur la protéine M.

**Tableau 13 : Correspondance entre la nature des acides aminés et leurs positions possibles sur la protéine M (BROWN *et al.* (2009))**

Position	Symbole	Acide aminé
108	H	Histidine
108	Y	Tyrosine
120	V	Valine
120	I	Isoleucine
138	I	Isoleucine
138	V	Valine
163	V	Valine
163	A	Alanine
199	I	Isoleucine
199	L	Leucine

Nous avons étudié les séquences obtenues sur la portion de la protéine M particulièrement significative pour distinguer les souches FECV et FIPV. On pourra remarquer que le séquençage n'a permis que l'obtention d'une séquence de M entre les acides aminés 115 et 242. Malheureusement, l'acide aminé situé en position 108 manque dans nos séquençages et nos résultats, détaillés dans le tableau 14, se limiteront donc aux acides aminés 120, 138, 163 et 199.

**Tableau 14 : Nature des acides aminés en position 120, 138, 163 et 199 pour les séquences obtenues de la protéine M**

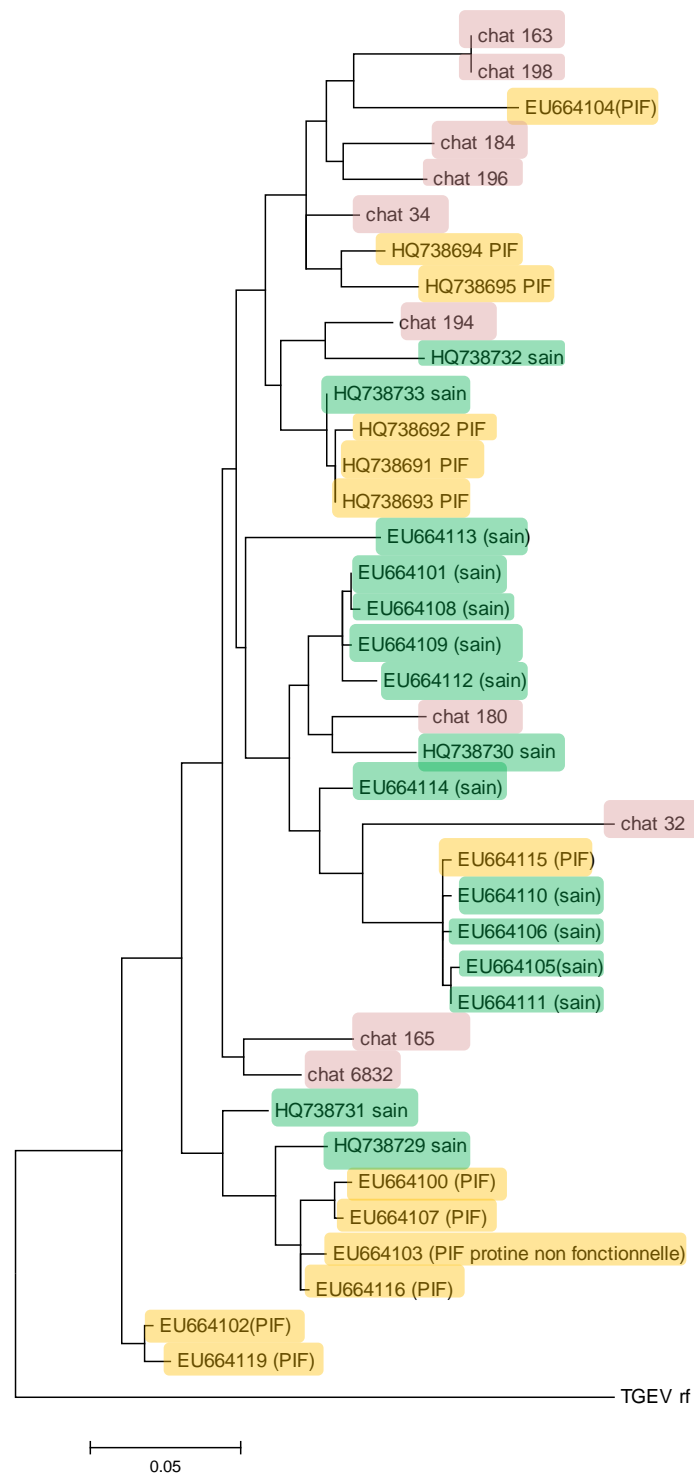
Chat acide aminé n°	32	34	163	165	180	184	196	6 832	194
120	I	V	V	V	V	V	I	V	I
138	I	I	I	V	V	I	I	I	I
163	A	A	A	A	A	A	A	A	A
199	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Alors que l'équipe de BROWN *et al.* (2009) proposait les haplotypes YIVAL et YIIAL comme étant associés au phénotype de PIF, nous trouvons chez nos chats malades les haplotypes suivants : ?VIAL, ?VVAL ou ?IIAL. Ainsi, nous pouvons remettre en cause la corrélation entre la présence de certains acides aminés sur la protéine M et la virulence des souches de coronavirus décrite par BROWN *et al.* (2009).

#### 4. Analyse phylogénétique

Sur l'arbre phylogénétique de la figure 18, construit comme précédemment, figurent les fragments de séquences du gène M obtenues à partir des 10 chats de notre étude. S'y ajoutent 8 séquences obtenues à partir de chats PIF et 10 séquences obtenues à partir de chats sains de l'article de BROWN *et al.*(2009) identifiés « EU » ainsi que 5 séquences du gène M obtenues à partir de chats PIF et 5 provenant de chats sains de l'étude de CHANG, EGBERINK et ROTTIER (2011) identifiés « HQ »

**Figure 18 : Arbre phylogénétique de probabilité maximale calculée sur le fragment de séquence du gène M compris entre les acides aminés 115 et 242**



- Chats PIF de notre étude
- Chats sains de la littérature
- Chats PIF de la littérature



Il ne semble pas y avoir, une fois de plus, d'ancêtres communs distincts pour les séquences provenant du groupe de chats sains et du groupe de chats malades.

