



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 26666

To cite this version:

Bercker, Clément. Etude des coronavirus du furet domestique (*Mustela putorius furo*) en France et en Belgique : éléments d'épidémiologie et diversité génétique. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 64 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ETUDE DES CORONAVIRUS DU FURET DOMESTIQUE (MUSTELA PUTORIUS FURO) EN FRANCE ET EN BELGIQUE : ELEMENTS D'ÉPIDÉMIOLOGIE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

Clément BERCKER
Né, le 09/06/1995 LILLE (59)

Directeur de thèse : M. Guillaume LE LOC'H

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Guillaume LE LOC'H
M. Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Professeur des Universités, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

Virologie et bactériologie

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

À Monsieur le Docteur Guillaume Le Loc'h

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Médecine zoologique et de la faune sauvage

Pour avoir accepté de diriger ces travaux,

Pour m'avoir permis de travailler de manière autonome tout en faisant preuve d'une grande disponibilité.

Reçois ici l'expression de mon grand respect et de ma profonde gratitude.

À Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie et infectiologie

Pour avoir accepté de juger ce travail.

Reçois ici mes remerciements et l'expression de toute mon estime.

Aux vétérinaires ayant participé à la collecte de prélèvements

Qui êtes trop nombreux pour être nommément cités ici.

Pour avoir rendu cette étude possible.

Recevez chacun mes remerciements les plus sincères.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
TABLE DES TABLEAUX.....	3
ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	4
INTRODUCTION	5
PARTIE 1 - ÉTAT DES CONNAISSANCES	7
I - Généralités sur les coronavirus.....	7
A - Classification.....	7
B - Protéines structurales	7
C - Génome	8
D - Cycle viral	8
E - Variabilité génétique	9
F - Importance en médecine vétérinaire	9
II - Les coronaviroses du furet.....	10
A - Étiologie.....	10
B - L'entérite catarrhale épizootique.....	11
1. Clinique	11
2. Épidémiologie	12
3. Lésions et pathogénie.....	13
4. Diagnostic	13
5. Traitement	14
6. Prévention	16
C - La coronavirose systémique.....	16
1. Clinique	17
2. Épidémiologie	18
3. Lésions	18
4. Pathogénie.....	19
5. Diagnostic	20
6. Traitement	23
7. Prévention	26

PARTIE 2 - ÉTUDE PROSPECTIVE	27
I - Objectifs	27
A - Objectif principal	27
B - Objectifs secondaires	27
II - Matériels et méthodes.....	27
A - Recrutement des prélèvements.....	27
B - Prélèvement, transport, réception et stockage.....	28
C - Extraction de l'ARN.....	29
1. Prélèvements sur carte FTA®	29
2. Écouvillons de fèces.....	29
3. Fragments d'organes et sang.....	29
D - Détection d'ARN coronaviral par RT-PCR.....	30
E - Séquençage partiel.....	32
F - Traitement des données génomiques	32
III - Résultats	33
A - Bilan des prélèvements reçus	33
B - Caractérisation de la population de furets	33
C - Caractérisation des prélèvements	35
D - Résultats de RT-PCR	35
E - Approche statistique	37
F - Analyse génétique	38
IV - Discussion.....	40
A - Méthodologie.....	40
B - Épidémiologie.....	42
C - Phylogénie.....	45
CONCLUSION	48
BIBLIOGRAPHIE.....	49
ANNEXE 1 – FICHE DE PRÉLÈVEMENT	58
ANNEXE 2 – FICHES DE PRÉLÈVEMENT FAUNE SAUVAGE	59
ANNEXE 3 – PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ARN	60
ANNEXE 4 – PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN.....	62
ANNEXE 5 – ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE COMPLET	64

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Particule coronavirale dans les selles d'un furet atteint d'entérite catarrhale épizootique (MET).	8
Figure 2. Organisation du génome d'un coronavirus : exemple de FRCoV.....	8
Figure 3. Fèces caractéristiques d'un furet en phase aiguë d'ECE.....	12
Figure 4. Fèces granuleuses d'un furet atteint de diarrhées chroniques.....	12
Figure 5. Péritonite pyogranulomateuse affectant le mésentère.	18
Figure 6. Nœud lymphatique mésentérique hypertrophié présentant des pyogranulomes coalescents.	18
Figure 7. Histologie de biopsie méningée d'un furet présentant un pyogranulome cérébral à coronavirus.....	19
Figure 8. Image échographique d'un nœud lymphatique hypertrophié et hétérogène, FSCD.	22
Figure 9. Image échographique d'une masse irrégulière et hétérogène dans du tissu adipeux de l'abdomen moyen, FSCD.	22
Figure 10. Immunohistochimie, anticorps monoclonal FIPV3-70, tissu adipeux péri-pancréatique.	23
Figure 11. Exemple de lecture d'un gel d'électrophorèse.....	31
Figure 12. Chromatogramme obtenu par séquençage Sanger de l'ADN amplifié par RT-PCR du prélèvement P027 (amorce FRCoV RdRp-F1).	32
Figure 13. Répartition des prélèvements reçus de mustélidés sauvages par espèce.	33
Figure 14. Répartition géographique des furets par lieu de prélèvement.....	34
Figure 15. Répartition des furets par classe d'âge.	34
Figure 16. Arbre phylogénétique construit sur la base de séquences partielles du gène RdRp.	39
Figure 17. Arbre phylogénétique construit sur la base de séquences partielles du gène S.	39
Figure 18. Prélèvements de fèces sur cartes FTA®.	41
Figure 19. Arbre phylogénétique construit sur la base de séquences partielles du gène RdRp.	47

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Posologie des principaux traitements médicamenteux de l'ECE.	16
Tableau 2. Posologie des principaux traitements médicamenteux utilisés dans le cadre de FSCD.....	25
Tableau 3. Récapitulatif des amorces utilisées.	30
Tableau 4. Composition du mix de RT-PCR.....	30
Tableau 5. Étapes et conditions de durée et température de RT-PCR.....	31
Tableau 6. Synthèse des prélèvements reçus et résultats (amorces RdRp).....	36
Tableau 7. Synthèse des résultats positifs.....	36
Tableau 8. Récapitulatif des variables et résultats du test de Fisher exact.....	37
Tableau 9. Dénomination des souches positives.	38
Tableau 10. Comparaison des populations de furets étudiées par Blanchard et al., 2018 et par la présente étude.	43

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ALAT : alanine aminotransférase

