

ANNEE 2001 THESE : 2001 – TOU 3 – 4110

# DIAGNOSTIC PAR PCR DES RETROVIROSES FELINES

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Frédérique SABOURDY**

Née, le 28 juillet 1974 à CLERMONT-FERRAND (Puy-de-Dôme)

---

**Directeur de thèse : Mlle le Docteur Christelle CAMUS**

---

**JURY**

**PRESIDENT :**

**Mme Jacqueline PUEL**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

**ASSESEUR :**

**Mlle Christelle CAMUS**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Mme Corine BOUCRAUT-BARALON**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche**  
**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur par Intérim : **M. G. BONNES**  
Directeurs honoraires : **M. R. FLORIO**  
**M. R. LAUTIE**  
**M. J. FERNEY**  
**M. G. VAN HAVERBEKE**  
Professeurs honoraires : **M. A. BRIZARD**  
**M. L. FALIU**  
**M. C. LABIE**  
**M. C. PAVAU**  
**M. F. LESCURE**  
**M. A. RICO**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*  
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*  
M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*  
M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
N. **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEUR ASSOCIE**

M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine.*

**PROFESSEUR CERTIFIE DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**MAITRES DE CONFERENCES 1° CLASSE**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*  
Mle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Réproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES 2° CLASSE**

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
Mle **HAY Magali**, *Productions animales, éthologie*  
M. **MAREDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A Madame le professeur Jacqueline PUEL  
Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
Bactériologie-Virologie  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A Madame le docteur Christelle CAMUS  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Biologie cellulaire et moléculaire  
Qui nous a fait l'amitié de prendre en considération ce travail.

Sincères remerciements.

A Madame le docteur Corine BOUCRAUT-BARALON  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie Infectieuse  
Qui nous a donné goût à la biologie moléculaire, nous a proposé ce travail, et nous a apporté son appui bienveillant.  
Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre plus vive reconnaissance et de notre plus profond respect.



A mes parents,

Pour leur soutien de chaque jour.

Pour l'éducation fondée sur le respect, la tolérance et l'honnêteté qu'ils ont su me donner.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de tout l'amour que j'ai pour eux.

A Gérard,

Pour son amour, sa patience, sa gaieté, son aptitude à toujours m'étonner et me faire rire.

Que la vie nous permette de faire des enfants qui te ressemblent...

A mes sœurs Véronique et Catherine,

Qui ont dû supporter mes caprices de «petite dernière », et ont su me les pardonner.

Merci pour la confiance établie entre nous.

A ma grand mère, Marie, et à la mémoire de mes grands parents disparus,

Je suis si fière d'être leur petite fille.

A ma famille au grand complet,

Pour son accueil toujours chaleureux et sa mosaïque de personnalités.

A Sandrine,

Pour tous nos fous rires de petites filles.

A tous mes amis, Cécile, Elisabeth, Nathalie, Vanessa, Nanou, Laulau, Rodolphe, Coco,

Cédric, Delphine, Florent, Oriane, Julie, Annick, Isa, Sandrine, Karine, Stéphane,

Christel... et à tous les «bordelais »...

Pour tous les moments inoubliables passés ensemble...en attendant les prochains !!!

A Mango,

Qu'il ne soit jamais infecté par ces saletés de virus !!!





<b>Sommaire.</b>	<b>Pages</b>
<b>Table des Illustrations</b>	13
<b>Table des Abréviations</b>	15
<b>Première Partie : Étude Bibliographique</b>	17
<b>Introduction.</b>	19
<b><u>I. Généralités sur les rétrovirus. Particularités du Virus leucémogène félin (FeLV) et du virus de l'immunodéficience féline (FIV).</u></b>	20
<b>A. Virologie.</b>	20
1. Découverte des rétrovirus	20
2. Nomenclature	20
3. Propriétés des rétrovirus	21
a. Structure	21
b. Propriétés physiques et chimiques des Rétrovirus	22
c. Le génome des rétrovirus	22
d. Les protéines	23
e. Lipides et glucides	25
4. Cycle de réplication des rétrovirus	25
<b>B. Épidémiologie.</b>	26
1. FeLV	26
a. Sources virulentes et modes de transmission du virus	26
b. Facteurs de réceptivité	27
c. Prévalence	27
2. FIV.	28
a. Sources virulentes et modes de transmission du virus	28
b. Facteurs de réceptivité	29
c. Prévalence	29
<b>C. Pathogénie.</b>	31
1. FeLV	31
a. Circulation du virus dans l'organisme	31
b. Pouvoir pathogène	32
2. FIV	33
a. Circulation du virus dans l'organisme	33
b. Pouvoir pathogène	33
<b>D. Signes cliniques</b>	34
1. FeLV	34
a. Formes tumorales	34
b. Formes non tumorales	35
2. FIV	36
<b>E. Prophylaxie</b>	37
1. FeLV	37
a. Prophylaxie sanitaire	37

b.	Prophylaxie médicale	37
2.	FIV	39
a.	Prophylaxie sanitaire	39
b.	Prophylaxie médicale	39
<b>F.</b>	<b>Traitement</b>	40
1.	FeLV	40
a.	Chats asymptomatiques	40
b.	Chats symptomatiques	40
2.	FIV	42
a.	Chats asymptomatiques	42
b.	Chats symptomatiques	42
<b>II.</b>	<b>Méthodes de diagnostic des infections par le FIV et le FeLV.</b>	44
<b>A.</b>	<b>FeLV</b>	44
1.	Diagnostic clinique	44
2.	Diagnostic de laboratoire	44
a.	Mise en évidence du virus	44
b.	Mise en évidence des antigènes viraux	45
c.	Mise en évidence de l'acide nucléique viral	50
<b>B.</b>	<b>FIV</b>	53
1.	Diagnostic clinique	53
2.	Diagnostic histologique	54
3.	Diagnostic de laboratoire	54
a.	Culture et isolement du virus	54
b.	Détection des anticorps antiviraux	55
c.	Détection du génome par PCR	62
	<b>Deuxième Partie : Étude Expérimentale. Mise au Point d'un Test de Diagnostic des Rétroviroses Félines par PCR.</b>	64
	<b>Introduction.</b>	65
	<b><u>I. Matériel et Méthodes</u></b>	65
	<b>A. Les Prélèvements</b>	65
	<b>B. Extraction de l'ADN à partir de sang total</b>	67
	<b>C. Choix des amorces et des séquences à amplifier</b>	68
1.	FeLV	68
2.	FIV	70
	<b>D. La réaction de polymérisation en chaîne</b>	73
1.	Réalisation de la PCR et procédures anti contamination	73
2.	Réactifs	73
3.	Programme d'amplification	74
	<b>E. Révélation de l'amplification</b>	74

<b><u>II. Résultats</u></b>	75
<b>A. Réalisation du test en PCR simple</b>	75
1. Vérification de l'efficacité des amorces	75
2. Mise au point du test.	75
a. Elaboration de dilutions d'amplicons	75
b. Détermination du seuil de détection	76
c. Mise au point des paramètres	77
<b>B. Mise au point du test en PCR multiplex.</b>	77
1. Premiers essais	77
2. Recherche des causes de perte de sensibilité du test en PCR multiplex	78
a. Mise en cause des amorces	78
b. Recherche d'une zone d'hybridation non désirée	79
c. Recherche de l'amorce responsable	80
3. Essais d'amélioration de la sensibilité du test en PCR multiplex	81
a. Modification de la température	81
b. Modification de la concentration en MgCl <sub>2</sub>	82
c. Modification de la quantité d'ADN	82
d. Modification de la concentration des amorces	82
e. Modification de l'enzyme polymérase	83
f. Vérification de la fiabilité du test multiplex «amélioré »	84
<b><u>III. Discussion</u></b>	85
<b>Conclusion</b>	89
<b>Références Bibliographiques</b>	91



## Table des illustrations.

<b>Figures :</b>	<b>pages</b>
Fig.I : Structure schématisée du FeLV	21
Fig. II : Structure schématisée du FIV	22
Fig. III : Aperçu du cycle de réplication des Rétrovirus	26
Fig. IV : Immunofluorescence directe et indirecte	46
Fig. V : Antigènes du FeLV produits par les cellules infecté	47
Fig. VI : ELISA : Méthode directe et indirecte	47
Fig. VII : Positions respectives des amorces et de la séquence à amplifier	50
Fig. VIII : Amplification d'une séquence d'ADN	51
Fig. IX : Illustration de la PCR nichée	52
Fig. X : Un exemple de kit destiné aux vétérinaires praticiens pour le diagnostic simultané de l'infection par le FeLV et le FIV	57
Fig. XI : Western blot pour l'identification d'anticorps	60
Fig. XII : Fiche de renseignements	66
Fig. XIII : Schématisation de l'extraction d'ADN à partir de sang total	67
Fig. XIV : Localisation des amorces et de la zone à amplifier sur le génome de FeLV	69
Fig. XV : Alignement de séquences issues de différentes souches de FIV (gène gag)	71-72
Fig. XVI : Localisation des amorces et de la zone à amplifier sur le génome de FIV	70
Fig. XVII : Test des amorces FeLV	75
Fig. XVIII : Test des amorces FIV	75
Fig. XIX : Détermination du seuil de détection des tests simples	76
Fig. XX : Test Multiplex	77
Fig. XXI : Amplification de FeLV en présence d'un ou deux couples d'amorces	78
Fig. XXII : Amplification de FIV en présence d'un ou deux couples d'amorces	79
Fig. XXIII: Positions respectives des amorces permettant l'amplification de FeLV, et de la zone potentielle d'hybridation de FIVGAG2	79
Fig. XXIV : Amplification du FeLV avec différents couples d'amorces	80
Fig. XXV : Amplification du FeLV avec U <sub>3</sub> F1 et FeGag1	80
Fig. XXVI : Amplifications simultanées du FeLV et du FIV	81
Fig. XXVII : Amplification à 51°C (1 <sup>ère</sup> étape) et 53°C (2 <sup>ème</sup> étape)	81
Fig. XXVIII : Amplification de FeLV avec dilution de l'ADN matrice pour la seconde PCR	82
Fig. XXIX : Amplification du FeLV avec concentration en amorces doublée	83
Fig. XXX : Amplification du FeLV avec deux polymérases différentes	83
Fig. XXXI : Test Multiplex sur 5 échantillons d'ADN de chats.	84

### **Tableaux :**

Tab. I : Résultats de tests ELISA réalisés sur des populations de chats malades	28
Tab. II : Prévalence du FIV dans différents pays	30
Tab. III : Vaccins contre la leucose féline	38
Tab. IV : Caractéristiques de plusieurs tests rapides de diagnostic de la leucose féline	49
Tab. V : Caractéristiques de plusieurs tests rapides de diagnostic du syndrome d'immunodéficience féline	59
Tab. VI : Propriétés des amorces servant à amplifier l'ADN du FeLV	69
Tab. VII : Propriétés des amorces servant à amplifier l'ADN du FIV	70
Tab. VIII : Concentrations et volumes des réactifs utilisés pour la réalisation de PCR	74



## Table des Abréviations

<b>Ac</b>	Anticorps
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>Ag</b>	Antigène
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>AZT :</b>	Zidovudine
<b>ddC :</b>	2'3'-dideoxycytidiae
<b>dNTP :</b>	Déoxynucléotide Phosphate
<b>EDTA :</b>	Ethylène Diamine Tétraacétique
<b>ELISA :</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>ENVT :</b>	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
<b>FeLV :</b>	<i>Feline Leukemia Virus</i>
<b>FeSV :</b>	<i>Feline Sarcoma Virus</i>
<b>FIV :</b>	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
<b>FOCMA :</b>	Feline Oncornavirus Cell Mediated Antigen
<b>GALT :</b>	Gut Associated Lymphoid Tissue
<b>gp</b>	Glycoprotéine
<b>HIV :</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HTLV :</b>	<i>Human T Lymphotropic Lentivirus</i>
<b>IFA :</b>	Immunofluorescence Antibody Test
<b>IFN<math>\alpha</math> :</b>	Interféron $\alpha$
<b>Ig :</b>	Immunoglobuline
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>LCR :</b>	Liquide Céphalo-Rachidien
<b>LTR :</b>	Long Terminal Repeat
<b>p</b>	Protéine
<b>PBS :</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PMEA :</b>	9-(2 phosphonoyl-methoxyethyl)adenine
<b>RIPA :</b>	Radioimmunoprecipitation Assay
<b>RT-PCR :</b>	Reverse Transcriptase PCR
<b>SIDA :</b>	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
<b>SPA :</b>	Sthaphylococcal Protein A
<b>TNF<math>\alpha</math> :</b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$





**Première Partie : Étude Bibliographique.**



## Introduction.

D'énormes progrès ont été réalisés ces dernières années dans la connaissance des virus, notamment grâce au développement de la biologie moléculaire. Certains sont des agents pathogènes majeurs en médecine humaine (virus des hépatites, du SIDA...). La recherche s'intéresse aussi aux virus des animaux, et en particulier aux homologues des virus humains. C'est le cas du FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) et du FeLV (*Feline Leukemia Virus*), responsables du syndrome d'immunodéficience acquise et de la leucose du chat domestique. Outre leur intérêt comme modèles animaux du HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) et du HTLV (*Human T Lymphotropic Lentivirus*), leur étude trouve son importance en médecine vétérinaire : ces virus sont en effet répartis mondialement et participent largement à la mortalité féline.

Dans ce mémoire, nous rappelons tout d'abord leurs principales caractéristiques avant de nous intéresser aux différents moyens de les diagnostiquer.

Pour plus de commodité, ces virus sont souvent recherchés simultanément, à l'aide de tests rapides. Néanmoins, la fiabilité de ces tests est de plus en plus discutée. La biologie moléculaire met aujourd'hui à notre disposition un nouvel outil de diagnostic, la réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R.), qui semble prometteur. Notre travail a consisté à utiliser cette méthode pour mettre au point un test de diagnostic du FeLV et du FIV.

## I. Généralités sur les rétrovirus. Particularités du Virus leucémogène félin (FeLV) et du virus de l'immunodéficience féline (FIV).

### A. Virologie.

#### 1. Découverte des rétrovirus.

Les Rétrovirus représentent une grande famille virale comprenant de nombreux virus importants en médecine vétérinaire. Aujourd'hui, ils sont très étudiés car certains d'entre eux sont des agents pathogènes majeurs pour l'homme (virus HIV, responsable du SIDA virus HTLV, responsable de leucémies).

En 1964, à la faculté vétérinaire de Glasgow, Jarrett et ses collaborateurs réussissent la transmission expérimentale de la leucose lymphoïde du chat. [70, 71]

En 1967, ils identifient l'agent responsable : Le virus leucémogène félin ou FeLV [68].

Le FIV fut isolé pour la première fois en 1986 à Petaluma en Californie, par le professeur Pedersen [114]. Les chats porteurs souffraient d'un syndrome d'immunodéficience mais n'étaient pas infectés par le FeLV. Le virus fut identifié comme un lentivirus de morphologie similaire au HIV mais d'antigénicité différente. On le retrouva ensuite dans des sérums stockés dans les années 60. [42, 126]

#### 2. Nomenclature [104].

Le nom de cette famille, *Retroviridae*, a été donné en référence à l'enzyme commune à tous les rétrovirus : une ADN polymérase ARN dépendante ou transcriptase inverse. Elle permet au virus, à partir de son ARN, de synthétiser le brin d'ADN correspondant et de l'intégrer au génome de la cellule cible. C'est le phénomène inverse de la transcription qui s'opère généralement dans une cellule, c'est une synthèse «rétrograde». Le radical rétro a ainsi été choisi pour qualifier cette famille de virus.

La famille des rétrovirus est divisée en 7 genres :

- Les *Alpharetrovirus* (rétrovirus aviaires de type C)
- Les *Betaretrovirus* (rétrovirus mammifères de type D et de type B)
- Les *Deltaretrovirus* (rétrovirus BLV-HTLV : virus leucémogènes bovin et humain)
- Les *Epsilonretrovirus* (rétrovirus de poissons)
- Les *Gammaretrovirus* (rétrovirus mammifères et reptiliens de type C)
- Les Lentivirus
- Les Spumavirus

La morphologie de type C du FeLV le classe parmi les Gammaretrovirus. Sa capacité à provoquer la transformation maligne des cellules qu'il infecte, à engendrer des leucémies et des lymphosarcomes, fait de lui un virus oncogène. Il fait ainsi partie des oncornavirus.

Le FIV (Virus de l'immunodéficience féline) appartient au genre des Lentivirus, comme le virus de l'immunodéficience de l'homme, du singe et des bovins, le virus de visna Maedi, de l'anémie infectieuse des équidés et de l'arthrite encéphalite de la chèvre. Ce nom fait référence à l'évolution lente des maladies dont ils sont responsables.

Le FIV fut d'abord appelé «Feline T lymphotropic Lentivirus» (FTLV) en raison de son tropisme pour les lymphocytes T et de son isolement à partir de lymphocytes de chats

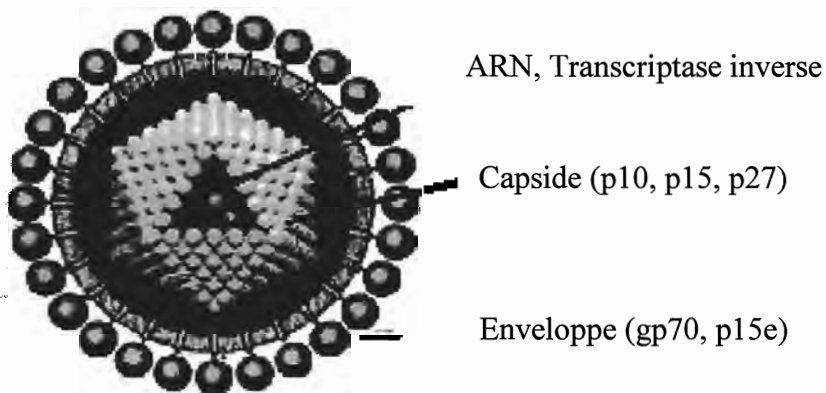
infectés. Son nom fut modifié lorsqu'on confirma qu'il était responsable du syndrome d'immunodéficience acquise du chat.

### 3. Propriétés des rétrovirus.

#### a. Structure [8, 104]

Les rétrovirus sont sphériques (diamètre compris entre 80 et 100 nm), et enveloppés. Leur structure peut se décomposer en trois couches :

Au centre du virus se trouve le noyau (ou core) constitué de l'ARN viral associé à des protéines comme la transcriptase inverse. Le noyau est protégé par des nucléases qui forment la capsid. Cette «boîte protectrice» est icosaédrique pour le FeLV, et plutôt cylindrique dans le cas du FIV. Cet ensemble est enfin entouré d'une enveloppe protéolipidique qui provient en partie de la membrane de la cellule hôte. Les glycoprotéines de l'enveloppe forment des spicules qui font saillie à la surface des virus.



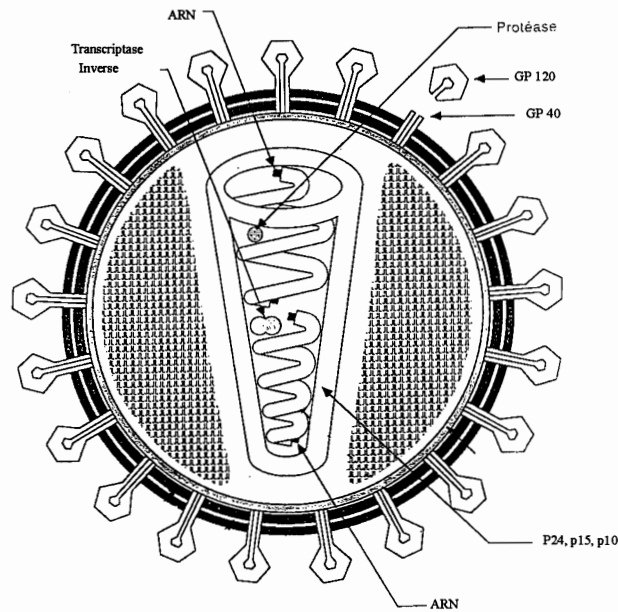
*Fig.I : Structure schématisée du FeLV [d'après 117]*

Diamètre : 100 à 110 nm

gp 70 : Glycoprotéine de surface

p 15e : Protéine transmembranaire

p 27, p 10, p15 : Protéines de la capsid



**Fig. II : Structure schématisée du FIV.**

Diamètre : 105 à 125 nm

gp 40 : Glycoprotéine transmembranaire

gp 120 : Glycoprotéine de surface

p 24, p 15, p10 : Protéines de la capsidie

#### b. Propriétés physiques et chimiques des Rétrovirus.

Les rétrovirus possèdent une enveloppe lipidique qui les rend sensibles à la chaleur (30 minutes à 56°C), à la sécheresse, au savon, aux désinfectants, aux détergents et au formaldéhyde. Ils sont relativement résistants aux rayons X et ultraviolets [138, 15].

Les glycoprotéines de surface peuvent être partiellement attaquées par des enzymes protéolytiques.

#### c. Le génome des rétrovirus.

Deux molécules d'ARN simple brin, linéaires, constituent le génome viral. De 7 à 11 Kb chacune (environ 8.3 Kb pour le FeLV et 10 Kb pour le FIV), elles sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes. Leur extrémité 3' est polyadénylée, leur extrémité 5' est coiffée.

Chaque molécule est associée à un ARN de transfert spécifique qui se situe du côté 5'.

Le génome des virus non déficients porte trois gènes majeurs :

- Le gène *gag* (pour **g**roup-**s**pecific **a**ntigen) code pour les protéines de la capsidie.

- Le gène *pol* code pour l'ADN **polymérase** ARN dépendante (transcriptase inverse).
- Le gène *env* code pour les protéines de l'**enveloppe**.

Caractéristiques particulières à chaque virus :

- FeLV

Le gène *gag* code pour les protéines p10, p12, p15 et p27. C'est le gène le plus conservé.

Le gène *pol* code pour la transcriptase inverse

Le gène *env* code pour les protéines d'enveloppe gp70 et p15e

Certains virus, comme le FeSV (*Feline Sarcoma Virus*), possèdent un quatrième gène majeur, l'oncogène viral (*v-onc*). Sa présence s'accompagne presque toujours de délétions dans le gène *env*, ce qui rend le virus incapable de synthétiser une enveloppe complète et de se répliquer : ces virus sont alors dépendants de virus non déficients et compétents pour la réplication. Ainsi, le virus FeSV s'associe au FeLV et devient alors fortement oncogène [32].

Le génome du virus FeLV peut se recombiner avec l'oncogène cellulaire *c-myc*. Il est alors responsable de leucémies aiguës, contrairement au FeLV classique.

Le RD114 est un virus endogène présent dans toutes les cellules de chats. Il n'est pas pathogène.

- FIV

Le génome du FIV est complexe et très étudié.

Le gène *gag* code pour les protéines p15, p24 et p10 de la capsid.

Le gène *pol* code pour une protéase, une transcriptase inverse, une dUTPase et une intégrase.

Le gène *env* code pour les protéines d'enveloppe gp40 et gp120.

Le génome du provirus a une longueur d'environ 9.5 kb. Deux longues répétitions terminales (LTRs) le bordent. Ces LTRs contiennent des éléments de régulation : U3, R et U5.

Le génome possède aussi 3 cadres de lecture majeurs et plusieurs petits cadres de lecture qui codent pour des facteurs de régulation.

Il existe également d'autres gènes (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*...) qui jouent un rôle dans la transcription et la traduction. [28]

Le gène *gag* est le plus conservé, le gène *env* le moins : La séquence d'acides aminés de la gp120 de deux isolats de FIV peut varier de 15% [115].

#### d. Les protéines.

Les protéines qui constituent les virus sont nombreuses et nous ne nous intéresserons ici qu'aux protéines majeures du FeLV et du FIV.

- FeLV [102, 49]

Les protéines d'enveloppe sont au nombre de deux :

- Une glycoprotéine qui fait saillie à la surface du virus sous forme de spicules de 8 nm de long. On l'appelle gp70 ou antigène majeur d'enveloppe. Sa structure polymorphe permet de distinguer trois sous groupes de FeLV [122] :

- Le sérotype A : Le plus fréquemment isolé chez le chat spontanément infecté. C'est le seul sérotype qui peut n'être associé à aucun autre.
- Le sérotype B : Il est toujours associé au sérotype A
- Le sérotype C : Il est toujours associé aux sérotypes A et B. Il est capable de se répliquer aussi dans les cellules de chien, de cobaye et d'homme.

Dans 50% des cas, seul le sérotype A est isolé. Dans 49% des cas, les sérotypes A et B sont associés. Dans 1% des cas, on isole les trois sérotypes [67].

Les sous-groupes B et C proviendraient d'une recombinaison du sous-groupe A avec de l'ADN de chat [134].

C'est aussi grâce à la gp70 que le virus s'unit aux récepteurs cellulaires. Ainsi, cette protéine joue un rôle majeur dans le pouvoir infectieux du virus [123].

Elle induit la formation d'anticorps neutralisants qui jouent un rôle de protection en empêchant le virus de se fixer à la cellule.

-L'antigène mineur d'enveloppe est la protéine transmembranaire p15e. Elle est liée à gp70 par des ponts disulfures. Elle intervient dans l'immunodépression causée par le FeLV [90].

Quatre antigènes internes sont produits en excès dans le cytoplasme de la cellule infectée : p15, p12, p27 et p10.

p27 est la protéine majeure de la nucléocapside. On obtient avec elle une réaction antigénique croisée pour tous les groupes de FeLV. Elle est donc utilisée dans les tests de détection du virus (Immunofluorescence, ELISA...). Elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire lors de la multiplication du virus ou libérée avec la lyse de la cellule.

La transcriptase inverse transcrit l'ARN viral en ADN monocaténaire puis en ADN bicaténaire : C'est une ADN polymérase ARN dépendante et ADN dépendante. Comme toutes les transcriptases inverses des oncovirus, elle est manganèse-dépendante [57].

- FIV [28].

Trois protéines structurales majeures, issues du clivage d'une polyprotéine, sont codées par le gène *gag* :

- la protéine de la matrice p15
- la protéine de la capsid p24
- la protéine de la nucléocapsid p10

Plusieurs enzymes, codées par le gène *pol*, facilitent la réplication et l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire.

- Une protéase d'environ 13 kDa, qui clive les polyprotéines issues de *gag* et *pol*.



-Une transcriptase inverse de 46 kDa, magnésium-dépendante (comme celle de tous les lentivirus) [107].

-Une déoxyuridine triphosphatase d'environ 14 kDa. Elle jouerait un rôle dans l'incorporation d'uracile à l'ADN viral lors de la transcription inverse.

-une intégrase d'environ 32 kDa.

Les protéines codées par *env* sont de deux types : une glycoprotéine de surface et une glycoprotéine transmembranaire.

Les anticorps neutralisants sont dirigés contre la glycoprotéine de surface, gp120 [57]. Leur mise en évidence est difficile.

Les anticorps dirigés contre la protéine transmembranaire gp40 sont recherchés pour le diagnostic sérologique du FIV.

#### e. Lipides et glucides

Les lipides proviennent de la membrane plasmique de la cellule hôte.

Les deux protéines d'enveloppe du FIV sont glycosylées, alors qu'une seule l'est dans le cas du FeLV.

#### 4. Cycle de réplication des rétrovirus. [138, 32]

Pour permettre au virus de pénétrer dans la cellule hôte, les glycoprotéines de l'enveloppe virale interagissent avec des récepteurs spécifiques de la cellule (le récepteur CD4 par exemple, dans le cas d'une infection par le HIV), entraînant la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique cellulaire.

La transcriptase inverse synthétise ensuite un ADN complémentaire double brin à partir de l'ARN viral et de l'ARN de transfert qui lui est associé. Cet ADN complémentaire est pourvu d'une LTR (Long Terminal Repeat) à chaque extrémité. Il se déplace jusqu'au noyau cellulaire où il se circularise (les deux LTRs se rejoignent). L'intégrase incorpore alors plusieurs molécules de ce type à différents niveaux de l'ADN cellulaire. On obtient un provirus. Ce phénomène ne se produit que dans les cellules en mitose active [100]. Le cycle peut alors s'arrêter et ne reprendre que beaucoup plus tard (Le virus est latent dans la cellule).

Le provirus est ensuite transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire en ARN viral et en ARNs messagers.

La traduction des gènes *gag*, *pro* et *pol* est effectuée à partir d'un grand ARN messager, qui représente le génome dans sa totalité. On obtient une polyprotéine qui sera clivée plus tard pour donner les protéines de structure, la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Un deuxième ARN messager plus petit et issu du gène *env* permet d'obtenir les précurseurs des protéines d'enveloppe. Ceux-ci subissent une phase de maturation : ils cheminent dans le REG et l'appareil de Golgi où ils sont glycosylés avant de s'enchâsser dans la membrane plasmique. La plupart des "polyprotéines gag" restent dans le cytoplasme, mais une fraction suit le même trajet que les précurseurs d'enveloppe.

L'ARN viral et les précurseurs des protéines codées par *gag* et *pol* s'assemblent dans le cytoplasme et forment la nucléocapside. La membrane plasmique bourgeonne et un phénomène d'exocytose se produit au cours duquel le virus acquiert son enveloppe. Au même moment, les polyprotéines sont clivées. De nouveaux virions sont ainsi libérés.

Lorsque la cellule infectée se divise, le génome des deux cellules filles contient à son tour le provirus [100].

La réplication des rétrovirus se caractérise par de nombreuses mutations, dues aux erreurs que commet la transcriptase inverse. Les gènes *gag*, *pol*, *onc* et certaines régions du gène *env* sont stables. En revanche, d'autres zones de *env* sont très variables, en particulier celles qui codent pour la région cible des anticorps.

A cela s'ajoute une haute fréquence de recombinaison avec d'autres virus qui peuvent coïnfecter la cellule hôte.

On comprend ainsi pourquoi les virus oncogènes à transformation rapides sont la cause de tumeurs très variées. Cela rend également la classification des virus plus difficile : Il existe en effet des pseudotypes qui ont le génome d'une espèce ou d'un sous-type de virus et les antigènes d'enveloppe d'un autre !

Le gène *env* des lentivirus, qui code pour la glycoprotéine gp120, présente cinq régions hypervariables. Les mutations d'enveloppe permettent au virus d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte, car les mutants, possédant de nouveaux antigènes, ne sont pas reconnus par les anticorps. Les gènes *gag* et *pol* sont plus stables.

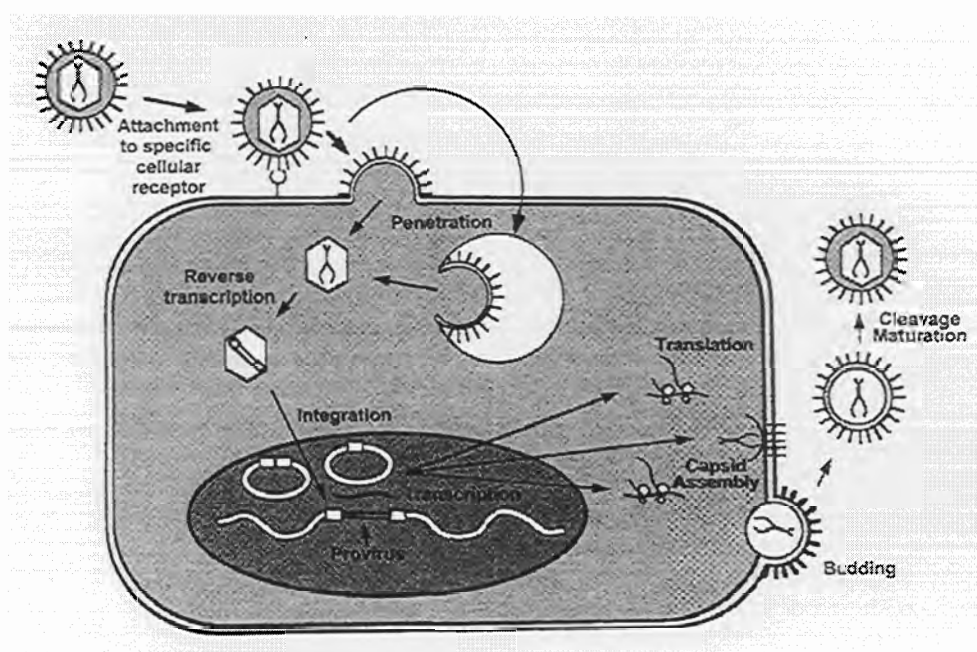


Fig. III : Aperçu du cycle de réplication des Rétrovirus [14].