### **III Discussion**

Le diagnostic de certitude de la PIF est très difficile actuellement car la distinction entre les souches non pathogènes et celles qui induisent la maladie n'est pas possible. Pourtant, de nombreuses études (HERREWEGH *et al.* (1995b), VENNEMA *et al.* (1998), LIN *et al.* (2008), KENNEDY *et al.* (2008), CHANG *et al.* (2009), PEDERSEN *et al.* (2009)) rapportent l'existence de mutations, en particulier sur les gènes 3c, 7b et M des souches de coronavirus félin associées à la PIF. En effet, une mutation se produirait sur la souche non pathogène FECV aboutissant au FIPV pathogène. La mutation serait corrélée à une propagation systémique du virus dans l'organisme et à sa faible réplication dans le tube digestif, d'où une excrétion et une contagion mineures. D'autres études (BROWN *et al.*, 2009) réfutent l'hypothèse mutationnelle pour privilégier l'existence de deux souches bien distinctes, pathogène et non pathogène, provenant de deux ancêtres différents. Nous nous sommes proposés dans cette étude de caractériser ces éventuelles mutations sur les gènes 3c, 7b et M et d'explorer leur potentiel intérêt dans le diagnostic de la maladie.

Notre étude se limite à des cas de PIF chez 15 chats. Nos deux principaux objectifs étaient d'une part de vérifier la présence de mutations sur les gènes 3c, 7b et M permettant la différenciation des souches pathogènes et des souches non pathogènes. D'autre part, nous avons confronté nos données à celles de l'étude de BROWN *et al.* (2009) afin de tester la possibilité de souches distinctes pathogènes et non pathogènes. Pour cela, nous avons construit des arbres phylogénétiques faisant apparaître des séquences d'un des gènes 3c, 7b ou M provenant de l'ARN extrait du liquide d'ascite des chats morts de PIF de notre étude et des séquences provenant de chats sains empruntées à d'autres études. Nous pouvons faire remarquer ici que notre étude ne contenait aucun chat sain. Nous nous sommes donc toujours référés à la littérature et aux articles déjà parus pour connaître les résultats de séquençage chez de tels chats. Cependant, notre ultime dessein était d'élaborer un test diagnostique à utiliser chez des chats malades uniquement, fortement suspects de PIF. Un test qui aurait la capacité qui plus est, de différencier les porteurs du FECV non pathogène de ceux porteurs du FIPV. Ceci permet de comprendre la restriction de notre échantillon à des chats malades.

#### **A. Le gène M**

La portion du gène M que nous avons séquencée ne comptait pas de délétion parmi les séquences provenant de nos chats malades. Nous n'avons pas non plus trouvé la même association d'acides aminés aux positions 120, 138, 163 et 199 que Meredith Brown, comme étant corrélée à la maladie. En effet, les séquences protéiques partielles que nous avons obtenues présentaient soit l'haplotype VIAL, soit IIAL, soit VVAL à ces positions. Cette combinaison ne correspond pas à celle exposée par l'équipe de M. Brown qui inclue les haplotypes IVAL et IIAL. Notons que nous n'avons obtenu qu'une séquence protéique

partielle de la protéine M de l'acide aminé 115 à l'acide aminé 242, ce qui exclue l'acide aminé en position 108 décrit par BROWN *et al.* (2009) comme étant systématiquement une tyrosine (Y) chez les chats malades et pouvant être un résidu histidine (H) ou tyrosine chez les chats sains. Une étude sur des chats sains porteurs asymptomatiques et un séquençage permettant d'inclure l'acide aminé en position 108 nous auraient permis une comparaison plus complète et aboutie de nos travaux avec ceux de l'équipe de BROWN *et al.* (2009) pour le gène M.

### **B. Le gène 7b**

En ce qui concerne le gène 7b, nous avons mis en évidence une mutation sur une séquence du gène chez un chat sur 7. Il s'agit d'une mutation de 3 nucléotides entre les positions 27 et 29 laissant la possibilité de synthèse d'une protéine 7b fonctionnelle. Ceci concorde avec une étude menée en 2009 (LIN *et al.*, 2009) qui trouve dans l'ARN viral provenant de 40 chats (dont 20 malades et 20 sains), 8 gènes 7b délétés dont 3 provenant de chats PIF. Dans cette étude, une des 8 délétions concerne 3 nucléotides entre les positions 30 et 32. Cette étude ainsi que la nôtre s'opposent à de précédentes recherches qui exposaient que les délétions retrouvées sur le gène 7b rendaient le virus muté moins virulent (VENNEMA *et al.*, 1998 et HERREWEGH *et al.*, 1995a et b). Or, nous avons retrouvé ces délétions sur une souche virulente chez un chat mort de PIF. Ainsi, il semble difficile à l'heure actuelle de conclure sur la virulence ou l'absence de virulence associées aux délétions affectant le gène 7b du FCoV. LIN *et al.* (2009) expliquent les résultats des précédentes études par le fait qu'elles étaient menées sur des souches de laboratoire et non de terrain. D'ailleurs, les délétions qu'ils obtenaient étaient très différentes de celles que l'on a obtenues. Il s'agissait de délétions de très grande taille et situées plutôt en partie 3' du gène.

On peut ajouter qu'il aurait été intéressant pour les chats 41, 198 et 163 notamment d'arriver à séquencer le gène 7b. En effet, on peut se demander si ces trois chats qui ne présentaient pas de mutation en 3c en présentaient une ou non sur le gène 7b. Notre étude s'est donc limitée à une analyse linéaire, gène par gène et elle aurait été plus complète s'il avait été possible d'y ajouter une analyse transversale par chat. De plus, notre étude ne comportait que des chats atteints de la forme humide de la PIF, il faut donc rester prudent car il n'est pas impossible que cela ait introduit un biais par rapport à des formes sèches.