ARN : acide ribonucléique

ARNsg : ARN subgénomique

BLAST : *basic local alignment search tool*

ECE : entérite catarrhale épizootique

EDTA : acide éthylène-diamine-tétra-acétique

FECV : *feline enteric coronavirus*

FIPV : *feline infectious peritonitis virus*

FRCoV : *ferret coronavirus*

FRECV : *ferret enteric coronavirus*

FRSCV : *ferret systemic coronavirus*

FSCD : *ferret systemic coronaviral disease*

GGT : gamma glutamyl transférase

GnRH : *gonadotropin releasing hormone* (gonadolibérine)

GREGE : groupe de recherche et d'étude pour la gestion de l'environnement

IBV : *infectious bronchitis virus*

I-CAD : société d'identification des carnivores domestiques

ICTV : *international committee on taxonomy of viruses*

LBA : lavage broncho-alvéolaire

MCoV : *mink coronavirus*

MET : microscopie électronique à transmission

NAC : nouveaux animaux de compagnie

NCBI : *national center for biotechnology information*

OMS : organisation mondiale de la santé

ORF : *open reading frame*

PAL : phosphatase alcaline

pb : paire de bases

PBS : *phosphate buffer saline*

PIF : péritonite infectieuse féline

RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante

RTC : *replicase-transcriptase complex*

RT-PCR : transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne

SIGS : syndrome inflammatoire granulomateux systémique

SRAS : syndrome respiratoire aigu sévère

TE : tris EDTA

TGEV : *transmissible gastroenteritis virus*

INTRODUCTION

Le Furet domestique (*Mustela putorius furo*) est une sous-espèce du Putois d'Europe (*Mustela putorius*) domestiquée il y a plus de 2 000 ans pour la chasse au lapin, probablement sur le pourtour méditerranéen (Thomson, 1951). Le furetage est aujourd'hui peu pratiqué en France, et ce petit mustélidé est avant tout considéré comme un animal de compagnie. C'est également une espèce d'intérêt en expérimentation animale, notamment en virologie, endocrinologie et toxicologie. Les utilisations plus confidentielles du furet incluent son usage comme animal de sport, de travail, ou dans l'industrie de la fourrure (Fox, 2014). Dans certains territoires où il a été introduit (Nouvelle-Zélande, îles britanniques), le furet est considéré comme une espèce invasive car son comportement de prédation et le portage d'agents pathogènes mettent en danger la faune locale (Lee, 2002 ; Bodey et al., 2011).

Malgré sa domestication précoce, le furet est considéré comme un «nouvel» animal de compagnie (NAC), car ce n'est qu'à partir des années 1980 qu'il a suscité un réel engouement dans les foyers occidentaux. Il est difficile d'estimer avec précision le nombre de furets en France : plusieurs sources ont relayé le chiffre de 300 000 proposé en 2010 par le Dr Norin Chai (Vinke, Schoemaker, 2012 ; Fox, 2014), alors que l'Agence France-Presse évoquait la même année un million de furets français (La Dépêche, 2010). La dynamique de la population semble actuellement décroissante : en 2019, 49 454 furets étaient identifiés auprès de la société d'identification des carnivores domestiques, soit une diminution de 9,34 % sur trois ans (I-CAD, 2020). En France comme en Belgique, le furet a le statut législatif de carnivore domestique, au même titre que le chien et le chat.

Le développement du furet comme animal de compagnie s'est accompagné d'une évolution de sa médecine, avec en particulier la création de collèges de spécialistes de médecine zoologique des petits mammifères listant le furet parmi les espèces d'intérêt. Cet engouement a permis d'identifier et de mieux connaître les affections spécifiques de cette espèce, parmi lesquelles deux coronaviroses décrites dans les années 1990 et 2000 : l'entérite catarrhale épizootique et la coronavirose systémique. Si elles ont fait l'objet de divers travaux, aucune étude n'a encore été réalisée sur les coronavirus de furets français ou belges. Après avoir fait l'état actuel des connaissances concernant ces maladies et leur agent étiologique, nous présenterons une étude prospective portant sur l'épidémiologie et la diversité génétique des coronavirus détectés chez des furets en France et en Belgique.

PARTIE 1 - ÉTAT DES CONNAISSANCES

I - Généralités sur les coronavirus

A - Classification

Les *Coronaviridae* sont une famille de virus enveloppés à ARN positif non segmenté appartenant à l'ordre des *Nidovirales*. Il en existe deux sous-familles, les *Letovirinae* et les *Orthocoronavirinae* (ICTV, 2019). Ces derniers se déclinent en quatre genres : les *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* et *Deltacoronavirus*. Les coronavirus *Alpha* et *Beta* infectent préférentiellement les Mammifères, alors que les *Gamma*- et *Deltacoronavirus* touchent généralement les Oiseaux (Masters, Perlman, 2013 ; Ma et al., 2015).

B - Protéines structurales

Le virion, d'un diamètre moyen de 118 à 136 nm, est constitué de quatre à cinq protéines structurales majeures (Masters, Perlman, 2013) :

- La glycoprotéine de spicule (S), constituée de deux sous-unités S1 et S2, est impliquée dans la liaison au récepteur cellulaire. C'est elle qui est responsable de l'aspect caractéristique du virion en microscopie électronique à transmission (Figure 1).
- La protéine d'enveloppe (E) participe à l'assemblage du virion et à l'exocytose des particules virales.
- La protéine de membrane (M), protéine la plus abondante de l'enveloppe, est notamment responsable de la forme du virion.
- La protéine de nucléocapside (N) se lie d'une part à l'ARN viral, formant le cœur ribonucléoprotéique du virion, et d'autre part à l'enveloppe via la protéine M.
- L'hémagglutinine-estérase (HE), présente uniquement chez certains *Betacoronavirus*, agit comme un cofacteur de la protéine S ; elle participe à l'attachement à la cellule hôte.

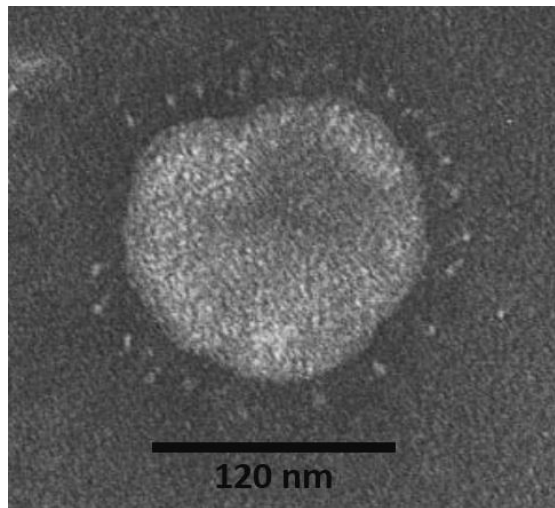


Figure 1. Particule coronavirale dans les selles d'un furet atteint d'entérite catarrhale épizootique (MET). D'après Williams et al., 2010.

