

Etude d'une souche de virus responsable d'une leucopénie du chat

par GIAUFFRET (A)*

avec la collaboration de M^{lle} ETASSE (Ch.) et M. GARIN (R.)

présenté par L. DHENNIN

La pathologie des carnivores domestiques prend à l'heure actuelle une importance croissante. Cependant, si les maladies virales du chien ont fait l'objet de multiples travaux, la pathologie du chat a été pendant longtemps relativement négligée. Au cours des dernières années, de nombreuses souches virales isolées chez le chat ont été caractérisées dans différents pays. Ces virus occupent à peu près tout l'éventail de la classification virale, cependant deux agents pathogènes semblent avoir une importance particulière. Le virus de la rhinotrachéite féline [F. V. R. de CRANDEL (4)] est un herpès virus facilement isolé et caractérisé en cultures cellulaires. Il provoque essentiellement une atteinte des premières voies respiratoires (« coryza ») et des stomatites. L'agent de la leucopénie infectieuse (« typhus », « entérite infectieuse ») dont la nature virale a été démontrée par VERGE et CRISTOFORONI en 1928 (19) a donné lieu à de nombreuses recherches. Au cours des dernières années, divers virus ont été isolés *in vitro* (2-3-5), mais on doit admettre (1) que l'agent essentiel de la Maladie correspond au FPV de JOHNSON (11-12) également étudié par LUST et col. (15). Ce virus, expérimentalement pathogène *in vivo*, est difficilement adapté en cultures cellulaires où il n'entraîne habituellement pas d'effet cytopathogène visible à l'état frais. Sa présence peut être reconnue *in vitro* par l'apparition d'inclusions nucléaires caractéristiques.

En France, les publications sur la virologie du chat sont actuellement peu nombreuses. FONTAINE et col. (8) ont étudié l'agent responsable d'une enzootie de type coryza. Ce virus semble se rapprocher du groupe picorna. FLORIO et col. (7) ont isolé des agents

* Laboratoire Régional de Recherches Vétérinaires, 63 Av. des Arènes, 06-Nice.

du coryza semblables au virus de la rhinotrachéite de CRANDEL. Ils ont étudié d'autre part l'étiologie de la leucopénie et de l'entérite infectieuse. Les souches décrites dans ces cas sont caractérisées par un pouvoir pathogène expérimental comportant une incubation de courte durée (24 h environ). Leur effet cytopathogène est rapide et entraîne la formation d'inclusions cytoplasmiques éosinophiles. Aucun des travaux actuellement publiés en France ne fait état de l'isolement d'un agent pathogène se rapprochant du virus de la leucopénie de JOHNSON (13).

Les recherches entreprises dans notre laboratoire depuis plusieurs années nous ont permis de confirmer l'importance et la fréquence des herpès virus dans les syndromes respiratoires et les stomatites du chat. Ces virus peuvent également être responsables de pneumonies rapidement mortelles chez les jeunes (9). Par contre, de nombreuses tentatives d'isolement à partir de chats atteints de typhus-entérite infectieuse ont été négatives. Ces échecs nous ont conduits à reprendre nos travaux en associant l'étude du pouvoir pathogène expérimental et la recherche systématique des lésions cellulaires *in vitro* en l'absence d'effet cytopathogène visible à l'état frais.

Maladie naturelle.

Ces travaux ont été entrepris dans un effectif d'une trentaine de chats où sévissait depuis plusieurs années, à l'état sporadique, une maladie contagieuse qui atteint les animaux de tous âges.

Les adultes présentent essentiellement une entérite de gravité variable qui entraîne souvent la mort après une phase de déshydratation. Chez les jeunes, on constate habituellement une évolution suraiguë. Ces animaux présentent une atteinte grave d'emblée, sans localisation et la mort se produit habituellement en 24 à 72 h. Cette évolution est presque de règle chez les jeunes animaux introduits dans l'effectif.

A l'autopsie on note dans les cas d'évolution suraiguë : une entérite congestive souvent localisée à une portion de l'intestin, une hypertrophie et une congestion des ganglions mésentériques, une hypertrophie splénique habituellement modérée, accompagnée de tâches hémorragiques multiples donnant à l'organe un aspect marbré et, dans certains cas, une dégénérescence hépatique. Les examens bactériologiques effectués à partir de nombreux animaux ont permis d'isoler diverses bactéries (Streptocoques du groupe G ; *E. coli*) qui ne sont pas retrouvés de façon régulière.