### **C. Le gène 3c**

Les séquençages réalisés sur le gène 3c de 10 chats inclus dans notre échantillon, révèlent pour 7 d'entre eux des mutations ou délétions à l'origine de protéines non fonctionnelles. Ainsi, 70 % des chats PIF pour lesquels nous avons obtenu une séquence ont un gène 3c muté. Ceci implique deux corollaires : le gène 3c joue d'une part un rôle très important pour la virulence du FCoV mais d'autre part, il ne s'agit pas du seul gène impliqué

dans cette virulence car certains des chats PIF testés dans notre étude portaient un gène 3c intact. Par ailleurs, les séquences obtenues sur nos prélèvements ont été comparées à celles obtenues à partir de 28 chats souffrant de PIF et à 27 chats sains issus de l'étude de CHANG *et al.* (2010).

Aucune des séquences du gène 3c provenant des chats sains de cette étude ne présentaient de délétions ni de quelconque mutation. En revanche, comme on peut le voir dans le tableau 15, parmi les 28 séquences analysées à partir de chats malades, 20 séquences présentaient soit des délétions, au nombre de 13, soit des mutations non-sens, au nombre de 5, soit des insertions, au nombre de 2.

71,4 % des chats malades de l'étude étaient donc porteurs d'une souche virale dont le gène 3c était soit délété, soit muté ponctuellement, soit présentait une insertion de quelques nucléotides. Il est intéressant de noter que la proportion de chats porteurs d'un gène 3c muté est la même dans notre étude que dans celle menée par CHANG *et al.* (2009), soit environ 70%.

**Tableau 15 : Position et caractéristiques des mutations et délétions du gène 3c de l'ARN viral extrait du liquide d'ascite des chats de l'étude de CHANG et al (2009)**

Identification du chat	Présence d'une délétion (D) ou d'une mutation non sens (M)	Nombre de nucléotides délétés ou mutés	Position de la délétion ou mutation
GU053640	oui (D)	3	561-563
GU053641	oui (D)	1	63
GU053642	oui (D)	55	321-376
GU053643	oui (D)	1	291
GU053644	non	0	
GU053645	oui (M)	1 (CAG→TAG)	615
GU053646	non	0	
GU053647	oui (M)	1 (ATG→ACG)	2
GU053648	oui (M)	1 (AAG→ATG)	323
GU053649	oui (insertion)	insertion de 6 nt	123-128
GU053650	oui (D)	7	14-20
		54	330-384
		8	608-615
GU053651	non	0	
GU053652	oui (D)	30	511-540
		34	254-288
GU053653	non	0	
GU053654	oui (D)	16	1-16
GU053655	oui (D)	25	515-539
		6	607-612
GU053656	oui (D)	12	368-379
GU053657	oui (M)	1 (CAA→TAA)	97
GU053658	oui (D)	1	173
		5	376-380
		31	453-483
GU053659	non	0	
GU053660	non	0	
GU053661	oui (D)	7	376-382
		31	453-483
GU053662	oui (D)	2	382-383
GU053663	oui (insertion)	insertion d'1 nt	180
GU053664	oui (M)	1 (AGA→TGA)	413
GU053665	oui (D)	13	1-13
		30	328-357
GU053666	non	0	
GU053667	non	0	

**NB** : dans la 3ème colonne du tableau 12 est précisé entre parenthèse la mutation lorsque celle-ci ne concerne qu'un nucléotide.

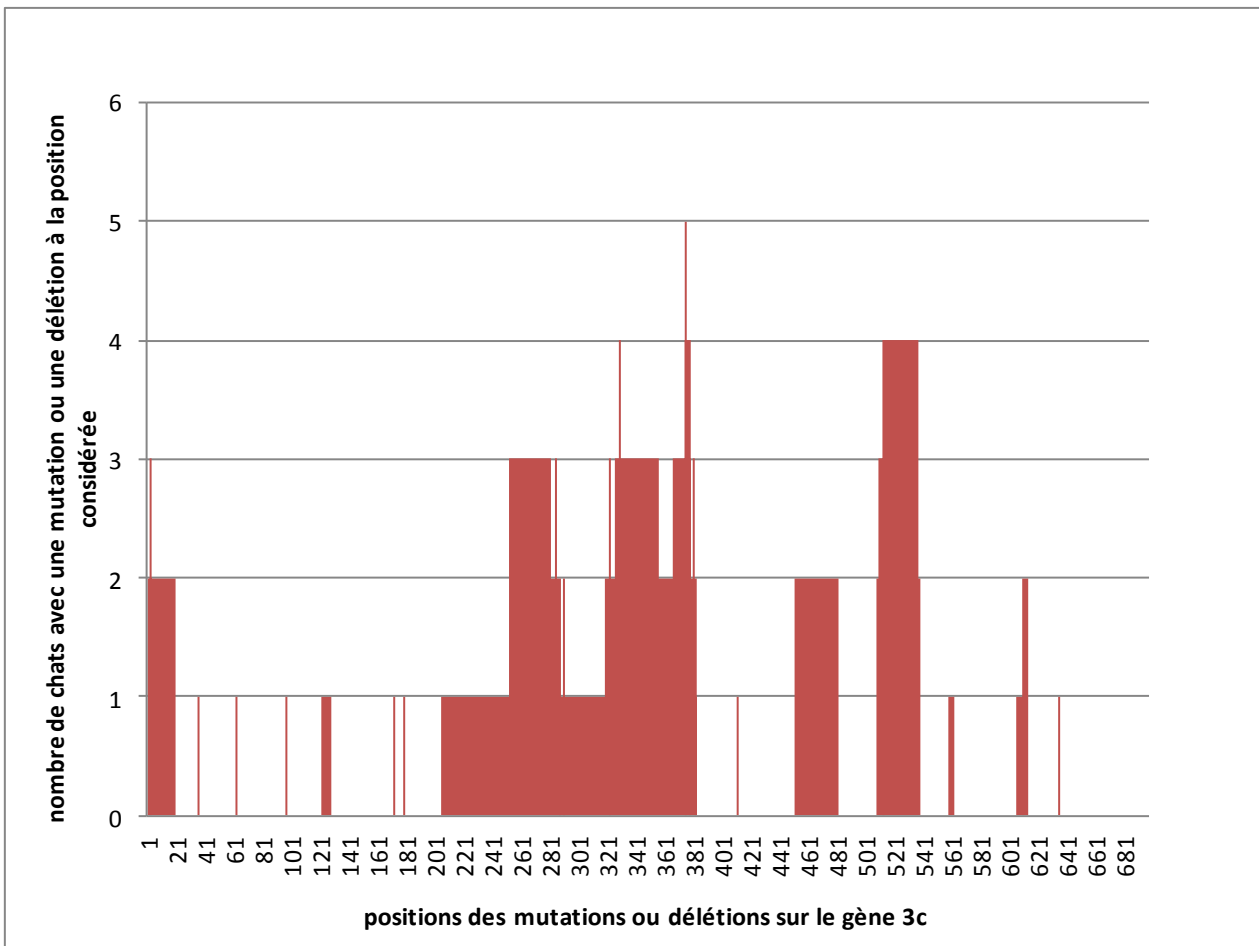
On constate que ces délétions et mutations non-sens aboutissent la plupart du temps à des protéines non fonctionnelles sans empêcher, bien au contraire même, la virulence.