## B. Épidémiologie.

1. FeLV [100, 49, 17, 15].

a. Sources virulentes et modes de transmission du virus.

On retrouve le FeLV dans toutes les sécrétions de l'organisme d'un animal virémique : dans la salive et les sécrétions trachéales essentiellement, mais aussi dans les larmes, les fécès, les urines, le lait et le sang.

Un millilitre de salive de chat infecté persistant peut contenir un million de particules virales [3].

L'excrétion virale dure tant que la virémie persiste. Le chat infecté persistant est donc la source principale de virus.

Le virus est rapidement inactivé dans le milieu extérieur (il peut néanmoins survivre 24 à 48 heures s'il est conservé dans un endroit humide et à température ambiante) [15]. Sa transmission n'est donc possible qu'à l'occasion de contacts rapprochés entre chats.

La transmission est le plus souvent horizontale. Les chats se contaminent en se léchant, se griffant ou se mordant, mais aussi en partageant la même gamelle ou la même litière.

Des transmissions par piqûres d'insectes et des contaminations iatrogènes (transfusion sanguine, utilisation d'aiguilles usagées) ont également été décrites.

La mère virémique peut aussi contaminer son petit pendant la gestation par voie placentaire ou pendant l'allaitement. Mais le plus souvent, c'est à l'occasion du toilettage des petits que le virus est transmis. La transmission verticale stricte (c'est-à-dire via les gamètes) est suspectée mais non prouvée.

#### b. Facteurs de réceptivité

Tous les chats ne répondent pas de la même façon à une infection par le FeLV : Il faut prendre en compte :

- L'âge de l'animal : les chatons sont beaucoup plus sensibles que les adultes. Avant 8 semaines, 85 à 100% développent une maladie mortelle dans un court délai. Après 4 mois, la majorité des chats résistent et deviennent naturellement immuns. Après 7 ans, la sensibilité des chats est à nouveau accrue. Une étude s'est proposée d'introduire des chats non infectés dans un effectif de chats virémiques. Sur les 10 chatons introduits à l'âge de 3 mois, 7 devinrent virémiques à 5 mois. En revanche, parmi les 17 adultes introduits, 3 seulement devinrent virémiques, et après une période de plus de sept ans [16].

- Le sexe de l'animal : les mâles semblent plus prédisposés à être infectés que les femelles. Selon une étude effectuée dans les années 80 en région parisienne [102], et portant sur 2770 chats positifs au test de dépistage du FeLV par ELISA, 35% étaient des mâles contre 29% des femelles. D'autres études confirment cette observation [37,10]. Ces écarts reflètent peut-être le fait que les mâles sont moins sédentaires que les femelles.

- Le mode de vie de l'animal : les chats qui vivent en communauté ont plus de risque de contracter le virus. Ils sont en effet plus à même d'avoir des contacts prolongés avec leurs congénères, ce qui est nécessaire à la transmission de la maladie (au cours d'un contact peu durable, le nombre de particules virales transmises est faible, et le chat s'immunise contre le virus plutôt qu'il ne développe la maladie). C'est pourquoi les chats de races, issus d'élevages, sont aussi plus atteints.

En conséquence, les chats les plus susceptibles d'être infectés sont les jeunes chats qui vivent au contact d'un compagnon infecté [36].

#### c. Prévalence

Le FeLV a été mis en évidence partout où il a été recherché. En Europe, le pourcentage d'infection est en moyenne de 10% mais ce chiffre varie selon le type de population auquel on s'intéresse [100].

Une étude [37] porta sur 6048 prélèvements effectués entre 1986 et 1991 à l'occasion de consultations (test Petchek FeLV. IDEXX, Portland, USA). La majorité des échantillons

provenaient d'île de France. Parmi les chats testés, 4146 présentaient des symptômes évocateurs des rétroviroses félines. 15.4% d'entre eux donnèrent un résultat positif au test. Les 1902 autres chats ne présentaient pas de symptômes mais furent testés par mesure de précaution (suspicion de contamination, en prévision d'une saillie, d'une transfusion, de l'introduction dans un effectif ou avant une vaccination contre la leucose féline). Le résultat du test s'avéra positif pour 5.4% d'entre eux.

Une autre étude [10], publiée en 1994, a été effectuée à l'initiative des laboratoires Idexx en partenariat avec plusieurs cliniques vétérinaires des États Unis et de différents pays d'Europe. La population de chats testés (CITE Combo FeLV/FIV test, IDEXX, Portland, USA) était restreinte aux chats malades vus en consultation. Cet échantillon ne se voulait donc pas représentatif de la population totale des pays concernés. Le tableau suivant indique les résultats obtenus :

	France	Italie	Royaume Uni	Allemagne	États Unis	Autriche	Suisse
Nombre de chats	9951	1631	4878	6101	27976	400	1660
% de chats FeLV positifs seulement	19.4	12.2	18.0	13.4	13.3	14.2	11.3
% de chats FIV et FeLV positifs	4.3	4.2	0.7	2.1	1.5	1.0	Non communiqué
% total de chats FeLV positifs	23.7	16.2	18.7	15.5	14.8	15.2	Non communiqué

*Tab. 1 : Résultats de tests ELISA réalisés sur des populations de chats malades [10].*

Plus récemment, une étude [2] réalisée à Madrid (Snap Combo Plus R ; Idexx, Inc., Westbrook, Maine) sur des chats présentés à la consultation révèle 15,6% de chats positifs pour le FeLV et 1.1% positifs pour le FeLV et le FIV parmi les chats sains. Parmi les chats présentant des symptômes, 30.4% sont positifs pour le FeLV et 2.6% pour le FeLV et le FIV.

En Norvège et en Australie, en revanche, on n'observe respectivement que 1.2% et 2% de chats positifs pour le FeLV [137, 88].

## 2. FIV.

### a. Sources virulentes et modes de transmission du virus.

Le virus FIV a d'abord été isolé dans le sérum, le plasma, la salive , le LCR, et plus récemment dans le colostrum, le lait et les cellules séminales [132, 11, 112, 73, 125].

La transmission du virus est essentiellement horizontale : Les chats se contaminent en se battant, le plus souvent à l'occasion d'une morsure. L'efficacité de cette transmission a été démontrée expérimentalement [143].

Pour étudier l'importance de la transmission entre chats vivants sous le même toit, des études [128,11] consistèrent à élever ensemble des chats non infectés et des chats séropositifs : Même après plusieurs années, pas ou très peu de chats séronégatifs devinrent séropositifs. Les risques de contamination par simples contacts furent alors considérés comme très faibles. Mais une analyse par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a permis de détecter de l'ADN de FIV dans des cellules de chats pourtant séronégatifs [20]. L'efficacité de ce mode de transmission a donc peut-être été sous estimée.

La transmission vénérienne a été décrite, mais seulement dans des conditions expérimentales : Une chatte a été infectée par inoculation vaginale d'une culture virale ou de sperme de chat infecté [98]. En revanche, la mise en présence de chattes infectées par le virus avec des mâles non infectés n'a donné lieu à aucune contamination [132].

La transmission verticale est également possible. Les chattes gravides en phase aiguë d'infection peuvent transmettre le virus à leurs chatons :

-In utero : les conséquences sont l'arrêt du développement fœtal, l'avortement, la naissance de chatons prématurés, de chatons viables mais infectés et déficients en lymphocytes T.

-Lors de la mise bas : un lavage vaginal a en effet révélé la présence du virus en pré et post partum. [110]

-Lors de l'allaitement : les cellules présentes dans le lait et le colostrum sont parfois infectées.

#### b. Facteurs de réceptivité [131, 128, 124].

On retrouve les mêmes facteurs que ceux rencontrés dans le cas du FeLV :

- L'âge de l'animal : la moyenne d'âge du chat séropositif se situe autour des 5-6 ans. Les anticorps anti FIV sont rarement détectés dans le sang des chats plus jeunes. Les motifs de bagarres sont en effet plus fréquents à l'âge adulte (défense du territoire, recherche d'un partenaire...).

- Le sexe de l'animal : selon les études, il y a au moins deux fois plus de mâles séropositifs que de femelles. Là encore, le comportement plus agressif du mâle non castré est mis en cause.

- Le mode de vie de l'animal : le chat de race commune semble plus exposé que le chat de race pure. Le premier est en effet souvent plus libre de vagabonder que le second, et est donc d'avantage susceptible de se battre avec ses congénères.

En conséquence, toutes les études s'accordent sur un point : le chat mâle de race commune, âgé de plus de cinq ans et qui vit à l'extérieur est la cible privilégiée du FIV.

#### c. Prévalence.

Comme le FeLV, le FIV a été isolé partout où il a été recherché. Diverses études épidémiologiques ont permis de connaître sa répartition dans le monde. Voici un tableau récapitulatif des résultats obtenus [57] :

PAYS	Nombre de chats testés	% de résultats FIV positifs	Références
Espagne	180 (Sains)	8.3	2000, [2]
	115 (Malades)	13.9	2000, [2]
Royaume Uni	1007 (Sains)	6	1989, [60]
	1024 (Malades)	19	1989, [60]
Royaume Uni	224 (Sains)	6	1991, [56]
	1450 (Malades)	17	1991, [56]
Royaume Uni	4878 (Malades)	13.5	1994, [10]
France	1902 (Sains)	10.3	1994, [37]
	4146 (Malades)	21.1	1994, [37]
France	9951 (Malades)	19.7	1994, [10]
France	208 (Malades)	22	1988, [84]
Pays Bas	123 (Sains)	1	1988, [84]
	98 (Malades)	3	1988, [84]
Suisse	178 (Sains)	3	1988, [84]
	775 (Malades)	4	1988, [84]
Allemagne	6101 (Malades)	10.5	1994, [10]
Autriche	400 (Malades)	3.7	1994, [10]
Italie	1631 (Malades)	27.6	1994, [10]
Japon	1584 (Sains)	12	1989, [62]
	1739 (Malades)	44	1989, [62]
Etats Unis	361 (Sains)	1	1989, [128]
	226 (Malades)	10	1989, [128]
Etats Unis	585 (Variés)	2	1989, [142]
Etats Unis	83 (Sains)	4	1989, [40]
	40 (Malades)	15	1989, [40]
Etats Unis	27976 (Malades)	8.9	1994, [10]
Etats Unis	511 (risque faible*)	1	1989, [143]
	2212 (risque élevé*)	14	1989, [143]
Canada	42 (risque élevé*)	19	1989, [143]
Australie	72 (Sains)	29	1990, [118]
	211 (Malades)	28	1990, [118]

*Tab. II : Prévalence du FIV dans différents pays.*

\*Le Risque faible correspond à des chats sains. Le risque élevé correspond à des chats atteints de troubles chroniques et à ceux qui sont en contact avec eux.

En France, en Espagne, au Royaume-Uni et aux États unis, les chiffres sont à peu près équivalents.

La prévalence est inférieure en Suisse, aux Pays-Bas et en Allemagne [11] et la différence entre les chats sains et malades est moins marquée. Les souches circulant dans ces pays sont peut-être moins virulentes.

En Australie et surtout au Japon, les chiffres sont très élevés. Il en est de même en Italie où, comme au Japon, la séroprévalence peut atteindre 25 à 30% [124]. Au Japon, cela peut s'expliquer par la forte densité de chats non castrés et errants.

L'infection par le FIV a été décrite chez les lions africains, les jaguars, les tigres et les panthères de Floride. L'isolat qui infecte ces animaux est à l'origine d'infection persistante chez le chat domestique, mais ne lui cause aucune maladie [124].

## C. Pathogénie.

### 1. FeLV

#### a. Circulation du virus dans l'organisme.

Le FeLV envahit l'organisme par étapes successives. Rojko[120] décrit six stades :

*Stade 1* : Le virus pénètre par voie orale ou nasale. Il se réplique dans les amygdales et le tissu lymphoïde local, puis dans les ganglions de la tête et du cou.

*Stade 2* : Si la réponse immunitaire n'est pas suffisante, on observe alors une virémie : Les lymphocytes et les macrophages infectés lors du premier stade sont libérés dans le sang. La position intracellulaire du virus lui permet d'échapper aux cellules réticulo-endothéliales.

*Stade 3* : Le tissu lymphoïde systémique (rate, ganglions, GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue)) est atteint et les cellules en mitose sont le siège d'une intense répllication virale.

Le chat peut alors développer suffisamment d'anticorps séroneutralisants et FOCMA (Feline Oncornavirus Cell Membran Antigens) pour enrayer l'infection. Le cas échéant, la progression du virus dans l'organisme continue :

*Stade 4* : Le virus atteint la moelle osseuse et envahit les mégacaryocytes et les cellules granulopoïétiques.

*Stade 5* : Les polynucléaires neutrophiles et les plaquettes alors libérées dans la circulation sont infectés. On parle d'animaux « virémiques ». En même temps, on observe des foyers d'infection dans les cryptes intestinales.

A ce stade, dans de rares cas, l'organisme peut encore se défendre et stopper la virémie.

*Stade 6* : L'infection s'étend aux épithéliums glandulaires et muqueux (glandes salivaires, pancréas, appareil respiratoire, vessie, reins) et les animaux sont alors « excréteurs » et contagieux.

Selon la réponse immunitaire de l'animal, trois situations se présentent à l'issue de l'infection [102, 15] :

- Les chats se défendent efficacement et rapidement avant l'installation de la virémie. Ils se débarrassent du virus et acquièrent une protection contre une éventuelle réinfection. Ce sont des animaux **régresseurs** (environ 40%).

- Les défenses immunitaires du chat ne sont pas suffisantes pour détruire complètement le virus, qui reste cantonné dans les cellules de la moelle osseuse. Les tests ELISA et d'immunofluorescence sont alors négatifs [15]. On observe parfois des phases de virémie transitoire. Ces animaux sont qualifiés d'**infectés latents** (environ 30%). La réactivation de l'infection est possible mais rare [15] et la plupart des animaux restent infectés latents ou finissent par se débarrasser définitivement du virus. Tant que l'infection reste latente, l'animal n'excrète pas le virus et n'est donc pas contagieux.

- Les chats ne se défendent pas ou mal. Ce sont des animaux **progresseurs** (environ 30%). Ils sont virémiques persistants, sont susceptibles de développer des maladies dans un délai de 3 à 36 mois et leur durée de vie est limitée à trois ans en moyenne. Ces chats sont contagieux car ils excrètent le virus en permanence.

On parle encore de **porteurs immuns** pour les chats positifs au test ELISA et négatifs au test IFA. Ils ont plus de chances de devenir infectés latents ou régresseurs que les animaux progresseurs [15].

#### b. Pouvoir pathogène.

Le FeLV est à l'origine de deux grands types de troubles. Il engendre un déficit du système immunitaire ou provoque des phénomènes cancéreux. Le pouvoir pathogène est fonction du sérotype considéré [102] :

- Le FeLV A provoque chez le chaton des anémies transitoires et des lymphomes ou leucémies après une longue période de latence. Chez l'adulte, on n'observe souvent qu'une virémie transitoire.

- Le FeLV B est à l'origine de désordres myéloprolifératifs.

- Le FeLV C engendre une aplasie mortelle de la lignée rouge lorsqu'il infecte des nouveaux nés ou des chats rendus virémiques par FeLV A.

La protéine d'enveloppe p15e serait responsable du dérèglement du système immunitaire : Elle déprime l'activité des lymphocytes T auxiliaires (*in vitro*, elle induit la diminution de la transformation blastique de ces lymphocytes [89]). Elle empêche ainsi le passage de la réponse précoce (IgM) vers la réponse plus tardive (IgG) . Elle nuit aussi au bon fonctionnement des lymphocytes T cytotoxiques et des macrophages activés puisqu'ils sont régulés par les lymphokines des lymphocytes T auxiliaires (IL2...). Le pouvoir de phagocytose des polynucléaires neutrophiles est également altéré [76].

Elle s'unit au premier composant du complément et en active la voie classique. Elle provoque ainsi une hypocomplémentémie [102].

La p27 forme des complexes immuns avec les IgG. Ces complexes inhibent la réponse immunitaire [21, 129] et peuvent également être responsables de glomérulonéphrites.

Enfin, ils activent eux aussi le système du complément [130] et induisent donc une hypocomplémentémie [49].

Le mécanisme de la transformation cellulaire fait l'objet de deux hypothèses [15] :

- Le virus s'insère dans le génome près de l'oncogène cellulaire (le plus souvent *myc*) qui est alors surexprimé et provoque une prolifération cellulaire.

- Le virus incorpore un oncogène, devient un virus recombinant avec des séquences oncogènes réarrangées et activées.



## 2. FIV [124].

### a. Circulation du virus dans l'organisme.

Lorsqu'on infecte expérimentalement des chats sains, le virus se réplique d'abord dans les cellules du tissu lymphoïde et des glandes salivaires. Une phase de virémie s'ensuit, qui peut durer plusieurs semaines [23] et peut s'accompagner des signes cliniques d'une infection aiguë. Deux semaines seulement après l'inoculation, on retrouve le virus dans les lymphocytes circulants [93] puis dans les cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes, macrophages) des organes non lymphoïdes (tractus intestinal, rein, poumons)[7].

En début d'infection, le FIV envahit préférentiellement les lymphocytes T auxiliaires, puis il s'attaque aux lymphocytes B qui seront finalement infectés en plus grand nombre que les premiers [22, 31].

La réponse immunitaire de l'hôte provoque une chute de la virémie. Les chats connaissent alors une période de silence clinique. Mais la production de virus continue et on le retrouve dans les lymphocytes du sang, dans le sérum ou le plasma, le liquide céphalo-rachidien, le sperme et les tissus lymphoïdes.

### b. Pouvoir pathogène.

L'infection par le FIV a surtout des répercussions sur le système immunitaire.

Très tôt, on observe une chute du nombre de lymphocytes auxiliaires CD4+ qui se poursuit pendant toute la période asymptomatique. Elle pourrait être secondaire à l'infection du thymus et de la moelle osseuse, ou à la lyse des CD4+ par le FIV, le système immunitaire ou encore par apoptose. Les CD4+ jouent un rôle critique dans la régulation de l'immunité, et leur lyse affaiblit le système de défense de l'hôte.

Le nombre de lymphocytes CD8+ et B reste, en revanche, assez stable (le nombre de CD8+ peut parfois augmenter légèrement). Ainsi, au cours de la maladie, on assiste à une inversion du rapport CD4+/CD8+, qui diminue progressivement. Néanmoins, aucune relation n'a pu être établie entre le niveau de CD4+/CD8+ et le stade clinique de l'infection [109, 53].

Les fonctions des cellules sont également altérées : Comme dans le cas de l'infection par le FeLV, les cellules infectées répondent beaucoup moins bien à la stimulation expérimentale par des mitogènes (concanavaleine A, lipopolysaccharides) ou par l'IL-2, ou à la stimulation *in vivo* par des antigènes [61, 8]. Le FIV altère aussi les fonctions des polynucléaires neutrophiles et des cellules «natural killer» [43].

L'infection se traduit aussi par des dérèglements dans la production de cytokines, comme le TNF $\alpha$  ou l'IL-6. La sécrétion d'IL-1 par les macrophages stimulés est également réduite [124].

Enfin, les chats infectés par le virus sont hypergammaglobulinémiques car leurs lymphocytes B, très stimulés, surproduisent les IgG [1, 34]. La concentration en complexes immuns dans la circulation en est anormalement augmentée [91] et est peut-être responsable des lésions rénales souvent observées dans cette infection.

La stimulation chronique des lymphocytes B pourrait aussi être à l'origine des lymphomes à cellules B que l'on observe chez les chats infectés exclusivement par le FIV [11].

Au-delà du système immunitaire, le FIV affecte le système nerveux. L'infection expérimentale d'astrocytes altère en effet les communications intercellulaires (jonctions gap) et le potentiel de membrane mitochondrial [19]. De plus l'activité de la glutathion réductase est réduite ce qui rend les cellules plus sensibles aux oxydations [124].

Le mécanisme de pénétration du virus dans la cellule n'est pas encore élucidé. L'équivalent du récepteur du HIV, le CD4, s'il intervient, ne semble pas être le seul impliqué [59, 106]. Les récepteurs à chemokines ou à immunoglobulines représentent des candidats potentiels, mais on envisage aussi une infection intercellulaire par fusion d'une cellule infectée avec une cellule qui ne l'est pas [124].

Certains symptômes survenant lors de l'infection par le FIV demeurent inexplicables mais on devine que l'altération des fonctions des cellules infectées a des répercussions sur de nombreux organes.

## **D. Signes cliniques**

### **1. FeLV [15, 100, 66, 81]**

Les maladies associées au FeLV sont de deux types. On distingue les pathologies de forme tumorale et non tumorale.

#### **a. Formes tumorales :**

Les tumeurs sont d'origine lymphoïde (dans 90 à 95 % des cas) ou myéloïde (5 à 10 % des cas).

Les tumeurs lymphoïdes se présentent sous la forme de lymphosarcomes ou de leucémies :

- *Le lymphosarcome médiastinal* : localisé dans la région du thymus, il est à l'origine de dyspnée et parfois même d'épanchement pleural. Il atteint généralement des chats de moins de quatre ans.

- *Le lymphosarcome alimentaire* : il se caractérise par des tumeurs diffuses de l'estomac et de l'intestin et atteint aussi les nœuds lymphatiques mésentériques. On l'observe sur des chats plus âgés (environ huit ans) . Il cause des troubles digestifs (vomissements, diarrhées), de l'anorexie et une perte de poids.

- *Le lymphosarcome multicentrique* : il envahit d'abord tous les tissus lymphoïdes de l'organisme (le volume des nœuds lymphatiques périphériques augmente visiblement), puis peut encore s'étendre à la rate, au foie et aux reins.

- Les lymphosarcomes non classés : la peau, les yeux, le système nerveux central, la vessie et tout autre tissu non lymphoïde (gencives, cavités nasales...) peuvent être la cible d'un lymphosarcome . Chaque cas engendre des signes cliniques particuliers (uvéite...).

- *Les leucémies lymphoïdes* : la moelle osseuse est envahie par des cellules lymphoïdes transformées (le plus souvent des lymphoblastes). L'hématopoïèse est perturbée et une anémie sévère peut alors en résulter. Si les cellules malignes circulent dans le sang, elles peuvent créer des lymphomes ou des infiltrations microscopiques de la rate et du foie. Une sévère lymphocytose accompagne souvent cette leucémie.

L'atteinte maligne des cellules myéloïdes induit des désordres myéloprolifératifs :

- *Les leucémies myéloïdes* : la moelle osseuse est envahie par des cellules blastiques d'origine érythrocytaire, mégacaryocytaire ou granulocytaire.

Les chats atteints d'érythroleucémie sont victimes d'une anémie arégénérative.

- *La myélodysplasie* : c'est le stade qui précède la leucémie et qui se traduit par une anémie arégénérative accompagnée dans certains cas d'une thrombocytopénie ou d'une granulocytopénie. Si la maturation des cellules de la moelle se révèle parfois anormale, le nombre de cellules blastiques ne permet pas de diagnostiquer une leucémie. Les chats meurent souvent à ce stade.

- *La myélofibrose* : Une biopsie révèle une fibrose diffuse de la moelle osseuse. C'est une lésion qui apparaît à un stade avancé de la maladie. Elle est souvent associée à une hémato-poïèse extramédullaire du foie et de la rate.

Cependant, la plus grande partie des chats victimes du FeLV sont atteints de maladies non tumorales.

#### b. Formes non tumorales :

La moelle osseuse peut là encore être la cible de l'infection, mais sous forme de maladies dégénératives. Ses cellules souches sont détruites et ne sont pas remplacées. Il s'agit du syndrome de dépression de la moelle osseuse. Il est responsable d'anémies arégénératives, de thrombocytopénies, de neutropénies et de lymphopénies.

La leucopénie s'accompagne parfois d'une entérite avec destruction de l'épithélium des cryptes intestinales et rappelle la panleucopénie infectieuse, mais s'en différencie par la présence d'une thrombopénie et d'une anémie.

Le système immunitaire reste la cible privilégiée du FeLV (cf. Pathogénie), et l'immunodépression qui en résulte rend les chats virémiques plus sensibles à diverses infections :

- Bactéries : stomatites, gingivites, abcès récurrents, pyodermites...
- Rickettsies : Hémobartonellose (*H. felis*) qui cause des anémies régénératives
- Virus : P.I.F. (entérite, troubles de la reproduction), infections de l'appareil respiratoire haut.
- Protozoaires : toxoplasmose (*T. gondii*), giardiose et cryptosporidiose (troubles digestifs)
- Infections fongiques : aspergillose, cryptococcose.

Le dépôt de complexes immuns provoquerait l'apparition de lésions rénales (glomérulonéphrites), et surtout de polyarthrites.

Des ostéochondromes (exostoses cartilagineuses) ont été décrits chez certains chats virémiques. Ils peuvent comprimer des nerfs ou la moelle épinière et aboutir ainsi la mort de l'animal.

Les lésions du système nerveux sont à l'origine d'anisocorie, d'ataxie, de troubles du comportement... L'incontinence urinaire est le trouble le plus communément rencontré.

Les troubles de la reproduction sont aussi très fréquents lors de l'infection par le FeLV : Endométrites, avortements (souvent tardifs), résorption fœtale (souvent confondu avec une infertilité de la chatte), naissances prématurées.

Les chatons contaminés à la naissance deviennent très rarement immuns. La plupart développent très vite la maladie (déshydratation, hypothermie, atrophie du thymus dans les deux premières semaines de la vie) et meurent rapidement.

## 2. FIV [132, 11, 124, 127 ]

L'infection expérimentale par le FIV permet de distinguer classiquement cinq stades cliniques :

- La phase aiguë qui survient environ 4 à 6 semaines après l'inoculation du virus. On note le plus souvent une lymphadénopathie généralisée transitoire, un syndrome fébrile et parfois des troubles digestifs (entérite), des stomatites, une neutropénie, une leucopénie... Cette phase ne dure que quelques semaines et passe le plus souvent inaperçue lors d'infection naturelle.

- La phase de portage asymptomatique se traduit par un silence clinique. Les chats paraissent sains. C'est une phase de latence qui dure souvent des années. Pourtant, le nombre de lymphocytes CD4 chute, le rapport CD4/CD8 s'inverse, les fonctions des cellules du système de défense sont altérées...

- La phase de lymphadénopathie généralisée persistante ne dure que quelques mois.

- La phase de pré-SIDA se caractérise par l'apparition d'affections à germes non opportunistes, mais secondaires à l'infection par le FIV. Il en résulte des pertes de poids, des diarrhées chroniques, des affections de l'appareil respiratoire haut (souvent conjonctivite et rhinite récurrentes avec parfois des lésions de stomatite) ou bas (bronchiolites, bronchites, pneumonies), des stomatites, gingivites et dermatites chroniques (pyodermites bactériennes, abcès chroniques), des otites externes, des infections bactériennes du tractus urinaire ... De nombreux chats meurent suite à ces lésions et n'atteignent pas le stade de SIDA.

- La phase terminale ou phase de SIDA est courte (1 à 6 mois environ) et aboutit à la mort de l'animal. Les chats sont faibles, avec une émaciation, une déplétion lymphoïde et sont victimes de diverses maladies, en particulier dues à des infections par des germes opportunistes, de natures variées :

- Virus : Calicivirus, FeLV, Feline syncytium-forming virus, herpes virus, poxvirus, papillomavirus

- Protozoaires : *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Haemobartonella felis* .

- Agents fongiques : *Candida*, *Cryptococcus*, Dermatophytes

- Bactéries : Streptocoques, mycobactéries.

Des néoplasmes envahissent l'organisme des chats en phase terminale : lymphomes (souvent à cellules B) et leucémies, maladies myéloprolifératives, fibrosarcomes, carcinomes des cellules squameuses ou bronchoalvéolaires, adénocarcinomes des glandes mammaires...

Les lésions oculaires sont fréquentes : uvéite antérieure, glaucome, pars planitis, dégénérescence rétinienne focale, hémorragies rétinienne internes, conjonctivite, kératite chronique...*T. gondii* peut participer à ces lésions.

Les troubles neurologiques apparaissent également à ce stade de la maladie, et se traduisent par des changements de comportement, de l'ataxie, des contractions spasmodiques, des tremblements, des convulsions, des troubles du sommeil...

Des troubles hématologiques surviennent également au cours de la maladie, mais il n'est pas possible de les rattacher à un stade clinique particulier. On observe surtout des anémies, le plus souvent arégénératives. Parfois, le test de Coombs est positif, et *H. felis* associée à l'anémie.

Les leucopénies sont fréquentes également, sous forme de neutropénies ou de lymphopénies intermittentes. Les neutropénies sont décrites à n'importe quel stade de la maladie, alors que les lymphopénies apparaissent surtout en phase terminale, en conséquence des infections opportunistes et des néoplasmes lymphoïdes.

Beaucoup plus rarement on observe des leucocytoses (en cas d'infections à foyers multiples), des thrombocytopénies et des pancytopénies.

## E. Prophylaxie

### 1. FeLV

#### a. Prophylaxie sanitaire [100, 95]

Les chats infectés représentent un risque de contamination pour leurs congénères. Il est donc conseillé de les garder à l'intérieur du logement. On limite ainsi leur exposition à d'éventuels pathogènes, auxquels ils sont particulièrement sensibles, et on évite qu'ils contaminent les chats du voisinage.

La situation est plus difficile à gérer lorsque plusieurs chats cohabitent dans le même logement. Il n'est souvent pas possible de mettre à l'écart les animaux infectés. C'est pourtant la seule solution pour empêcher la transmission du FeLV qui se fait essentiellement par le toilettage, le partage des gamelles... Néanmoins, il faut rappeler que le risque de voir les autres chats de la maison devenir virémiques n'est pas très élevé. Aussi, si on ne peut pas les séparer, le mieux est de laisser les chats cohabiter, en vaccinant pour plus de précaution les chats sains contre le FeLV et en informant le propriétaire des risques de contamination encourus.

Dans un gros effectif, un élevage par exemple, le virus doit être éradiqué. Il faut donc impérativement séparer les chats sains et les chats infectés. Un test de dépistage est donc mis en œuvre. Tous les chats dont le test se révèle positif sont écartés de l'effectif. Ce test doit être renouvelé tous les trois mois, car le statut des animaux peut évoluer (cf. animaux en incubation). Ce protocole doit être appliqué systématiquement avant d'introduire un nouveau chat dans l'effectif.

Les animaux participant à des saillies doivent aussi être contrôlés régulièrement.

#### b. Prophylaxie médicale [133].

L'immunité naturelle que certains chats développaient contre le virus laissait présager qu'il serait facile de mettre au point des vaccins efficaces. Pourtant, les premiers essais échouèrent : les vaccins provoquaient des immunodépressions ou perdaient leur efficacité quand on les inactivait.

Pour limiter les risques de retour à la virulence, les vaccins à virus FeLV vivants sont aujourd'hui abandonnés. Les vaccins commercialisés à base de virus atténués ou de fractions virales sont cependant moins immunogènes et certains nécessitent d'être adjuvés (Tab.III).

Le sérotype **FeLV A** est le plus utilisé : Sa présence semble suffire à protéger contre tous les sérotypes puisque les sérotypes B et C ne sont pathogènes que si l'animal est infecté par FeLV A. De plus, les anticorps neutralisants réagissent contre les différents isolats de FeLV A.

L'antigène FOCMA permet la formation d'anticorps qui protègent contre l'apparition des phénomènes néoplasiques mais qui n'ont aucune action sur la virémie. On préfère donc stimuler la formation d'anticorps anti **gp70** qui ciblent directement le virus (et inhibent par conséquent aussi le développement des tumeurs.)

De nombreuses études ont été mises en œuvre pour évaluer l'efficacité de ces vaccins [113, 77, 65]. La principale conclusion est qu'aucun d'entre eux n'est fiable à 100%.

En outre, il est très difficile de comparer les résultats des différentes études car chaque chercheur utilise un protocole différent (le nombre de chats utilisés, les souches de virus employées, les doses administrées, les sites d'injection...ne sont pas les mêmes d'une étude à l'autre).

Jarrett et Ganiere ont pourtant comparé trois vaccins (leucogen, leucat et leukocell 2) lors de la même étude [65], et ont conclu à une meilleure efficacité du vaccin recombinant. Il faut cependant souligner que l'étude a été réalisée sur un nombre restreint d'animaux (12 chats pour chaque vaccin).

Enfin, la plupart des études reposent sur des infections expérimentales, et leurs conclusions ne peuvent donc pas s'appliquer parfaitement à l'infection naturelle.