C - Génome

Le génome des coronavirus, comprenant 26 000 à 32 000 paires de bases, est le plus grand connu parmi les virus à ARN. Il présente une structure générale invariable : le gène *réplicase*, constitué des deux cadres de lecture ouverte (ORF) rep1a et rep1b, occupe les deux tiers du génome en 5'. Le tiers distal comprend les ORF 2, 4, 5 et 6 codant respectivement pour les protéines structurales S, E, M et N. Des ORF codant pour des protéines non structurales peuvent se trouver entre l'extrémité 3' de rep1b et l'extrémité 3' du génome, sauf entre E et M. Lorsqu'il existe, l'ORF de HE se trouve entre rep1b et S (Masters, Perlman, 2013). Une représentation simplifiée du génome d'un coronavirus de furet (FRCoV) est présentée en figure 2.



Figure 2. Organisation du génome d'un coronavirus : exemple de FRCoV. Chaque rectangle correspond à un ORF. La ligne oblique en pointillés représente le chevauchement partiel des ORF rep1a et rep1b. D'après Lamers et al., 2016.

D - Cycle viral

Lorsque la sous-unité S1 de la glycoprotéine de spicule se lie à un récepteur de la cellule hôte, des changements de conformation surviennent, dirigés par S2, et aboutissent à la fusion des membranes virale et cellulaire. Il y a libération de la nucléocapside dans le cytoplasme où a lieu la traduction du génome viral. Elle commence par la traduction du gène *réplicase*, qui conduit à la synthèse de deux polyprotéines. Ces dernières subissent une autoprotéolyse

donnant naissance aux protéines non structurales nsp1 à nsp16. Certaines de ces protéines permettent la synthèse d'ARN viral, comme l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) issue de nsp12 et l'hélicase issue de nsp13. D'autres comme nsp1 sont responsables de l'inhibition de la synthèse protéique et de la réponse immunitaire de l'hôte. L'agencement de ces protéines forme le complexe réplique-transcriptase (RTC). Pour les gènes en aval du gène *réplicase*, l'ARN génomique est transcrit par le RTC sous forme d'ARN subgénomiques (ARNsg) qui jouent le rôle d'ARN messagers. La traduction de ces ARNsg permet entre autres la synthèse des protéines structurales, qui encapsident l'ARN génomique et forment de nouveaux virions. Ces derniers sont libérés par exocytose et peuvent alors infecter de nouvelles cellules (Masters, Perlman, 2013).

E - Variabilité génétique

Contrairement à la plupart des virus à ARN, les *Coronavirinae* présentent une activité exoribonucléase, portée par nsp14 (Minskaia et al., 2006). Elle permet, dans une certaine mesure, la correction d'erreurs survenues lors de la synthèse d'ARN. Malgré ce mécanisme nécessaire à la relative stabilité d'un génome de grande taille, les coronavirus restent soumis à un taux de mutation important, de l'ordre de 10^{-6} substitution par nucléotide et par cycle de réplication (Eckerle et al., 2010). Leur plasticité génomique est d'autant plus grande qu'ils subissent également des phénomènes de recombinaison homologue et non homologue à des fréquences supérieures à celles observées chez tous les autres virus à ARN (Masters, Perlman, 2013). Ainsi, bien qu'ils présentent une spécificité d'hôte portée par S1, il a été décrit à plusieurs reprises un franchissement de cette barrière d'espèce. Ce fut notamment le cas lors de l'épidémie de Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) en 2002-2003, qui semble avoir fait suite au passage chez l'homme d'un coronavirus de chauve-souris (Gouilh et al., 2011). Plus récemment, la pandémie de COVID-19 a pour agent étiologique le SARS-CoV-2 qui serait issu d'un virus de chauve-souris, avec un passage discuté par le pangolin (Li et al., 2020 ; Zhang et al., 2020).

F - Importance en médecine vétérinaire

Des coronavirus sont décrits dans un grand nombre d'espèces d'intérêt vétérinaire. On peut citer à titre d'exemple le virus de la gastroentérite transmissible chez le porc (TGEV), le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV), ou encore le virus de la bronchite infectieuse

qui touche les poulets (IBV) (Wang, 2016). Ils ont le plus souvent un tropisme gastro-intestinal ou respiratoire.

II - Les coronaviroses du furet

A - Étiologie

En 2000, un nouvel *Alphacoronavirus* a été identifié comme responsable de l'entérite catarrhale épizootique (ECE), entité clinique décrite dans les années 1990 aux États-Unis (Williams et al., 2000). Il a par la suite été proposé que ce *ferret coronavirus* (FRCoV) appartienne à une nouvelle espèce, nommée *Alphacoronavirus 2*, comprenant également le coronavirus du vison (*mink coronavirus*, MCoV) (Vlasova et al., 2011 ; Lamers et al., 2016 ; Li et al., 2017). Le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) répertoriait FRCoV et MCoV comme deux espèces distinctes appartenant au sous-genre *Minacovirus* (ICTV, 2019), mais les deux espèces ont récemment été fusionnées sous l'appellation *Mink Coronavirus 1* (ICTV, 2020). Le pathotype impliqué dans l'ECE a été nommé *ferret enteric coronavirus* (FRECV) (Wise et al., 2006). Un second pathotype de FRCoV, le *ferret systemic coronavirus* (FRSCV), s'est révélé responsable d'un syndrome inflammatoire granulomateux systémique semblable à celui observé chez les chats atteints de la forme sèche de la PIF (péritonite infectieuse féline) (Martinez et al., 2006 ; Garner et al., 2008).