Ceci pose la question du rôle de ce gène dans le cycle viral du coronavirus. On peut par exemple supposer que ce gène intact est garant d'une répllication limitée localement à la lumière du tractus digestif.

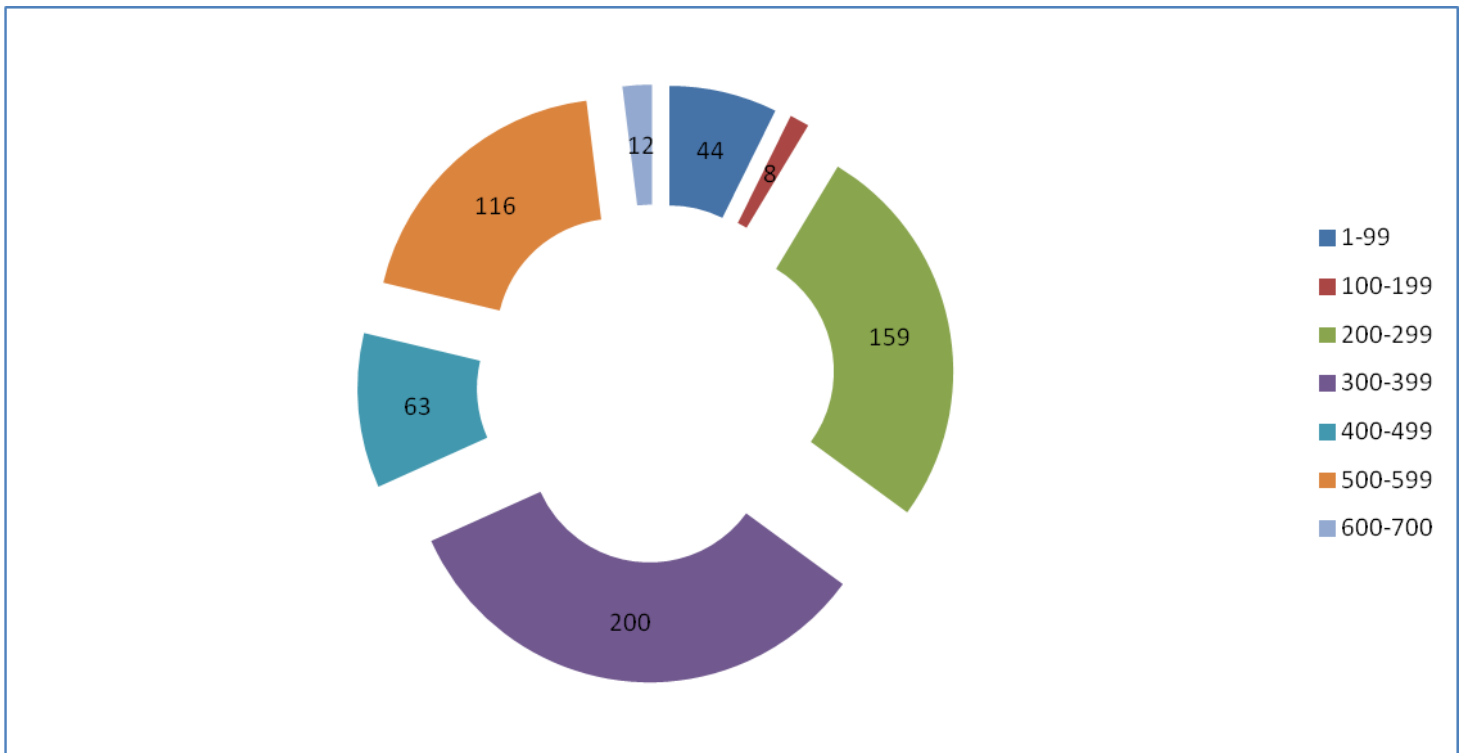
Si l'on s'intéresse à la localisation génétique où se produisent ces mutations et délétions, on remarque qu'elles n'occupent pas de façon systématique la même position aussi bien dans notre étude que celle menée par CHANG *et al.* (2010). En croisant nos deux études, on remarque que certains loci sont tout de même plus fréquemment concernés par une délétion ou une mutation : comme on le voit sur les graphiques 19 et 20, le gène est plus souvent muté entre les nucléotides 201 et 541

On note des délétions plus fréquentes du nucléotide n°254 au n°380 et également entre les n°511 et 540 (voir tableaux dans la partie résultats gène 3c), aussi bien dans notre étude que dans celle de CHANG *et al.* (2010). C'est le nucléotide n°376 qui est le plus souvent muté : le gène 3c provenant de 5 chats différents est muté à cet endroit.