Des réactions secondaires à la vaccination ont parfois été observées :

- Douleur ou gonflement au lieu d'injection.
- Syndrome fébrile transitoire

Ces réactions surviennent dans un peu moins d'un cas sur cent.

- Fibrosarcomes le plus souvent (les études font état d'un cas sur dix mille à un cas sur mille) ou sarcomes indifférenciés, rhabdosarcomes, chondrosarcomes, ostéosarcomes, hystiocyctomes fibreux malins...quatre mois à deux ans après le vaccin.

Ces tumeurs ont aussi été décrites après des vaccinations antirabiques. On met en cause les adjuvants des vaccins, en particulier l'aluminium, qui provoquerait une inflammation chronique et induirait ainsi la prolifération des fibroblastes. Le FeSV (Feline Sarcoma Virus ), virus endogène, n'est peut-être pas non plus étranger à ce phénomène [86].

Un nouveau vaccin (EURIFEL FeLV, Merial) vient d'être commercialisé. Il s'agit d'un virus vivant (canaripoxvirus) remanié génétiquement de façon à exprimer les protéines issues des gènes *gag* et *env*. Ce vaccin présente l'avantage de stimuler efficacement l'immunité humorale comme cellulaire (le virus vivant infecte les cellules) tout en offrant une innocuité parfaite (le virus est incapable de se répliquer dans les cellules de mammifères). Il ne nécessite donc pas d'adjuvants. Une étude relate de la bonne protection des chatons vaccinés contre la virémie persistante après des expositions virales expérimentales ou naturelles [41].

Nom déposé	Laboratoire	Caractéristiques du vaccin	Présence des sérotypes FeLV et Ag FOCMA
LEUCAT	Merial	Inactivé, non adjuvé, virus entier	A, B, C, FOCMA
LEUCOGEN	Virbac	Purifié, adjuvé, recombinant non glycosylé de gp 70	A
LEUKOCELL 2	Pfizer	Inactivé, adjuvé, suspension d'antigène gp 70 issu de filtrat de culture de tissus infectés par le FeLV	A, B, C, FOCMA
FEVAXYN	Fort Dodge	Inactivé, adjuvé, virus entier	A, B
EURIFEL	Merial	Vecteur viral vivant, antigènes issus de <i>gag</i> et <i>env</i>	A

**Tab. III : Vaccins contre la leucose feline.**

Les différents vaccins n'interfèrent pas avec les tests de dépistage du virus.

Le protocole de vaccination consiste en deux injections à environ 3 semaines d'intervalle lors de la primovaccination. L'immunité est ensuite relancée par une injection unique chaque année.

## 2. FIV

### a. Prophylaxie sanitaire [11, 95]

Pour éviter les situations de conflits entre chats et les contaminations qui en résultent, il est recommandé de garder les animaux infectés à l'intérieur des logements.

La cohabitation de chats infectés et non infectés est plus facile à gérer que dans le cas du FeLV. En effet, les occasions de conflits entre chats vivant sous le même toit sont rares puisque leur hiérarchie sociale est déjà établie. Les risques de transmission du virus sont donc restreints. L'introduction d'un nouvel animal dans le groupe est, en revanche, fortement déconseillée : elle viendrait bousculer l'ordre social en place, provoquant de nouveaux conflits et des contaminations éventuelles.

Au sein d'un effectif important, on procèdera de la même façon que pour le FeLV, c'est-à-dire en effectuant régulièrement des tests de dépistage du virus. Il faut cependant apporter une attention particulière aux résultats des tests ELISA qui peuvent être faussés chez le nouveau-né par la présence d'anticorps maternels. Un test de vérification doit être mis en œuvre lorsque le chaton est âgé de plus de seize semaines.

### b. Prophylaxie médicale [29].

Le FIV étant proche du HIV, les chercheurs s'appliquent à la recherche d'un vaccin, mais malgré de nombreuses études, la formule efficace n'a pas encore été trouvée.

Les premiers résultats porteurs d'espoir sont obtenus en 1991 [144] avec des vaccins inactivés à virus entier ou à cellules infectées (lymphocytes T). La souche vaccinale est FIV Petaluma (FIV PET). On obtient une protection de plus de 90% des chats vaccinés lorsqu'on les infecte avec une faible dose de virus homologue ou légèrement hétérologue (souche FIV DIX, dont la séquence en acides aminés de l'enveloppe diffère de 9% par rapport à celle de FIV PET). Le vaccin engendre une forte immunité cellulaire et humorale, et un titre élevé en d'anticorps, surtout neutralisants. Mais le vaccin devient inefficace contre des souches un peu plus hétérologues [72].

En 1996, Matteuci et ses collaborateurs [92] mettent au point un vaccin (lymphocytes T infectés par la souche Milan 2) qui induit une protection contre la souche homologue en l'absence d'anticorps séroneutralisants. C'est la première fois qu'une souche vaccinale du sous groupe B permet d'obtenir une protection.

D'autres tentatives de vaccins inactivés à virus entier se soldèrent par des échecs : un vaccin avec la souche United Kindom 8 n'entraîna pas de protection mais accéléra l'apparition de la virémie chez les chats vaccinés [29] !

La biologie moléculaire a permis de mettre au point des vaccins recombinants. On utilise des sous unités virales (protéines virales purifiées), des peptides synthétiques, des virus ou bactéries vivants comme vecteurs. Des essais de vaccin avec des protéines recombinantes du core, des peptides synthétiques de la région V3 de l'enveloppe ou des protéines recombinantes glycosylées ou non de l'enveloppe ont entraîné l'apparition d'anticorps

correspondants aux antigènes vaccinaux et dans certains cas d'anticorps séroneutralisants [33, 58, 38, 83, 140, 35]. Mais on n'obtient pas de protection, même contre une faible dose de souche homologue.

Comme dans le cas des vaccins inactivés, certains vaccins (exprimant des sous unités d'enveloppe, ou des protéines du core par l'intermédiaire d'*E.coli*) provoquent une accélération de l'infection [58].

Aucun type de vaccin ne donne donc encore de résultats satisfaisants : la réponse immunitaire est soit insuffisante, soit inappropriée. Les recherches continuent cependant pour déterminer la participation de l'immunité humorale et cellulaire à la protection contre le virus et pour identifier les antigènes communs aux différents isolats et les épitopes protecteurs.

## **F. Traitement.**

### **1. FeLV**

#### **a. Chats asymptomatiques [95, 15] .**

Le propriétaire d'un animal infecté doit impérativement être informé des risques de zoonoses (toxoplasmose...) qu'il encourt. Il doit également être sensibilisé au fait que son chat, même s'il ne présente pas de signes cliniques, requiert une attention particulière du fait d'une immunodépression éventuelle.

Il est conseillé de vacciner les chats infectés asymptomatiques, mais toujours avec des vaccins inactivés. La vaccination contre le FeLV est inutile. Le propriétaire prendra soin de nourrir son chat de façon équilibrée, et pourra éventuellement stimuler son appétit (diazépam...). Les chirurgies de convenance peuvent être envisagées : elles n'entraînent le plus souvent aucune conséquence sur la santé de l'animal. Cependant, le propriétaire devra être informé des risques, aussi minimes soient-ils, de complications (infections secondaires...) qui peuvent résulter de l'opération.

Un chat infecté présenté à la consultation doit être soumis à un bilan complet (formule numération, recherche d'hémobartonelles, paramètres biochimiques, analyse d'urine et coprologie). Les parasitoses internes et externes doivent être traitées. Chaque affection diagnostiquée doit faire l'objet d'un traitement agressif : une infection sera traitée à l'aide d'antibiotiques adaptés (on aura recours à un antibiogramme), la dose et la durée habituelles du traitement seront augmentées. Si un syndrome fébrile ne rétrocede pas aux antibiotiques, le praticien devra s'orienter vers la recherche de virus, de protozoaires ou d'infections fongiques. Une éventuelle neutropénie doit également être envisagée.

On aura recours aux corticoïdes uniquement s'ils sont indispensables, c'est-à-dire pour le traitement de maladies auto-immunes (stomatite lymphoplasmocytaire, polyarthrite, thrombocytopenie...). En effet, leur action immunodépressive augmente les risques d'infection pour l'animal et accroît sa capacité à transmettre le virus ( par déclenchement de la virémie).

#### **b. Chats symptomatiques.**

- Les traitements symptomatiques [15].

Le lymphome, s'il n'est pas traité, est suivi de la mort de l'animal en moyenne un à deux mois après son diagnostic. Il fait appel à un traitement par chimiothérapie. On utilise le plus souvent l'alliance cyclophosphamide, vincristine et prednisone (associé parfois à la doxorubicine). Le pronostic dépend de l'état général de l'animal en début de traitement et du



degré d'atteinte de sa moelle osseuse. On obtient parfois des rémissions qui durent plusieurs années. La chimiothérapie est cependant responsable d'immunodépression, de myélo-dépression et d'anorexie. La radiothérapie sur le lymphome nasal donne de bons résultats. Le lymphome alimentaire est, en revanche, de mauvais pronostic, sauf dans les rares cas où son excrèse totale est possible.

En cas de leucémies aiguës, la moelle osseuse doit être débarrassée des cellules cancéreuses et recolonisée par des cellules saines (à partir de précurseurs hématopoïétiques). Ici encore on fait appel à la chimiothérapie.

Pour traiter les anémies, on a recours à la transfusion sanguine, éventuellement accompagnée de prednisone. L'érythropoïétine recombinante humaine est parfois utilisée.

Les neutropénies provoquées par un arrêt de maturation des cellules de la moelle osseuse sont traitées à l'aide de glucocorticoïdes à dose anti-inflammatoire ou immunodépressive.

- Les traitements étiologiques [95, 15].

- Les Antiviraux (inhibiteurs de la transcriptase inverse): Zidovudine (AZT, Retrovir, Burroughs wellcome, Research triangle park, NC); 9-(2 phosphonyl-methoxyethyl)adenine (PMEA); 2'3'-dideoxycytidiae (ddC, Hivid, Hoffman La Roche, Nutley, NJ)

L'AZT a prouvé son efficacité expérimentalement. Elle permet de prévenir l'antigénémie lorsqu'elle est injectée quelques heures avant l'infection des chats par le FeLV.

Des études font état d'une augmentation de la production d'anticorps neutralisants et d'une amélioration de la moyenne de survie des animaux traités.[15]

Le traitement de chats infectés persistants a pour conséquence de réduire la réplication virale, mais la virémie persiste [135]. Après trois semaines de traitement, on observe une nette amélioration de l'état général et des lésions de stomatites des chats infectés naturellement [51].

La posologie recommandée est de 20 mg/Kg trois fois par jour pendant une semaine puis de 10 mg/Kg trois fois par jour [94]. Le traitement est administré oralement. Il peut s'accompagner d'anorexies transitoires et des pertes de poids pendant les deux premières semaines. Des anémies non régénératives peuvent apparaître à la suite d'un long traitement. L'administration d'AZT doit alors être interrompue et ne reprendre que lorsque l'anémie est soignée.

Le ddC n'a fait l'objet que d'études expérimentales. En l'utilisant en perfusion continue, l'infection est retardée [116]. La dose recommandée est de 10 mg/Kg/h. Au delà, des hémorragies sont à craindre car le ddC provoque des thrombopénies.

Le PMEa, utilisé en traitement de chats naturellement infectés et atteints de stomatites (2.5 mg/Kg deux fois par jour), donne de bons résultats, meilleurs que ceux obtenus avec l'AZT [51]. Le PMEa est parfois responsable d'anémie, mais un traitement discontinu permet de l'éviter.

- Immunothérapie: IFN $\alpha$  (Roferon-A, Hoffman LaRoche, Nutly, NJ); diethylcarbamazine (carbam, Sanofi Animal Health, Overland Park, KS); Staphylococcal protein A (SPA, Pharmacia biotech, Piscataway, NJ), *Propionibacterium acnes* (Immunoregulin, ImmunoVET, Tampa, FL); acemannan (Carrisyn, Carrington laboratories, Irving, TX)

L'immunothérapie se propose de stimuler le système immunitaire afin de le rendre plus réactif face au virus.

Des essais ont été effectués avec des anticorps de chats immuns ou des anticorps monoclonaux murins dirigés contre gp 70. Le traitement ne fut efficace que pour les chats infectés expérimentalement, il échoua sur les chats naturellement infectés. En outre, l'utilisation d'anticorps génère la formation de complexes immuns [15].

L'IFN $\alpha$  a des effets anticancéreux et immunomodulateurs. On observe une amélioration clinique sur 75% de chats naturellement infectés traités à raison de 30 U/jour par voie orale [141]. Un IFN $\alpha$  recombinant est disponible au Japon, et les premiers essais d'injection sous cutanée ont fait disparaître la virémie d'un petit nombre de chats [141]. L'IFN $\alpha$  et l'AZT agissent en synergie et peuvent donc être associés.

Le SPA s'utilise par voie intrapéritonéale à raison de 10  $\mu$ g/Kg deux fois par jour puis une fois par mois quand les symptômes disparaissent. Il a été testé sur 18 chats FeLV positifs : 9 présentèrent une amélioration clinique, 6 une rémission à long terme et 5 chats passèrent du stade virémiques à non virémiques [30].

L'acemannan n'a pas donné de résultats objectivement concluants sur le traitement du FeLV [95].

*P.acnes* a été testé sur 99 chats (0.5 mL de la solution commercialisée par voie intraveineuse, deux fois par semaine puis une fois). On a obtenu une amélioration clinique sur 9 chats, et une séroconversion de 2 chats [30].

On manque encore d'information sur l'efficacité de l'immunothérapie. Ce type de traitement mérite d'être étudié car il présente l'avantage d'être très peu toxique.

## 2. FIV

### a. Chats asymptomatiques [95].

Comme dans le cas du FeLV, les chats infectés par le FIV sont soumis à une surveillance rigoureuse. Les mêmes précautions (vaccins inactivés, repas équilibrés...) sont prises, et chaque signe de maladie doit être suivi d'un bilan complet de l'état de santé de l'animal et d'un traitement approprié et agressif.

La vaccination contre le FeLV est recommandée car les chats coinfectés ont une espérance de vie moins longue.

### b. Chats symptomatiques.

- Les traitements symptomatiques [124].

Les infections sont traitées de façon agressive à l'aide de molécules appropriées : métronidazole ou clindamicine pour les stomatites, itraconazole dans le cas de cryptococcoses ou dermatophyties. La griséofulvine est à proscrire car elle est responsable de graves neutropénies.

Lorsqu'une affection ne répond pas au traitement classique, toutes les analyses possibles doivent être mises en œuvre pour déterminer la cause du problème : examen clinique approfondi, analyses de sang et d'urine, imagerie médicale (radiographies du thorax, de l'abdomen, échographies), cytologie ou mise en culture (urine, sang, épanchement, lavage trachéal). On identifie ainsi parfois une néoplasie, une infection occulte...

Si on constate une cytopénie, une ponction de la moelle osseuse ou une biopsie permet d'en connaître la cause et de la traiter en conséquence. On peut aussi avoir recours à des facteurs de croissance hématopoïétiques (érythropoïétine 100 UI/Kg /j, voie sous cutanée) ou de stimulation des granulocytes (5µg/Kg voie sous cutanée).

- Les traitements étiologiques [124, 95]

- Les Antiviraux

L'AZT et le PMEA inhibent la réplication du FIV *in vitro* [25, 108].

Des chats infectés naturellement et présentant des lésions de stomatite ont été traités avec de l'AZT ou du PMEA [51, 25]. Dans les deux cas, une régression des lésions de stomatite et une augmentation du rapport CD4/CD8 ont été observés.

D'autres composants ont été testés, mais leur efficacité clinique n'a pas été établie.

- Immunothérapie

Les études de traitement à base d'IFN $\alpha$  n'ont pas donné de résultats concluants. Combiné avec l'AZT, l'IFN $\alpha$  provoque une augmentation de la prolifération lymphoïde et de la réponse en anticorps dépendants des lymphocytes T. Mais on n'observe aucun effet sur l'infection elle-même [39].

L'acemannan administré à 49 chats infectés par le FIV donna des résultats non statistiquement significatifs, mais notables : augmentation du poids corporel, atténuation du syndrome fébrile et diminution des épisodes de lymphadénopathie [146].

Le traitement efficace contre les rétrovirus félines n'est donc pas encore découvert. Il devra inhiber la réplication virale tout en présentant les caractéristiques d'un traitement administrable à long terme, c'est à dire non toxique, de prise facile et peu coûteux.

Le FeLV et FIV sont deux virus très proches tant par leur structure que par leur symptomatologie. Mais leur caractéristique commune principale est leur capacité à transcrire leur ARN en ADN pour l'intégrer ensuite au génome cellulaire. Cette propriété leur permet de rester à l'intérieur de la cellule hôte sous forme latente, sans se multiplier ni libérer d'antigènes, avant de se remanifester à tout moment. Nous allons voir comment cette particularité peut avoir des conséquences sur le diagnostic.

## **II. Méthodes de diagnostic des infections par le FIV et le FeLV.**

### **A. FeLV**

#### **1. Diagnostic clinique.**

Les signes cliniques causés par le FeLV sont divers et non spécifiques : stomatites, gingivites, atteinte de l'appareil respiratoire haut, abcès récidivants, sepsis généralisé, émaciation, hyperthermie, lymphadénomégalie, vomissement, diarrhée ... Aucun de ces symptômes n'est caractéristique de l'infection par le FeLV et nombreux font aussi partie du tableau clinique du FIV. L'examen clinique ne permet donc pas de conclure à une infection par le FeLV, mais seulement de la suspecter [111].

L'examen clinique permet cependant de mettre parfois en évidence une tumeur à la palpation. Des examens complémentaires (biopsie, histologie, radiologie, autopsie) sont utiles pour en connaître la nature et l'origine. Les hémopathies malignes sont, pour leur part, détectées grâce aux analyses hématologiques, et l'examen des cellules sanguines au microscope permet de visualiser les cellules tumorales [85].

Le diagnostic de lymphomes, leucémies ou myélodysplasies ne doit pas conduire à la conclusion systématique d'une infection par le FeLV. Certains chats infectés par le FIV ou même exempts d'infection virale sont en effet parfois victimes de ce type d'affections [5].

Les tests de laboratoire sont donc indispensables pour confirmer la suspicion d'infection par le FeLV établie lors de l'examen clinique.

#### **2. Diagnostic de laboratoire**

##### **a. Mise en évidence du virus.**

- Observation du virus au microscope électronique.

La morphologie des virus est caractéristique de la famille à laquelle ils appartiennent. On les reconnaît donc en les observant au microscope électronique. Le virus FeLV est sphérique, enveloppé et recouvert de spicules. Sa capsid est icosaédrique. Le prélèvement observé doit être de bonne qualité et suffisamment concentré en virus (plus de  $10^7$  virions par mL).

Cette méthode est très spécifique, mais peu sensible. Elle n'est pas applicable en routine, car elle nécessite un matériel coûteux, du personnel qualifié et du temps. Elle n'est utilisable que dans des laboratoires spécialisés [105].

- Isolement du virus [85].

##### **- Isolement du virus infectieux**

On effectue un prélèvement (sang total, salive, urine ou fragments de tissus) après la phase aiguë de la maladie, ou le plus tôt possible après la mort de l'animal.

Ce prélèvement est mis en présence d'un clone de fibroblastes félines non infectés par le FeLV, mais porteurs d'un provirus déficient sarcomatogène de souris. Si le virus FeLV est présent dans le prélèvement, il se réplique et libère ainsi le virus sarcomatogène. Les fibroblastes félines sont alors transformés et prolifèrent.

Ce test est très spécifique. Il détecte un virus capable de se répliquer et donc transmissible aux autres chats. Mais il est limité par la thermolabilité du FeLV qui ne conserve ses propriétés infectieuses que quelques heures dans le milieu extérieur. L'idéal est

donc d'effectuer le prélèvement directement au laboratoire, ce qui représente une contrainte non négligeable.

Cette méthode est longue et délicate à effectuer, elle n'est utilisée que dans des laboratoires spécialisés.

- Isolement du virus après culture de la moelle osseuse.

Ce test consiste à cultiver les cellules de la moelle osseuse *in vitro*, en présence de corticoïdes ou de macrophages de chats afin de réduire ou de détourner l'activité immunitaire et permettre ainsi au virus de se développer.

Cette méthode est l'une des rares permettant de détecter le virus latent dans les cellules de la moelle et donc de dépister les chats «infectés latents».

Malheureusement, elle n'est pas applicable en routine puisqu'elle nécessite de nombreux prélèvements frais de moelle osseuse. Elle est, de plus, très longue à réaliser (environ trente jours !).

b. Mise en évidence des antigènes viraux.

• Immunodiffusion

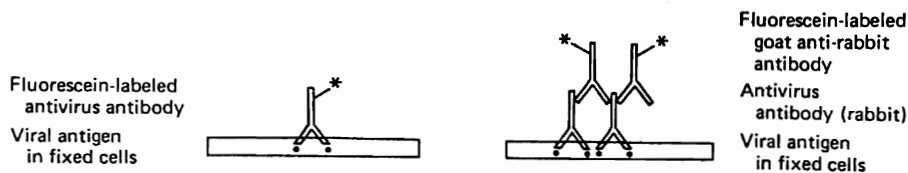
Ce test consiste à déposer l'échantillon suspect de contenir des antigènes viraux dans un puits creusé dans un gel d'agarose. On lui oppose un autre puits identique dans lequel on place les anticorps correspondants. Les réactifs diffusent alors dans le gel et forment une ligne de précipitation si l'antigène est présent [105].

Ce test fut employé pour le dépistage du FeLV grâce à la découverte en 1969 d'un sérum de lapin spécifique anti FeLV [45, 48]. Son excellente spécificité lui valut d'être utilisé pour les premières études épidémiologiques du virus. Mais l'immunodiffusion nécessitait de grande quantité de serum ou de tissu. Elle fut supplantée par l'IFA. [44]

• Test d'immunofluorescence : Immunofluorescence antibody test (IFA)

En 1968, on découvre que le FeLV est présent dans les leucocytes et les plaquettes des chats infectés [80, 79]. Hardy et ses collaborateurs supposent donc que l'on peut mettre en évidence les antigènes internes du virus dans le cytoplasme de ces cellules. Ils développent un test d'IFA pour détecter l'antigène p27 [46, 47] (protéine de la capsid spécifique du FeLV et commune à toutes les souches de FeLV) dans les leucocytes du sang, les plaquettes et les cellules de la moelle osseuse. Ce test est ensuite adapté pour travailler à partir d'un frottis sanguin. [44]

Le frottis sanguin est fixé à l'alcool ou à l'acétone et envoyé à un laboratoire spécialisé. On le met à incuber une heure à 37°C en présence d'un sérum de lapin anti-FeLV. Si l'antigène est présent, des complexes Ag-Ac se forment alors. La lame est ensuite lavée pour éliminer les anticorps non fixés. On ajoute des anticorps anti IgG de lapin couplés à un fluorochrome, puis du bleu Evans. On observe enfin la lame au microscope à fluorescence. Une fluorescence vert pomme apparaît sur les cellules infectées. Les cellules saines sont rouges. [85]



*Fig. IV : Immunofluorescence directe (à gauche) et indirecte (à droite). [105]*

L'IFA fut le premier test de dépistage du FeLV commercialisé, en 1972. Il fut très utilisé pour étudier le virus, sa pathogénie, son épidémiologie, et pour découvrir les maladies qui lui sont associées.

L'IFA a pour avantage de ne requérir que deux ou trois gouttes de sang frais. Le test s'effectue assez rapidement (environ une heure). Les antigènes fixés sur le frottis sanguin et conservés à température ambiante sont très stables, détectables pendant trois mois.

Le test par immunofluorescence est spécifique, mais il pêche essentiellement par son manque de sensibilité.

Les leucopénies ou les thrombocytopénies sont parfois à l'origine de résultats faussement négatifs. Il en va de même lorsque l'échantillon de sang à tester est hépariné : cela réduit la fluorescence des cellules infectées. On note aussi qu'en début d'infection, pendant toute la durée de la première virémie et avant l'atteinte de la moelle osseuse, l'IFA est négative (alors que l'ELISA est positive) [5].

On observe également des faux positifs lorsque le frottis est trop épais, en présence d'agrégats de plaquettes ou d'éosinophiles [85]. L'EDTA et certains fixateurs sont aussi responsables de résultats faussement positifs [5].

L'IFA nécessite d'avoir à disposition un microscope à fluorescence. De plus, le test ne peut être effectué que par un personnel qualifié. Une fois encore, ceci n'est possible que dans des laboratoires spécialisés.

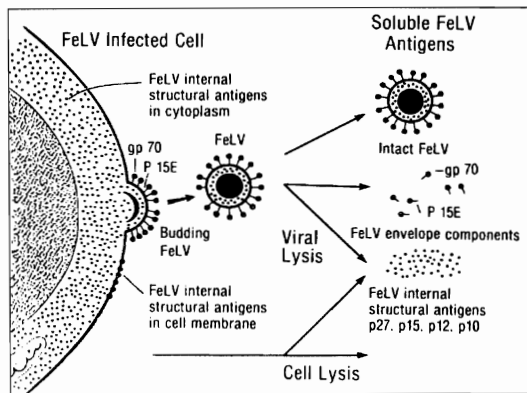
#### *Interprétation des résultats :*

Un résultat positif à l'IFA signifie que l'antigène p27 est présent dans les cellules sanguines. L'animal est donc virémique et excrète le virus. Sa moelle osseuse est infectée. 97% des chats positifs à ce test le demeurent toute leur vie. Seulement 3% d'entre eux se négativent par la suite.

Un résultat négatif signifie que le chat n'est pas infecté, qu'il est en début d'infection (avant l'atteinte de la moelle osseuse) ou que le virus ne se multiplie pas et ne produit donc pas d'antigène (virus latent sous forme de provirus intégré au génome cellulaire). Un test de vérification devra donc être réalisé douze semaines plus tard utilisant la méthode IFA ou ELISA. [5]

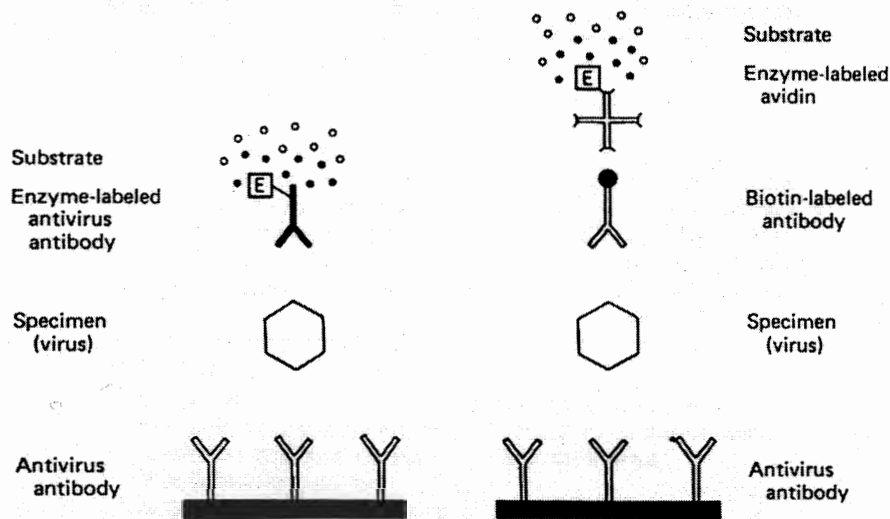
- La méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Comme l'IFA, la méthode ELISA met en évidence la présence de l'antigène p27. Cependant, l'ELISA détecte cet antigène sous forme soluble dans les fluides de l'organisme : sang, serum, plasma, larmes, salive.



**Fig. V : Antigènes du FeLV produits par les cellules infectées.** Ils peuvent être détectés dans les cellules par IFA ou sous forme soluble dans le plasma par ELISA [44].

Un anticorps monoclonal dirigé contre le FeLV est fixé à une phase solide (membrane, bandelette réactive ou micropuits). On ajoute l'échantillon à tester : si l'antigène p27 est présent, il s'accroche aux anticorps fixés sur la phase solide. On ajoute encore un deuxième anticorps monoclonal anti p27, conjugué à une enzyme (péroxydase, phosphatase alcaline...). Il se lie au couple Ag-Ac déjà formé. Un lavage élimine tout ce qui n'est pas fixé à la phase solide. Enfin, l'enzyme agit sur un chromatogène et une coloration apparaît pour indiquer la présence de l'antigène p27.[5]



**Fig. VI : ELISA : Méthode directe (à gauche) et indirecte (à droite). [105]**

La méthode ELISA présente l'énorme avantage d'être disponible en kits pour les vétérinaires praticiens. Le test est réalisé rapidement, pendant la consultation, le plus souvent à partir de sang total ou de serum, et ne nécessite aucun équipement particulier.

En laboratoire, l'ELISA est automatisé et plusieurs centaines d'échantillons sont testés en même temps.

On peut également réaliser le test à partir de larmes ou de salive mais la détection est fluctuante en début d'infection. Les résultats sont plus fiables après quatre semaines d'infection. On note néanmoins 10 à 30% de faux négatifs par rapport au test sur sang, et quelques faux positifs dus aux bactéries et aux débris de la cavité buccale. Ce test est utile

dans les gros effectifs car il est plus facile de prélever des larmes ou de la salive que du sang. Si aucun des chats testés n'est positif, on conclut que l'effectif est indemne. En revanche, si on obtient quelques cas de positivité, tous les chats devront être retestés par une méthode plus fiable (ELISA à partir de serum par exemple).[85]

D'anciens kits donnaient des résultats faussement positifs, à cause de la présence d'anticorps anti IgG de souris dans le sang des chats. Les nouveaux kits commercialisés ont été rectifiés, mais un titre particulièrement élevé de ces anticorps dans le sang peut encore fausser le résultat. Il est donc préférable d'utiliser un test incluant un contrôle négatif. Récemment, une activité semblable due cette fois-ci à des anticorps anti IgG de lapin a été découverte sur un kit (VIRACHEK/ FeLV ; M Pough, NYDSL) [5].

Des faux positifs sont aussi observés lorsqu'on utilise de la salive ou du sang total plutôt que du serum ou du plasma [5].

Les faux négatifs sont parfois dus à la mauvaise utilisation des kits (kits mal conservés, périmés, prélèvements de sang hémolysés, erreurs de manipulation...). Il arrive aussi qu'en tout début d'infection, avant la première virémie, les antigènes ne soient pas détectés.

Pendant longtemps, le test ELISA a été considéré comme un test très fiable (les notices d'utilisation faisant part de sensibilité et spécificité proches de 100%). Certaines études montrent pourtant que cette méthode n'est pas sans limite :

Une étude de comparaison des méthodes IFA et ELISA (test ELISA/CITE, EVL) a été effectuée sur 149 échantillons de sang de chats suspects d'être infectés par le FeLV [74]. 46 chats furent détectés positifs à l'IFA contre 16 seulement à l'ELISA. Les chats positifs à l'IFA et négatifs à l'ELISA faisaient partie de ceux dont la clinique reflétait le plus une infection par le FeLV : les résultats de l'ELISA semblaient donc erronés. Cette étude, qui suppose l'existence de faux négatifs à l'ELISA, est toutefois discutable : le sang destiné au test IFA fut prélevé sur EDTA, ce qui peut engendrer des résultats faux positifs. De plus, l'isolement viral qui aurait permis de vérifier les résultats n'a pas été effectué [5].

Une autre étude [52], portant cette fois sur 800 échantillons de sérums et 200 échantillons de sang total, a comparé les résultats du test ELISA SNAP (IDEXX) avec ceux de l'isolement viral. Le nombre de tests ELISA interprétables avec le sang total est faible (données non communiquées). En ne considérant que les résultats obtenus à partir des sérums, la sensibilité et la spécificité du test sont respectivement de 90.9% et 97.8%.

#### *Interprétation des résultats :*

Un résultat positif à l'ELISA est le reflet de l'antigénémie. Le virus se multiplie et circule dans le sang (virémie). Le test ne permet pas de distinguer un animal infecté transitoire d'un animal infecté persistant. Un test d'IFA peut alors compléter l'ELISA : s'il est positif, le chat est probablement infecté persistant (cf. chapitre IFA). S'il est négatif, l'infection ne s'est encore assez développée et le test devra être à nouveau effectué douze semaines plus tard [5]. Le chat sera alors infecté persistant (ELISA et IFA positifs), se sera débarrassé du virus (ELISA et IFA négatifs), ou sera devenu infecté latent (ELISA et IFA négatifs).