L'analyse comparative partielle des génomes de trois souches de chaque pathotype a permis de distinguer deux génotypes sur la base de séquences partielles du gène S : le génotype 1 associé au FRSCV (souche MSU-1) et le génotype 2 associé au FRECV (souche MSU-2) (Wise et al., 2010). À partir de ces résultats, deux RT-PCR ont pu être développées, spécifiques de chaque génotype. Par la suite, la correspondance suggérée entre pathotype et génotype a largement été remise en question : de nombreux FRCoV de génotype 1 ont été détectés chez des animaux asymptomatiques (Provacia et al., 2011 ; Terada, Minami, et al., 2014 ; Li et al., 2017), et un coronavirus de génotype 2 a été détecté dans des lésions caractéristiques de coronavirose systémique (Lindemann et al., 2016). De plus, l'analyse d'une souche de FRECV a montré une plus grande proximité avec MSU-1 qu'avec MSU-2 (Lamers et al., 2016). L'analyse d'autres souches de FRECV a conduit à la description d'un nouveau génotype comprenant les souches Saitama-1 et Aichi-1 (Minami, Kuroda, et al., 2016). Face à ces nouvelles données soulignant l'absence d'équivalence entre les génotypes et les

pathotypes, les RT-PCR précédemment décrites ne peuvent plus être considérées comme un outil permettant de différencier FRSCV et FRECV.

Une autre inconnue réside dans le lien phylogénétique entre les deux virus. Par analogie avec la PIF, il a d'abord été suggéré que le FRSCV émerge *de novo* chez des individus infectés par le FRECV, par mutation *in vivo* (Garner et al., 2008 ; Laprie et al., 2009). L'absence d'épisode aigu d'ECE dans les antécédents médicaux de nombreux furets infectés par un FRSCV pourrait aller à l'encontre de cette idée. Les autres hypothèses seraient une émergence par recombinaison, ou une co-circulation indépendante de souches des deux pathotypes dans la population. Si plusieurs épisodes de recombinaison ont pu être mis en évidence (Lamers et al., 2016 ; Minami, Kuroda, et al., 2016), aucune étude n'a démontré d'association claire entre un événement de mutation ou de recombinaison et un changement de pathogénicité. Lors de la caractérisation génétique des premières souches, une distance plus importante entre les souches de FRECV et FRSCV analysées qu'entre les virus systémique (FIPV) et entérique (FECV) félins favorisait l'hypothèse d'une co-circulation. Les connaissances actuelles, en particulier la description de souches entériques plus proches du génotype 1 que du génotype 2 et la présence de FRCoV chez des individus sains, suggéreraient plutôt l'acquisition *in vivo* du caractère pathogène systémique (voir C – 4. Pathogénie). Le séquençage complet de plusieurs FRCoV de pathotype entérique n'a pas encore permis d'élucider cette situation (Lamers et al., 2016 ; Li et al., 2017). Les connaissances relatives à l'histoire phylogénétique de ces virus et au déterminisme de leur pathogénie restent aujourd'hui largement lacunaires.

B - L'entérite catarrhale épizootique

L'entérite catarrhale épizootique a été décrite pour la première fois en 1993 sur la côte est des États-Unis, et nommée ainsi par analogie avec la gastroentérite catarrhale épizootique du vison (Williams et al., 2000).

1. Clinique

L'ECE est caractérisée par sa phase aiguë, qui dure 5 à 7 jours et pendant laquelle les individus malades présentent une diarrhée mucoïde profuse et purulente, généralement de couleur verte (Figure 3). L'apparition de la diarrhée est typiquement précédée de peu par des signes cliniques non spécifiques : léthargie, anorexie ou dysorexie, vomissements (Murray et al., 2010). L'examen clinique met en évidence une déshydratation importante, un inconfort

abdominal, et la palpation abdominale peut révéler une adénomégalie mésentérique. Suite à la résolution de cette phase hypersécrétoire s'installe souvent une phase plus chronique caractérisée par des fèces granuleuses (Figure 4), qui peut durer jusqu'à plusieurs mois. Il a été suggéré que cet aspect anormal des selles soit dû à des phénomènes de maldigestion et/ou de malabsorption, en particulier des lipides et protéines (Williams et al., 2000).



Figure 3. Fèces caractéristiques d'un furet en phase aiguë d'ECE.

Kiupel, Perpiñán, 2014, courtesy of Dr Bruce Williams.



Figure 4. Fèces granuleuses d'un furet atteint de diarrhées chroniques.

Quesenberry et Carpenter, 2012.

2. Épidémiologie

L'ECE présente une très forte contagiosité, avec une morbidité de 100 % dans les élevages, refuges et foyers affectés. Elle est en revanche rarement létale, et le taux de mortalité reste inférieur à 5 % (Murray et al., 2010). L'excrétion fécale et salivaire de virus peut être massive et perdurer de manière intermittente longtemps après l'infection (Kiupel, Perpiñán, 2014).

Lors des premières épizooties rapportées, les furets adultes étaient plus sévèrement affectés que les juvéniles, qui ne présentaient que des signes cliniques modérés voire des formes subcliniques. Aujourd'hui encore, dans un contexte épidémiologique considéré « classique », ce sont principalement des animaux adultes qui déclarent la maladie lors de l'introduction d'un fureton porteur sain (Quinton, Gaillot, 2015 ; Welle, 2016). Pourtant, il semble que les formes sévères d'ECE soient désormais plus rares, au moins aux États-Unis. L'épidémiologie actuelle serait plutôt de forme enzootique, avec la déclaration d'épisodes cliniques d'intensité modérée à la faveur d'événements stressants, n'épargnant pas les individus les plus jeunes (Kiupel, Perpiñán, 2014). Dans ce contexte et bien que l'ECE reste la forme historiquement décrite, il peut être préférable d'utiliser le terme de coronavirose entérique, qui ne préjuge pas de l'expression épidémiologique de l'affection.

3. Lésions et pathogénie

À l'autopsie, on observe généralement une hyperhémie de la muqueuse et un amincissement de la paroi intestinale. Une adénomégalie mésentérique peut être notée. L'examen histologique révèle une entérite lymphocytaire diffuse avec atrophie villositaire. Dans les cas aigus, une dégénérescence vacuolaire et une nécrose de l'épithélium apical sont des observations communes, alors que les stades chroniques révèlent plutôt une fusion et une érosion des villosités. En raison d'une évolution segmentaire le long de l'intestin grêle, ces différents stades lésionnels peuvent être observés de manière concomitante chez un même individu (Kiupel, Perpiñán, 2014). L'immunohistochimie utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène des *Alphacoronavirus* met en évidence la présence de coronavirus dans de nombreuses cellules épithéliales.

4. Diagnostic

La suspicion d'ECE découle du contexte épidémio-clinique. Elle est à envisager chez des animaux présentant des signes digestifs dont une diarrhée verte mucoïde profuse et un état d'abattement aigu, en particulier lorsqu'un contact avec un nouvel individu ou un épisode de stress sont rapportés au cours des dernières 48 à 72 heures. Il est à noter que la diarrhée verte du furet n'est pas pathognomonique de l'ECE : il n'est pas inhabituel d'en observer chez les furets souffrant d'autres affections intestinales, en particulier lors de coccidiose (Kiupel, Perpiñán, 2014).