Maladie expérimentale.

Les inoculations ont été réalisées par voie intra-péritonéale à partir d'extraits abactériens de rate, ou d'un mélange foie-rate, provenant d'un animal mort de maladie naturelle (0,5 à 1 ml de broyat d'organes au 1/10 dans le liquide de Hanks, clarifié par centrifugation et filtré sur membrane millipore de porosité 0,45 μ).

L'évolution de la maladie expérimentale est très caractéristique chez des chats âgés de 3 à 6 mois : après une incubation de 5 à 7 jours pendant laquelle la température reste normale, nous avons noté l'installation brutale d'une maladie typhique suraiguë accompagnée de déshydratation et d'une hypothermie marquée. Au stade terminal, on note régulièrement une leucopénie très importante qui atteint pour certains animaux 1.000 leucocytes/mm³. La mort a lieu 24 à 48 h après l'apparition des premiers signes. L'évolution est plus lente chez des animaux plus âgés et, dans certains cas, une phase d'hyperthermie importante a été notée. A l'autopsie des animaux morts de maladie expérimentale, des lésions semblables à celles de la maladie naturelle ont été constatées.

Au cours de nos essais, environ la moitié des animaux inoculés se sont montrés résistants lors d'administration de préparations reconnues infectieuses par ailleurs. Trois passages en série ont été réalisés *in vivo*, par filtrats, avec des résultats identiques.

Etude in vitro.

Des essais de culture *in vitro* ont été réalisés sur cellules rénales de 1^{re} ou 2^e explantation, à partir de prélèvements provenant d'un chat atteint de maladie naturelle et des différents animaux morts à la suite des infections expérimentales.

Toutes les suspensions infectieuses *in vivo* ont fait l'objet d'essais de culture *in vitro* et il n'a jamais été possible de mettre en évidence un effet cytopathogène visible à l'état frais. Pour tous les prélèvements étudiés, la destruction même partielle du tapis cellulaire n'a jamais été obtenue au cours de trois passages en série.

L'action du virus sur les cellules cultivées *in vitro* a cependant été marquée, dans certaines conditions par la formation de lésions nucléaires très caractéristiques. Ces inclusions primitivement de faible densité (fig. 1) apparaissent ultérieurement fortement basophiles. Elles occupent à peu près tout le volume du noyau, en respectant les nucléoles qui apparaissent entourés d'un halo et en ménageant le plus souvent un espace clair au contact de la mem-

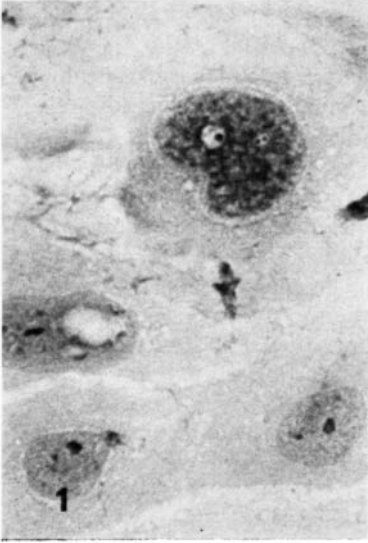


FIG. 1. — Lésion nucléaire au stade initial, Hémalum-éosine, (Grossissement : 650).



FIG. 2. — Inclusions nucléaires caractéristiques, Hémalum-éosine, (Grossissement : 1.500).

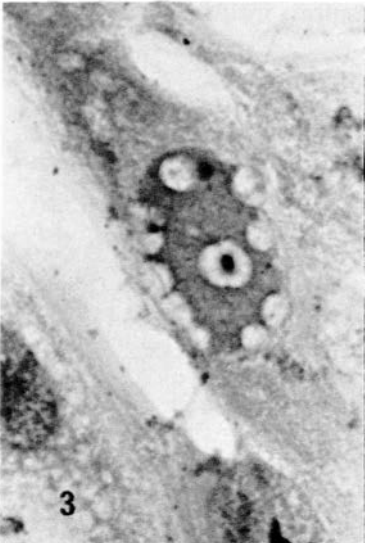


FIG. 3. — Inclusion nucléaire rétractée, Hémalum-éosine, (Grossissement : 1.500).