Il arrive que les résultats ELISA positifs -IFA négatifs perdurent. Le chat développerait suffisamment d'anticorps neutralisants pour enrayer la virémie mais la réplication virale s'effectuerait toutefois discrètement dans certains tissus (nœuds lymphatiques, glandes salivaires...). Une autre hypothèse est que le génome viral ne s'intègre que partiellement à l'ADN de la cellule hôte, autorisant la production de p27 mais pas de virus infectieux.[111]



Un résultat négatif à l'ELISA reflète l'absence d'antigénémie. Il n'exclut en aucun cas la possibilité d'une exposition antérieure au virus, ni l'état de latence du virus dans l'organisme.

Ainsi, un chat négatif à l'ELISA peut ultérieurement être le siège d'une virémie, ou développer une maladie néoplasique induite par le FeLV. [111]

- L'immunomigration rapide ou immunochromatographie.

Cette technique est employée dans des kits commercialisés depuis peu. Comme les kits ELISA, ils sont destinés aux vétérinaires praticiens et permettent de tester des échantillons individuels. L'échantillon à tester est mis en présence de particules d'or colloïdal sensibilisées. Les complexes ainsi formés s'écoulent le long d'une membrane. Les antigènes p27 éventuellement présents sont capturés au niveau d'une zone où sont fixés des anticorps monoclonaux dirigés contre eux. L'accumulation des antigènes complexés à l'or colloïdal sur cette zone fait apparaître une bande colorée qui informe de la positivité du résultat. Des zones de contrôle sont incluses dans le test [105, 139].

Ce type de test est réalisable rapidement et ne nécessite qu'une seule étape de manipulation. Le risque d'erreur technique est donc très réduit. De plus, les molécules utilisées sont inertes et ces tests sont donc beaucoup plus stables que les tests ELISA qui utilisent des molécules biologiquement actives (enzymes...)

Voici les résultats d'une étude récente [52] testant la fiabilité de plusieurs tests d'immunomigration rapide (DUOSpeed, BIO VETO TEST ; Fast Test, MEGACOR ; Witness, RHONE MERIEUX ; On Site, BIOTECH, Sweden ; One Step, EVL, The Netherlands) et d'un test ELISA (Snap, IDEXX, USA) à partir de 800 serum de chats. Les tests positifs sont vérifiés par isolement viral.

	Snap (%)	DUOSpeed (%)	Fast Test (%)	Witness (%)	OnSite (%)	One Step (%)
Tests interprétables	98.1	99.7	100	<b>86.4</b>	97.3	99.0
Tests facilement interprétables (lecture aisée)	87.3	96.0	96.6	<b>79.6</b>	86.0	89.3
Sensibilité	90.9	89.1	87.9	<b>68.0</b>	<b>54.7</b>	87.9
Spécificité	97.8	97.7	98.0	98.6	96.4	91.5
Valeur prédictive positive	78.9	77.0	79.5	80.9	<b>52.7</b>	<b>47.9</b>
Valeur prédictive négative	99.2	99.0	98.9	97.2	96.7	99.0

*Tab. IV : Caractéristiques de plusieurs tests rapides de diagnostic de la leucose féline [52].*

Le test Witness présente un nombre important de résultats difficilement interprétables. Les tests Witness et OnSite ont une sensibilité peu élevée. L'ensemble des tests présentent des valeurs prédictives positives faibles. Dans le cas de résultats positifs sur des chats en bonne santé et non exposés à des risques de contamination, il est donc impératif de confirmer le résultat avec un autre test. Les tests DuoSpeed et FastTest apparaissent comme les plus fiables.

Les tests d'immunomigration rapide sont disponibles pour le diagnostic simultané du FeLV et du FIV (Kits commercialisés en France : WITNESS FeLV-FIV- SYNBIOTICS EUROPE; DUOSpeed FeLV-FIV- BIO VETO TEST) .

- Limites des tests basés sur la recherche d'antigène pour le diagnostic de la leucose féline.

Les tests ELISA et d'immunomigration rapide sont actuellement les plus utilisés pour le diagnostic de la leucose féline. Ces techniques ont de bonnes performances intrinsèques (spécificité et sensibilité). Cependant, l'infection par le FeLV peut parfois les mettre en échec :

Dans le cas d'une infection latente, le virus ne se multiplie pas et reste sous la forme d'ADN intégré au génome de la cellule hôte. Il n'y a donc pas de production d'antigène, et l'infection virale échappe à la détection des tests rapides.

Les formes localisées d'infection (stomatites isolées, certaines formes tumorales) sont elles aussi mal diagnostiquées puisqu'elles sont très irrégulièrement associées à une antigénémie détectable.

c. Mise en évidence de l'acide nucléique viral.

- L'hybridation moléculaire

Cette technique consiste à utiliser une sonde ADN marquée et complémentaire de la séquence d'ADN que l'on veut mettre en évidence. En s'hybridant, par le principe de complémentarité des bases nucléotidiques, à cet ADN (ici l'ADN du provirus), la sonde marquée permet de détecter sa présence. Cette technique n'est cependant pas suffisamment sensible pour être utilisée en routine comme test de diagnostic.

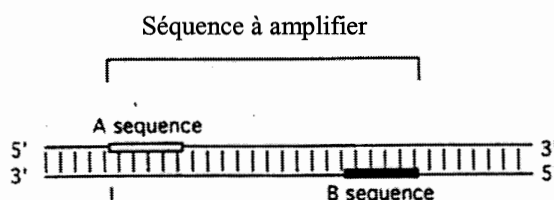
- La Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction). [105, 82]

*Découverte de la méthode PCR.*

En 1983, Mullis et Faloona réussissent l'amplification d'un fragment d'ADN *in vitro* [103]. Cette découverte vaut à Mullis l'obtention du prix Nobel de chimie en 1993. Cette méthode permet en effet d'amplifier spécifiquement une très faible quantité d'ADN cible. Elle répond ainsi à la nécessité d'avoir une quantité suffisante de matériel génétique pour le détecter et l'étudier.

*Principe de la PCR.*

La PCR est une méthode de biologie moléculaire s'effectuant *in vitro*. Elle consiste à amplifier une séquence d'acide nucléique spécifique par synthèse enzymatique. Deux amorces (des oligonucléotides d'environ 20 paires de bases) s'hybrident sur les brins d'ADN complémentaires et opposés de façon à encadrer la séquence à amplifier.



**Fig. VII : Positions respectives des amorces et de la séquence à amplifier [105].** A et B séquence : amorces.

L'ADN, qui sert de matrice à la réaction, est obtenu après extraction à partir de prélèvements de natures diverses (sang, biopsies, LCR...).

Les conditions de la réaction sont capitales au bon déroulement de l'amplification : Température, force ionique et concentrations des différents réactifs sont calculées précisément.

Le choix des amorces est également primordial. Il est souvent réalisé à l'aide de programmes informatiques conçus pour le rendre optimal (Les amorces ne doivent pas s'hybrider entre elles, doivent posséder des températures de fusion proches...). Les programmes préconisent aussi la température et la durée de la réaction.

Le mélange réactionnel contient l'ADN cible, l'enzyme polymérase, les amorces, les nucléotides, le tampon et les ions (magnésium...) nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme.

Les échantillons sont placés dans un thermocycleur programmable qui effectue des cycles de température répétitifs, composés de trois étapes successives :

- Étape de **dénaturation** : les deux brins de l'hélice d'ADN sont séparés sous l'effet d'une température élevée (supérieure à 90°C).

- Étape d'**hybridation** des amorces : les amorces s'accrochent au niveau de leur séquence cible à la température de fusion qui leur est spécifique.

- Étape d'**élongation** : l'enzyme polymérase synthétise l'ADN.

Les produits synthétisés au premier cycle servent de matrice au cycle suivant et ainsi de suite. On obtient une accumulation exponentielle de la séquence d'ADN cible. 20 cycles multiplie la séquence environ un million de fois.

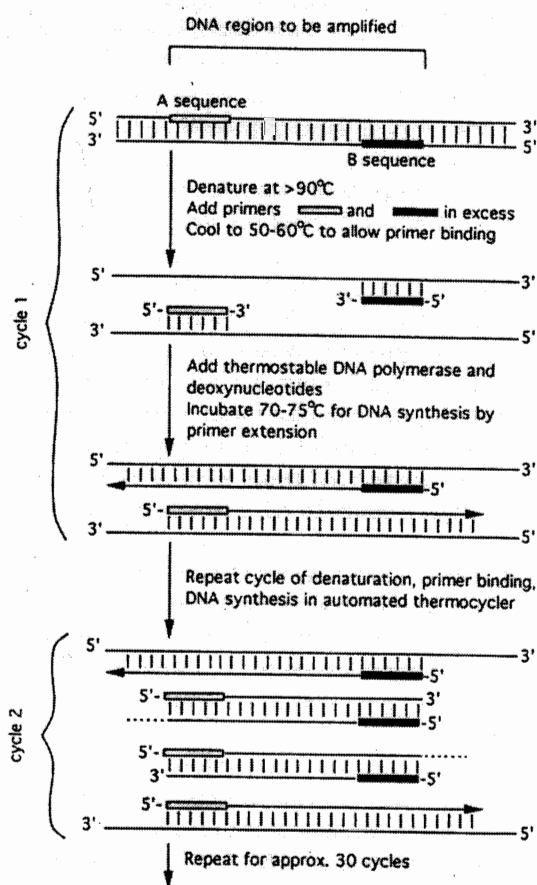


Fig. VIII : Amplification d'une séquence d'ADN [105].

Les premières PCR utilisaient l'ADN polymérase d'*E.coli*, enzyme thermolabile qui était inactivée lors de l'étape de dénaturation. Elle devait donc être ajoutée à chaque cycle. En 1988, l'introduction d'une enzyme thermostable, la *Taq* polymérase, issue d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* permet l'automatisation de la PCR. La spécificité de la méthode est accrue : l'élongation peut se faire à température supérieure ce qui réduit les risques de formation de structures secondaires de l'ADN et d'amplifications non spécifiques.

#### Détection des produits amplifiés.

Les produits de la PCR sont déposés dans des puits sur gel d'agarose. Ce gel contient du bromure d'ethidium qui rend les molécules d'acide nucléique fluorescentes aux ultra-violet. L'électrophorèse permet de séparer les acides nucléiques selon leur taille : Sous l'influence

d'un champ électrique, les molécules d'ADN migrent dans le gel et parcourent une distance inversement proportionnelle à leur longueur. Un marqueur de poids moléculaire est déposé sur le gel en même temps que les échantillons et permet de déduire la taille des fragments d'ADN obtenus.

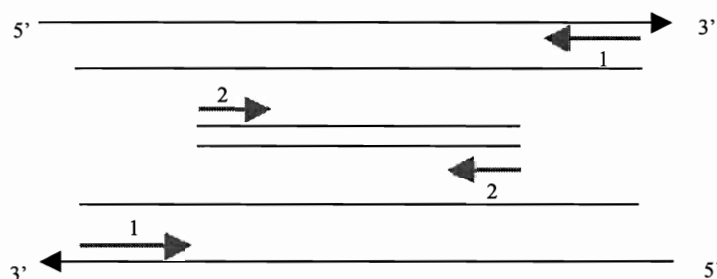
Il existe d'autres moyens de révéler les produits de la PCR, par colorimétrie ou chimioluminescence (ELISA et amorces biotinylées, sonde ADN biotinylée...).

La spécificité du test réside dans l'obtention d'un fragment d'ADN de la taille attendue. L'identité des produits de la réaction peut néanmoins être confirmée par digestion par des enzymes de restriction, par le séquençage du fragment, par l'utilisation d'une sonde à ADN...

La plupart des publications concernant la PCR font état d'une sensibilité de détection de l'ordre de 1 pour  $10^5$  (un leucocyte pour 100000 cellules sanguines nucléées).

#### *Variantes de la PCR.*

- La **PCR nichée** : C'est une PCR qui se déroule en deux étapes. Une première PCR s'effectue de manière «classique». Les produits de cette PCR servent ensuite de matrice à une deuxième PCR qui utilise deux nouvelles amorces, différentes des premières. Ces amorces sont donc choisies de manière à être «plus internes» aux précédentes sur la molécule d'ADN.



**Fig. IX : Illustration de la PCR nichée**

1: amorces pour la première étape d'amplification

2: amorces pour la deuxième étape d'amplification

Parfois, on conserve une amorce du premier couple et on n'introduit qu'une seule nouvelle amorce pour la deuxième PCR. On parle alors de **PCR semi nichée**.

Cette technique, grâce à une double amplification, est extrêmement sensible. De plus, le mélange réactionnel de la deuxième PCR permet de diluer les éventuels inhibiteurs présents lors de la première PCR. La spécificité de la méthode est également accrue : la deuxième amplification n'est possible que si la première a précisément amplifié la séquence cible. La spécificité de la première réaction est ainsi vérifiée.

Cependant, la PCR nichée requiert un travail rigoureux et précautionneux : sa grande sensibilité a pour conséquence d'augmenter les risques de contamination d'un échantillon négatif par les aérosols d'amplicons formés lors de l'ouverture des tubes. Il est donc impératif de réaliser des témoins négatifs lors de chaque réaction.

- La **PCR multiplex** est utile lorsque plusieurs agents pathogènes sont susceptibles d'être à l'origine d'une affection. Elle permet d'amplifier différentes séquences dans la même réaction (on amplifie l'ADN de plusieurs virus distincts, par exemple). On utilise plusieurs couples d'amorces, chacun spécifique d'une séquence cible. On économise ainsi du temps, et des réactifs.

- La **RT-PCR** (pour reverse transcriptase PCR) permet de réaliser une amplification à partir d'ARN. Nous nous intéressons ici à l'amplification de l'ARN des rétrovirus : l'ARN viral est d'abord transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une enzyme recombinante ADN polymérase qui possède aussi une activité de transcriptase inverse. Cette enzyme est thermostable et issue de la bactérie *T. thermophilus*.

#### *Avantages et inconvénients de la PCR.*

La PCR possède une sensibilité et une spécificité très élevées.

Elle permet de détecter la présence d'acide nucléique viral dans n'importe quel tissu. Ceci est utile lorsque l'infection est localisée. Un fragment du génome de FeLV a ainsi été amplifié à partir d'une tumeur lymphoïde alors que la recherche d'antigènes dans le sang s'était révélée négative [63].

Cette méthode permet aussi de détecter les virus qui ne se multiplient pas (virus latents ou génétiquement défectifs) ou présents en très faible quantité. Ces virus échappent à la détection des tests rapides mais n'en sont pourtant pas moins pathogènes.

La PCR apparaît donc très utile pour mettre en évidence le FeLV chez les chats infectés non virémiques ou atteints d'infections localisées.

Enfin, la PCR présente l'avantage d'être automatisable, ce qui réduit les risques d'erreurs techniques.

Le principal inconvénient de cette méthode est dû à sa grande sensibilité. En effet, la moindre erreur de manipulation peut engendrer des résultats faussement positifs par suite d'une contamination avec des fragments amplifiés. Il faut donc travailler avec le plus grand soin, en prenant des précautions draconiennes pour éviter toute contamination. Des contrôles positifs et négatifs sont toujours inclus à la manipulation. De plus, un système entièrement automatisé réduit les risques de façon conséquente.

Un résultat de PCR positif doit être interprété avec vigilance. Outre les risques de faux positifs par contamination, l'amplification de l'ADN d'un agent pathogène ne signifie pas forcément qu'il est responsable des troubles dont souffre l'animal. La PCR peut en effet détecter un microorganisme présent en quantité minimale dans l'organisme et n'ayant pas d'influence sur l'état de santé de l'animal.

La procédure actuelle n'est réalisable qu'au sein de laboratoires spécialisés ou se consacrant à la recherche en diagnostic (universités) car elle nécessite un équipement particulier. Les vétérinaires praticiens ont ainsi d'avantage recours aux tests rapides, réalisables au cabinet, plutôt qu'à la PCR. Les résultats de PCR peuvent néanmoins être obtenus relativement rapidement (en 24 heures environ). De plus, la PCR est un test sensible et spécifique qui ne présente pas les limites des tests fondés sur la recherche des antigènes. Elle apparaît donc comme une méthode de choix pour le dépistage du FeLV.

## **B. FIV**

### **1. Diagnostic clinique.**

L'infection par le FIV se traduit, comme pour le FeLV, par des symptômes divers et non spécifiques. Les chats, immunodéprimés, sont prédisposés aux lésions de stomatite, aux gingivites, pyodermites, troubles de l'appareil respiratoire supérieur, syndromes fébriles, lymphadénomégalias, vomissements et diarrhées [111]. A ce stade, il est impossible de distinguer l'affection causée par le FIV de celle causée par le FeLV ou par d'autres virus.

Le FIV engendre aussi des troubles hématologiques, notamment des cytopénies (lymphopénies, neutropénies, anémies...), et des modifications des paramètres biochimiques

(urémie, créatinémie, glycémie ou protéinémie parfois augmentées [124]). Des troubles nerveux sont quelquefois observés. Mais aucun de ces signes ne permet de diagnostiquer avec certitude le FIV. Il faut donc faire appel au diagnostic de laboratoire pour confirmer la suspicion du praticien.

## 2. Diagnostic histologique [18].

Pendant la phase de lymphadénopathie généralisée, l'histologie du ganglion est assez caractéristique de l'infection par le FIV. On observe une sévère hyperplasie folliculaire avec altération des follicules, une hyperplasie paracorticale, une vascularisation abondante, une plasmocytose médullaire et de nombreux mastocytes et lymphocytes T8 dans les centres germinatifs. Le nœud lymphatique peut toutefois avoir un aspect différent lors des stades terminaux de la maladie.

## 3. Diagnostic de laboratoire.

### a. Culture et isolement du virus.[18, 43]

L'isolement du virus se fait le plus souvent à partir de sang de chats infectés, mais on peut aussi travailler à partir de salive ou d'un prélèvement de cellules de moelle osseuse [43].

On isole d'abord les lymphocytes du sang (à l'aide de Ficoll). On les cultive ensuite avec des lymphocytes de chats sains. Leur multiplication est stimulée par des mitogènes (Concanavaleine A le plus souvent) et de L'IL-2 recombinante humaine. A partir de cette culture, on peut mettre en évidence le virus de quatre façons différentes :

- Observation au microscope électronique :

On observe des particules virales de formes sphériques, intra et extracellulaires. La nucléocapside, au centre du virus, est tronconique (selon le plan de coupe) : elle est caractéristique des lentivirus. On peut voir, à la surface de certaines cellules, des irrégularités et des protubérances de la membrane plasmique qui correspondent aux bourgeonnements viraux.

- Observation de l'effet cytopathogène :

Six à quatorze jours après la stimulation des lymphocytes, on observe une dégénérescence ballonisante des cellules, des syncytia (cellules géantes) et des cellules lysées. Les cultures sont colorées au cristal violet, ce qui permet de compter les syncytia au microscope à faible grossissement. Seuls les syncytia à sept noyaux ou plus sont comptabilisés [43].

- Dosage de l'activité de la transcriptase inverse  $Mg^{2+}$  dépendante :

Par action d'un détergent sur une culture virale, l'enzyme polymérase du virus est libérée. Cette enzyme est placée dans un milieu contenant, entre autre, du magnésium (enzyme  $Mg^{2+}$  dépendante), de la thymidine triphosphate tritiée et une matrice ARN.

La transcriptase inverse synthétise l'ADN correspondant à la matrice ARN en utilisant la thymidine tritiée. La quantité de radioéléments incorporés est proportionnelle au nombre de molécules de transcriptase inverse. Si l'activité de l'enzyme est cinq fois supérieure à celle du contrôle négatif, on conclut à la présence du virus dans la culture. On peut confirmer ce résultat à l'aide de l'ELISA qui détecte les antigènes p24 [43]. La mesure de la radioactivité permet aussi de déduire la quantité de virus présents initialement dans la culture.

- Détection des antigènes viraux (p24 ou p15)

On travaille avec le surnageant de la culture et on utilise une méthode ELISA Sandwich : des anticorps monoclonaux sont adsorbés sur une phase solide ; on ajoute alors les antigènes (suspension de virus lysés), et on met l'ensemble en incubation. On effectue un lavage et on ajoute un autre anticorps monoclonal couplé à une peroxydase. On réalise encore une incubation, et on lave à nouveau. On révèle enfin les réactions anticorps-antigènes-anticorps à l'aide d'un chromogène qui réagit avec la peroxydase.

Les sensibilités des techniques de détection des antigènes viraux et de comptage des syncytia sont proches, et supérieure à celle du dosage de l'activité de la transcriptase inverse. La méthode qui consiste à compter les syncytia est la plus rapide [43].

Ces méthodes de diagnostic direct ont l'avantage d'être indépendantes de la réponse humorale. Cependant, la quantité de virus dans le sang, des antigènes viraux ou des cellules infectées est le plus souvent trop faible pour être détectée par ces tests. De plus, ce sont des méthodes lourdes à mettre en œuvre et longues à réaliser.

#### b. Détection des anticorps antiviraux.

Lors d'une infection par le FIV, le niveau de virémie est trop bas pour que les tests classiques détectent les antigènes viraux. En revanche, la présence d'anticorps est un bon indicateur de l'infection puisque la plupart des chats qui subissent la séroconversion restent infectés à vie. Différents tests sérologiques (IFA, ELISA, Western Blot et RIPA) permettent de mettre en évidence les anticorps anti FIV, et leur détection est, le plus souvent, très bien corrélée à l'infection par le FIV. Dans quelques cas pourtant, ces tests sont mis en échec par les caractéristiques propres à l'infection par le FIV. Ces situations, non rares et non négligeables, sont développées après présentation des différents type de tests sérologiques.

- Test d'immunofluorescence : Immunofluorescence antibody test (IFA)

*Le principe de cette méthode est schématisé dans le paragraphe consacré au diagnostic du FeLV par IFA.*

L'immunofluorescence indirecte fut le premier test de diagnostic consistant à rechercher les anticorps dirigés contre le FIV [114].

Des cellules infectées par le FIV sont fixées dans des puits. Les premiers tests utilisaient des lymphocytes, mais ils sont aujourd'hui remplacés par des cellules CrFK (cellules rénales de Crandell), qui améliorent la sensibilité du test [132]. On ajoute le sérum à tester. Le mélange est mis à incuber à 37°C pendant 30 minutes. Les couples Ag-Ac se forment alors. Un lavage au PBS permet d'éliminer tout ce qui n'est pas fixé. On ajoute alors des anticorps de lapin anti IgG de chats conjugués à la fluorescéine. On place à nouveau l'ensemble à 37°C pendant 30 minutes. On ajoute enfin du bleu Evans pour amplifier la fluorescence des cellules. Les cellules infectées présentent une fluorescence vert pomme au microscope à fluorescence [85, 18].

On inclut toujours au test des contrôles positifs et négatifs pour éviter de faux résultats : Certains anticorps réagissent en effet avec un composant non viral de la préparation d'antigènes et sont responsables de fluorescences non spécifiques. Ces réactions non spécifiques peuvent, en outre, empêcher la visualisation de réactions spécifiques, et être ainsi à l'origine de faux négatifs [6] ! Enfin, les résultats sont parfois douteux, et doivent être confirmés à l'aide d'un autre test (Western Blot par exemple)[18].

Les anticorps détectés par immunofluorescence apparaissent environ une semaine après ceux détectés par Western Blot ou ELISA [145].

Comme nous l'avons déjà vu avec le FeLV, cette méthode nécessite du matériel coûteux et un personnel compétent. Elle n'est donc applicable que dans des laboratoires spécialisés.

- Le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Le test ELISA, parce qu'il est pratique, rapide et relativement peu onéreux, est le plus utilisé pour diagnostiquer le FIV.

Le premier test ELISA mis au point était fondé sur une méthode indirecte : des protéines virales purifiées étaient fixées sur une phase solide. On ajoutait l'échantillon de sérum à tester, et s'il contenait des anticorps anti FIV, ceux-ci se fixaient aux protéines. Les couples Ag/Ac ainsi formés étaient révélés après addition d'IgG anti félin conjuguées à une enzyme qui réagissait avec un substrat chromogène.

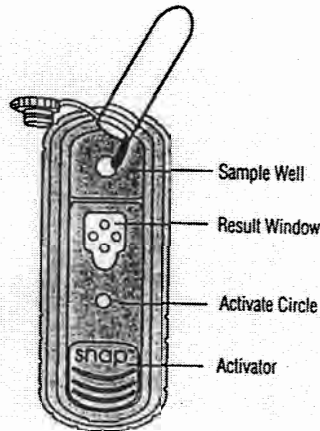
Ce test engendrait de nombreuses réactions non spécifiques : n'importe quel anticorps félin qui se fixait sur la phase solide donnait en effet un signal positif. Pour y remédier, il fallait diluer l'échantillon à tester. Cette méthode fut abandonnée quand on décida de créer un test de dépistage simultané du FeLV et du FIV. On ne pouvait en effet plus diluer l'échantillon sous peine de réduire de manière très importante la sensibilité de détection des antigènes FeLV [136].

Dans les tests actuels, l'antigène fixé à la phase solide est aussi présent sous la forme d'un complexe antigène-enzyme. Les anticorps anti FIV se lient aux antigènes fixés sur la phase solide puis aux complexes antigène-enzyme. Ce système permet, après action du substrat chromogène, une révélation plus spécifique.

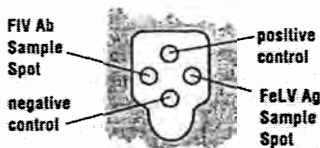
Il existe des kits individuels à l'usage des vétérinaires praticiens, utilisant des membranes réactives (cf. schéma), et des kits destinés aux laboratoires, sous forme de micropuits.



A



**Interpreting Test Result**



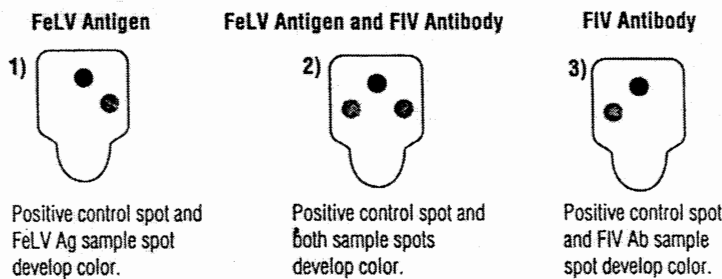
To determine test results, read the reaction spots in the Result Window. Color development in sample spots is proportional to the concentration of FeLV antigen or FIV antibody in the sample. If no color develops in the positive control spot, repeat the test.

**Negative Result**



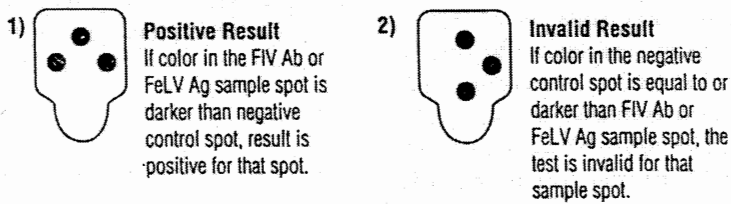
Only positive control spot develops color.

**Positive Result**



**Reaction with Negative Control**

The negative control spot serves as a safeguard against false positives.



**Invalid Results**

**1. Background**  
If the sample is allowed to flow past the activate circle, background color may result. Some background color is normal. However, if colored background obscures test result, repeat the test.

**2. No Color Development**  
If positive control does not develop color, repeat the test.

**Fig. X : Un exemple de kit destiné aux vétérinaires praticiens pour le diagnostic simultané de l'infection par le FeLV et le FIV : Test SNAP COMBO Plus FeLV/FIV. IDEXX.**

On utilise une solution contenant des conjugués enzyme-anticorps monoclonaux anti p27 (dirigés contre la protéine p27 du FeLV) et enzyme-antigène du FIV. On mélange cette solution à l'échantillon à tester (plasma, sérum ou sang total). Le conjugué enzyme-Ac anti p27 se lie aux éventuels antigènes p27 et le complexe enzyme-Ag FIV aux éventuels Ac anti FIV. Le mélange obtenu est versé dans la cupule prévue à cet effet et s'écoule le long de la membrane réactive. Les anticorps anti p27 (spot FeLV) et les antigènes FIV (spot FIV) fixés à la membrane capturent respectivement les complexes Enzyme-Ac anti p27-p27 et Enzyme-Ag FIV-Ac antiFIV.

On appuie alors sur le « SNAP », ce qui libère un tampon de lavage et le substrat de l'enzyme. La coloration du spot FeLV indique la présence des antigènes FeLV dans l'échantillon, la coloration du spot FIV celle des anticorps anti FIV. Ce test comporte également des contrôles positif et négatif [105].

Dans les années 1989-1990, «l'antigène» utilisé était un lysat de virus entier issu d'une culture de fibroblastes félines. Mais il donnait lieu à de nombreux résultats faux positifs et faux négatifs. En particulier, les sérums de chats vaccinés avec des vaccins produits sur cultures de cellules félines engendraient des réactions non spécifiques [129, 32].

En 1991, un test utilisant des protéines recombinantes du core, p24 et p17, fut mis au point. La sensibilité et la spécificité étaient meilleures que celles des tests précédents mais les anticorps contre ces protéines n'étaient pas présents tout au long de la maladie.[129, 69]

En 1993 et 1995, de nouveaux essais furent effectués avec des protéines recombinantes de la glycoprotéine de surface transmembranaire (gp40) [4, 129]. Les résultats obtenus furent concluants, la sensibilité et la spécificité du test furent encore accrues. Expérimentalement, on montre que les anticorps dirigés contre cette glycoprotéine apparaissent précocement (environ quatre semaines après l'infection), et ont un titre plus élevé que les anticorps dirigés contre les protéines de capsid ou de surface [12].

Malgré ces progrès, il existe encore des résultats erronés. On note des faux positifs, le plus souvent dus aux erreurs de manipulation de l'opérateur. L'utilisation de sang total serait également à l'origine de réactions non spécifiques, mais ce n'est pas prouvé. Il est donc toujours conseillé de confirmer un résultat positif à l'ELISA par un autre test (Western blot par exemple) [105].

Les résultats négatifs sont plus fiables, surtout concernant les chats asymptomatiques et non exposés à des risques de contamination. En revanche, un résultat négatif pour un chat présentant les symptômes de l'infection, ou ayant été exposé au virus, requiert une confirmation huit à douze semaines plus tard [105].

- Test d'immunomigration rapide ou immunochromatographie.

Comme pour le FeLV, ce type de test a été récemment commercialisé sous forme de kits, à l'usage des vétérinaires praticiens. Il vise à détecter les anticorps dirigés contre la glycoprotéine transmembranaire gp40 du virus FIV. En effet, cette protéine est conservée parmi les différentes souches de FIV et induit la production d'anticorps dont le titre est durablement élevé (cf. test ELISA ci-dessus). L'échantillon à tester est mis en présence de particules d'or colloïdal sensibilisées. Les complexes formés s'écoulent sur une membrane et les anticorps éventuellement présents sont immobilisés au niveau d'une zone où sont fixés des peptides reproduisant un épitope de la protéine transmembranaire gp40. L'accumulation des anticorps et de l'or colloïdal sur cette zone fait apparaître une bande colorée qui traduit un résultat positif. Des zones de contrôles positif et négatif sont incluses dans le test [105, 139].

Ce type de test est réalisable rapidement et ne nécessite qu'une seule étape de manipulation. Le risque d'erreurs techniques est donc très réduit. La fiabilité du test dépend essentiellement de la qualité des réactifs employés [105].

Les résultats d'une étude récente [52] permettent d'évaluer la fiabilité de différents tests d'immunomigration rapide (DUOSpeed, BIO VETO TEST ; Fast Test, MEGACOR ; Witness, RHONE MERIEUX ; On Site, BIOTECH, Sweden ; One Step, EVL, The Netherlands) et d'un test ELISA (Snap, IDEXX, USA), tous fondés sur la mise en évidence des anticorps anti gp40 (Tab.V). L'étude a été réalisée sur 800 sérums de chats, et les résultats positifs ont été vérifiés par Western Blot.

	Snap (%)	DUOSpeed (%)	Fast Test (%)	Witness (%)	OnSite (%)	One Step (%)
Tests interprétables	98.3	99.7	99.9	<b>87.4</b>	99.9	99.8
Tests facilement interprétables (lecture aisée)	<b>85.6</b>	93.6	93.2	91.3	91.9	97.4
Sensibilité	86.1	97.3	90.3	95.5	<b>41.5</b>	87.5
Spécificité	98.6	98.6	99.0	99.7	97.1	99.2
Valeur prédictive positive	86.1	87.7	90.3	97.0	<b>57.4</b>	91.3
Valeur prédictive négative	98.6	99.7	99.0	99.5	94.6	98.8

*Tab. V : Caractéristiques de plusieurs tests rapides de diagnostic du syndrome d'immunodéficience féline [52].*

Le test Witness présente un nombre important de résultats non interprétables. La valeur prédictive positive et la sensibilité du test One site sont mauvaises. Les autres tests apparaissent globalement équivalents.