Les affections digestives du furet entraînant des signes non spécifiques comme l'anorexie et les vomissements et faisant partie du diagnostic différentiel de l'ECE incluent les corps étrangers gastro-intestinaux, les gastro-entérites bactériennes (notamment à *Helicobacter mustelae*, *Clostridium* spp, *Campylobacter* spp et *Salmonella* spp), parfois secondaires à l'ECE, ou virales (rotavirose), l'intolérance alimentaire, la gastrite éosinophilique, ou encore la gastro-entérite lymphoplasmocytaire (Wise et al., 2006 ; Oglesbee, 2011).

Les modifications hémato-biochimiques sont inconstantes et non spécifiques. Elles comprennent une leucocytose lors de surinfection bactérienne, une augmentation de l'hématocrite en lien avec la déshydratation et des paramètres hépatiques (activités ALAT et PAL) fréquemment augmentés. Une hypoprotéinémie sévère est parfois observée dans les formes chroniques (Oglesbee, 2011).

La microscopie électronique à transmission permet la visualisation de particules coronavirales dans les fèces (Figure 1). Cependant, dans un contexte qui semble tendre vers l'enzootie, ces observations ne sont pas diagnostiques d'ECE en l'absence de signes cliniques évocateurs (Kiupel, Perpiñán, 2014). Par ailleurs, cet examen n'est pas disponible pour un diagnostic de routine.

Le diagnostic définitif nécessite théoriquement la mise en évidence de FRCoV par immunohistochimie sur biopsie jéjunale ou prélèvement nécropsique, puis éventuellement son génotypage par RT-PCR (l'interprétation des résultats de RT-PCR étant sujette à caution, comme détaillé en partie A). Ces moyens ne sont pas proportionnés à la sévérité de l'affection et ils ne sont que très rarement mis en œuvre. En pratique, la détection de FRCoV par RT-PCR dans les selles d'un animal clinique est généralement considérée diagnostique.

L'hybridation *in situ* a permis la mise en évidence d'ARN de FRECV, mais cette méthode ne fait pas l'objet de tests commerciaux (Wise et al., 2006). Un test sérologique permet de mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre FRCoV, sans distinction de génotype (Minami, Terada, et al., 2016). Il ne s'agit cependant pas d'un test diagnostique puisqu'il ne permet pas de mettre en évidence une infection active avec certitude.

5. Traitement

La gestion médicale de l'ECE consiste à traiter les signes cliniques et à prévenir les complications. Il est recommandé d'hospitaliser les patients sévèrement déshydratés, anorexiques ou débilités.

La réhydratation est l'élément central du traitement. Elle est réalisée préférentiellement par voie intraveineuse à l'aide d'un soluté cristalloïde isotonique salé en première intention, à un débit à ajuster selon l'état de déshydratation clinique de l'animal. Un suivi du ionogramme peut s'avérer nécessaire afin d'ajuster la perfusion d'électrolytes. Dans les cas les plus sévères de déshydratation et d'hypoprotéïnémie, l'utilisation d'un soluté colloïde peut être envisagée.

Un soutien nutritionnel doit permettre au furet de ne pas perdre de poids au cours de l'épisode infectieux. Il consiste à lutter contre l'anorexie en proposant des aliments particulièrement appétents, voire à mettre en œuvre une alimentation forcée à l'aide d'un aliment hyperdigestible.

Enfin, une thérapeutique médicamenteuse peut être instaurée en fonction de la présentation clinique : antiémétiques lors de nausées et vomissements, protecteurs de la muqueuse gastro-duodénale chez les patients anorexiques, antibiothérapie lors de surinfection bactérienne. Il est à noter que les recommandations d'une antibioprophylaxie systématique décrites dans la littérature ne sont plus d'actualité, d'une part dans le contexte des bonnes pratiques liées à la lutte contre l'antibiorésistance, et d'autre part pour des raisons législatives en France. En effet, l'utilisation de l'enrofloxacin, fluoroquinolone désormais soumise à la réglementation relative aux antibiotiques critiques, a souvent été recommandée (Oglesbee, 2011 ; Kiupel, Perpiñán, 2014). Aujourd'hui, l'antibiothérapie de première intention fait plutôt appel aux associations amoxicilline-acide clavulanique ou triméthoprime-sulfamides. Le métronidazole, en raison de ses effets antibactérien et anti-inflammatoire, pourrait également présenter un intérêt, à condition que sa faible appétence ne soit pas délétère à l'observance du traitement ou à la reprise de l'alimentation spontanée (Kiupel, Perpiñán, 2014). L'utilisation de molécules antidiarrhéiques peut éventuellement être envisagée lors d'accès hypersécrétoires en phase aiguë, uniquement chez les patients pour lesquels sont exclus corps étranger digestif, hépatopathie, iléus, glaucome et entérite bactérienne. Lors de l'installation d'une forme chronique par malabsorption, la corticothérapie pourrait améliorer les signes cliniques, mais elle ne doit être envisagée que lorsque d'éventuelles infections concomitantes sont exclues. Les posologies des principaux traitements médicamenteux figurent dans le tableau 1.

Tableau 1. Posologie des principaux traitements médicamenteux de l'ECE.

IM : voie intra-musculaire ; PO : per os ; q : quaque ; SC : voie sous-cutanée.

¹Morrisey et Johnston, 2018. ²Oglesbee, 2011.

Traitement	Molécule	Posologie	Remarques
Antiémétiques	Métoclopramide	0,2-1 mg/kg PO, SC, IM q6-8h ¹	
	Maropitant	1 mg/kg SC q24h ²	
Protecteur gastrique	Sucralfate	25-125 mg/kg PO q12h ¹	Administrer avant les repas et à distance d'éventuels antiacides.
Antibiothérapie	Amoxicilline – acide clavulanique	12,5-25 mg/kg PO q8-12h ^{1,2}	
	Triméthoprimé – sulfamides	15-30 mg/kg PO, SC q12h ^{1,2}	
	Métronidazole	15-20 mg/kg PO q12h ¹	
Antidiarrhéique	Lopéramide	0,2 mg/kg PO q12h ^{1,2}	Uniquement en phase aiguë.
Corticothérapie	Prednisone	0,25-1 mg/kg PO q12h ²	Dans les cas de diarrhées chroniques et en l'absence d'infection concomitante.