**Figure 19 : Positions des mutations et délétions sur le gène 3c : les séquences de notre étude et celle de CHANG *et al.* (2009) sont prises en compte**



**Figure 20 : Nombre de nucléotides mutés (pour l'ensemble des chats) par groupe de 100 nucléotides sur le gène 3c : les chats de notre étude et celle de CHANG *et al.* (2009) sont pris en compte**



#### ***D. Élaboration d'un test diagnostique***

Suite à ces observations sur différents gènes, il semble que l'on pourrait envisager un test diagnostique, basé sur l'étude du gène 3c seul : il serait fondé sur l'extraction d'ARN viral à partir d'un prélèvement (épanchement ou prélèvement d'organes) réalisé sur le chat suspect. Une RT-PCR ciblée sur le gène 3c de l'ARN viral, suivie d'un séquençage, seraient alors réalisés. Ils auraient pour but de détecter les éventuelles mutations de ce gène. Étant donné les résultats de notre étude et celle de CHANG *et al.* (2010), on peut aussi définir la sensibilité et la spécificité qu'auraient ce test. On a en effet estimé que l'on détectait 70% des chats réellement infectés par une souche FIPV. La sensibilité, qui est l'aptitude du test à fournir une réponse positive chez un individu infecté (TOMA *et al.*, 2001) est donc de 70% (Vrais Positifs/ (Vrais Positifs+Faux Négatifs)). Quant à la spécificité du test, qui est son aptitude à fournir une réponse négative chez un individu indemne, elle est très proche de 100% car aucun des chats sains de la littérature ne présentaient de mutation sur le gène 3c de l'ARN viral qu'il hébergeait. Le risque d'affirmer qu'un chat est positif pour le FIPV alors qu'il ne l'est pas est donc très proche de zéro. De la même manière, on peut calculer les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) de ce test. La VPP est la probabilité qu'une réponse positive à un test de dépistage corresponde bien à un organisme infecté. On peut par intuition évaluer la VPP à 100% ici car suite aux études menées par Rottier, jamais

une mutation (=réponse positive au test) n'a été relevée pour un individu sain. En effet,  $VPP = VP / (VP+FP) = 28 / (28+0) = 1$ . Enfin, la  $VPN = VN / (VN+FN) = 27 / (27+8) = 0,77$ . D'où, la probabilité qu'une réponse négative au test corresponde bien à un individu sain est de 77%. Notons que ces valeurs dépendent en fait aussi de la prévalence de la maladie et du choix des animaux testés. Ce test possède une très bonne spécificité et VPP. On l'utilisera donc dans les cas où l'on est très en faveur de l'hypothèse de PIF (convergence des autres examens préalables vers cette hypothèse). On aura une grande confiance en un résultat positif.

Ainsi, on peut résumer les caractéristiques de notre test dans le tableau 16 :

**Tableau 16 : Caractéristiques du test diagnostique virtuel basé sur le séquençage du gène 3c**

Qui	les chats fortement suspects de PIF
Quoi	prélèvement d'ascite ou d'organes lésés (biopsie, cytoponction) de sang
Comment	1. RT-PCR ciblée sur le gène 3c 2. séquençage si obtention d'une bande positive à l'électrophorèse
Pourquoi	Se=70%
	VPN=77%
	<b>Sp=100%</b>
	<b>VPP=100%</b>

Notons tout de même que ce test, s'il était utilisé couramment, présenterait un certain nombre de limites. Il nécessite en effet un séquençage qui met quelques jours à être réalisé par une société extérieure (2 à 3 jours) et qui représente un coût supplémentaire (environ 6 euros par gène séquencé en un sens). Il nécessite de plus l'obtention du gène 3c en entier (car comme on vient de le détailler, les mutations se produisent à des loci différents sur le gène en fonction des chats testés). Par ailleurs, les RT-PCR ciblées sur le gène 3c n'ont été un succès que pour 10 chats sur les 15 inclus dans l'étude. Nous ne savons rien du gène 3c pour les 5 chats restants. Ainsi, si on se plaçait dans une étude prospective et que la RT-PCR était un échec, on ne pourrait absolument rien conclure sur l'intégrité du gène 3c.

### ***E. Hypothèse mutationnelle versus Hypothèse de souches pathogènes et non pathogènes distinctes***

En réalisant successivement des arbres phylogénétiques de probabilité maximale pour chaque gène (dans lesquels figurent des chats PIF et des chats sains porteurs asymptomatiques), nous avons mis à l'épreuve la théorie de coexistence de souches pathogènes et non pathogènes (BROWN *et al.*, 2009). Que ce soit pour le gène 3c, le gène 7b ou le M, cette théorie ne semble pas validée. On ne retrouve pas un ancêtre commun pour

les souches pathogènes (FIPV) et un autre distinct pour les souches non pathogènes (FECV).

Il aurait été par ailleurs intéressant de réaliser un arbre phylogénétique en utilisant non plus du virus prélevé sur des chats malades et des chats sains, mais chez un même chat malade, du virus provenant du liquide d'épanchement et du virus provenant des fèces. Ceci aurait pu montrer une parenté entre le virus fécal et le virus systémique dans le cas où une mutation chez le premier avait abouti au second. Cela a été réalisé dans l'étude de CHANG *et al.* (2009) et les résultats vont dans le sens d'une parenté entre la souche entérique et la souche systémique provenant du même animal. L'idéal serait enfin de suivre un chat au cours du temps, en supposant que celui-ci déclare une PIF humide à un moment donné. On pourrait alors séquencer le gène 3c à des étapes clés de l'infection, dans les fèces et le liquide d'ascite.