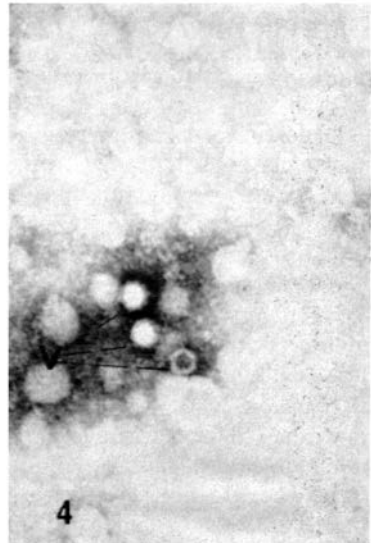


FIG. 4. — Microscopie électronique — Présence de deux virions et d'une capsid (V). Coloration négative à l'acide phosphotungstique, (Grossissement : 178.000).

brane nucléaire (fig. 2). Ces inclusions présentent parfois un aspect rétracté leur donnant une forme irrégulièrement étoilée (fig. 3). Ces lésions nucléaires sont facilement différenciées de celles de l'herpès virus du coryza qui entraîne par ailleurs une destruction rapide du tapis cellulaire.

Cet effet cytopathogène, révélable seulement après fixation et coloration, n'apparaît que très irrégulièrement lors d'infections réalisées par la technique classique, sur des cultures parvenues au tapis cellulaire. Dans ces conditions, les inclusions peuvent faire défaut au cours de très nombreux essais réalisés à partir de suspensions cependant reconnues infectieuses.

Les inoculations pratiquées sur des suspensions cellulaires, au moment de la mise en culture (13-16) ont permis d'obtenir un effet plus régulier. Dans ces conditions, les premières lésions cellulaires ont été constatées dans certains cas en moins de 24 h et ont été retrouvées pendant 3 à 4 jours. Au cours des essais les plus favorables, 7 p. 100 des cellules présentaient des lésions caractéristiques. Le passage *in vitro* a été obtenu à partir d'extraits de rate, de ganglions et de matières fécales d'animaux infectés naturellement ou expérimentalement.

*Microscopie électronique **

Des examens en microscopie électronique ont été réalisés à partir de broyats, de foie purifiés par deux cycles d'ultracentrifugation (clarification à 10.000 g — ultracentrifugation à 70.000 g).

Après coloration négative à l'acide phosphotungstique à pH 7, il a été possible de reconnaître la présence de particules de type viral de morphologie parasphérique de 20 à 25 m μ de diamètre (fig. 4).

CONCLUSIONS

Cette étude nous a permis de mettre en évidence dans un effectif où sévissait une enzootie de type typhus-entérite infectieuse un virus qui apparaît bien caractérisé par son pouvoir pathogène expérimental et son action *in vitro*.

La maladie expérimentale obtenue chez de jeunes chats évolue selon une chronologie définie. Après une incubation de 5 à 7 jours,

* Nous remercions très vivement le Pr. CACHON qui nous a permis d'effectuer ces examens au Service de microscopie électronique du laboratoire de Protistologie Marine de Villefranche/Mer.

on note une évolution suraiguë qui entraîne la mort en 24 à 48 h. La leucopénie est très marquée en phase terminale et les lésions sont semblables à celles de la maladie naturelle.

Les préparations virulentes *in vivo* n'ont pas entraîné d'effet cytopathogène discernable à l'examen direct, en cultures cellulaires de rein de chat. Le virus est cependant caractérisé *in vitro* par la formation d'inclusions nucléaires fortement basophiles au stade terminal. Ces lésions cellulaires révélées après fixation et coloration des préparations, doivent être recherchées en réalisant des inoculations sur des suspensions cellulaires au moment de la mise en culture.

D'autre part, les particules virales mises en évidence en microscopie électronique pourraient correspondre à l'agent causal de la maladie.

L'ensemble des caractères de la souche virale isolée permet de la rapprocher du virus de la panleucopénie de JOHNSON. En ce qui concerne les virus de type leucopénie et typhus de FLORIO et col., les caractères de leur action *in vivo* et *in vitro* permettent d'écarter tout rapprochement.

L'existence d'animaux de différente provenance qui ont résisté à une inoculation expérimentale indique vraisemblablement la présence d'anticorps protecteurs (6 - 10 - 14 - 18) et signale donc une certaine extension de l'infection due à ce virus dans notre région.

Les travaux en cours ont pour but de réaliser une meilleure adaptation du virus en cultures cellulaires, d'étudier les caractères de l'agent pathogène et de préciser les techniques de dépistage de cette virose qui semble avoir une importance particulière en pathologie du chat.