6. Prévention

Les individus présentant des signes cliniques d'ECE doivent être isolés de leurs congénères, et de strictes mesures d'hygiène mises en place. Il est néanmoins très difficile de prévenir la diffusion du virus, car les individus touchés peuvent rester excréteurs au moins six mois après la disparition des signes cliniques (Burgess, 2007). L'instauration d'une quarantaine à l'introduction de tout nouvel animal au sein d'un groupe, bien que probablement insuffisante, est une pratique qui doit être encouragée.

C - La coronavirose systémique

Le premier rapport de coronavirose systémique chez le furet semble dater de 1951, bien que l'affection fût à l'époque décrite comme une atteinte granulomateuse maligne enzootique d'étiologie inconnue (Momborg-Jørgensen, 1951). La maladie a ensuite émergé dans les années 2000, avec de premiers cas détectés en Espagne puis aux États-Unis (Martinez et al., 2006 ; Garner et al., 2008). L'étude de cette infection a été menée quasi-exclusivement par comparaison avec la PIF, et l'appellation *FIP-like disease* a d'abord été employée. On parle aujourd'hui plus volontiers de coronavirose systémique ou *ferret systemic coronaviral disease* (FSCD).

1. Clinique

Tous les signes classiquement rapportés lors de PIF ont été décrits pour la FSCD. La présentation clinique est non spécifique et variable selon les organes affectés.

Diarrhées, léthargie, pâleur des muqueuses, vomissements, anorexie et perte de poids jusqu'à l'émaciation sévère comptent parmi les signes les plus fréquemment décrits. Une atteinte nerveuse centrale peut être observée, sous la forme de parésie ou paraparésie des membres pelviens, d'ataxie, de tremblements ou de crises convulsives. Notons que les difficultés locomotrices ne sont pas toujours dues à une atteinte nerveuse : une faiblesse du train arrière due à une amyotrophie sévère peut également être incriminée. L'examen clinique révèle souvent une splénomégalie et la présence de masses abdominales, correspondant généralement à une adénomégalie mésentérique, et parfois à une néphromégalie ou une paroi intestinale épaissie (Kiupel, Perpiñán, 2014).

Les autres signes cliniques, plus rares, dépendent directement des organes touchés. Ils peuvent concerner la sphère respiratoire (dyspnée, toux, éternuements, jetage nasal), cardiaque (souffle systolique) et les viscères abdominaux (ictère). Des érythèmes cutanés focaux, des urines verdâtres, du bruxisme, une adénomégalie périphérique et une hyperthermie ont également été rapportés (Murray et al., 2010). Les signes oculaires connus dans les cas de PIF sont longtemps restés inobservés chez le furet atteint de coronavirose. Ce n'est qu'en 2016 qu'une première description de panophtalmie pyogranulomateuse à coronavirus a été faite dans cette espèce (Lindemann et al., 2016). L'ensemble de ces signes cliniques et des lésions associées a été regroupé sous le nom de syndrome inflammatoire granulomateux systémique (SIGS) (Perpinan, Lopez, 2008).

Un unique cas d'atteinte nerveuse périphérique par un FRSCV a été rapporté, sous la forme d'une radiculonévrite sciatique. Une parésie des membres pelviens y était associée, ainsi qu'une incontinence fécale et urinaire (Linsart et al., 2013). Un cas atypique de pancréatite suppurative a également été décrit (Wills et al., 2018).

L'évolution inéluctable de la maladie se traduit cliniquement par une détérioration progressive de l'état général, bien que des phases d'amélioration transitoire aient été décrites (Perpinan, Lopez, 2008). Tout comme la PIF, la FSCD est généralement fatale en quelques semaines à quelques mois.

2. Épidémiologie

Contrairement à l'ECE, la coronavirose systémique est réputée peu contagieuse mais présente une létalité proche de 100 %. De rares cas de furets survivant plusieurs années avec traitement ont été rapportés (Murray et al., 2010 ; Wills et al., 2018). L'infection a le plus souvent été diagnostiquée chez des individus de moins de 18 mois, mais elle peut également toucher les furets plus âgés.

Les premiers cas rapportés en France datent de 2009 (Laprie et al., 2009). Il a été suggéré que le commerce international d'animaux soit un moteur majeur de la diffusion de la maladie dans le monde. Elle a en effet été détectée au Japon (Michimae et al., 2010), au Royaume-Uni (Graham et al., 2012), ou encore au Pérou (Lescano et al., 2015).

3. Lésions

Les lésions macroscopiques observées sont tout à fait similaires à celles rencontrées dans la forme non effusive de la PIF. On retrouve en particulier des nodules irréguliers multifocaux à coalescents sur les séreuses, variant de quelques millimètres de diamètre à des plages de plusieurs centimètres (Murray et al., 2010). Le mésentère est particulièrement touché (Figure 5), mais tous les organes peuvent être atteints, en particulier le foie, les reins, la rate et les poumons. Une adénomégalie mésentérique sévère est presque invariablement notée (Figure 6), avec un nœud lymphatique déformé par des granulomes coalescents et pouvant mesurer jusqu'à huit fois sa taille normale. Notons que cette adénomégalie n'est pas décrite de manière aussi systématique chez le chat atteint de PIF (Dominguez et al., 2011). Une splénomégalie, fréquente et non spécifique chez le furet, peut être observée. Une hépatomégalie et une néphromégalie, plus rares, sont également rapportées.

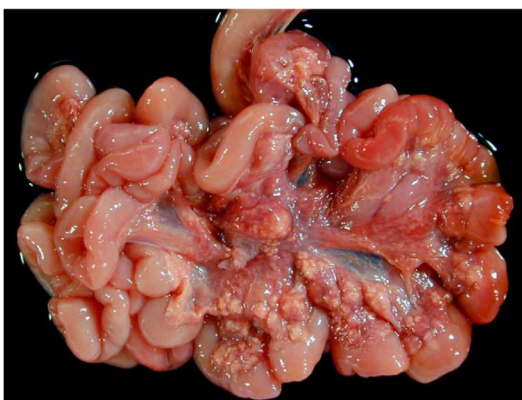


Figure 5. Péritonite pyogranulomateuse affectant le mésentère.
Laprie et al., 2009.



Figure 6. Nœud lymphatique mésentérique hypertrophié présentant des pyogranulomes coalescents.
Perpinan, Lopez, 2008.