## CONCLUSION

En redéfinissant les principales caractéristiques de la péritonite infectieuse féline dans la première partie de l'exposé : les symptômes, l'épidémiologie, la physiopathogénie notamment, et en mettant en relief les outils actuellement disponibles pour son diagnostic, nous avons pu illustrer l'intérêt du travail expérimental décrit dans la seconde partie de l'exposé. Celui-ci ayant pour principal but de déterminer une méthode diagnostique plus pertinente et plus spécifique de la PIF, fondée sur les récentes découvertes relatives au séquençage génomique des coronavirus félines. En conclusion de notre étude, nous pouvons affirmer que le seul test diagnostique possible pour le moment serait basé sur le gène 3c. Ce dernier étant muté pour environ 70% des séquences provenant de nos chats malades de PIF et toujours intact pour les séquences issues des chats sains de la littérature. Ce test, s'il était mis en œuvre, posséderait une bonne spécificité comme on l'a vu (proche de 100%) et une sensibilité de 70%. Cependant, plusieurs réserves existent quant à son utilisation en pratique courante. Il nécessiterait en effet un séquençage du gène 3c complet précédé d'une RT-PCR, ce qui représente un certain coût et prendrait plusieurs jours dans le meilleur des cas. Ainsi, ce test pourrait convenir dans des situations de forte suspicion de PIF sèche pour lesquelles aucun prélèvement d'épanchement n'est possible. Il pourrait alors être réalisé à partir d'un prélèvement par cytoponction échoguidée (en évitant le caractère invasif d'une biopsie). Ce test peut aussi être envisagé en post-mortem, en complément d'une analyse histologique.

Malgré ces sérieuses limites, il est tout à fait envisageable d'approfondir les recherches ciblées sur les gènes accessoires et structuraux des coronavirus félines. Elles pourraient aboutir à la détermination de régions du génome particulières, permettant un diagnostic différentiel entre le FECV et le FIPV. Ceci en partant de l'hypothèse d'une ou de plusieurs mutation(s) participant à la virulence des souches mutées.



## BIBLIOGRAPHIE

ADDIE D, MCLACHLANA SA, GOLDERA M, RAMSEYB I, JARRETTA O (2004 a). Evaluation of an in-practice test for feline coronavirus antibodies. *J. Feline. Med. Surg.*, **6**, 63–67.

ADDIE D, PALTRINIERI S, PEDERSEN NC (2004 b). Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium In: the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium, Scotland, août 2002, 125-130 (*J. Feline. Med. Surg.*, **6**).

ADDIE D (2008). Comparaison d'un test rapide immunochromatographique de détection d'anticorps anti-coronavirus félin Speed® F-Corona avec la méthode de référence immunofluorescence indirecte. *Maladies infect. Fel, BVT groupe VIRBAC*.

ADDIE D, GAGNON A-C (2010). Infectiologie féline, actualités. *Point. Vét.*, **41**, 94-124.

BATTILAN M, CORADIN T, SCAGLIARINI A, CIULLI S, OSTANELLO F, PROSPERI P *et al.* (2003). Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats. *Immunol. Med. Microbiol.*, **39**, 141-147.

BENETKA V, KÜBBER-HEISS A, KOLODZIEJEK J, NOWOTNY N, HOFMANN-PARISOT M, MÖSTL K (2004). Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.*, **99**, 31–42.

BENZ P, MAAß G, CSOKAI J, FUCHS-BAUMGARTINGER A, SCHWENDENWEIN I, TICHY A *et al.* (2011). Detection of Encephalitozoon cuniculi in the feline cataractous lens. *Vet. Ophthalmol. (Supplement)*, **1**, 37–47.

BOETTCHER IC, STEINBERG T, MATIASEK K, GRENE CE, HARTMANN K, FISCHER A (2007). Use of anti-coronavirus antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis involving the central nervous system in cats. *J. Am. Vet. Med Assoc.*, **230**, 199-205.

BORDE I pour l'Université Pierre et Marie Curie. *La PCR*, [en-ligne], mise à jour le 23 mars 2006, [<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm#>], (consulté le 05 août 2011).

BROWN MA. , TROYER JL, PECON-SLATTERY J, ROELKE ME, O'BRIEN SJ (2009). Genetics and Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **15**, 1445-1452.

CACHON T, CHUZEL T (2005). Epidémiologie, pathogénie et symptômes de la PIF. *Point. Vét.*, **254**, 18-21.

CANNON MJ, SILKSTONE MA, KIPAR AM (2005). Cutaneous lesions associated with coronavirus -induced vasculitis in a cat with feline infectious peritonitis and concurrent feline immunodeficiency virus infection. *J. Feline. Med. Surg.*, **7**, 233-236.

CAN-SXAHNA K, ATASEVEN VS, PINAR D, OGUZOGLU TC (2007). The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *J. Feline. Med. Surg.*, **9**, 369-372.

CHANG H-W, DE GROOT RJ, EGBERINK HF AND ROTTIER PJM (2010). Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J. Gen. Virol.*, **91**, 415–420.

CHANG H-W, EGBERINK HF, ROTTIER PJM (2011). Sequence analysis of Feline Coronavirus and the Circulating Virulent/Avirulent Theory. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**(4), 744-750.

COLITZ CMH (2005). Feline Uveitis: Diagnosis and treatment. *Clin. Tech. Small An. P.*, **20**, 117-120.

CORAPI WV, OLSEN CW, JACOBSN RH, SIMKINS RA, SAIF LJ, SCOTT FW (1993). Identification of antigenic sites mediating antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infectivity. *J. Gen. Virol.*, **74**, 745-749.

CRESPEAU F (2012). *Anatomie pathologique générale*. Polycopié. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Médicale d'anatomopathologie, 122p.

DECLERCQ J, DE BOSSCHERE H, SCHWARZKOPF I, DECLERCQ L (2008). Papular cutaneous lesions in a cat associated with feline infectious peritonitis. *Vet Dermatol.*, **19**, 255–258.

DE GROOT-MIJNES JDF, VAN JM, VAN DER MOST RG, DE GROOT RJ (2005). Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *J. Virol.*, **79**, 1036–1044.

DENISET P (2007). Ponction de liquide cérébro-spinal et maladies inflammatoires du système nerveux central : étude rétrospective à l'école nationale vétérinaire d'Alfort de 1996 à 2005, Thèse Méd. Vét., Alfort.

DIAZ JV, POMA R (2009). Diagnosis and clinical signs of feline infectious peritonitis in the central nervous system. *Can. Vet. J.*, **50**, 1091-1093.

DYE C, SIDDELL SG (2007). Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. *J. Feline. Med. Surg.*, **9**, 202–213.

DYE C, HELPS CR, SIDDELL SG (2008). Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats. *J. Feline. Med.Surg.*, **10**, 167-174.