RÉSUMÉ

Un virus responsable d'une leucopénie du chat a été caractérisé *in vivo* et *in vitro*. La maladie expérimentale obtenue chez de jeunes chats comporte une incubation de 5 à 7 jours et une évolution suraiguë accompagnée d'une leucopénie marquée. La mort des animaux inoculés se produit 24 à 48 h après l'apparition des premiers signes. En cultures cellulaires de rein de chat, le virus entraîne la formation d'inclusions nucléaires basophiles caractéristiques, sans modification de l'aspect des cellules à l'examen direct. Des virions parasphériques de 20 à 25 μ de diamètre ont été mis en évidence en microscopie électronique.

L'ensemble des caractères de la souche isolée permet de la rapprocher du virus de la panleucopénie de JOHNSON, dont l'isolement n'a jamais été signalé en France.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDREWES (Ch.), PEREIRA (H. G.). — « Virus of vertebrate » London, 1967, Baillière Tindall and Cassel.
2. BITTLE (J. L.), EMERY (J. B.), YORK (J. C.), MC MILLEN (J. K.). — « Comparative study of feline cytopathogenic viruses and feline Panleukopenia virus. » *Am. J. Vet. Res.* 1961, **22**, 374.
3. BOLIN (V. S.). — « The cultivation of Panleukopenia virus in tissue culture. » *Virology*, 1957, **4**, 389.
4. CRANDEL (R. A.), MAURER (F. D.). — « Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion bodies. » *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958, mars, 487.
5. FASTIER (L. B.). — « A new feline virus isolated in tissue culture. » *Am. J. Vet. Res.* 1957, **18**, 382.
6. FASTIER (L. B.). — « Feline Panleukopenia — a serological study » *The Vet. Rec.* 1968, décembre, 653.
7. FLORIO (R.), BERTRAND (M.), LAPRAS (M.), PAPAGEORGIOU (C.), VALETTE (L.), VICARIA (J.). — « De l'étiologie des principales maladies virales félines. Etude systématique des virus infectant le chat dans la région lyonnaise. » *Rev. Med. Vet.* 1966, février, 97.
8. FONTAINE (M. P.), FONTAINE (M.), BRION (A.). — « Le virus du coryza contagieux du chat. » *Rev. Med. Vét.* 1965, **141**, 269-277.
9. GIAUFFRET (A.), POUTIERS (F.). — Publication en cours.
10. GORHAM (J. R.), HARTSOUGH (G. R.), SATO (N.), LUST (S.). — « Studies on cell culture adapted feline panleukopenia virus. Virus neutralization and antigenic extinction. » *Small an. clin.*, 1966, **8**, 35.
11. JOHNSON (R. H.). — « Virus of feline panleukopenia » *Nature*, 1965, janvier, 107.
12. JOHNSON (R. H.). — « Feline Panleukopenia. I. Identification of a virus associated with the syndrome. » *Res. Vet. Sci.*, 1965, **6**, 466.
13. JOHNSON (R. H.). — « Feline panleukopenia virus. IV. Methods for obtaining reproducible *in vitro* results. » *Res. Vet. Sci.* 1967, **8**, 256.
14. KING (D. A.), CROGHAN (D. L.). — « Immunofluorescence of feline panleukopenia virus in cell culture. Determination of immunological status of feline by serum neutralization. » *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1965, avril, **29**, 85.
15. LUST (S. J.), GORHAM (J. R.), SATO (N.). — « Occurrence of intranuclear inclusions in cell cultures infected with infectious feline enteritis virus. » *Am. J. Vet. Res.* 1965, septembre, **26**, 114, 1163.
16. O'REILLY (K. J.), WHITAKER (A. M.). — « The development of feline cell lines for the growth of feline infectious enteritis (panleukopenia) virus. » *J. Hyg. Camb.* 1969, **67**, 115.

17. PERRIN-RAYBAUD (M^{me} F.). — « Essai de démembrement des maladies virales des 1^{res} voies respiratoires du chat. » Thèse Alfort-Paris 1967.
 18. SCOTT (F. W.), CSIZA (C. K.), GILLESPIE (J. H.). — « Maternalley derived immunity to feline Panleucopenia » *J. A. V. M. A.*, 1970, février, **156**, 4, 439.
 19. VERGE (J.), CRISTOFORONI (N.). — « Recherches bactériologiques sur la gastro-entérite infectieuse des chats. » *Rec. Méd. Vét.* 1928, juillet, 107.
-