À l'histopathologie, des foyers d'inflammation granulomateuse sont visibles dans tous les organes touchés (Figure 7). Leurs caractéristiques histologiques ont donné lieu à la description de quatre types de lésions : des granulomes avec et sans centre nécrotique, des granulomes à neutrophiles et des inflammations granulomateuses diffuses (Doria-Torra et al., 2016). Dans toutes ces lésions, les macrophages sont la population cellulaire majoritaire, comme observé dans les lésions de PIF. Une différence majeure entre les deux maladies réside dans l'omniprésence des lésions de vascularite chez le chat (voir 4. Pathogénie).

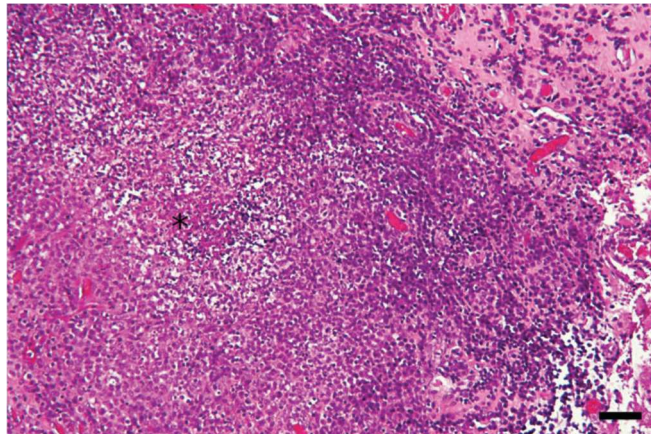


Figure 7. Histologie de biopsie méningée d'un furet présentant un pyogranulome cérébral à coronavirus.
Pyogranulome à centre nécrotique (*) entouré d'une couronne de macrophages. Coloration hémalaun - éosine. Echelle 100 µm.
Gnirs et al., 2016.

4. Pathogénie

En l'absence de succès à cultiver le virus à ce jour, aucune étude n'a pu se pencher de manière prospective sur la pathogénie de la coronavirose systémique du furet. Néanmoins, cet aspect a été largement étudié dans le cadre de la PIF, et les similarités étiologiques, cliniques et lésionnelles laissent présager une pathogénie semblable (Kiupel, Perpiñán, 2014).

Chez le chat, la pathogénicité du FIPV découle de sa capacité à infecter les monocytes et macrophages. Les monocytes infectés sont activés et lèsent les parois vasculaires, entraînant le recrutement de nombreux autres monocytes via la sécrétion de cytokines. Les propriétés d'adhésion des monocytes entre eux et à l'endothélium vasculaire sont à l'origine d'une accumulation périvasculaire de macrophages. Ces derniers sécrètent une métalloprotéinase responsable de la dégradation du collagène de type IV dans la lame basale vasculaire (Kipar et al., 2005).

S'il a été proposé que le développement des lésions chez le furet suive le même schéma angiocentré (Laprie et al., 2009), le fait que les lésions de vascularite ne soient pas décrites aussi systématiquement chez le furet que chez le chat pose question (Martínez et al., 2008 ; Michimae et al., 2010 ; Graham et al., 2012). Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette différence : (i) les lésions vasculaires, précoces, pourraient être masquées par le développement de la réaction granulomateuse, (ii) une évolution plus lente de la maladie chez le furet que chez le chat pourrait permettre la résolution des lésions de vascularite avant l'expression clinique de l'infection (Doria-Torra et al., 2016).

Les différents types de granulomes peuvent se retrouver chez un même individu et au sein d'un même organe, suggérant leur développement au cours de différents épisodes de virémie successifs, comme c'est le cas chez le chat (Doria-Torra et al., 2016). Il est admis que la PIF est une maladie à la fois virale et immunitaire, avec des expressions cliniques différentes selon le profil immunitaire de l'individu infecté (Kipar, Meli, 2014). Chez le furet, il a été suggéré que la FSCD puisse se développer à la faveur d'une immunodépression passagère, en particulier chez les jeunes individus soumis au stress lié au sevrage et aux changements d'environnement entre leur élevage de naissance, l'animalerie où ils sont vendus et le foyer qui les accueille (Perpinan, Lopez, 2008).

5. Diagnostic

La seule présentation clinique amène rarement à une suspicion précise de FSCD, car les diagnostics différentiels des signes présentés sont larges (Laprie et al., 2009 ; Dominguez et al., 2011) :

- La palpation d'une masse abdominale chez le furet peut évoquer un granulome péritonéal (causé par un FRSCV, une affection fongique, une mycobactériose ou un corps étranger), un phénomène néoplasique primaire (lymphome, adénocarcinome surrénalien...) ou métastatique, une adénomégalie, un corps étranger digestif, ou toute organomégalie.
- L'adénomégalie mésentérique est rencontrée lors de lymphosarcome, d'entérite chronique et de nombreuses maladies infectieuses (ECE, FSCD, maladie aléoutienne, parasitoses digestives...).
- Même la péritonite granulomateuse n'est pas pathognomonique de la coronavirose systémique : on retrouve des lésions similaires lors de mycobactériose ou de

nocardiose. Une pleuropneumonie pyogranulomateuse liée à une infection à *Pseudomonas luteola* a également été documentée (Martínez et al., 2012).

Ainsi, face au caractère variable et aspécifique de la présentation clinique, le recours aux examens paracliniques est indispensable.

L'hématologie met souvent en évidence une anémie non régénérative, une thrombocytopénie, une hyperglobulinémie et une hypoalbuminémie. L'électrophorèse des protéines sériques montre typiquement une hypergammaglobulinémie polyclonale, bien que des cas d'hypergammaglobulinémie monoclonale aient également été décrits (Dominguez et al., 2011). Les deux profils se retrouvent aussi chez le chat atteint de PIF. Le diagnostic différentiel de l'hypergammaglobulinémie comprend la maladie aléoutienne, un lymphome ou lymphosarcome, un myélome multiple et toute infection ou inflammation chronique (gastrite à *Helicobacter mustelae*, maladie inflammatoire chronique de l'intestin...) (Murray et al., 2010). Une leucocytose neutrophilique est parfois détectée. Il est supposé que le recrutement des neutrophiles au sein des granulomes entraîne une hyperproduction compensatrice (Garner et al., 2008 ; Laprie et al., 2009).

Les résultats de l'analyse biochimique sont variables selon les organes touchés. Les plus fréquents semblent être une hyperurémie et l'augmentation des activités ALAT, PAL, GGT et lipase.