European Bioinformatics Institute EMBL-EBI. *Site EBI*, [en-ligne], [www.ebi.ac.uk], (consulté entre le 1er juillet 2011 et le 20 mars 2012).

FEHR D, HOLZNAGEL E, BOLLA S, HAUSER B, HERREWEGH AA, HORZINEK MC *et al.* (1997). Placebo-controlled evaluation of a modified live virus vaccine against feline infectious peritonitis: safety and efficacy under field conditions. *Vaccine.*, **15**, 1101-1109.

FOLEY JE, POLAND A, CARLSON J, PEDERSEN NC (1997). Risk factors of feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **210**, 1313-1318.

FOLEY JE, LAPOINTE J-M, KOBLIK P, POLAND A, PEDERSEN NC (1998). Diagnostic features of neurological feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.*, **12**, 415-423.

GONON V (1998). The feline coronaviruses. *Viol.*, **2**, 205-13.

GONON V, DUQUESNE V, KLONJKOWSKI B, MONTEIL B, AUBERT A, ELOIT M (1999). Clearance of infection in cats naturally infected with feline coronaviruses is associated with an anti-S glycoprotein antibody response. *J. Gen Virol.*, **80**, 2315–2317.

GUNN-MOORE DA, GRUFFYDD-JONES TJ, HARBOUR DA (1998). Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.*, **62**, 193-205.

HARPOLD LM, LEGENDRE AM, KENNEDY MA, PLUMMER PJ, MILLSAPS K, ROHRBACH B (1999). Fecal shedding of feline coronavirus in adult cats and kittens in an Abyssinian cattery. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **215**, 948-951.

HARTMANN K, RITZ S (2008). Treatment of cats with Feline Infectious Peritonitis. *Vet. Immunol. Immunop.*, **123**, 172–175.

HEBERT F (2005). Guide pratique de médecine interne canine et féline. 2<sup>nd</sup> éd. Paris , Med'com, 456p.

HERREWEGH A, DE GROOT RJ, CEPICA A, EGBERINK HF, HORZINEK MC, ROTTIER PJM (1995a). Detection of Feline Coronavirus RNA in Feces, Tissues, and Body Fluids of Naturally Infected Cats by Reverse Transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 684–689.

HERREWEGH A, VENNEMA H, HORZINEK MC, ROTTIER PJM, De GROOT RJ (1995b). The molecular genetics of feline coronaviruses: sequence analysis of the ORF 7a/7b transcription unit of different biotypes. *Viol.*, **212**, 662-631.

HERREWEGH A, MÄHLER M, HEDRICH HJ, HAAGMAN BL, EGBERINK HF, HORZINEK MC *et al.* (1997). Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Viol.*, **234**, 349-363.

HIRSCHBERGER J, HARTMANN K, WILHELM N, FROST J, LUTZ H, KRAFT W (1995). Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis. *Tierärztl Prax.*, **23**, 92-99.

HOHDATSU T, NAKAMURA M, ISHIZUKA Y, YAMADA H, KOYAMA H (1991). A study of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. *Arch Virol.*, **120**, 207-217.

HOLZWORTH JE (1963). Some important disorders of cats. *Cornell Vet.*, **53**, 157-60.

HORZINEK M, ADDIE D, BÉLAK S, BOUCRAUT-BARALON C, HEGBERINK H, FRYMUS T *et al.* (2008). Feline Infectious Peritonitis. *ABCD guidelines*, **11**, 594-604.

KIPAR A, MAY H, MENGER S, WEBER M, LEUKERT W, REINACHER M, (2005). Morphologic Features and Development of Granulomatous Vasculitis in Feline Infectious Peritonitis. *Vet. Pathol.*, **42**, 321-330.

KIPAR A, MELI ML, FAILING K, EULER T, GOMES-KELLER MA, SCHWARTZ D *et al.* (2006). Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet. Immunol. Immunop.*, **112**, 141–155.

LE CORRE B (2000). Essai d'assainissement d'effectifs félins infectés par un Coronavirus. Thèse Méd. Vét., Alfort, n°101, 91p.

LEIBOWITZ JL (2007). Coronaviruses, molecular and cellular biology. 2<sup>nd</sup> éd. Texas, Volker thiel, 183-184.

LE PODER S (2005). Péritonite infectieuse féline - Feline infectious peritonitis. *EMC-Vétérinaire*, **2**, 169–178.

LE PODER S, ELOIT M (2008-2009). *Virologie* (version 5). Polycopié. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Médicale de Virologie.

LEWIS KM, O'BRIEN MT (2010). Abdominal ultrasonographic findings associated with feline infectious peritonitis: a retrospective review of 16 Cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **46**, 152-160.

LIN C-N, SU B-L, HUANG H-P, LEE J-J, HSIEH M-W, CHUEH L-L (2009). Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *J. Feline Med. Surg.*, **11**, 413-419.

McREYNOLDS C, MACY D (1997). Feline infectious peritonitis. Part I. Etiology and diagnosis. *The Compendium*, **19**, 1007-1015.

NEGRIN A, LAMB CR, CAPELLO R, CHERUBINI GB (2007). Results of magnetic resonance imaging in 14 cats with meningoencephalitis. *J. feline Med. Surg.*, **9**, 109-116.

NUHAM J (2007). Contribution à l'étude phylogénétique des infections à coronavirus canin et félin, Thèse Méd. Vét., Alfort.

OLIN (1977). Examination of the aqueous humor as a diagnostic of anterior uveitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **171**, 557-559.

PALTRINIERI S, CAMMARATA MP, CAMMARATA G, COMAZZI S (1998). Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Vet. Immunol. Immunop.*, **65**, 205-220.

PALTRINIERI S, PONTI W, COMAZZI S, GIORDANO A, POLI G (2003). Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet. Immunol. Immunop.*, **96**, 141-148.

PALTRINIERI S (2008). The feline acute phase reaction. *Vet. J.*, **177**, 26-35.

PEDERSEN NC (1976). Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.*, **37**, 1449-1453.

PEDERSEN NC, BOYLE JF (1980). Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 868-876.