Les tests d'immunomigration rapide sont disponibles pour le diagnostic simultané du FeLV et du FIV (Kits commercialisés en France : WITNESS FeLV-FIV- SYNBIOTICS EUROPE; DUOSpeed FeLV-FIV- BIO VETO TEST) .

- Le Western Blot ou immunoblot.

Le western blot est souvent utilisé pour confirmer les résultats douteux obtenus avec l'ELISA. Il permet de mettre en évidence les anticorps spécifiques des différentes protéines du virus.

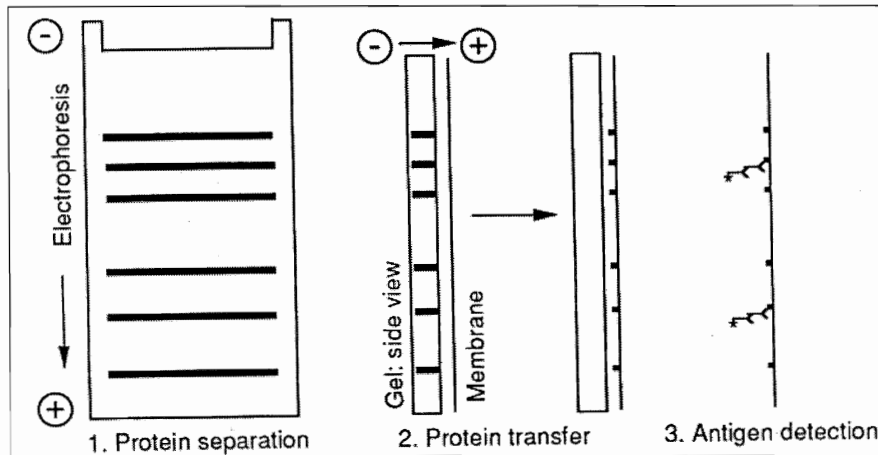
*Principe [85, 18] :*

On commence par préparer les protéines qui serviront de cibles aux anticorps : le virus est extrait des cellules infectées, purifié et lysé sous l'action d'un détergent. Les protéines sont alors solubilisées. On les charge négativement à l'aide de SDS.

Un gel de polyacrylamide est coulé entre deux plaques de verre verticales. Un peigne en plastique, placé dans la partie supérieure du gel, creuse des puits. Lorsque le gel est solidifié, les protéines sont déposées dans ces puits. Une piste est réservée à un marqueur de poids moléculaires.

Les protéines sont séparées par électrophorèse en fonction de leur taille et de leur poids moléculaire (plus la taille et le poids des molécules sont faibles, plus elles parcourent de distance).

Les bandes de protéines obtenues sont ensuite transférées, à l'aide d'un nouveau champ électrique perpendiculaire au premier, sur une membrane de nitrocellulose parallèle au gel de polyacrylamide (cf. schéma). Cette opération dure environ deux heures. Pour vérifier si le transfert est réussi, on peut colorer le gel au bleu de Coomassie : les protéines restées sur le gel se colorent. On peut aussi colorer la membrane de nitrocellulose au rouge Ponceau : des bandes apparaissent, correspondant aux protéines transférées.



**Fig. XI : Western blot pour l'identification d'anticorps [105].**

La feuille de nitrocellulose est découpée en plusieurs bandes pour tester les échantillons. On met d'abord ces bandes à incuber pendant une nuit avec les sérums à tester. Si les anticorps sont présents, ils se lient à leur protéine cible. On effectue ensuite un lavage pour éliminer tout ce qui n'est pas fixé avant de remettre les bandes à incuber avec des anticorps dirigés contre les IgG de félins et couplés à une enzyme peroxydase. Cette incubation dure deux heures. On lave à nouveau et on ajoute le substrat de l'enzyme qui révèle les éventuels complexes Ag-Ac. La coloration des bandes est comparée celle d'une bande de référence et les anticorps présents sont alors identifiés.

*Avantages et inconvénients :*

Le western blot est un test plus spécifique que l'ELISA ou l'IFA. En effet, les anticorps spécifiques des protéines individuelles du FIV peuvent être distingués entre eux et des anticorps dirigés contre les composants non viraux de la préparation d'antigènes. Le western blot est d'ailleurs souvent utilisé pour confirmer les résultats des tests ELISA : les chats infectés par le virus de la PIF, le FeLV ou *Toxoplasma gondii* donnent parfois des résultats douteux à l'ELISA mais parfaitement négatifs en Western blot. Au contraire, certains sérums engendrent un résultat équivoque à l'ELISA mais donnent un résultat incontestablement positif au western blot [5]. Enfin, pendant le stade terminal de la maladie, le western blot pourrait mettre en évidence des anticorps indétectables par ELISA [124].

La technique du western blot reste du domaine des laboratoires car elle est assez onéreuse, nécessite du temps et du personnel expérimenté. La sensibilité et la spécificité du test varient d'ailleurs en fonction du laboratoire qui l'effectue puisqu'il n'existe pas de kits standards commercialisés [5].

Les anticorps dirigés contre la gp120, même s'ils sont présents dans le sérum testé, ne sont parfois pas décelés par le Western blot. En effet, la glycoprotéine est souvent fractionnée lors de la purification du virus. Pour y remédier, on travaille de plus en plus à partir de lysat de cellules infectées [85, 18].

Certains anticorps peuvent aussi passer inaperçus si les antigènes viraux du test ne sont pas identiques à ceux de la souche circulante (la variabilité des antigènes externes d'enveloppe, par exemple, est importante...)[75].

Enfin, le western blot donne un nombre non négligeable de résultats équivoques (le sérum réagit avec toutes les protéines, spécifiques ou non du virus ou ne réagit qu'avec une

seule...), et on doit parfois renouveler le test plusieurs fois avant d'obtenir un résultat interprétable.

#### *Interprétation des résultats :*

Elle diffère selon les chercheurs. En général, la visualisation de bandes colorées au niveau d'au moins deux protéines spécifiques du virus est considérée comme un résultat positif. Une seule bande représente un résultat équivoque. L'absence de bande colorée au niveau des protéines spécifiques traduit un résultat négatif. Lorsque le résultat est équivoque ou douteux, le sérum est testé à nouveau huit à douze semaines plus tard. Le résultat est alors le plus souvent interprétable [5].

- Le test de radioimmunoprécipitation (Radioimmunoprecipitation Assay : RIPA)

La méthionine marquée au soufre  $^{35}\text{S}$  est incorporée aux protéines du virus pendant la culture cellulaire. Les cellules sont ensuite lysées, et le lysat obtenu est mis à incuber une nuit avec le sérum à tester. Si le sérum contient des anticorps spécifiques du FIV, des complexes immuns se forment alors. Ces complexes sont ensuite récupérés après centrifugation (la protéine A, couplée à des billes de sépharose, se lie aux complexes immuns formés et les alourdit) et séparés par électrophorèse. Les antigènes des complexes sont alors détectés par radiophotographie. On les identifie en déduisant leur poids moléculaire de la distance qu'ils ont parcourue [18].

Les techniques du RIPA et du western blot sont proches. Elles permettent toutes les deux d'identifier les anticorps dirigés contre les différentes protéines du virus. Elles sont toutes les deux très spécifiques et sensibles et sont donc utilisables pour confirmer les résultats obtenus par ELISA ou immunomigration rapide.

La différence des deux méthodes réside essentiellement dans le déroulement des étapes. Dans le cas du RIPA, les antigènes réagissent avec les anticorps avant l'électrophorèse. Ils sont alors dans leur forme native. Dans le cas du western blot, au contraire, les antigènes subissent d'abord l'électrophorèse et le transfert sur membrane de nitrocellulose. Ils sont alors dénaturés, et ne sont exposés qu'ensuite au contact des anticorps. C'est pourquoi certains épitopes conformationnels sont parfois reconnus par RIPA et pas par western blot [26].

Le test RIPA présente également l'avantage de détecter, beaucoup mieux que le western blot, les anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe gp120. Ces anticorps apparaissent assez tôt dans le sang des animaux infectés (avant ceux dirigés contre les protéines codées par le gène *gag*) et leur titre reste élevé tout au long de la maladie [18].

Le test de RIPA est donc sensible et surtout très spécifique. Mais il est très long à réaliser, et n'est pas adapté à l'usage commercial. Il n'est donc pas applicable en routine et reste réservé aux laboratoires de recherche.

- Le test d'hémagglutination.

Récemment, un nouveau type de kit pour le diagnostic du FIV a été mis sur le marché en Australie (VetRED FIV<sup>TM</sup>, AGEN Biomedical Ltd., Queensland, Australia.). Il fait appel à une technique d'hémagglutination : un anticorps monoclonal non agglutinant dirigé contre les hématies de chats est conjugué à un peptide synthétique dérivé de la région transmembranaire du FIV. En présence d'anticorps dirigés contre la protéine transmembranaire du FIV, il se forme un complexe Ac/Ag/Ac qui provoque l'agglutination des hématies. L'intensité de la

réaction est noté de +1 à +4. Si aucune réaction ne se produit, un anticorps monoclonal agglutinant anti-hématie est ajouté pour vérifier que l'agglutination est possible [24].

Lors d'une étude récente [24], ce kit a été utilisé pour tester 49 chats dont 34 avaient été infectés expérimentalement par le FIV. Les 15 autres chats n'étaient pas infectés. Une partie des chats fut testée régulièrement pendant huit semaines, l'autre ponctuellement au bout d'environ 24 et 70 semaines. Le test ne donna aucun faux résultat.

Les mêmes chercheurs effectuèrent alors une étude comparative de ce kit et du test ELISA Petcheck ( FIV test kit ; IDEXX, Portland, ME, USA) à partir 548 prélèvements de sang soumis à un laboratoire pour le diagnostic. Ils obtinrent 32 résultats discordants, qui furent vérifiés par western blot. Finalement, ils conclurent, pour le test d'hémagglutination, à une sensibilité et une spécificité de 97% ( contre respectivement 99% et 98% pour le test Petcheck), et confirmèrent l'intérêt de ce type de test [24].

Le principe de l'hémagglutination permet aussi de mesurer les titres en complexes immuns des sérums de chats. Les valeurs obtenues dans le cas de chats infectés et non infectés étant significativement différentes, ces mesures peuvent prendre une valeur diagnostique [91].

- Limites des tests sérologiques.

Les techniques de mise en évidence des anticorps dirigés contre le FIV sont nombreuses et à la base de tests de diagnostic fiables. Elles sont cependant parfois mises en échec par les caractéristiques propres à l'infection par le FIV :

- La séroconversion ne s'effectue qu'environ huit semaines après l'infection. Expérimentalement, le délai dépasse même parfois six mois! En tout début d'infection, il existe donc toujours une fenêtre de quatre à huit semaines pendant laquelle les tests de recherche d'anticorps sont négatifs alors que le chat est infecté [5].

- En début d'infection, le titre en anticorps est parfois très faible, et peut le rester plusieurs mois, voire plus d'un an. Il est alors insuffisant pour être décelé [5].

- En phase terminale de la maladie, la faiblesse du système immunitaire est telle que la production en anticorps est trop faible pour être détectable [124].

- Jusqu'à l'âge de quatre mois, les chatons peuvent posséder des anticorps maternels anti FIV, sans être infectés. Le test donne pourtant un résultat positif. A l'inverse, les chatons infectés ont un système immunitaire parfois trop immature pour développer des anticorps. Le test est alors négatif. Le statut des chatons ne peut ainsi être établi avec sûreté qu'à partir de l'âge de huit mois. Si un test est effectué auparavant, son résultat devra être confirmé lorsque l'animal aura atteint huit mois [5].

### c. Détection du génome par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Les tests directs que nous avons décrits jusqu'à présent sont mal adaptés à la détection du FIV : il n'existe pas de technique suffisamment sensible pour mettre en évidence de façon directe les antigènes viraux. L'isolement viral est long à réaliser, et manque également de sensibilité [5]. C'est pourquoi les tests de diagnostic du syndrome d'immunodéficience féline les plus utilisés sont des tests indirects, fondés sur la détection d'anticorps. Ils présentent cependant certaines limites incontestables, liés aux particularités de l'infection par le FIV (cf. paragraphe précédent).

La PCR représente une alternative intéressante : c'est un test direct, qui ne possède pas les inconvénients des tests sérologiques, et qui est extrêmement sensible. Son principe est exposé dans le chapitre concernant le diagnostic du FeLV. La PCR permet d'amplifier

spécifiquement l'ADN du provirus intégré au génome de la cellule infectée. Comme l'isolement viral, elle peut donc détecter la présence du virus dans les cellules de chats séronégatifs. C'est le cas pendant certaines phases de la maladie, lorsque le titre en anticorps est faible : stade précoce de l'infection [132], phase asymptomatique [5], en fin de maladie lorsque le système immunitaire est déficient [124]...

Grâce au principe de l'amplification, la PCR est plus sensible que l'isolement viral (on rapporte souvent des résultats positifs en PCR et négatifs par isolement viral [11, 93]). Elle peut mettre en évidence une cellule infectée sur un million de cellules. De plus, c'est une méthode beaucoup plus rapide : Le résultat peut être connu en 24 heures environ.

La difficulté pour mettre en œuvre un test de diagnostic du FIV par PCR réside surtout dans le choix des amorces. Les différentes souches de FIV présentent en effet une grande variabilité génétique. Les amorces sont donc choisies pour amplifier une partie du gène *gag*, le plus conservé du génome viral. Malgré cela, il est impossible de trouver deux amorces capables d'amplifier toutes les souches de FIV. Il faut alors dessiner plusieurs couples d'amorces, adaptés aux différentes souches virales existantes [99]. Le même test ne pouvant pas dépister toutes les souches de FIV, des risques de résultats faux négatifs existent.

Les tests mis au point utilisent le plus souvent la technique de PCR nichée [99], ou de double PCR [54] (deux PCR successives, réalisées avec les mêmes amorces) pour augmenter la sensibilité du test (et la spécificité dans la cas de PCR nichée). Une charge virale très faible peut en effet passer inaperçue à la première amplification et n'être révélée qu'à la seconde [54, 99].

La PCR est une technique de diagnostic du FIV très sensible, spécifique, rapide, et fiable tout au long de la maladie (indépendamment des fluctuations de la réponse immunitaire de l'hôte). Elle nécessite cependant un équipement particulier, un personnel qualifié, et ne peut être réalisée qu'en laboratoire. Un soin tout particulier doit être apporté aux manipulations car la sensibilité de la technique augmente les risques de contamination et donc de faux positifs.

Les tests de diagnostic rapide des rétroviroses félines sont indiscutablement les plus utilisés à l'heure actuelle. Ils sont simples d'emploi et révèlent leurs résultats en quelques minutes, ce qui répond parfaitement aux besoins du vétérinaire praticien.

Ces tests présentent néanmoins certaines limites, puisqu'ils sont dépendants de la multiplication virale (recherche d'antigènes) ou de la réponse immunitaire de l'hôte (recherche d'anticorps). Ainsi les cas d'infection latente (le virus ne se multiplie pas) ne sont pas dépistés. De même, les tests sérologiques s'avèrent inefficaces si l'animal ne produit pas suffisamment d'anticorps (phase précédant la séroconversion, phase de dépression du système immunitaire...).

L'isolement viral et la PCR sont les seules méthodes qui s'affranchissent de ces contraintes. La PCR est en outre plus rapide à réaliser et plus sensible que l'isolement viral. Elle semble donc s'imposer comme moyen de diagnostic du FeLV et du FIV. C'est pourquoi nous avons choisi d'orienter notre travail dans ce sens en essayant de mettre au point un test de diagnostic du FeLV et du FIV par PCR.

**Deuxième Partie : Étude Expérimentale.**

**Mise au Point d'un Test de Diagnostic  
Des Rétroviroses Félines par PCR.**



## **Introduction.**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) apparaît comme une méthode de choix pour diagnostiquer les rétroviroses félines. Les tests utilisés en routine, s'appuyant sur les méthodes ELISA ou d'immunomigration rapide, sont en effet dépendants de l'antigénémie ou de la réponse immunitaire de l'hôte, deux paramètres variables. Ils sont donc parfois à l'origine de résultats faussés. Le diagnostic par PCR s'affranchit de ces paramètres : c'est un test direct, dont le principe est d'amplifier l'ADN proviral intégré au génome de la cellule cible. La PCR est aussi un outil spécifique et extrêmement sensible. Ainsi, il suffit que le virus infecte la cellule hôte pour le mettre en évidence par PCR.

Le travail que nous présentons ici consiste en l'élaboration d'un test de diagnostic du FeLV et du FIV par PCR. Nous exposons donc les différentes étapes qui nous ont permis de le mettre au point. Les deux virus étant cependant très proches, tant par le tableau clinique qu'ils engendrent que par leur comportement au sein de l'organisme infecté, nous avons cherché à rendre notre test apte à les dépister de façon simultanée.

Après présentation du matériel et des méthodes utilisés, nous exposerons les résultats obtenus et nous les discuterons.

### **I. Matériel et Méthodes.**

#### **A. Les Prélèvements.**

La mise au point du test a été réalisée à l'aide de prélèvements effectués à la demande des cliniciens lors des consultations à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse ou adressés par des confrères praticiens, entre novembre 1998 et décembre 1999. Certaines biopsies ont été réalisées à L'ENVV à l'occasion d'autopsie.

Le sang est prélevé sur EDTA (acide éthylènediamine tétra-acétique), les anticoagulants à base d'héparine représentant des inhibiteurs potentiels de l'enzyme polymérase. Les tissus solides sont traités de préférence frais ou conservés dans le formol.

Les prélèvements parviennent au laboratoire accompagnés d'une fiche de renseignements (Fig. XII) remplie par le vétérinaire. Elle nous informe sur l'identité du chat prélevé (sexe, âge, race...), sur les symptômes qu'il peut éventuellement présenter, ainsi que sur les motifs pour lesquels le test a été demandé.

ANIMAL SUSPECT D'INFECTION PAR FeLV OU FIV

- MEDECINE INTERNE -  
- Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse -

Nom et adresse du propriétaire

Animal: nom, Espèce, race  
Sexe, Date de naissance

N° de dossier

Demandé par : Pr : Et :  
Date du prélèvement sanguin ou tissulaire:

Commémoratifs et anamnèse :

- Motif de la demande:  Détermination du statut de l'animal  
 Contact avec un animal suspect ou infecté (préciser depuis quand)  
 Suspicion clinique

L'animal est-il vacciné?  Oui  Non Par quel vaccin? .....

Un test de dépistage a-t-il déjà été effectué?  Oui  Non

Si oui: Lequel? ..... Quand? .....

Résultats? .....

Signes cliniques :

- Pas de signe clinique
- |   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Abattement         | <input type="checkbox"/> Anorexie               | <input type="checkbox"/> Hyperthermie        | <input type="checkbox"/> Maigreur      |
| <input type="checkbox"/> Anémie             | <input type="checkbox"/> Ictère                 | <input type="checkbox"/> Adénomégalie isolée |  |
| <input type="checkbox"/> Polyadénomégalie   | <input type="checkbox"/> Stomatite              | <input type="checkbox"/> Gingivite           | <input type="checkbox"/> Conjonctivite |
| <input type="checkbox"/> Otite              | <input type="checkbox"/> Troubles cutanés ..... | <input type="checkbox"/> Tumeurs .....       |  |
| <input type="checkbox"/> Troubles digestifs | <input type="checkbox"/> Troubles respiratoires | <input type="checkbox"/> Troubles rénaux     |  |
| <input type="checkbox"/> Troubles nerveux   | <input type="checkbox"/> Autres .....           |  |  |

Maladies infectieuses intercurrentes :

- |                                       |   |  |
|---------------------------------------|---|--|
| <input type="checkbox"/> Coryza       | <input type="checkbox"/> Hémobartonellose | <input type="checkbox"/> P.I.F.        |
| <input type="checkbox"/> Toxoplasmose | <input type="checkbox"/> Parasitoses      | <input type="checkbox"/> Autres: ..... |

Hématologie :

- |  |  |  |                                   |
|--|--|--|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Anémie régénérative | <input type="checkbox"/> Anémie non régénérative | <input type="checkbox"/> Lymphopénie   | <input type="checkbox"/> Leucémie |
| <input type="checkbox"/> Dysmyelopoïèse      | <input type="checkbox"/> Aplasie médullaire      | <input type="checkbox"/> Autres: ..... |                                   |

Résultats du test de dépistage par P.C.R. :

P.C.R. effectuée le .....

FIV :  Positif  Négatif FeLV :  Positif  Négatif Remarques :

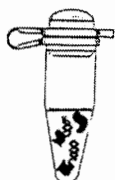
Fig. XII : Fiche de renseignements.

## B. Extraction de l'ADN à partir de sang total.

Avant toute PCR, on extrait l'ADN contenu dans les échantillons de sang collectés.

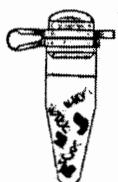
La méthode classique d'extraction au phénol-chloroforme est longue et délicate. Nous choisissons de travailler avec un kit d'extraction (High Pure PCR Template Kit, Boehringer Mannheim), qui rend cette étape plus rapide et plus simple à réaliser. La manipulation effectuée est illustrée par la figure XIII :

- ◆ Préchauffer 200  $\mu$ L de tampon d'élution à 70°C

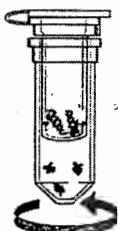


- ◆ Dans un tube, mettre :
  - 200  $\mu$ L de sang
  - 200  $\mu$ L de tampon de fixation
  - 40  $\mu$ L de protéinase K

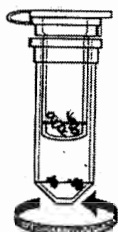
- ◆ Vortexer **immédiatement**
- ◆ Mettre à incuber 10 minutes à 72°C



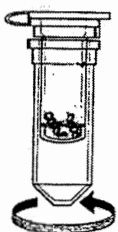
- ◆ Ajouter 100  $\mu$ L d'isopropanol
- ◆ Vortexer



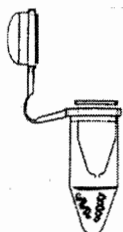
- ◆ Transférer le mélange dans une colonne posée sur un tube collecteur sans bouchon
- ◆ Centrifuger 1 min à 8000 tours/min



- ◆ Vider le tube collecteur, et le replacer sous la colonne
- ◆ Ajouter 500  $\mu$ L de tampon de lavage dans la colonne
- ◆ Centrifuger 1 min à 8000 tours/min
- ◆ Répéter cette étape une fois



- ◆ Vider le tube collecteur, et le replacer sous la colonne
- ◆ Centrifuger 10 secondes à vitesse maximale (10000 tours/min)



- ◆ Transférer la colonne sur un tube propre avec bouchon
- ◆ Ajouter 200  $\mu$ L du tampon d'élution préchauffé dans la colonne
- ◆ Centrifuger 1 min à 8000 tours/min

Fig. XIII : Schématisation de l'extraction d'ADN à partir de sang total.

Les acides nucléiques obtenus sont stables et sont conservés au réfrigérateur à 4°C (ou au congélateur à -20°C si le temps de conservation est supérieur à une semaine) avant d'être utilisés pour la PCR.

*Cas particulier d'extraction d'ADN à partir de tissus solides :*

Nous utilisons le même kit que pour l'extraction d'ADN à partir de sang total (High Pure PCR Template Kit, Boehringer Mannheim).

L'échantillon de tissu (25 à 50 mg), coupé en petits morceaux, est d'abord mélangé à 200µL de tampon de lyse et 40 µL de protéinase K. L'ensemble est mis à incuber 1 heure à 55°C. On ajoute alors 200 µL de tampon de fixation et on remet à incuber 10 minutes à 72°C. On ajoute encore 100 µL d'isopropanol et on reprend le protocole précédent à partir de l'étape faisant intervenir la colonne.

### **C. Choix des amorces et des séquences à amplifier.**

La qualité du test repose en grande partie sur le choix de la séquence du génome viral que l'on va amplifier. Cette séquence doit bien sur être caractéristique du virus à dépister, donc spécifique de ce virus. Mais pour éviter les résultats faussement négatifs, elle doit être conservée sur les différentes souches du virus qui peuvent exister.

Les amorces sont des oligonucléotides dont la séquence est choisie de façon à s'hybrider aux extrémités du fragment à amplifier. La sensibilité et la spécificité du test dépendent de la qualité de l'hybridation des amorces avec leur séquence cible.

Pour obtenir un appariement de bonne qualité (et donc permettre à la PCR de se dérouler efficacement), plusieurs conditions doivent être rassemblées :

-La séquence cible des amorces doit être très conservée. En effet, si certaines bases nucléotidiques qui la composent varient d'une souche virale à une autre, les amorces ne lui seront plus parfaitement complémentaires et ne s'hybrideront alors plus complètement. La sensibilité du test peut en être affectée et la réaction d'amplification peut même être complètement bloquée.

-Les différentes amorces utilisées pour la PCR ne doivent pas s'hybrider entre elles, de façon à ne pas affecter la sensibilité du test. Elles ne doivent pas non plus se replier sur elles-mêmes.

Il faut apporter une attention toute particulière aux extrémités 3' des amorces qui doivent impérativement se lier à la séquence cible pour permettre à la Taq polymérase de s'accrocher à l'ADN et de procéder à l'amplification.

-Les amorces ne doivent s'hybrider à l'ADN qu'à un seul endroit, c'est-à-dire au niveau de leur séquence cible. Cette séquence ne doit donc pas se répéter ailleurs sur l'ADN sous peine d'engendrer des amplifications non spécifiques.

#### 1. FeLV

Pour nous aider dans le choix de la région du génome du FeLV à amplifier, nous nous sommes inspirées d'une publication récente [97]. La zone choisie est à cheval sur le gène *gag* et la région U<sub>3</sub> du LTR. Le gène *gag* est, comme nous l'avons vu dans la partie virologie, le plus conservé, *pol* et surtout *env* étant plus variables.

La zone empiète sur la région U<sub>3</sub> pour une raison particulière : le génome du chat comporte en effet des copies de virus FeLV endogènes, non pathogènes, dont la séquence est très proche de celle du virus FeLV exogène et pathogène que nous cherchons à dépister. La région U<sub>3</sub> du LTR n'existe que sur les virus FeLV exogènes et pathogènes, et permet donc de distinguer les deux séquences virales [9, 13, 96]. En amplifiant une partie de cette région, on

évite ainsi d'amplifier les virus endogènes qui pourraient représenter une source de résultats faussement positifs.

Le choix des amorces s'inspirent aussi de la publication [97]. Nous les avons un peu modifiées pour éviter qu'elles s'hybrident entre elles lors de la réaction (nous nous sommes surtout appliquées à limiter les liaisons fortes (G-C) entre les extrémités des amorces), et pour qu'elles possèdent des températures de fusion proches.

*séquences des amorces pour l'amplification de FeLV :*

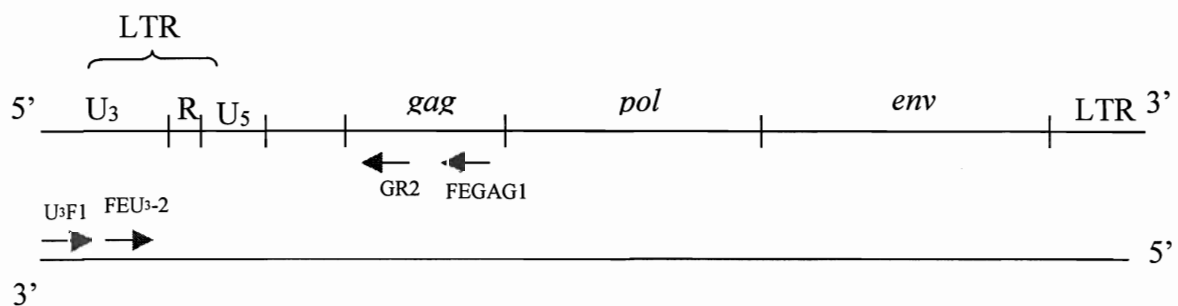
- **PCR1** (1ère étape) : U<sub>3</sub>F1 : 5' **ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC** 3' (186-205)  
 FEGAG1 : 5' **CAGACCAGTGATCAAGGGTGA** 3' (954-934)
- **PCR2** (2ème étape) : FEU<sub>3-2</sub> : 5' **CTCCAGGCTCCCCAGTTGA** 3' (218-236)  
 GR2 : 5' **GCTTCGGTACCAAACCGAAA** 3' (824-805)

Les bases en caractères gras ont été ajoutées par rapport aux séquences proposées par la publication. Certaines bases ont également été retirées. U<sub>3</sub>F1 et GR2 n'ont pas été modifiées.

amorce	nombre de nucléotides	température de fusion*	longueur du fragment amplifié
U <sub>3</sub> F1	20	60	769 pb
FEGAG1	21	60	
FEU <sub>3-2</sub>	19	59	605 pb
GR2	20	60	

\*Température de fusion donnée par le laboratoire ayant synthétisé les amorces (ISOPRIM)

**Tab. VI : Propriétés des amorces servant à amplifier l'ADN du FeLV.**



**Fig. XIV : Localisation des amorces et de la zone à amplifier sur le génome de FeLV.**  
 U<sub>3</sub>F1, FEGAG1 : amorces pour la première amplification  
 FEU<sub>3-2</sub>, GR2 : amorces pour la deuxième amplification

## 2. FIV

Le génome du FIV varie beaucoup d'une souche à l'autre. Il est très difficile d'y trouver une région constante à amplifier. On ne peut donc que se contenter de travailler sur la séquence qui nous paraît la moins variable. Comme pour le FeLV, elle se trouve sur le gène *gag*. Nous réalisons également un alignement des séquences des différentes souches virales disponibles dans les banques de données informatiques (Fig. XV).

Les amorces FIV sont choisies de façon à s'hybrider au minimum entre elles et à posséder des températures de fusion proches pour fonctionner lors de la même réaction.

Comme nous envisageons de mettre au point un test par PCR multiplex, des contraintes supplémentaires apparaissent :

- Les amorces FIV ne doivent pas s'hybrider non plus avec les amorces FeLV.
- Les températures de fusion des amorces FIV et FeLV doivent être proches.
- Les séquences amplifiées sur le FIV et sur le FeLV doivent présenter des longueurs suffisamment différentes pour pouvoir être distinguées après migration par électrophorèse.

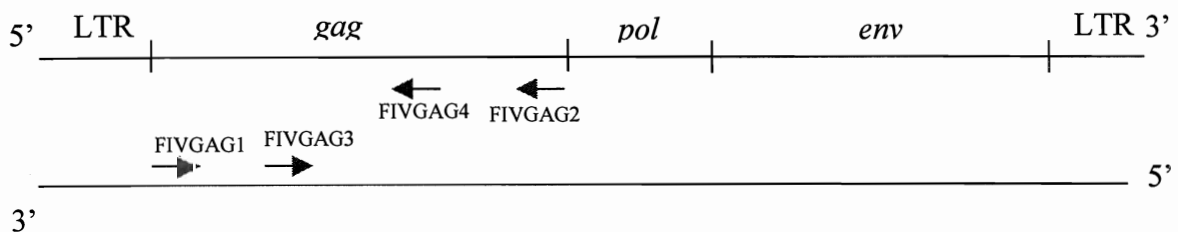
Le choix des amorces est donc particulièrement délicat, et des programmes informatiques nous rendent la tâche moins difficile.

*séquences des amorces pour l'amplification de FIV :*

- **PCR1** (1<sup>ère</sup> étape) : FIVGAG1 : 5' CCCTCCACAGGCATATCCTA 3' (390-409)  
FIVGAG2 : 5' CTGGCTTAAGATGACTCATTGC 3' (1003-982)
- **PCR2** (2<sup>ème</sup> étape) : FIVGAG3 : 5' TGGAGCACCACAATATGTAGC 3' (423-443)  
FIVGAG4 : 5' CTAATGCCTCAAGATACCATGC 3' (793-772)

Amorces	Nombre de nucléotides	Température de fusion*	Longueur du fragment amplifié
FIVGAG1	20	58	613 pb
FIVGAG2	22	61	
FIVGAG3	21	59	371 pb
FIVGAG4	22	61	

**Tab. VII : Propriétés des amorces servant à amplifier l'ADN du FIV.**



**Fig. XVI : Localisation des amorces et de la zone à amplifier sur le génome de FIV.**

FIVGAG1, FIVGAG2 : Amorces pour la première amplification  
FIVGAG3, FIVGAG4 : Amorces pour la deuxième amplification

FIV

Section 7

	(499)	499	510	520	530	540	550	560	570	581
Italie (1)										
Paris (222)		TGGATCTAGTAAAGAAATGACATGGCAATGCTGCATTA								
Pays Bas (222)		TGGATCTAGCAAGGAAATGACATGGCAATTACAAC								
Petaluma (449)		TGGATCTAGCAAGAAATGATATGGCAATGTGACAT								
Portugal (242)		TGGATCTAGTAAAGAAATGATATGGCAATCACCAC								
Rockville (499)		TGGATCTAGCAAGAAATGATATGGCAATGTGACAT								
Consensus (499)		TGGATCTAGCAAGAAATGATATGGCAATGACAT								

Section 8

	(582)	582	590	600	610	620	630	640	650	664
Italie (1)										
Paris (305)		CTGCTGCTGCAGCTGAAAAATATGTATACTCAGAT								
Pays Bas (305)		CTGCTGCTGCGCGCGAAAAATATGTATACTCAGAT								
Petaluma (532)		CTGCTGCTGCAGCTGAAAAATATGTATCTCAAA								
Portugal (325)		CTGCTGCTGCAGCTGAAAAATATGTATGCTCAGAT								
Rockville (582)		CTGCTGCTGCAGCTGAAAAATATGTATCTCAAA								
Consensus (582)		CTGCTGCTGCAGCTGAAAAATATGTATCTCAGAT								

Section 9

	(665)	665	670	680	690	700	710	720	730	747
Italie (1)										
Paris (388)		GGCCCTCCACAGGCATATCCTATTCAAACAGTAAAT								
Pays Bas (388)		GGCCCTCCACAGGCATATCCTATTCAAACAGTAAAT								
Petaluma (615)		GGCCCTCCACAGGCATATCCTATTCAAACAGTAAAT								
Portugal (408)		GAGCCTCCACAGGCTTATCCAATCAAACAGTAAAT								
Rockville (665)		GGCCCTCCACAGGCATATCCTATTCAAACAGTAAAT								
Consensus (665)		GGCCCTCCACAGGCATATCCTATTCAAACAGTAAAT								

Fiv gag 1

Fiv gag 3

Numéros d'accession :

- Italie : Y13867
- Paris : L06311
- Pays bas : X68019
- Petaluma(USA) : M25381
- Portugal : AJ304962
- Rockville(USA) : NC 001482

FIV

Section 10

	(748)	748	760	770	780	790	800	810	820	830
Italie (86)		TATGGAGAAGGCAAGAGAGGGCTTAGGAGGTGAGGAG								
Paris (471)		TATGGAAAAGGCAAGAGAAGGATTAGGAGGTGAGGA								
Pays Bas (471)		TATGGAAAAGGCAAGAGAAGGATTAGGAGGTGAGGA								
Petaluma (698)		TATGGAAAAGGCAAGAGAAGGATTAGGAGGTGAGGA								
Portugal (491)		TATGGAAAAGGCAAGAGAAGGATTAGGAGGTGAGGA								
Rockville (748)		TATGGAAAAGGCAAGAGAAGGATTAGGAGGTGAGGA								
Consensus (748)		TATGGAAAAGGCAAGAGAAGGATTAGGAGGTGAGGA								

Section 11

	(831)	831	840	850	860	870	880	890	900	913
Italie (149)		ATATGGCTACCTTAATATATGCTGCACCTGGCTGT								
Paris (554)		ACATGGCCACATTAATAATGGCTGCACACAGGGT								
Pays Bas (554)		ATATGGCCACATTAATAATGGCTGCACACAGGGT								
Petaluma (781)		ACATGGCCACATTAATAATGGCTGCACACAGGGT								
Portugal (574)		ATATGGCTACCTTAATATATGCTGCACCTGGCTGT								
Rockville (831)		ACATGGCCACATTAATAATGGCTGCACACAGGGT								
Consensus (831)		ATATGGCCACATTAATAATGGCTGCACACAGGGT								

Section 12

	(914)	914	920	930	940	950	960	970	980	996
Italie (232)		GAATATGATCGTACCCATCCCTCTGATGGCCCTAG								
Paris (637)		GAATATGATCGCAGCATCCCCCTGATGGTCTTAG								
Pays Bas (637)		GAATATGATCGTACACATCCCCCTGATGGTCTTAG								
Petaluma (864)		GAATATGATCGCACACATCCCCCTGATGGTCTTAG								
Portugal (657)		GAGTATGATCGTACCCACCCCTGATGGTCTTAG								
Rockville (914)		GAATATGATCGCACACATCCCCCTGATGGTCTTAG								
Consensus (914)		GAATATGATCGTACACATCCCCCTGATGGTCTTAG								

Fig.XV : Alignement de séquences issues de différentes souches de FIV (gène gag)

FIV

Fiv gag 4

Section 13

	(997)	997	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1079
Italie (315)		TC	AAGAACAACAGG	CAGAACCAGATTTGC	ACCAGCCAGAATGC	AGTGTAGAGCATGGT	ACCTTGAAGCATTAGG	AAAGTTGG	
Paris (720)		TC	AAGAACAACAAG	CAGAAGCAAGATTTGC	ACCAGCTAGGATGC	AGTGTAGAGCATGGT	ATCTCGAGGCATTAGG	AAATTTGG	
Pays BAs (720)		TC	AAGAACAAGC	AGAACCAGATTTGC	ACCAGCTAGGATGC	AGTGTAGAGCATGGT	ATCTTGAAGCATTAGG	AAATTTGG	
Petaluma (947)		TC	AAGAACAACAAG	CAGAAGCAAGATTTGC	ACCAGCTAGGATGC	AGTGTAGAGCATGGT	ATCTCGAGGCATTAGG	AAATTTGG	
Portugal (740)		TC	AAGAACAACAAG	CAGAAGCAAGATTTGC	ACCAGCTAGGATGC	AGTGTAGAGCATGGT	ATCTTGAAGCATTAGG	AAATTTGG	
Rockville (997)		TC	AAGAACAACAAG	CAGAAGCAAGATTTGC	ACCAGCTAGGATGC	AGTGTAGAGCATGGT	ATCTCGAGGCATTAGG	AAATTTGG	
Consensus (997)		TC	AAGAACAACAAG	CAGAAGCAAGATTTGC	ACCAGCTAGGATGC	AGTGTAGAGCATGGT	ATCTTGAAGCATTAGG	AAATTTGG	

Section 14

	(1080)	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1162
Italie (398)		CAGCTATAAAAGCT	AAATCTCCTCCGAGC	AGTACAAATTGAAGCA	GGAGCTAAAGAGGACT	TATTCCTCATTATAGATAGACTA				
Paris (803)		CTGCCATAAAAGCT	AAATCTCCTCGAGCT	GTGCAGTTAAGACA	GGAGCTAAAGAGAT	TATTCATCCTTTATAGACAGATTG				
Pays BAs (803)		CCGCCATAAAAGCT	AAATCTCCTCGAGCT	GTGCAGTTAAGACA	GGAGCTAAAGAGAT	TATTCATCCTTTATAGACAGATTG				
Petaluma (1030)		CTGCCATAAAAGCT	AAATCTCCTCGAGCT	GTGCAGTTAAGACA	GGAGCTAAAGAGAT	TATTCATCCTTTATAGACAGATTG				
Portugal (823)		CAGCTATAAAAGGCT	AAATCTCCTCGAGC	AGTACAAATTAAGCA	GGAGCTAAAGAGGAT	TATTCCTCCTTCATAGATAGACTA				
Rockville (1080)		CTGCCATAAAAGCT	AAATCTCCTCGAGCT	GTGCAGTTAAGACA	GGAGCTAAAGAGAT	TATTCATCCTTTATAGACAGATTG				
Consensus (1080)		CTGCCATAAAAGCT	AAATCTCCTCGAGCT	GTGCAGTTAAGACA	GGAGCTAAAGAGAT	TATTCATCCTTTATAGATAGATTG				

Section 15

	(1163)	1163	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1245
Italie (481)		TTTGCTGAAATAGAT	CAAGAGCAGAACAC	AGCTGAAGTAAAGCT	GTATCTAAAGCAATCT	TAAAGTATAGCTAATGC	TAATCC			
Paris (886)		TTTGCCCAAATAGAT	CAAGAACAATAAC	AGCTGAAGTAAAGT	TATATCTAAACAGTC	ATAAAGCATAGCTAATGC	TAATGC			
Pays BAs (886)		TTTGCCCAAATAGAT	CAAGAACAATAAC	AGCTGAAGTAAAGT	TATATCTAAACAGTC	ATAAAGCATAGCTAATGC	TAATGC			
Petaluma (1113)		TTTGCCCAAATAGAT	CAAGAACAATAAC	AGCTGAAGTAAAGT	TATATCTAAACAGTC	ATAAAGCATAGCTAATGC	TAATGC			
Portugal (906)		TTTGCCCAAATAGAT	CAAGAACAATAAC	AGCTGAAGTAAAGT	TATATCTAAACAGTC	ATAAAGCATAGCTAATGC	TAATGC			
Rockville (1163)		TTTGCCCAAATAGAT	CAAGAACAATAAC	AGCTGAAGTAAAGT	TATATCTAAACAGTC	ATAAAGCATAGCTAATGC	TAATGC			
Consensus (1163)		TTTGCCCAAATAGAT	CAAGAACAATAAC	AGCTGAAGTAAAGT	TATATCTAAACAGTC	ATAAAGCATAGCTAATGC	TAATGC			

Fiv gag 2 FIV

Section 16

	(1246)	1246	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1328
Italie (564)		AGATTGTAAGAGG	CAATGAGTCACTCT	TAAACAGAAAGTAC	CTTAGAGGAAAACT	AAGAGCTCTCCA	AGAAGTAGGA	----	
Paris (969)		AGACTGCAAAAAG	GCAATGAGTCACT	CTTAAAGCCAGAA	AGTACCTTAGAAG	AAAAAGTTGAGAG	CTTGCAAGAGAT	AGGATCC	
Pays BAs (969)		AGACTGCAAAAAG	GCAATGAGTCACT	CTTAAAGCCAGAA	AGTACCTTAGAAG	AAAAAGTTGAGAG	CTTGCAAGAGAT	AGGATCC	
Petaluma (1196)		AGACTGTA AAAA	AGGCAATGAGCC	ACCTTAAAGCCAG	AAAGTACCTTAGA	AGAAAAGTTGAG	AGCTTGCAAG	AAATAGGCTCAC	
Portugal (989)		AGACTGTAAGAG	GCAATGAGTCACT	TAAAGCCAGAA	AGTACCTTAGAAG	AAAAAGTTGAG	AGCTTGCAAG	AAATAGGATCCG	
Rockville (1246)		AGACTGTA AAAA	AGGCAATGAGCC	ACCTTAAAGCCAG	AAAGTACCTTAGA	AGAAAAGTTGAG	AGCTTGCAAG	AAATAGGCTCAC	
Consensus (1246)		AGACTGTA AAAA	AGGCAATGAGTCACT	TAAAGCCAGAA	AGTACCTTAGAAG	AAAAAGTTGAG	AGCTTGCAAG	AAATAGGATCC	

Section 17

	(1329)	1329	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1411
Italie (643)		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Paris (1052)		CAGGATATAAGAT	GCAGCTCTTAGC	AGAAGCCCTTACA	AAAAGTTCAAGTAGT	TACAATCAAAAAGG	ACCAGGACCAGT	GTGTTTT		
Pays BAs (1052)		CAGGATATAAAAT	GCAACTCTTGGC	AGAAGCTCTTACA	AAAAGTTCAAGTAGT	GCAATCAAAAAGG	ATCAGGACCAGT	GTGTTTT		
Petaluma (1279)		CAGGATATAAAAT	GCAACTCTTGGC	AGAAGCTCTTACA	AAAAGTTCAAGTAGT	GCAATCAAAAAGG	ATCAGGACCAGT	GTGTTTT		
Portugal (1072)		CAGGATACAAAAT	GCAATTTATGGC	AGAGGCTCTTACA	AGGTTCAAACAGTT	CAAGCAAAAAGG	AAACAGCCAGT	TATGTTTT		
Rockville (1329)		CAGGATATAAAAT	GCAACTCTTGGC	AGAAGCTCTTACA	AAAAGTTCAAGTAGT	GCAATCAAAAAGG	ATCAGGACCAGT	GTGTTTT		
Consensus (1329)		CAGGATATAAAAT	GCAACTCTTGGC	AGAAGCTCTTACA	AAAAGTTCAAGTAGT	GCAATCAAAAAGG	ATCAGGACCAGT	GTGTTTT		

Section 18

	(1412)	1412	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1494
Italie (643)		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Paris (1135)		AATTGTAAAAGAC	CAGGCATCTAGCA	AGACAGTGCAGAG	ATGTGAAAAATGTA	ATAAATGCGGAAAG	CCTGGTCATT	TAGC		
Pays BAs (1135)		AATTGTAAAAGAC	CAGGCATCTAGCA	AGACAGTGCAGAG	ATGTGAAAAATGTA	ATAAATGCGGAAAG	CCTGGTCATT	TAGC		
Petaluma (1362)		AATTGTAAAAGAC	CAGGCATCTAGCA	AGACAGTGCAGAG	ATGTGAAAAATGTA	ATAAATGCGGAAAG	CCTGGTCATT	TAGC		
Portugal (1155)		AATTGTAAAAGAC	CAGGCACCTGGCC	AGACAAATGTAGA	CAAGCAAAAGAAAT	GTAATAACTGTGG	AAACCTGGT	CACCTAGC		
Rockville (1412)		AATTGTAAAAGAC	CAGGCATCTAGCA	AGACAGTGCAGAG	ATGTGAAAAATGTA	ATAAATGCGGAAAG	CCTGGTCATT	TAGC		
Consensus (1412)		AATTGTAAAAGAC	CAGGCATCTAGCA	AGACAGTGCAGAG	ATGTGAAAAATGTA	ATAAATGCGGAAAG	CCTGGTCATT	TAGC		

Fig.XV : Aligement de séquences issues de différentes souches de FIV (gène gag)



La première PCR amplifie une séquence de 769 paires de bases sur le FeLV et de 613 paires de bases sur le FIV.

La deuxième PCR amplifie une séquence de 613 paires de bases sur le FeLV et de 371 paires de bases sur le FIV.

Les séquences amplifiées sont de longueurs suffisamment éloignées pour être distinguées après migration par électrophorèse.

Les amorces sont commandées (laboratoire ISOPRIM, Toulouse) et nous parviennent sous forme lyophilisée. Elles sont alors remises en solution de concentration 200 $\mu$ M et conservées à moins 18°C.

#### **D. La réaction de polymérisation en chaîne.**

##### **1. Réalisation de la PCR et procédures anti contamination.**

La première étape de la PCR consiste à élaborer le mélange des réactifs ou «mix». Pour éviter les contaminations, le mix est toujours réalisé dans la même pièce, où l'ADN ne pénètre jamais. Les pipettes utilisées n'ont jamais servi à pipeter d'acides nucléiques, et sont munies de cônes à filtre. On applique un principe de «marche en avant»: on ne revient jamais dans cette pièce après la confection du mix.

La deuxième étape consiste à rajouter l'ADN, qui sert de matrice à la réaction, dans le mix. On utilise là aussi une pipette réservée à cet usage, et dotée de cônes à filtre pour éviter de la contaminer.

La manipulation comporte toujours un témoin négatif et un témoin positif. Dans le témoin négatif, l'ADN est remplacé par de l'eau. Ce témoin permet de contrôler que le mix n'a pas été contaminé. Le témoin positif contient de l'ADN de chat que l'on sait infecté, et doit donc toujours engendrer un résultat positif. Il permet de vérifier que la réaction d'amplification a fonctionné.

Les tubes sont ensuite déposés dans le thermocycleur qui effectue des cycles de température préprogrammés.

Nous nous proposons ici d'effectuer une PCR nichée. 1 $\mu$ L des produits amplifiés obtenus à la première PCR est donc transféré dans un second mix, et subit une deuxième PCR. Ce transfert est délicat puisqu'on manipule des produits amplifiés, potentiellement contaminants. Il est donc réalisé sous hôte à flux laminaire, à l'aide d'une pipette munie d'un cône à filtre et réservée à cet usage. Après la manipulation, les rayons ultra-violetts sont activés sous la hôte afin d'éliminer les amplicons qui ont pu s'échapper des échantillons.

##### **2. Réactifs**

Le volume de la réaction de PCR est fixé à 50  $\mu$ L par échantillon:

Première réaction: 20 $\mu$ L d'ADN + 30 $\mu$ L de mix

Deuxième réaction: 1 $\mu$ L d'ADN + 49 $\mu$ L de mix

Le mix se compose d'une série de réactifs tous indispensables à la PCR (GibcoBRL). Voici les concentrations auxquelles nous les avons utilisées :

	<b>Concentration initiale</b>	<b>Concentration Finale</b>	<b>Volume par échantillon</b>
<b>Amorces</b>	10µM	200nM	1µL
<b>dNTP</b>	2mM	200µM	5µL
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50µM	2mM	2µL
<b>Tampon</b>	10X	1X	5µL
<b>Taq polymérase</b>	5U/µL	1U/réaction	0.2µL

*Tab. VIII : Concentrations et volumes des réactifs utilisés pour la réalisation de PCR.*

On ajoute de l'eau aux réactifs pour obtenir le volume de mix souhaité.

### 3. Programme d'amplification

Il se déroule en 40 cycles de trois étapes:

- **Etape de dénaturation de l'ADN**, à 94°C pendant 25 secondes. Cette étape permet de séparer les double brins d'ADN.
- **Etape d'hybridation des amorces**, à 55°C pendant 25 secondes. Afin d'obtenir une hybridation efficace, la température est toujours choisie légèrement en dessous de la **température** donnée par le laboratoire qui synthétise les amorces.
- **Etape d'élongation**, à 72°C pendant 30 secondes. La Taq polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN cible. La durée de l'étape est fonction de la longueur du fragment amplifié: on programme environ une minute pour 1000 paires de bases. Nous amplifions ici des fragments de 500 paires de bases en moyenne, et choisissons donc une durée d'élongation de 30 secondes.

Deux étapes sont ajoutées avant et après les 40 cycles pour optimiser la réaction:

- Une étape de 3 minutes à 94°C avant le début du premier cycle pour séparer les double brins d'ADN contenus dans le mélange réactionnel.
- Une longue étape de 10 minutes à 72°C en fin de réaction pour permettre à la Taq polymérase de parfaire l'amplification.

Le programme se termine par une étape de conservation de l'ADN à 4°C de durée illimitée.

### E. Révélation de l'amplification

La révélation des produits amplifiés est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.2%. Le gel d'agarose contient du bromure d'éthidium (50µg/L). On dépose environ 10µL d'amplicons dans chaque puits. Un puits est réservé à un marqueur de poids moléculaire (1kb DNA ladder, Gibco BRL).

La lecture se fait sous rayons ultra-violet. Un système vidéo relié à un ordinateur permet de visualiser le gel et les bandes d'ADN à l'écran, d'enregistrer et d'imprimer une photo.

Le marqueur de poids moléculaire permet de déduire la longueur des fragments amplifiés.

## II. Résultats

### A. Réalisation du test en PCR simple.

#### 1. Vérification de l'efficacité des amorces.

En effectuant une PCR, nous voulons vérifier si les amorces que nous avons commandées donnent le résultat escompté. Nous utilisons de l'ADN de chat infecté respectivement par le FIV ou le FeLV (cet ADN ayant déjà fait l'objet d'un test par PCR utilisant d'autres amorces). La manipulation comporte également un témoin négatif.



*Fig. XVII : Test des amorces FeLV*

M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

A : Témoin négatif

B : Test avec ADN de chat infecté

1 : 1<sup>ère</sup> étape de PCR (PCR1)

2 : 2<sup>ème</sup> étape de PCR (PCR2)

1 2 1 2  
M A B



*Fig. XVIII : Test des amorces FIV*

M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

A : Témoin négatif

B : Test avec ADN de chat infecté

1 : 1<sup>ère</sup> étape de PCR (PCR1)

2 : 2<sup>ème</sup> étape de PCR (PCR2)

1 2 1 2  
M A B

Les signaux obtenus sont très nets. La distance parcourue pendant la migration par les fragments amplifiés correspond à la taille attendue. Le témoin négatif n'est pas contaminé (Les petites bandes observées dans le cas du test FIV correspondent à la présence résiduelle d'amorces). La manipulation s'est donc correctement déroulée et les amorces semblent convenir pour élaborer un test dépistage du FeLV et du FIV.

#### 2. Mise au point du test.

##### a. Élaboration de dilutions d'amplicons.

Afin de déterminer approximativement le seuil de détection de notre test, nous diluons des solutions de fragments amplifiés. Les solutions de départ sont constituées des produits

amplifiés par la première étape de PCR. Nous disposons de deux solutions, l'une contenant des amplicons de FeLV, l'autre de FIV. Ces amplicons sont d'abord purifiés à l'aide d'un kit de purification (High Pure PCR Product Purification Kit, Boehringer Mannheim). Les densités optiques des solutions obtenues sont mesurées par spectrophotométrie à 260 nm. On en déduit leur concentration (1DO<sub>260</sub> d'ADN double brin correspond à une concentration de 50µg/mL) :

FeLV: DO=0.05

FIV: DO=0.04

Les solutions de départ possèdent donc les concentrations suivantes:

FeLV: **2.5 ng/µL**

FIV: **2ng/µL**

Une solution de fragments d'ADN de 1000 pb à 50 µg/mL contient  $4.74 \cdot 10^{13}$  molécules par millilitre. Nous en déduisons la concentration moléculaire de nos solutions d'amplicons:

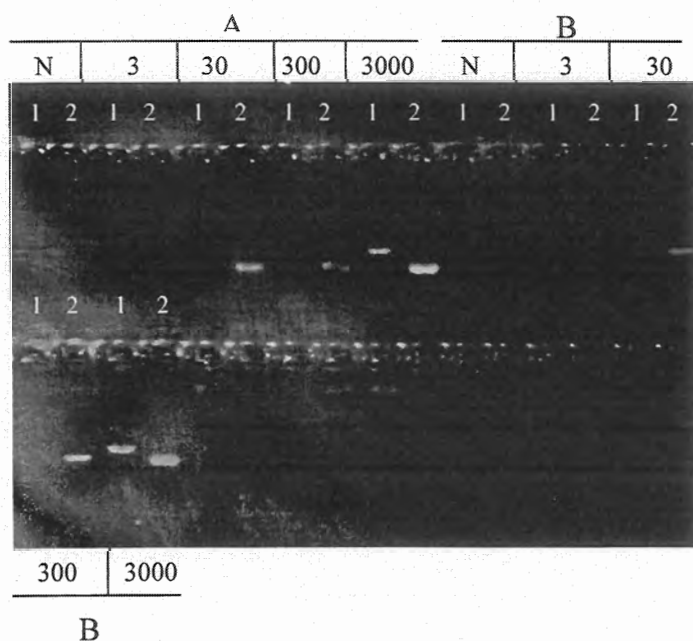
FeLV (770pb):  **$3.08 \cdot 10^{10}$  molécules/10µL**

FIV (615pb):  **$3.08 \cdot 10^{10}$  molécules/10µL**

Une dilution sériée de ces deux solutions nous permet d'obtenir des solutions de 3, 30, 300, 3000 et 30000 copies/10µL.

#### b. Détermination du seuil de détection.

Lors de la même PCR, nous amplifions séparément 3, 30, 300 et 3000 copies de fragments de FIV ou de FeLV : Chaque échantillon de la réaction contient 10 µL d'une dilution que nous avons préparée, 30 µl de mix et 10µL d'eau. Le témoin négatif contient 30µL de mix et 20 µL d'eau. La PCR nichée est réalisée en transférant 1 µL du produit de la première PCR vers la deuxième. Les paramètres de la réaction sont ceux exposés dans la partie «Matériel et Méthodes ».



**Fig. XIX : Détermination du seuil de détection des tests simples**

A : Amplification de FIV

B : Amplification de FeLV

N : Témoin Négatif

3, 30, 300, 3000 : Amplification à partir de 3, 30, 300 ou 3000 copies de fragments FIV ou FeLV

1 : 1<sup>ère</sup> étape de PCR (PCR1)

2 : 2<sup>ème</sup> étape de PCR (PCR2)

Les résultats obtenus dénotent d'une bonne sensibilité du test en PCR nichée : le premier signal apparaît lorsque la solution contient 30 copies de fragments de génome viral.

### c. Mise au point des paramètres

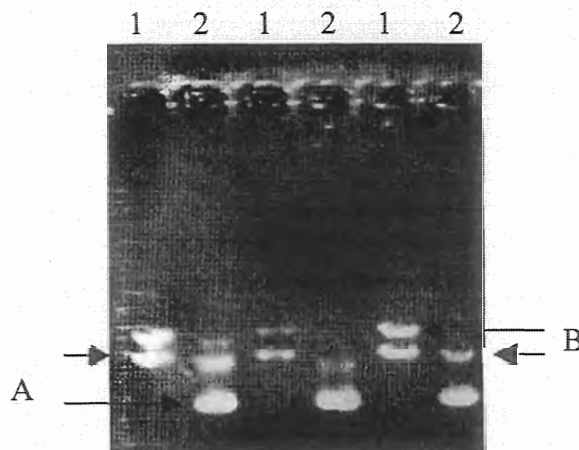
Pour déterminer la concentration optimale en  $MgCl_2$ , nous avons amplifié 3 échantillons d'ADN identiques, en faisant varier les concentrations en  $MgCl_2$  de 1.5mM, 2mM et 2.5mM. Les résultats étant sensiblement les mêmes, et la modification de concentration n'apportant pas d'amélioration à la sensibilité du test, nous avons conservé la concentration de 2mM qui convient aussi bien à l'amplification du FeLV que du FIV.

Nous avons également testé plusieurs températures d'hybridation (51°C, 53°C, 55°C et 57°C). L'amplification du FeLV est optimale à 55°C et celle du FIV à 53°C. Nous avons retenu la température convenant le mieux à l'amplification du FeLV et du FIV (en vue d'un test par PCR multiplex). La température de 55°C a été choisie.

## B. Mise au point du test en PCR multiplex.

### 1. Premiers essais

Pour commencer, le test multiplex est effectué sur de l'ADN de chat infecté à la fois par le FIV et le FeLV (résultat positif par un test PCR déjà au point). Nous conservons les paramètres choisis pour les tests simples. Les concentrations des réactifs restent inchangées, mais quatre amorces différentes (et non plus deux) sont déposées dans le mix : deux amorces sont destinées à l'amplification du FeLV, et deux à l'amplification du FIV. Il en est de même lors de la deuxième étape (PCR nichée).



**Fig. XX : Test Multiplex**

A : Amplification de FIV

B : Amplification de FeLV

1 : 1<sup>ère</sup> étape de PCR (PCR1)

2 : 2<sup>ème</sup> étape de PCR (PCR2)

Le test multiplex semble fonctionner : l'amplification s'est déroulée correctement puisqu'on observe deux bandes à chaque étape, la plus grande (donc la plus haute) correspondant au FeLV, la plus petite au FIV. Les fragments amplifiés sont de tailles suffisamment éloignées pour être distingués, après migration, sur le gel d'électrophorèse.

Cet essai concluant nous permet d'aller plus loin et de tenter de déterminer le seuil de détection du test en PCR multiplex.

On utilise pour cela les dilutions déjà préparées pour le test simple. Chaque échantillon contient 30  $\mu L$  de mix, 10  $\mu L$  de dilution d'amplicons FeLV et 10  $\mu L$  de dilution d'amplicons FIV. Un témoin positif et un témoin négatif sont inclus à la manipulation.

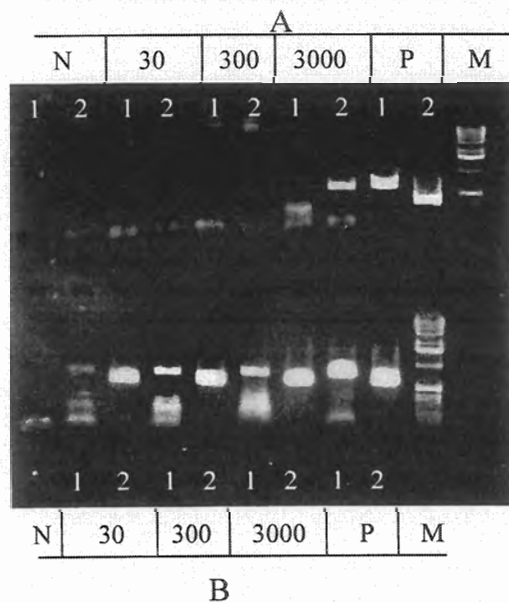
Le résultat est décevant : seul le témoin positif donne un signal d'amplification visible à l'électrophorèse, prouvant ainsi que la PCR s'est déroulée correctement. En revanche, l'amplification des fragments dilués qui, par PCR simple, donnait de bons résultats, n'est pas suffisante en PCR multiplex pour être détectée à l'électrophorèse. La sensibilité du test en PCR multiplex est donc nettement diminuée par rapport à celle des tests simples. Nous nous proposons donc de rechercher les causes de cette perte de sensibilité.

## 2. Recherche des causes de perte de sensibilité du test en PCR multiplex.

### a. Mise en cause des amorces

Le test multiplex diffère du test simple par la mise en présence des deux génomes viraux et des amorces qui permettent de les amplifier. Une hybridation non spécifique des amorces pourrait expliquer la diminution de la sensibilité du test en PCR multiplex: Les amorces FeLV et FIV, malgré le soin que nous avons apporté à leur choix, peuvent s'hybrider entre elles, ou à la séquence du génome viral à amplifier (amorces FIV sur la séquence du FeLV et inversement), et inhiber ainsi l'amplification.

Pour vérifier si la présence simultanée des deux couples d'amorces est responsable d'une diminution du seuil de détection, nous tentons d'amplifier, lors de la même PCR, les dilutions de fragments de FeLV avec deux mix différents : L'un contenant uniquement les amorces FeLV, l'autre les deux couples d'amorces.



**Fig. XXI : Amplification de FeLV en présence d'un ou deux couples d'amorces**

A : Amplification avec amorces FeLV et FIV

B : Amplification avec amorces FeLV seules

N : Témoin négatif

P : Témoin positif

M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

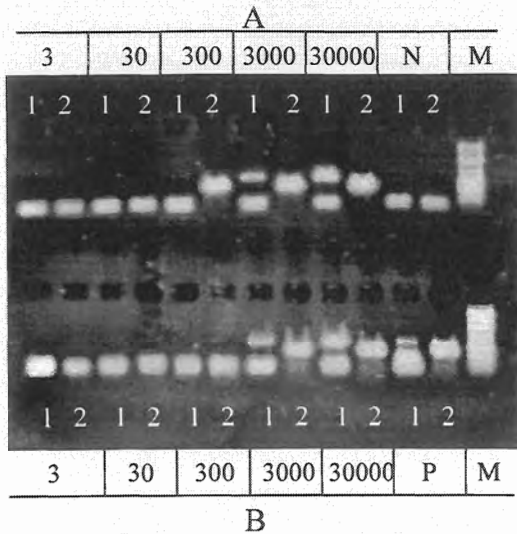
3, 30, 300, 3000 : Amplification à partir de 3, 30, 300 ou 3000 copies de fragments FIV ou FeLV

1 : 1<sup>ère</sup> étape de PCR (PCR1)

2 : 2<sup>ème</sup> étape de PCR (PCR2)

Il apparaît ici très nettement que l'ajout des amorces FIV dans le mix inhibe l'amplification du FeLV et donc diminue la sensibilité du test. Trente copies de FeLV suffisent, après amplification par PCR simple, à donner un signal visible à l'électrophorèse, alors qu'il en faut au moins trois mille pour que l'amplification par PCR multiplex soit détectable.

La même réaction est réalisée avec les dilutions de FIV. Mais l'amplification du FIV est moins inhibée par le test multiplex que celle du FeLV (Fig. XXII).