PEDERSEN NC, ALLEN CE, LYONS LA (2008). Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J. Feline Med. Surg.*, **10**, 529-541.

PEDERSEN NC, LIU H, DODD KA et PESAVENTO PA (2009). Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. *Viruses*, **1**, 166-184.

PEDERSEN NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963 à 2008 (2009). *J. Feline, Med. Surg.*, **11**, 225-258.

PESTEANU-SOMOGYI L, RADZAI C, PRESSLER BM (2006). Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *J. Feline Med. Surg.*, **8**, 1-5.

POINDESSAULT SANTA-CROCE AS (2006). Prophylaxie des infections à coronavirus félins. Thèse Méd. Vét., Alfort, 66 p.

POSCH A, POSCH U, KÜBBER-HEISS A, STUR I, SEISER M, MÖSTL K (2001). Feline Coronaviren: Differenzierung der Typen I und II mittels RT-PCR und deren Vorkommen in Österreichischen Katzepopulationen. *Tierärztl. Mschr.*, **88**, 1-9.

POSTORINO REEVES (1995). Vaccination against naturally occurring FIP in a single large cat shelter. *Feline Pract.*, **23**, 81-82.

POTKAY S, BACHER JD, PITTS TW (1974). Feline infectious peritonitis in a closed breeding colony. *Lab. Anim. Sci.*, **24**, 279-289.

PRATELLI A (2008). Comparison of serological techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 45–50.

QIAGEN® (octobre 2010) One-Step RT PCR kit handbook.

RIGODY J (2009). Les Coronaviruses des Carnivores domestiques. Thèse Méd. Vét., Alfort, 125 p.

RITZ S, EGBERINK H, HARTMANN K (2007). Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.*, **21**, 1193-1197.

ROHRBACH BW, LEGENDRE AM, BALDWIN CA, LEIN DH, REED WM, WILSON RB (2001). Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospital. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **21**, 1111-1115.

ROTTIER PJM, NAKAMURA K, SCHELLEN P, VOLDERS H, HAIJEMA BJ (2005). Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. *J. Virol.*, **79**, 14122–14130.

SCOTT F (1991). Transmission and epidemiology. *In*: Proceedings of the symposium. Orlando, Florida, 11 janvier 1991, 220-224.

SHARIF S, ARSHAD S, HAIR-BEJO M, OMAR AR, ZEENATHUL NA, ALAZAWY A (2008). Diagnostic methods for feline coronavirus: a review. *J. Vet. Intern. Med.*, **2010**, 1-7.

SIMONSA FA, VENNEMAC H, ROFINAB JE, POLD JM, HORZINEKE MC, ROTTIER PJM *et al.* (2005). A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J. Virol. Methods*, **124**, 111–116.

SPARKES AH, GRUFFYDD-JONES TJ, HARBOUR DA (1991). Feline infectious peritonitis: a review of clinico-pathological changes in 65 cases, and a critical assessment of their diagnostic value. *Vet. Rec.*, **129**, 209-212.

STADLER K, MASIGNANI V, EICKMANN M, BECKER S, ABRIGNANI S, KLENK HD *et al.* (2003). SRAS – Beginning to understand a new virus. *Nat. Reviews Microbiol.*, **1**, 209-219.

STATHOPOULOS GT, KOLLINTZA A, MOSCHOS C (2007). Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes malignant pleural effusion. *Cancer Res.*, **67**, 9825-9834.

STEINBERG TA, BOETTCHER IC, MATIASEK K, HIRSCHVOGEL K, HARTMANN K, KUNZ A *et al.* (2008). Use of albumin quotient and IgG index to differentiate blood-vs brain- derived



proteins in the cerebrospinal fluid of cats with feline infectious peritonitis. *Vet. Clin. Pathol.*, **37**, 207-223.

STODDART CA, BARLOUGH JE, SCOTT FW (1984). Experimental studies of a coronavirus and coronavirus-like agent in a barrier-maintained feline breeding colony. *Arch. Virol.*, **79**, 85-94.

TAKANO T, HOHDATSU T, HASHIDA Y, KANEKO Y, TANABE M, KOYAMA H (2007). A “possible” involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.*, **119**, 121–131.

TAKANO T, OHYAMA T, KOKUMOTO A, SATOH R, HOHDATSU T (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP. *Virus Res.*, **158**, 161–168.

TAYLOR SS, TAPPIN SW, DODKIN SJ, PAPASOULIOTIS K, CASAMIAN-SORROSAL D, TASKER S (2010). Serum protein electrophoresis in 155 cats. *J. Feline Med. Surg.*, **12**, 643-653.

TOMA B, DUFOUR B, SANAA M, BÉNET J-J, SHAW A, MOUTOU F *et al.* (2001). *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. 2<sup>nd</sup> éd. AEEMA. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 52-63.

TSAI HY, CHUEH LL, LIN CN, SU BL (2011). Clinicopathological findings and disease staging of feline infectious peritonitis: 51 cases from 2003 to 2009 in Taiwan, *J. Feline Med. Surg.*, **13**, 74-80.

US National Library of Medicine National Institutes of Health. *Site PubMed*, [en-ligne], [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/], (consulté du 1er juillet 2011 au 20 mars 2012).

VENNEMA H, POLAND A, FOLEY J, PEDERSEN NC (1998). Feline Infectious Peritonitis Viruses Arise by Mutation from Endemic Feline Enteric Coronaviruses. *Virol.*, **243**, 150–157.

VOGE G pour l'école normale supérieure de Lyon. *La PCR*, [en-ligne], mise à jour le 15 juillet 2002, [http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects\_techniques/rtpcr/rtpcr02.htm], (consulté le 05 août 2011).

WANDERLEY MYRRHA L, MIQUELITTO FIGUERA DA SILVA F, FERNANDES DE OLIVEIRA PETERNELLI E, SILVA JUNIOR A, RESENDE M, ROGERIA DE AMEIDA M (2011). The paradox of feline coronavirus (FCoV) pathogenesis : Review. *Adv. Virol.*, **2011**, 8p.