**Fig. XXII : Amplification de FIV en présence d'un ou deux couples d'amorces**

A : Amplification avec amorces FIV seules

B : Amplification avec amorces FeLV et FIV

N : Témoin négatif

P : Témoin positif

M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

3, 30, 300, 3000, 30000 : Amplification à partir de 3, 30,

300, 3000 ou 30000 copies de fragments FIV ou FeLV

1 : 1<sup>ère</sup> étape de PCR (PCR1)

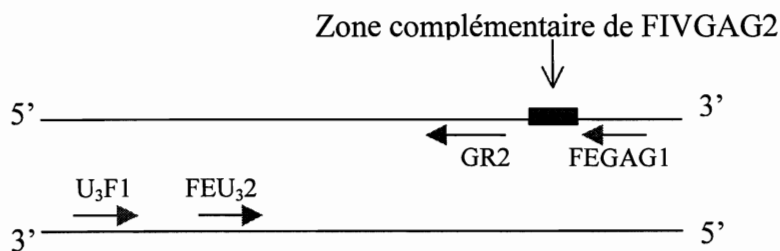
2 : 2<sup>ème</sup> étape de PCR (PCR2)

Nous choisissons donc de nous intéresser à la gêne que semblent provoquer les amorces du FIV sur l'amplification du FeLV.

b. Recherche d'une zone d'hybridation non désirée.

Nous suspectons les amorces FIV de se lier à la séquence à amplifier du FeLV ou aux amorces qui permettent cette amplification, et ainsi d'inhiber la réaction de PCR. Nous vérifions donc à nouveau les séquences de bases pour nous assurer qu'elles ne sont pas partiellement complémentaires. Nous ne trouvons aucune zone d'appariement possible entre les amorces FIVGAG1 et FIVGAG2 et les amorces FeGAG1 et U<sub>3</sub>F1. En revanche, une zone de six paires de bases sur le fragment à amplifier du génome du FeLV [929-934] est parfaitement complémentaire de la séquence de FIVGAG2 (Fig. XXIII). Cette zone est susceptible de provoquer une hybridation non désirée.

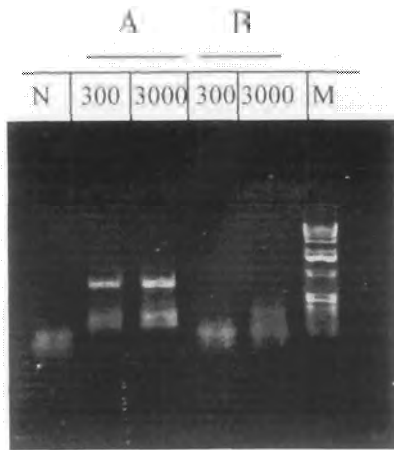
FIVGAG2 : 5' CTGGCTTAAGATGACTCATTGC 3'  
En gras : zone de complémentarité.



**Fig. XXIII : Positions respectives des amorces permettant l'amplification de FeLV, et de la zone potentielle d'hybridation de FIVGAG2**

Pour savoir si cette zone est responsable des mauvais résultats obtenus avec le test multiplex, nous réalisons une nouvelle PCR : Nous amplifions les dilutions des fragments de FeLV (300 et 3000 copies) d'une part avec les amorces U<sub>3</sub>F1 et FeGAG1 seules, d'autre part avec U<sub>3</sub>F1 et GR2 (utilisée normalement à la deuxième étape de PCR) auxquelles on ajoute

FIVGAG1 et FIVGAG2 (Fig. XXIV). Ceci nous permet en effet d'amplifier un fragment de FeLV ne contenant pas la zone critique sur laquelle FIVGAG2 peut s'hybrider, cette zone se trouvant entre la séquence cible de FeGAG1 et de GR2.



**Fig. XXIV : Amplification du FeLV avec différents couples d'amorces**

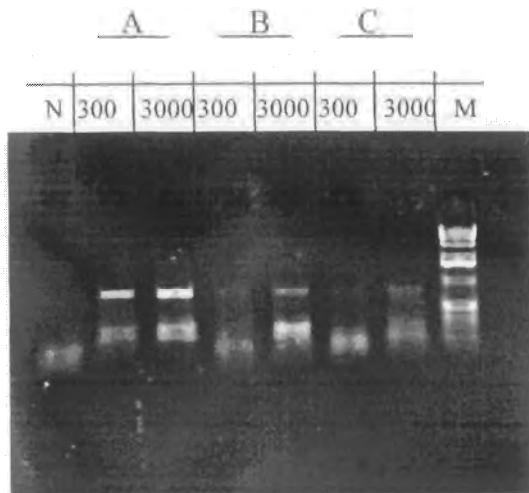
A : Amplification avec amorces U<sub>3</sub>F1 et FeGag1  
 B : Amplification avec amorces U<sub>3</sub>F1 et GR2 en présence de FIVGAG1 et FIVGAG2  
 300, 3000 : Amplification à partir de 300 ou 3000 copies de fragments FeLV  
 N : Témoin négatif  
 M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

La modification de la zone à amplifier n'a pas apporté d'amélioration. L'amplification reste moins efficace lorsque les amorces FIV sont présentes dans le mix. Notre hypothèse n'est donc pas vérifiée et il nous faut chercher une autre explication.

### c. Recherche de l'amorce responsable

Comme le défaut de sensibilité du test multiplex ne s'explique pas par une hybridation inopportune des amorces, nous nous proposons d'identifier quelle amorce, de FIVGAG1 ou 2, est responsable du problème.

Nous amplifions donc le fragment de FeLV avec U<sub>3</sub>F1 et FeGAG1 seules, en ajoutant au mix FIVGAG1 ou en lui ajoutant FIVGAG2.



**Fig. XXV : Amplification du FeLV avec U<sub>3</sub>F1 et FeGag1**

A : En l'absence de FIVGag1 et de FIVGag2  
 B : En présence de FIVGag1  
 C : En présence de FIVGag2  
 300, 3000 : Amplification à partir de 300 ou 3000 copies de fragments FeLV  
 N : Témoin négatif  
 M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

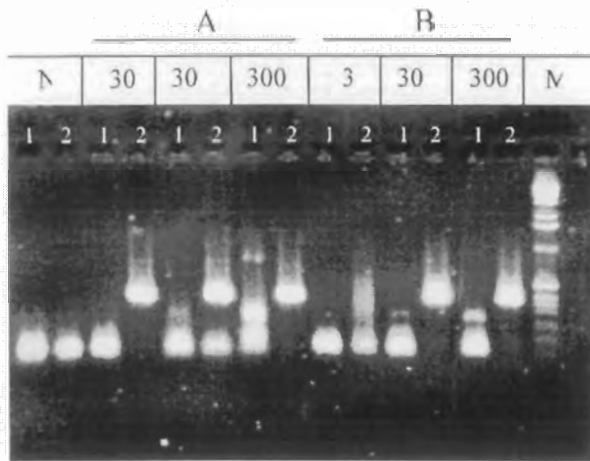
L'expérience montre que l'amplification est inhibée par FIVGAG1 comme par FIVGAG2. Cependant, FIVGAG2 semble encore plus gênante que FIVGAG1.

Ceci nous amène à réaliser une autre PCR. Nous cherchons ici à amplifier l'ADN du FeLV et du FIV (30 µL de mix, 10 µL de dilution FeLV, 10 µL de dilution FIV) en



remplaçant FIVGAG2 par FIVGAG4 (normalement utilisé lors de la deuxième étape de PCR). L'amplification «classique» avec FIVGAG2 est effectuée en parallèle (Fig. XXVI).

Le résultat n'est pas concluant puisque l'amplification n'est pas améliorée par l'élimination de l'amorce FIVGAG2



**Fig. XXVI : Amplifications simultanées du FeLV et du FIV**

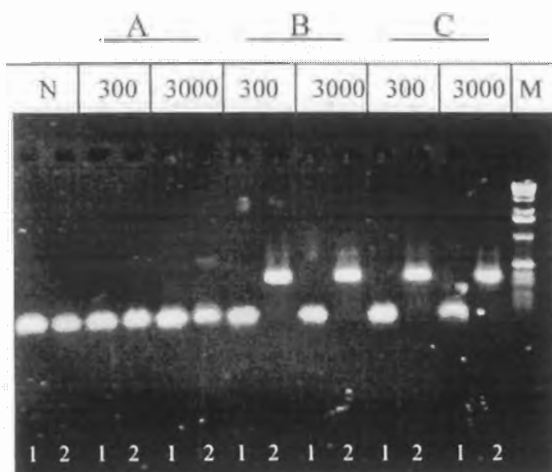
A : PCR1 avec amorces U<sub>3</sub>F1, FeGag1, FIVGag1 et FIVGag2  
 B : PCR1 avec amorces U<sub>3</sub>F1, FeGag1, FIVGag1 et FIVGag4  
 N : Témoin négatif  
 M : Marqueur de poids moléculaire 1kb  
 30, 300, 3000, : Amplification à partir de 30, 300 ou 3000 copies de fragments FIV ou FeLV

Nous n'avons donc pas réussi à déterminer comment les amorces FIV inhibent la réaction d'amplification du FeLV. Nous pouvons simplement supposer qu'il s'agit d'un problème d'encombrement stérique, ou que les paramètres de la réaction ne sont pas adaptés au test multiplex. Nous allons donc chercher à améliorer ce test.

### 3. Essais d'amélioration de la sensibilité du test en PCR multiplex.

#### a. Modification de la température.

En diminuant la température pendant la phase d'hybridation des amorces, on augmente la sensibilité de la réaction. Ainsi, nous essayons de passer de 55°C à 51°C pour la première étape de PCR et à 53°C pour la seconde (et non pas à 51°C afin de conserver une bonne spécificité). La réaction est réalisée avec les dilutions de 300 et 3000 copies pour 10 µL. On utilise les deux couples d'amorces (FIV et FeLV) à chaque étape. On dépose dans le mix l'ADN de FeLV seul, l'ADN de FIV seul, ou les ADN des deux virus ensemble.



**Fig. XXVII : Amplification à 51°C (1<sup>ère</sup> étape) et 53°C (2<sup>ème</sup> étape)**

A : Amplification de FeLV  
 B : Amplification de FIV  
 C : Amplification simultanée de FeLV et FIV  
 N : Témoin négatif  
 M : Marqueur de poids moléculaire 1kb  
 300, 3000 : Amplification à partir de 300 ou 3000 copies de fragments FIV et/ou FeLV  
 1 : Première étape d'amplification  
 2 : Deuxième étape d'amplification

Seul l'ADN du FIV est amplifié, le FeLV n'apparaît pas du tout à l'électrophorèse. La diminution de température n'a pas amélioré la sensibilité de l'amplification du FeLV en PCR multiplex.

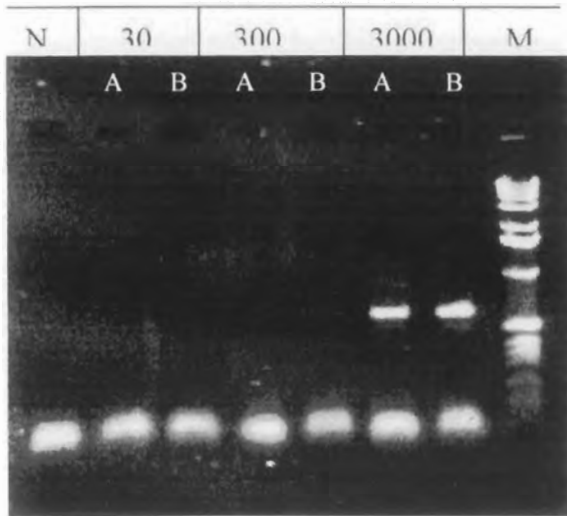
Une autre PCR a été effectuée à 57°C, mais n'a pas apporté d'amélioration non plus.

b. Modification de la concentration en MgCl<sub>2</sub>.

Les concentrations en MgCl<sub>2</sub> de 1.5, 2 et 2.5 mM sont comparées en PCR multiplex. Mais aucune n'améliore le seuil de détection du FeLV.

c. Modification de la quantité d'ADN.

En PCR nichée, il arrive que le produit de la première étape de PCR soit trop concentré et inhibe la seconde étape d'amplification. Ainsi, on obtient parfois de bien meilleurs résultats en le diluant avant de l'introduire dans le mix de la deuxième PCR. Nous avons donc tenté d'amplifier l'ADN du FeLV seul (dilutions 30, 300 et 3000), dans une PCR à 55°C, utilisant les amorces destinées au FeLV et au FIV. Les fragments amplifiés obtenus à la première étape sont dilués au dixième. 1 µL de cette dilution sert de matrice à la seconde étape d'amplification. La réaction sans dilution est effectuée en parallèle pour servir de point de comparaison.



**Fig. XXVIII : Amplification de FeLV avec dilution de l'ADN matrice pour la seconde PCR**

A : Amplification sans dilution de l'ADN matrice.

B : Amplification avec dilution de l'ADN matrice.

N : Témoin négatif

M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

30, 300, 3000 : Amplification à partir de 30, 300 ou 3000 copies de fragments FeLV

Les fragments visualisés aux ultra violets présentent la même intensité, que les produits de la première amplification aient été dilués ou non. La dilution des produits de la première étape n'a donc pas apporté d'amélioration.

d. Modification de la concentration des amorces.

Pour augmenter la sensibilité de l'amplification du FeLV, nous nous proposons de doubler la quantité des amorces FeLV. La réaction est réalisée avec :

U<sub>3</sub>F1 : 2 µL/échantillon

FIVGAG1 : 1 µL/échantillon

FeGAG1 : 2 µL/échantillon

FIVGAG2 : 1 µL/échantillon

FeU<sub>3</sub>2 : 1 ou 2 µL/échantillon

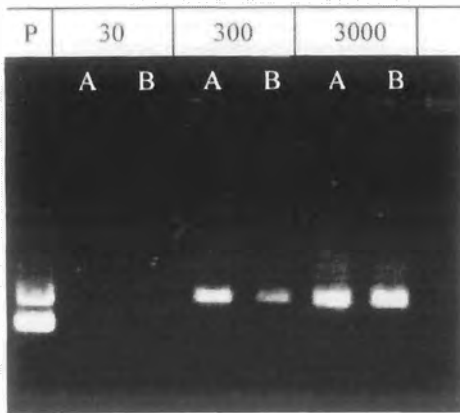
FIVGAG3 : 1 µL/échantillon

GR2 : 1 ou 2 µL/échantillon

FIVGAG4 : 1 µL/échantillon

Cette expérience n'améliore pas les résultats de la première étape. En revanche, à la seconde étape, on observe une amplification du FeLV dès la dilution de 300 copies/10µL

(Fig. XXIX). C'est la première fois qu'on obtient un aussi bon résultat en présence des amorces du FIV (le seuil de détection est normalement situé à 3000 copies/10 µL).



**Fig. XXIX : Amplification du FeLV avec concentration en amorces doublée**

A : Concentration doublée pour la première étape d'amplification seulement.

B : Concentration doublée pour la première et la seconde étape d'amplification

N : Témoin négatif

M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

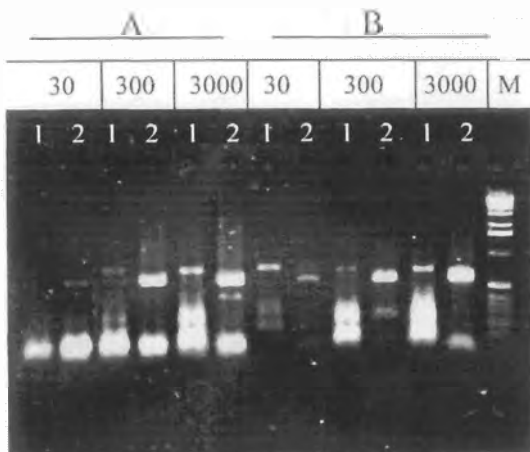
30, 300, 3000 : Amplification à partir de 30, 300 ou 3000 copies de fragments FeLV

Ainsi, le fait de doubler la quantité d'amorces destinées au FeLV lors de la première étape de la PCR nichée semble améliorer la sensibilité du test. Cette amélioration n'est détectable qu'à la seconde étape de la PCR.

#### e. Modification de l'enzyme polymérase.

Nous avons recours à une polymérase inactive à température ambiante, et qui n'est activée qu'à forte température, lors de la première étape de dénaturation de la PCR. Elle limite ainsi les amplifications non spécifiques qui peuvent être initiées lors de la confection du mix. En conséquence, elle permet aussi d'améliorer le rendement et la sensibilité de la réaction.

Nous amplifions les dilutions d'ADN de FeLV, en présence des amorces destinées au FeLV et au FIV, avec une polymérase classique (Taq, GibcoBRL) ou la polymérase Hot Start (Platinum Taq DNA Polymerase, GibcoBRL).



**Fig. XXX : Amplification du FeLV avec deux polymérases différentes :**

A : Polymérase classique Taq Qiagen

B : Polymérase Hot start Qiagen

30, 300, 3000 : Amplification à partir de 30, 300 ou 3000 copies de fragments FeLV

M : Marqueur de poids moléculaire 1kb

1 : Première étape d'amplification

2 : Deuxième étape d'amplification

L'amplification de la dilution 30 est améliorée par l'utilisation de l'enzyme Hot start. Nous choisissons donc de continuer à l'utiliser pour le test multiplex.

f. Vérification de la fiabilité du test multiplex «amélioré».

Nous réalisons en parallèle une PCR simple et une PCR multiplex sur des échantillons d'ADN de chats, afin de vérifier que les deux tests sont équivalents en terme de dépistage, et donnent les mêmes résultats.

Le test multiplex «amélioré» est utilisé : La réaction est réalisée avec l'enzyme Hot Start et la quantité d'amorces FeLV est doublée pour la première étape d'amplification.

Les échantillons donnant un résultat FeLV positif et n'apparaissant qu'à la deuxième étape de PCR du test simple ne sont pas amplifiés par le test multiplex.

Nous essayons de modifier encore les paramètres de la réaction de façon à améliorer la sensibilité du test multiplex. Nous augmentons la durée de la première étape de dénaturation (5 minutes) afin d'activer efficacement l'enzyme Hot start. La résistance de l'enzyme Hot start nous autorise également à augmenter le nombre de cycles de chaque réaction (45 cycles pour la PCR1, 50 pour la PCR2).



**Fig. XXXI : Test Multiplex sur 5 échantillons d'ADN de chats.**

A, B, C, D, E et F : échantillons à tester.  
N : Témoin négatif  
M : Marqueur de poids moléculaire 100 pb  
1 : Première étape d'amplification  
2 : Deuxième étape d'amplification

Les résultats obtenus avec le test multiplex concordent parfaitement avec ceux du test simple. Le chat A et le chat B sont positifs pour le FeLV, et ne sont détectés qu'après la deuxième amplification, aussi bien avec le test simple qu'avec le test multiplex. Le chat C est détecté positif pour le FeLV uniquement, dès la première amplification. Le chat D est positif pour le FIV uniquement, après la deuxième amplification. Les chats E et F sont détectés à la fois positifs pour le FeLV et le FIV.

La présence de FeLV dans les échantillons A et B n'est dépistée par le test simple qu'après la deuxième étape d'amplification, ce qui traduit que le virus est présent en faible quantité. Nos expériences précédentes ont montré que le test multiplex était moins sensible que le test simple, notamment pour amplifier le FeLV. Il l'est cependant suffisamment pour mettre en évidence le virus dans les échantillons A et B. Il en est de même concernant l'échantillon D et le FIV. Le test multiplex «amélioré» apparaît donc assez sensible pour rivaliser avec le test simple et permettre de diagnostiquer les rétroviroses félines en routine.

### III. Discussion.

Notre étude propose un test de dépistage des virus FeLV et FIV. Le traitement efficace contre la leucose et le syndrome d'immunodéficience du chat n'a certes pas encore été découvert, mais il reste très important d'identifier les animaux porteurs : ceci permet d'intervenir efficacement lors d'affections banales afin de prévenir les complications potentielles dues à l'immunodépression, mais aussi d'isoler les chats infectés et d'éviter ainsi la propagation du virus.

Pour élaborer ce test, nous avons choisi d'utiliser la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR. Cet outil permet d'amplifier un fragment du génome viral sous sa forme de provirus, c'est à dire sous forme d'ADN intégré au génome de la cellule hôte. Nous avons essentiellement travaillé avec des prélèvements sanguins, mais la PCR peut être réalisée à partir de n'importe quelles cellules de l'organisme.

Nous avons choisi cette technique parce qu'elle se prête particulièrement bien au dépistage des rétrovirus. Elle permet en effet de les détecter là où les tests de recherche d'anticorps ou d'antigènes échouent. C'est le cas lorsque les virus ne se multiplient pas (virus latents ou défectueux) ou se multiplient de manière localisée (formes tumorales, lésions de stomatite...). Ils n'en sont cependant pas moins pathogènes ! Le FeLV a ainsi été plusieurs fois mis en évidence par PCR dans des tumeurs lymphoïdes, alors que les tests de recherche d'antigènes dans le sang s'étaient avérés négatifs [63]. La PCR est aussi très utile pour le diagnostic du FIV. Les tests sérologiques sont en effet limités dans certains cas : Dépistage des chatons porteurs d'anticorps maternels, de chats fortement immunodéprimés (en fin de maladie par exemple) et dont le titre en anticorps est insuffisant pour être mis en évidence... La PCR permet de déterminer si ces chats sont infectés ou non, ce qu'un test sérologique n'est pas en mesure de nous indiquer.

Nous nous sommes appliqués à rendre notre test fiable, sensible et spécifique. Les prélèvements de sang ont été effectués sur EDTA et non sur héparine, qui peut inhiber la PCR et donc affecter sa sensibilité. A chaque réaction, un contrôle négatif et positif ont été réalisés pour garantir la fiabilité des résultats. De nombreuses mesures visant à éviter des contaminations par des fragments de virus amplifiés ont été prises (salle réservée à la confection du mix, pipettes réservées à la manipulation d'échantillons dépourvus d'ADN, contenant de l'ADN non amplifié ou contenant de l'ADN amplifié, utilisation de cônes à filtre, destruction des fragments amplifiés potentiellement contaminants par rayonnements ultra violets...).

Pour obtenir un test très sensible, nous avons choisi de réaliser deux étapes de PCR successives, ou PCR nichée. Dans certain cas, le virus n'est en effet détectable qu'à l'issue de la deuxième amplification. Il est possible d'atteindre, par une seule réaction d'amplification, un seuil de détection équivalent à celui de la PCR nichée, mais il faut procéder auparavant à une culture des cellules [54]. Ceci est très long à réaliser et la PCR nichée nous est apparue bien plus pratique. Pour augmenter la sensibilité du test, nous aurions également pu centrifuger les prélèvements de sang pour isoler le «buffy coat » et travailler ainsi directement sur les cellules susceptibles d'être infectées. Nous n'avons pas mis en oeuvre cette méthode mais elle pourrait représenter une solution au problème de sensibilité que nous avons rencontré avec le test multiplex.

Le choix des amorces et des régions à amplifier a été mûrement réfléchi. Nous avons cherché à éviter toute zone d'appariement défavorable au bon déroulement de l'amplification. Pour amplifier le FeLV, nous avons choisi de situer les séquences cibles de deux amorces

dans la région U<sub>3</sub> du provirus. Cette région permet en effet de distinguer le virus exogène et pathogène que nous recherchons, d'un autre virus FeLV endogène au génome félin et non pathogène.

Malgré toutes ces précautions, le test que nous avons mis au point n'est pas parfait !

Nous avons cherché à obtenir un seuil de détection le plus faible possible, mais on peut encore se trouver en dessous. Nous travaillons à partir d'un petit nombre de cellules sanguines (300µL de sang). Quand l'ADN en est extrait, nous en pipetons un très petit volume (10µL) afin de l'amplifier. Le prélèvement sanguin et le pipetage sont aléatoires. Si les cellules infectées sont peu nombreuses, elles peuvent donc nous échapper ou être prélevées en nombre insuffisant pour mettre en évidence le virus. Ce type de situation, que l'on rencontre plutôt dans le cas d'infection par le FIV, n'est cependant susceptible de se produire qu'avec des chats dont la charge virale est minime.

La sensibilité du test n'est pas toujours responsable de la non détection d'un chat contaminé. Dans certains cas, le FeLV est en latence dans la moelle osseuse, les tissus épithéliaux ou les tumeurs qu'il engendre [78, 87, 2]. Une amplification à partir d'un prélèvement de sang ne permet alors pas de le dépister et peut aboutir à un résultat faussement négatif. La mise en évidence n'est alors possible qu'en effectuant la PCR à partir des cellules des tissus infectés. Certes, le test de diagnostic par PCR présente un avantage essentiel vis à vis des tests rapides : il permet de mettre en évidence le virus lorsqu'il ne se multiplie pas. Cependant, il est indispensable de prélever le tissu dans lequel le virus s'est « installé » pour pouvoir le détecter.

Nous avons pu constater que le test simple permet une amplification efficace des souches FeLV et FIV qui circulent en France. En revanche, rien ne nous assure de l'efficacité du test vis à vis des souches étrangères. Les séquences du génome viral, et en particulier du FIV, varient en effet beaucoup d'une souche à l'autre. Les séquences cibles des amorces que nous avons choisies ne sont donc pas forcément conservées. L'utilisation de notre test se limite donc à la France, voire à l'Europe, où les souches sont encore proches.

Pendant plus d'un an, nous avons testé des chats présentés à la consultation de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Les prélèvements qui nous parvenaient étaient essentiellement du sang, mais il nous a été également possible de contrôler l'efficacité du test sur des prélèvements de tissus (foie, rate, tube digestif, nœuds lymphatiques...) ou de fluides biologiques (liquide céphalo-rachidien...). A titre indicatif, nous donnons ici les résultats obtenus avec le test simple (le test multiplex étant moins sensible). Nous avons reçu 73 prélèvements de chats dont les symptômes évoquaient une infection par le FIV ou le FeLV. 23 (31.5%) donnèrent des résultats positifs pour le FIV et 23 (31.5%) pour le FeLV. Parmi eux, 11 (15.07%) étaient positifs pour les deux virus. Nous avons aussi reçu 25 prélèvements de chats sains, dont les propriétaires désiraient connaître le statut. 10 prélèvements (40%) s'avèrent positifs pour le FIV, 5 (20%) pour le FeLV. 2 prélèvements (8%) étaient positifs pour les deux virus. Pour certains chats, un test de dépistage fondé sur la recherche d'antigènes ou d'anticorps (ELISA, immunomigration rapide ou Western Blot) avaient été réalisés avant la PCR. Sur 20 prélèvements de chats symptomatiques soumis au test de recherche d'antigènes de FeLV, 2 résultats seulement discordèrent avec ceux de la PCR. Sur les 15 prélèvements testés pour la présence d'anticorps anti FIV, un seul résultat discordant fut noté. Parmi les chats sains, la recherche d'antigènes FeLV fut réalisée sur 5 prélèvements, dont 2 discordèrent avec les résultats PCR. La recherche d'anticorps anti FIV fut réalisée sur 3 prélèvements, dont un discordant. Tous les cas de discordance s'avèrent positifs en PCR et négatifs pour la recherche d'antigènes ou d'anticorps. Cependant, dans la majorité des cas, les résultats des différentes techniques concordaient, ce qui nous conforta dans la fiabilité de

notre test. Parmi les cas discordants, on observe en particulier que les résultats « douteux » à l'ELISA donnent souvent des signaux franchement positifs à la PCR. Ceci avait déjà été constaté lors d'une étude comparant les deux méthodes de diagnostic [64].

Malgré toutes les améliorations que nous avons cherchées à apporter au test multiplex, nous n'avons pas réussi à le rendre aussi sensible que le test simple. Les échantillons de sang qui nous ont été confiés ont donc été testés par PCR simple. Des hybridations indésirables (entre amorces FeLV et FIV ou avec les séquences à amplifier), semblaient être l'explication la plus vraisemblable à cette perte de sensibilité. Plusieurs vérifications des séquences nous ont cependant conduit à écarter cette hypothèse. Les modifications des paramètres de la PCR (concentrations en réactifs, températures de la réaction...) n'ont pas non plus résolu le problème. En ayant recours à une enzyme polymérase «Hot start », en doublant la quantité d'amorces FeLV et en augmentant le nombre de cycles de la réaction, nous avons cependant réussi à améliorer la sensibilité du test. La perte de sensibilité du test en PCR multiplex reste néanmoins inexplicée. L'encombrement stérique dû à l'ajout d'un couple d'amorces dans le mix en est peut être responsable.

Le test multiplex reste cependant compétitif concernant le diagnostic des rétroviroses félines. Les résultats obtenus par test simple et multiplex sur plusieurs échantillons d'ADN de chats concordent en effet parfaitement, et ceci même lorsque la charge virale est faible (échantillons positifs seulement à la deuxième étape d'amplification). Cette observation reste cependant à vérifier sur un nombre plus conséquent d'échantillons. Le test multiplex que nous avons mis au point pourrait donc être utilisé en routine pour le diagnostic. Il possède en effet de nombreux avantages sur le test simple : il permet de dépister simultanément deux virus capables de coinfecter le chat, et à l'origine d'un tableau clinique très proche. Il rivalise sur ce point avec les tests rapides. Sa mise en œuvre, de plus, ne nécessite qu'une seule PCR pour les deux virus, ce qui réduit le temps de travail et la quantité de réactifs à utiliser, donc le prix de revient de la manipulation. Toutefois, il devrait être utilisé avec plus de réserve pour la détermination de statut de chat asymptomatiques, pour laquelle le test simple, plus sensible, paraît plus approprié.

Quoi qu'il en soit, la simplicité de mise en œuvre du test par PCR ne fait pas de doute : Il ne nécessite qu'une très petite quantité de sang ou de tissu, ce qui rend le prélèvement plus facile. La manipulation est simple et sans danger et les résultats peuvent être obtenus en 24 heures. De plus, il est très utile pour dépister le virus dans les cas où les tests rapides s'avèrent inefficaces. Il permet donc de diagnostiquer davantage de cas d'infection que les tests rapides, mais certains peuvent encore lui échapper (charge virale inférieure au seuil de détection, virus localisé dans un tissu non prélevé...).

Le test par PCR représente donc une amélioration sur le plan du dépistage des rétroviroses félines. Il peut nous permettre de mieux connaître ces virus et de lutter plus efficacement contre leur propagation.





## **Conclusion :**

La PCR apparaît comme un nouveau moyen, efficace et fiable, de diagnostiquer les rétroviroses félines. En effet, elle permet parfois, comme nous l'avons évoqué dans ce mémoire, de mettre en évidence le FeLV et le FIV là où les tests rapides échouent. Elle reste cependant bien moins utilisée que ces derniers. Son coût et sa réalisation exclusive en laboratoire rebutent en effet la plupart des vétérinaires praticiens, qui préfèrent avoir recours aux tests rapides, réalisables pendant la consultation. Néanmoins, de plus en plus de vétérinaires adoptent la PCR pour confirmer un test rapide douteux. C'est le cas par exemple lorsque le signal positif n'est pas franc ou lorsque le résultat ne concorde pas avec les commémoratifs ou la suspicion du clinicien.

La PCR n'améliore pas le diagnostic seulement sur le plan qualitatif, puisqu'elle peut également fournir des renseignements mesurables. Les techniques actuelles de PCR quantitative permettent de mesurer précisément la charge virale des animaux infectés. Des études s'appuyant sur cette technique pourront peut être mettre en évidence une corrélation entre le degré d'infection des chats et le stade clinique.

Les progrès engendrés par la PCR pour le dépistage du FeLV et du FIV trouvent leur application dans le diagnostic, et peuvent avoir des répercussions dans d'autres domaines. Les études épidémiologiques devraient être actualisées à l'aide de la PCR. En effet, la littérature ne fait état que d'enquêtes pour la plupart anciennes, et toutes réalisées avec des tests rapides. La prévalence des rétroviroses félines a donc certainement été jusqu'ici sous estimée. Les études relatant l'efficacité des traitements et des vaccins pourraient également être vérifiées et précisées en utilisant la PCR, voire la PCR quantitative. Enfin, un recours plus systématique à la PCR permettrait de détecter d'avantages de cas de rétroviroses et d'améliorer ainsi la prophylaxie sanitaire.

En médecine vétérinaire, le diagnostic par PCR ne se limite pas aux rétroviroses félines : la PCR représente une alternative de choix aux méthodes de diagnostic de la maladie de Carré, de la leishmaniose, des affections dues aux herpes virus... La PCR apparaît donc comme un outil d'avenir en matière de dépistages des microorganismes pathogènes, et promet d'apporter de nombreuses informations permettant de faire progresser la recherche fondamentale et appliquée.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**Mlle Frédérique SABOURDY**

a été admis(e) sur concours en : 1994

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 juillet 1998

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussignée, C. CAMUS, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

déclare que j'ai lu la thèse de :

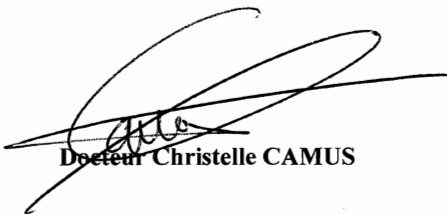
**Mlle Frédérique SABOURDY**

intitulée :

*Diagnostic par PCR des rétrovirus félines.*

et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



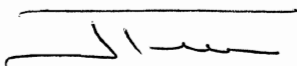
**Docteur Christelle CAMUS**

**Vu :  
Le Directeur par intérim  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



**Professeur Gilbert BONNES**

**Vu :  
Le Président de la thèse :**



**Professeur Jacqueline PUEL**

**Vu le : 11/07/2001  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier**



**Professeur Raymond BASTIDE**

## Références Bibliographiques.

1. ACKLEY, C.D., YAMAMOTO, J.K., LEVY, N., *et al.* Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with Feline Immunodeficiency Virus. *J. Virol.*, 1990, **64**, 5652-5655.
2. ARJONA A., ESCOLAR E., SOTO I., *et al.* Seroepidemiological survey of infection by Feline Leukemia Virus and Immunodeficiency Virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 3448-3449.
3. AUGUST, J.R. Feline infectious diseases part I. Feline leukemia virus : Epizootiology and control. *Compendium on continuing education for the practicing veterinary*, 1986, **7**, 49-52.
4. AVRAMEAS, A., STROSBERG, A.D., MORAILLON, A., *et al.* Serological diagnosis of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) infection based on a synthetic peptides from Env glycoproteins. *Res. Virol.*, 1993, **144**, 209-218.
5. BARR, M.C. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin. Vet. Med. Surg., Small Animal*, 1996, **11**, 144-153.
6. BARR, M.C., POUGH, M.B., JACOBSON, R.H. et SCOTT FW. Comparison and interpretation of diagnostic tests for Feline Immunodeficiency Virus infection . *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 1377-1381.
7. BEEBE, A.M., DUA, N., FAITH, T.G., *et al.* Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J Virol.*, 1994, **68**, 3080-3091.
8. BENNETT, M. et SMYTH, N.R. Feline immunodeficiency virus : A brief review. *Br.Vet. J.*, 1992, **148**, 399-412.
9. BERRY, B.T., GHOSH, A.K., KUMAR, D.V., *et al.* Structure and function of endogenous Feline Leukemia Virus long terminal repeats and adjoining regions. *J. Virol.*, 1988, **62**, 3631-3641.
10. BRALEY, J. FeLV and FIV : Survey shows prevalence in the United States and Europe. *Feline-Practice*, 1994, **22** , 25-28.
11. CALLANAN, J.J. Feline immunodeficiency virus infection : a clinical and pathological perspective. In: WILLETT, B.J. et JARRETT, O. Feline immunology and immunodeficiency. Oxford : Oxford Science Publications, 1995, 111-130.
12. CALZOLARI, M., YOUNG E., COX D., DAVIS D. et LUTZ H.: Serological diagnosis of Feline Immunodeficiency Virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1995, **46**, 83-92
13. CASEY, J.W., ROACH, A., MULLINS, J.I., *et al.* The U<sub>3</sub> portion of Feline Leukemia Virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 7778-7782.
14. COFFIN, J.M. Retroviridae : The viruses and their replication. In : FIELDS, B.N., KNIPE D.M., HOWLEY, P.M., *et al.*. Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia : Lippincott-Raven publishers, 1996. 1767-1848.
15. COTTER, S.M. Feline viral neoplasia. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1998. 71-84.
16. COTTER, S.M.. Feline viral neoplasia. In : GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphie : WB Saunders, 1990, 316-334.
17. COURCHAMP, F., PONTIER, D., FROMONT, E., et ARTOIS, M. Impact of two feline retroviruses on natural populations of domestic cat. *Mammalia*, 1995, **59**, 589-598.

18. CUMINET, J.M. Contribution à l'étude de l'infection du chat par le FIV, Virus de l'immunodéficience féline : Connaissances actuelles et diagnostic. Th. : Med. Vet. : Lyon : 1994; n°043. 150 p.
19. DANAVE, I.R., TIFFANY-CASTIGLIONI, E., ZENGER, E., *et al.* Feline Immunodeficiency Virus Decreases cell-cell communication and Mitochondrial membrane potential. *J Virol.*, 1994, **68**, 6745-6750.
20. DANDEKAR, S., BEEBE, A.M., BARLOGH, J. *et al.* Detection of Feline Immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats. *J.Virol.*, 1992, **66**, 4040-4049.
21. DAY, N.K., O'REILLY-FELICE, C., HARDY, W.D.Jr., *et al.* Circulating immune complexes associated with naturally occurring lymphosarcoma in pet cats. *J. Immun.*, 1980, **126**, 2363-2366.
22. DEAN, G.A., REUBEL, G.H., MOORE, P.F. *et al.* Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. *J. Virol.*, 1996, **70**, 5165-5169.
23. DEHL, L.J., MATHIASON-DUBARD, C.K., O'NEIL, L.L., *et al.* Longitudinal assesment of feline immunodeficiency virus kinetics in plasma by use of a quantitative competitive reverse transcriptase PCR. *J.Virol.*, 1995, **69**, 2328-2332.
24. DEL FIERRO, G.M., BUNDESEN, P., MARTIN, S., *et al.* Evaluation of an autologous red cell agglutination test, VetRED FIV™, for the presence of FIV antibody in cats. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 1995, **46**, 93-101.
25. EGBERINK, H., BORST, M., NIPHUIS, H., *et al.* Supression of Feline Immunodeficiency Virus infection in vivo by 9-,2-phosphonomethoxyethyl adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 3087-3091.
26. EGBERINK, H.F., LUTZ, H. et HORZINEK, M.C. Use of western blot and radioimmunoprécipitation for diagnosis of Feline Leukemia and Feline Immunodeficiency Virus infections. *J Am Vet Mes Assoc.*, 1991, **199**, 1339-1342.
27. ELDER, J.H. et PHILLIPS, T.R. Feline immunodeficiency virus as a model for development of molecular approaches to intervention strategies against lentivirus infections. *Adv. virus res.*, 1995, **45**, 225-247.
28. ELDER, J.H. et PHILLIPS, T.R. The genomic organisation of feline immunodeficiency virus. In: WILLETT, B.J. et JARRETT, O. Feline immunology and immunodeficiency. Oxford : Oxford Science Publications, 1995, 220-237.
29. ELYAR, J.S., TELLIER, M.C., SOOS, J.M. *et al.* Perspectives on FIV vaccine development. *Vaccine*, 1997, **15**, 1437-1444.
30. ENGELMAN, R.W., TYLER, R.D., TRANG, L.Q., *et al.* Clinicopathologic responses in cats with feline leukemia virus-associated leukemia-lymphoma treated with staphylococcus protein A. *Am. J. pathol.*, 1985, **118**, 367-378.
31. ENGLISH, R.V., JOHNSON, C.M., GEBHARD, D.H. *et al.* In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 1993, **67**, 5175-5186.
32. FENNER, F.J., GIBBS, E.P.J, MURPHY, F.A., *et al.* Retroviridae. In : Veterinary virology. Second edition. San Diego : Academic Press, 1993, 561-594.
33. FLYNN, J.N., BEATTY, J.A., CANNON, C.A, *et al.* Involvement of gag- and env-specific cytotoxic T lymphocytes in protective immunity to Feline Immunodeficiency Virus . *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 1995, **11**, 1107-1113.
34. FLYNN, J.N., CANNON, C.A., LAWRENCE, C.E., *et al.* Polyclonal B-cell activation in cats infected with feline Immunodeficiency Virus. *Immunology*, 1994, **81**, 626-630.
35. FLYNN, J.N., CANNON, C.A., REID, G., *et al.* Induction of Feline Immunodeficiency Virus-specific cell mediated and humoral immune responses following immunization

- with a multiple antigenic peptide from the envelope V3 domain. *Immunology*, 1995, **85**, 171-175.
36. FROMONT, E. Analyse comparative de la circulation de deux rétrovirus dans des populations naturelles de chats (*Felis catus*). Mémoire de DEA : Lyon : Université Claude-Bernard, Lyon 1 : 1994.
  37. GOFFLOT, C. Rétroviroses félines pathogènes : Enquête portant sur 6048 chats testés à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Th. : Med. Vet. : Créteil : 1994; n°086. 115 p.
  38. GOHIN, P., FOURNIER, A., OUALIKENE, W., *et al.* Immunization trial of cats with a replication-defective adenovirus type 5 expressing the *ENV* gene of Feline Immunodeficiency Virus. *Vet. Microbiol.*, 1995, **45**, 393-401.
  39. GREGORY, C.R., GRIFFEY, S.M., PATZ, J.D. *et al.* Effects of insulin-like growth factor-1 and AZT in cats experimentally infected with FIV. *Feline pract.*, 1997, **25**, 23-31.
  40. GRINDEM, C.B., CORBETT, W.T., AMMERMAN, B.E., *et al.* Seroepidemiologic survey of Feline Immunodeficiency Virus infection in cats of Wake county, North California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **194**, 226-228.
  41. GRUFFYDD-JONES, T.J., *et al.* A comparative study on the effects of a canaripox based recombinant leukemia vaccine (EURIFEL®FeLV) against a natural FeLV challenge in cats. 1999, proceedings du 24<sup>ème</sup> congrès mondial de la WSAVA.
  42. GRUFFYDD-JONES, T.J., HOPPER, C.D., HARBOUR, D.A., *et al.* Serological evidence of Feline Immunodeficiency Virus infection in UK cats from 1975-76. *Veterinary record*. 1988, **123**, 569-570.
  43. HANLON, M.A., MARR, J.M., HAYES, K.A. *et al.* Loss of neutrophils and natural killer cell functions following feline immunodeficiency virus infection. *Viral Immunol.*, 1993, **6**, 119-124.
  44. HARDY, W.D. Jr et ZUCKERMAN, E.E. Development of the immunofluorescent antibody test for detection of Feline Leukemia Virus infection in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 1327-1335
  45. HARDY, W.D. Jr, GEERING, G., OLD, L.J., *et al.* Feline Leukemia Virus; occurrence of viral antigen in the tissues of cats with lymphosarcoma and other diseases. *Science*, 1969, **166**, 1019-1021.
  46. HARDY, W.D. Jr, HIRSHAUT, Y. et HESS, P. Detection of the Feline Leukemia Virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. *In*: KARGER, S. Unifying concepts of leukemia. Basel, Switzerland : DUTCHER R.M., CHIECO-BIANCHI L., 1973, 778-799.
  47. HARDY, W.D. Jr, OLD, L.J., HESS, P.W., *et al.* Horizontal transmission of Feline Leukemia Virus. *Nature*, 1973, **244**, 266-269.
  48. HARDY, W.D. Jr. Immunodiffusion studies of feline leukemia and sarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1971, **158**, 1060-1069.
  49. HARDY, W.D. Jr et ESSEX, M. FELV-Induced Feline Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Prog. Allergy*, 1986, **37**, 353-376.
  50. HARDY, W.D. jr. The virology, immunology, and epidemiology of the feline leukemia virus. *In*: HARDY, ESSEX, MC CLELLAND. Feline Leukemia Virus. Amsterdam : Elsevier/ North Holland, 1980, 33-78.
  51. HARTMANN, K., NONATH, A., BEER, B., *et al.* Use of two virustica (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1992, **35**, 167-175.
  52. HARTMANN, K., WERNER, R.M. et JARRETT, O. Nouvelles méthodes de diagnostic biologique rapide de rétroviroses félines. CNVSPA. Nice, France, 1998.

53. HOFFMAN-FEZER, G., THUM, J., ACKLEY, C., *et al.* Decline in CD4+ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *J.Virol.*, 1992, **66**,1484-1488.
54. HOHDATSU, T., YAMADA, M., OKADA, M., *et al.* Detection of Feline Immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 1992, **30**, 113-123.
55. HOPPER, C., SPARK, A., GRUFFYDD-JONES, T.J., *et al.* Feline T-lymphotropic virus infection. *Vet. Rec.*, 1988, **122**, p 590.
56. HOPPER, C.D., CRIPPS, P.J., HOWARD, P.E., *et al.* The epidemiology of Feline Immunodeficiency Virus infection in the cats in the United Kingdom. Proceedings of the society for veterinary epidemiology and preventative medicine, 17-19 avril 1991, 67-74.
57. HOPPER, C.D., SPARKES, A.H., GRUFFYDD JONES, T.J., *et al.* Clinical and laboratory findings in cats infected with FIV. *Vet records*, 1989, **125**, 341-346.
58. HOSIE, M.J., OSBORNE, R., REID, G., *et al.* Enhancement after Feline Immunodeficiency Virus vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1992, **35**, 191-197.
59. HOSIE, M.J., OSBORNE, R., YAMAMOTO, J.K., *et al.* A monoclonal antibody which blocks infection with feline immunodeficiency virus identifies a possible non CD4 receptor. *J. Virol.*, 1993, **67**,1667-1671.
60. HOSIE, M.J., ROBERTSON, C. et JARRETT, O. Prevalence of Feline Leukemia Virus and antibodies to Feline Immunodeficiency Virus in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 1989, **125**, 293-297.
61. ISHIDA, T., TANIGUCHI, A. et MATSUMARA, S. Longterm clinical observations on Feline Immunodeficiency Virus infected asymptomatic carriers. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1992, **35**, 15-22.
62. ISHIDA, T., WASHIZU, T., TORIYABE, K. *et al.* Feline Immunodeficiency Virus in cats in Japan. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **194**, 221-225.
63. JACKSON, M.L., HAINES, D.M., MERIC, S.M., *et al.* Feline Leukemia Virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can. J. Vet. Res.*, 1993, **57**, 269-276.
64. JACKSON, M.L., HAINES, D.M., TAYLOR, S.M.. Feline Leukemia Virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1996, **8**, 25-30.
65. JARRETT, O. et GANIERE, J.P. Comparative studies of the efficacy of a recombinant feline leukemia virus vaccine. *Vet. records*, 1996, **138**, 7-11.
66. JARRETT, O. L'infection du chat par le virus de la leucémie feline. *Ann. Med. Vet.*, 1984, **128**, 255-260.
67. JARRETT, O., HARDY, W.D.Jr, GOLDEN, M.C. *et al.* The frequency of occurrence of feline leukemia virus subgroups in cats. *Int. J. Cancer*, 1978, **21**, 334-337.
68. JARRETT, O., LAIRD, H.M., CRIGHTON, G.W., *et al.* 1968. Advances in feline leukemia. *Bibl. Haematol.*, 1968, **30**, 244-254.
69. JARRETT, O., PACCITTI, A.M., HOSIE, M.J., *et al.* Comparison of diagnostic methods for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *J. Am.Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 1362-1364.
70. JARRETT, W.F.H., CRAWFORD, E.M., MARTIN, J.O., *et al.* A virus like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature*, 1964, **202**, 506-509.

71. JARRETT, W.F.H., MARTIN, W.B., CRIGHTON, G.N., *et al.* Leukemia in the cat. Transmission experiments with leukemia (Lymphosarcoma). *Nature*, 1964, **202**, 566-567.
72. JONHSON, C.M., TORRES, B.A., KOYAMA, H., *et al.* Tenth anniversary perspectives on AIDS: FIV as a model for AIDS vaccination. *AIDS res. Hum. Retrovir.*, 1994, **10**, 225-228.
73. JORDAN, H.L., HOWARD, J., TOMPKINS, W.A., *et al.* Detection of feline Immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*). *J. Virol.* 1995, **69**, 7328-7333.
74. KERR, M.G. et SMITH, K.J.D. Detection of FeLV antigen by indirect immunofluorescence in ELISA/CITE negative cats. *Vet. Record*, 1995, **136**, 516-518.
75. LACHERETZ, A., BERTHON, A.F., VIALARD, J., *et al.* Etude de la réponse humorale dans le syndrome immuno-déficitaire félin par ELISA et Western Blot. *Revue Med. Vet.*, 1995, **146**, 847-854.
76. LAFRADO, L.J et OLSEN, R.G. Demonstration of Depresses PolyMorphonuclear Leukocyte Function in Nonviremic FeLV infected cats. *Cancer invest.*, 1986, **4**, 297-305.
77. LAFRADO, L.J. Evaluation of a feline leukemia virus vaccine in a controlled natural transmission study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **204**, 914-917.
78. LAFRADO, L.J., DEZZUTTI, C.S., LEWIS, M.G. *et al.* Immunodeficiency in latent Feline Leukemia Virus infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1989, **21**, 39-46.
79. LAIRD, H.M., JARRETT, O., CRIGHTON, G.W., *et al.* Replication of leukemogenic type virus in cats inoculated with feline lymphosarcoma extracts. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1968, **41**, 879-893.
80. LAIRD, H.M., JARRETT, O., CRIGHTON, G.W., *et al.* An electron microscopic study of virus particles in spontaneous leukemia in the cat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1968, **41**, 867-878.
81. LAPPIN, M.R. Opportunistic infections associated with retroviral infections in cats. *Semin. Vet. Med. Surg. (small animal)*, 1995, **10**, 244-250.
82. LETEMPLE, F.: La réaction de polymérisation en chaîne en médecine vétérinaire : Méthodologie et application à la détection du virus de l'IBR dans la semence. Th. : Med. Vet. : Toulouse : 1994; n°039. 134 p.
83. LOMBARDI, S., GARZELLI, C., et PISTELLO, M. *et al.* A neutralizing antibody-inducing peptide of the V3 domain of Feline Immunodeficiency Virus envelope glycoprotein does not induce protective immunity. *J. Virol.*, 1994, **68**, 8374-8379.
84. LUTZ, H., EGBERINK, H., ARNOLD, P., *et al.* Feline T-Lymphotropes lentivirus (FTLV) : Experimentelle infektion und vorkommen in einigen Landern Europas. *Kleintierpraxis*, 1988, **33**, 445-459.
85. MACCHI, S. Contribution à l'étude du diagnostic et du dépistage de l'infection par les rétrovirus félins : Comparaison de 3 techniques rapides. Th. : Med. vet. : Nantes : 1997 ; n°070. 115 p.
86. MACY, D.W. The potential role and mechanisms of FeLV vaccine-induced neoplasms. *Semin. Vet. Med. Surg. (small animal)*, 1995, **10**, 234-137.
87. MADEWELL, B.R. et JARRETT, O. Recovery of Feline Leukemia Virus from non-viraemic cats. *Vet. Rec.*, 1983, **112**, 339-342.
88. MALIK R., KENDALL K., CRIDLAND J., *et al.* Prevalences of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus infections in cats in Sydney. *Aust. Vet. J.*, 1997, **75**, 323-327.
89. MATHES, L.E., OLSEN, R.G., HEBEBRAND, L.C., *et al.* Abrogation of lymphocyte blastogenesis by a Feline Leukemia Virus protein. *Nature Lond.*, 1978, **274**, 687-689.

90. MATHES, L.E., OLSEN, R.G., HEBEBRAND, L.C., *et al.* Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15000 dalton protein, from feline leukemia virus. *Cancer Research*, 1979, **39**, 950-955.
91. MATSUMOTO, H., TAKEMURA, N., TOSHIMORI, S., *et al.* Serum concentration of circulating immune complexes in cats infected with feline Immunodeficiency Virus detected by immune adherence hemagglutination method. *J. Vet. Med. Sci.*, 1997, **59**, 395-397.
92. MATTEUCI, D., PISTELLO, M., MAZETTI, P. *et al.* Vaccination protects against in vivo-grown Feline Immunodeficiency Virus even in the absence of detectable neutralizing antibodies. *J. Virol.*, 1996, **70**, 617-622.
93. MATTEUCI, D., BALDINOTTI, F., MAZETTI, P., *et al.* Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 494-501.
94. Mc CAW, D. Caring for the retrovirus infected cat. *Semin. Vet. Med. Surg. (small animal)*, 1995, **10**, 216-219.
95. Mc CAW, D.L. Advances in therapy for retroviral infections. In: AUGUST, J.R. Consultations in feline internal medicine 2. Philadelphia : WB, Saunders, 1994. 21-25.
96. McDOUGALL, A., TERRY, A., TZAVARAS, T., *et al.* Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: evidence for a role in natural resistance to subgroup B Feline Leukemia Viruses. *J. Virol.*, 1994, **68**, 2151-2160.
97. MIAZAWA, T., *et* JARRETT, O. Feline Leukemia Virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ("discordant") cats. *Arch. Virol.*, 1997, **142**, 323-332.
98. MOENCH, T.R., WHALEY, K.J., MANDRELL, T.D. *et al.* The cat/ feline immunodeficiency virus model for transmucosal transmission of AIDS: nonoxynol-9 contraceptive jelly blocks transmission by an infected cell inoculum. *AIDS*, 1993, **7**, 797-802.
99. MOMOI, Y., MATSUMOTO, Y., WATARI, T., *et al.* Detection of Feline Immunodeficiency Virus proviral DNA in feline peripheral blood mononuclear cells by the nested two-step polymerase chain reaction. *Zbl. Bakt.*, 1993, **279**, 274-282.
100. MORAILLON, A. Infection du chat par le virus leucémogène (FeLV). *Point vet.* 1986, **18**, 575-586.
101. MORAILLON, A. L'infection du chat par le virus de l'immunodéficience (FIV). *Point Vet.*, 1991, **23**, 675-683.
102. MORAILLON, A. L'infection du chat par le virus leucémogène félin : Situation en France. *Rec. Med. Vet.* 1986, **162**, p 605.
103. MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Meth. Enzym.*, 1985, **155**, 335-351.
104. MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., *et al.* Laboratory diagnosis of viral diseases. In : Veterinary Virology, Third Edition. San Diego : Academic Press, 1999, 193-224.
105. MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., *et al.* Retroviridae. In : Veterinary Virology, Third Edition. San Diego : Academic Press, 1999, 363-389.
106. NORIMINE, J., MIYAZAWA, T., KAWAGUSHI, Y. *et al.* Feline CD4 molecules expressed on feline non-lymphoid cell lines are not enough for productive infection of highly lymphotropic feline immunodeficiency virus isolates. *Arch Virol*, 1993, **130**, 171-178.
107. NORTH, T.W., CRONN, R.C., REMINGTON, K.M., *et al.* Characterisation of reverse transcriptases from feline immunodeficiency virus. *J.Biol.Chem.* 1990, **265**, 5121-5128.



108. NORTH, T.W., NORTH G.L.T., PEDERSEN, N.C.. Feline Immunodeficiency Virus, a model for reverse transcriptase-targeted chemotherapy for acquired immune deficiency syndrome. *Antimicrob. Agents Chemoter*, 1989, **33**, 915-919.
109. NOVOTNEY, C., ENGLISH, R., HOUSMAN, J., *et al.* Lymphocyte population changes in cats naturally infected with Feline Immunodeficiency Virus. *AIDS*, 1990, **4**, 1213-1218.
110. O'NEIL, L.L., BURKHARD, M.J., DIEHL, L.J., *et al.* Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1995, **11**, 171-182.
111. PARRY, B.W. *et al.* Diagnosis of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus infections. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 1989, **19**, 719-727.
112. PEDERSEN, N.C. et BARLOUGH, J.E. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 1298-1305.
113. PEDERSEN, N.C. Immunogenicity and efficacy of a commercial Feline leukemia virus vaccine. *J. Vet. Intern. Med.*, 1993, **7**, 34-39.
114. PEDERSEN, N.C., HO, E.W., BROWN, M.L., *et al.* Isolation of a T-Lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*, 1987, **235**, 790-793.
115. PHILLIPS, T.R., TALBOTT, R.L., LAMONT, C., *et al.* Comparison of two host cell range variants of FIV. *J. Virol.* 1990, **64**, 4605-4613.
116. POLAS, P.J., SWENSON, C.L., SAMS, R., *et al.* In vitro and in vivo evidence that the antiviral activity of 2'3'dideoxycytidine is target cell dependant in a feline retrovirus animal model. *Antimicrob. agents chemother*, 1990, **34**, 1414-1421.
117. POULET, H. EURIFEL®FeLV : premier vaccin FeLV à vecteur viral vivant non répliquatif. *In* : Conférences Eurifel®FeLV, Paris, France, 30 mai 2001.
118. ROBERTSON, I.D., ROBINSON, W.F., ALEXANDER, R., *et al.* Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus in cats. *Austral. Vet. Pract.*, 1990, **20**, 66-69.
119. ROBINSON, A., DECANN, K., AITKEN, E., *et al.* Comparison of a rapid immunomigration test and ELISA for FIV antibody and FeLV antigen testing in cats. *Vet. Record*, 1998, **142**, 491-492.
120. ROJKO, J.L. *et al.* Pathogenesis of experimental Feline leukemia virus infection. *J.N.C.I.*, 1979, **63**, 759-778.
121. ROJKO, J.L. et KOCIBA, G.J. Pathogenesis of Feline Leukemia Virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 1305-1310.
122. SARMA, P.S., LOG, T. Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology*. 1973, **54**, 160-169.
123. SCHALLER, J.P., ESSEX, M., YOHN, D.S., *et al.* Feline oncornavirus associated cell membran antigen. Humoral immune response to virus and cell membran antigens in cats inoculated with Gardener-Arnstein feline sarcoma virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1975, **55**, p 1373.
124. SELLON, R.K. : Feline immunodeficiency virus infection. *In*: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1998. 84-96.
125. SELLON, R.K., JORDAN, H.L., KENNEDY-STOSKOPF, S., *et al.* Feline Immunodeficiency virus can be experimentally transmitted via milk during acute maternal infection. *J. Virol.* 1994, **68** :3380-3385.
126. SHELTON, G.H., GRANT, C.K., COTTER, S.M., *et al.* Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in

- cats : a retrospective study (1968-1988). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 1990, **3**, 623-630.
127. SHELTON, G.H., LINENBERGER, M.L., PERSIK, M.T., *et al.* Prospective hematologic and clinicopathologic study of asymptomatic cats with naturally acquired Feline Immunodeficiency Virus infection . *J. Vet. Intern. Med.*, 1995, **9**, 133-140.
  128. SHELTON, G.H., WALTIER, R.M., CONOR, S.C., *et al.* Prevalence of Feline Immunodeficiency Virus infection in pet cats . *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1989, **25**, 7-12.
  129. SIBILLE, P., AVRAMEAS, A., MORAILLON, A., *et al.* Comparison of serological tests for the diagnosis of Feline Immunodeficiency Virus infection of cats. *Vet. Microbiology*, 1995, **45**, 259-267.
  130. SNYDER, H.W.Jr., JONES, F.R., DAY, N.K., *et al.* Isolation and characterization of circulating Feline Leukemia Virus-immune complexes from plasma of persistently infected pet cats removed by ex vivo immunosorbption. *J.Immun.*, 1982, **128**, 2726-2730.
  131. SPARGER, E. Feline immunodeficiency virus infection . *In*: GREENE, C.E. Infectious Diseases of the dog and cat : Philadelphia, WB Saunders Company, 1990. 334-345.
  132. SPARGER, E.E. Current thoughts on feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Clin. North Am. Small anim. Pract.* 1993, **23**, 173-191.
  133. SPARKES, A.H. Feline Leukemia Virus : a review of immunity and vaccination. *J. Small animal practice*, 1997, **98**, 187-194.
  134. STEWART, M.A.,WARNOCK, M., *et al.* Nucleotide Sequences of feline leukemia virus subgroup A envelop gene and long terminal repeat and evidence for the recombinant origin of subgroup B viruses. *J. Virol.* 1986, **58**, 825-834.
  135. TAVARES, L., RONEKER, C., POSTIE, L., *et al.* Testing of nucleoside analogues in cats infected with Feline Leukemia Virus : A model. *Intervirolgy ,suppl.1*, 1989, **30**, 26-35.
  136. TONELLI, Q.J. Enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus . *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 1336-1339.
  137. UELAND K. et LUTZ H. Prevalence of Feline Leukemia Virus and antibodies to Feline Immunodeficiency Virus in cats in Norway. *Zentbl. Vet. Med.*, 1992, **39**, 53-58.
  138. VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., *et al.* Family retroviridae. *In* : Virus taxonomy. San Diego : Academic Press, 2000, 369-387.
  139. VANDAFLE, E., VEILLET, F. DMV 99 [Cédérom]. Le point vétérinaire, 1999. Test witness FeLV-FIV, Synbiotics Europe.
  140. VERSCHOOR, E.J., WILLEMSE, M.J. and STAM, J.G. *et al.* Evaluation of subunits vaccine against Feline Immunodeficiency Virus infection . *Vaccine*, 1996, **14**, 285-289.
  141. WEISS, R.C., CUMMINS, J.M., RICHARD, S. Low dose orally administered alpha interferon for feline leukemia virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991, **199**, 1477-1481.
  142. WITT, C.J., MOENCH, T.R., GITTELSON, A.M., *et al.* Epidemiological observations on Feline Immunodeficiency Virus and *Toxoplasma gondii* coinfection in cats in Baltimore, Md. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1989, **194**, 229-233.
  143. YAMAMOTO, J.K., HANSEN, H., HO, E.W., *et al.* Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **194**, 213-220.
  144. YAMAMOTO, J.K., OKUDA, T., ACKLEY, C.D. *et al.* Experimental vaccine protection against Feline Immunodeficiency Virus . *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 1991, **7**, 911-922.

145. YAMAMOTO, J.K., SPARGER, E., HO, E.W., *et al.* Pathogenesis of experimentally induced FIV infection in cats. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 1246-1258.
146. YATES, K.M., ROSENBERG, L.J., HARRIS, C.K. *et al.* Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with Feline Immunodeficiency Virus. *Vet Immunol. Immunopathol.*, 1992, **35**, 177-189.







Toulouse, 2001

NOM : SABOURDY

PRENOM : Frédérique

TITRE : Diagnostic par PCR des rétroviroses félines.

RESUME :

Les virus FeLV (Feline Leukemia Virus) et FIV (Feline Immunodeficiency Virus) constituent, de part leurs conséquences cliniques, des pathogènes majeurs du chat. En l'absence de traitement et de vaccin parfaitement efficaces, il est impératif de dépister les animaux infectés afin d'assurer une prophylaxie sanitaire des rétroviroses félines.

Après une présentation générale des virus, l'auteur expose les différentes méthodes disponibles pour leur mise en évidence chez l'animal, en soulignant leurs avantages et inconvénients. La PCR (Polymerase Chain Reaction) apparaît comme une technique de choix, permettant de dépister les deux rétrovirus à des stades cliniques où les tests utilisant la recherche d'anticorps ou d'antigènes échouent.

L'auteur présente ensuite la mise au point de tests de diagnostic utilisant le principe de la PCR. Deux tests sensibles et spécifiques, l'un permettant le dépistage du FIV, l'autre du FeLV, sont élaborés. En ayant recours à la PCR multiplex, l'auteur envisage alors de réaliser un test permettant le dépistage simultané des deux virus. Malgré plusieurs tentatives d'optimisation de ce test, il s'avère moins sensible que les tests qui dépistent séparément les deux virus. Cependant, les diagnostics réalisés avec les deux types de tests sur plusieurs prélèvements de sang de chats donnent les mêmes résultats. Le test multiplex apparaît donc assez sensible pour être utilisé en routine pour le diagnostic.

MOTS-CLES : FIV; FeLV; *Retroviridae*; Rétrovirose; Diagnostic; PCR; Chat.

---

ENGLISH TITLE : FIV and FeLV infections : a diagnosis assay based on PCR.

ABSTRACT :

Due to their clinical outcomes, FeLV (Feline Leukemia Virus) and FIV (Feline Immunodeficiency Virus) are major feline pathogens. Since there are neither treatment nor effective vaccine, infected animals should be detected to ensure sanitary prophylaxis.

The author presents a review of the two viruses, and the methods which allow their detection in infected animal, underlining the advantages and drawbacks of each method. PCR (Polymerase Chain Reaction) appears to be well adapted to feline retrovirus diagnosis, since it is able to detect both retroviruses at clinical stages when methods based upon antigens or antibodies detection fail.

Then, the author sets up a diagnosis assay based upon PCR. Two specific and sensitive tests are designed, detecting FeLV and FIV respectively. Using multiplex PCR, the author tries to set up another assay, in order to detect both viruses simultaneously. Despite several attempts to refine this assay, it turned out to be less sensitive than tests which allow the detection of individual viruses. However, all of these tests gave identical results when used to screen for FeLV and FIV in cats' blood samples. Hence the multiplex assay might be sensitive enough to be used for routine diagnosis.

KEY WORDS : FIV; FeLV; Retrovirus; Retrovirus infection; Diagnoses; Diagnostic test; PCR; Cat.