Les données concernant l'analyse d'urine sont peu nombreuses. Ont été rapportés une protéinurie, une activité peroxydase, de rares cristaux de bilirubine et une coloration verdâtre des urines traduisant probablement une biliverdinurie (Murray et al., 2010).

Les examens d'imagerie médicale peuvent également orienter le diagnostic. La radiographie abdominale montre généralement une perte de musculature lombaire, une perte de contraste abdominal associée à une cachexie et à un état inflammatoire, la présence de masses tissulaires intra-abdominales, et souvent une splénomégalie. L'échographie abdominale, plus sensible, peut mettre en évidence un nœud lymphatique mésentérique de taille augmentée et/ou de structure anormale (Figure 8), des masses tissulaires (Figure 9), une péritonite, et fréquemment une néphromégalie et une échogénicité corticale rénale modifiée (Dominguez et al., 2011). L'examen tomодensitométrique peut également présenter un intérêt, notamment dans la détection de lésions intracrâniennes (Gnirs et al., 2016).

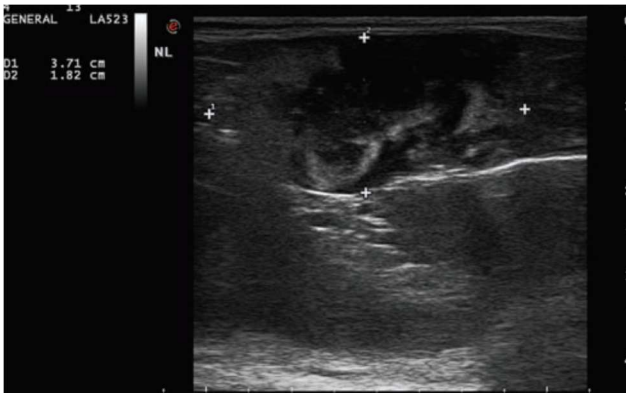


Figure 8. Image échographique d'un nœud lymphatique hypertrophié et hétérogène, FSCD. Dominguez et al. 2011.

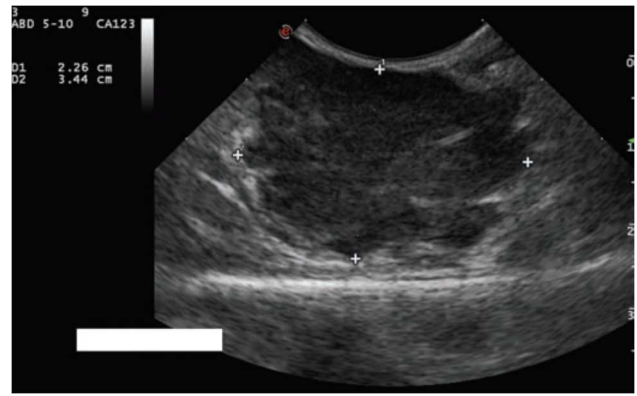


Figure 9. Image échographique d'une masse irrégulière et hétérogène dans du tissu adipeux de l'abdomen moyen, FSCD. Dominguez et al., 2011.

Bien que la structure histologique des granulomes soit très évocatrice, le diagnostic définitif nécessite la mise en évidence d'antigènes coronaviraux au sein des macrophages impliqués dans les lésions, par immunohistochimie (Figure 10). On utilise généralement l'anticorps monoclonal FIPV3-70, qui détecte de manière non spécifique tous les *Alphacoronavirus* (Murray et al., 2010). Théoriquement, le diagnostic étiologique nécessite donc de coupler ce test à une RT-PCR spécifique de FRSCV et FRECV, afin de les différencier. Mais les amorces disponibles pour ces RT-PCR ont été établies à partir d'un nombre limité de souches virales (Wise et al., 2010), et si elles se veulent spécifiques d'un génotype, l'association certaine avec un pathotype a été réfutée (voir A - Étiologie). Dans ce contexte, un résultat de RT-PCR négatif pour FRSCV ne saurait exclure formellement une FSCD si l'immunohistochimie est positive. Un tel cas s'est déjà présenté, avec une RT-PCR négative pour FRSCV mais positive pour FRECV dans le cadre de lésions pyogranulomateuses multi-organiques (Lindemann et al., 2016). En pratique, la seule immunohistochimie pratiquée sur biopsies d'organes présentant des lésions granulomateuses est considérée diagnostique de coronavirose systémique (Gnirs et al., 2016). Sans constituer un diagnostic de certitude, la détection de FRCoV par RT-PCR chez un animal présentant des signes cliniques compatibles est fortement évocatrice de FSCD.

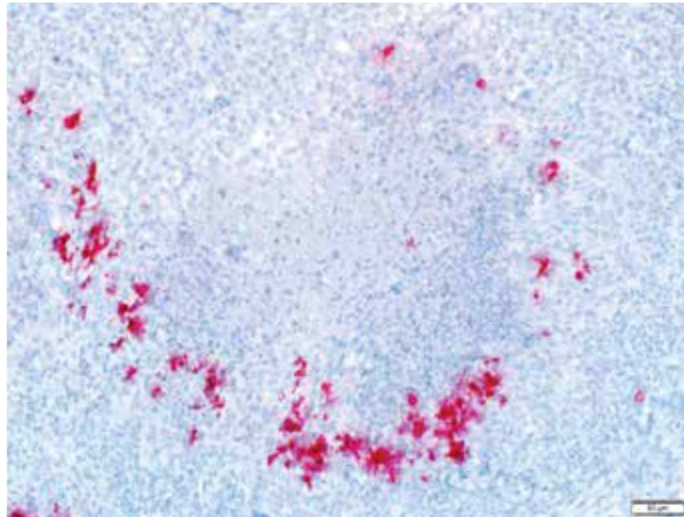


Figure 10. Immunohistochimie, anticorps monoclonal FIPV3-70, tissu adipeux péri-pancréatique.
Les macrophages en périphérie du granulome présentent une forte coloration cytoplasmique traduisant la présence de coronavirus.
Wills et al., 2018.

Un test sérologique permettant de détecter des anticorps dirigés contre FRCoV, sans spécificité génotypique, a été décrit (Minami, Terada, et al., 2016). Un résultat positif indique que l'animal a été exposé à un FRCoV. S'il présente un intérêt pour des études épidémiologiques, ce test ne doit en aucun cas être considéré comme un outil de diagnostic.

6. Traitement

Aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour, et à de rares exceptions près les furets meurent ou sont euthanasiés dans les quelques semaines à mois suivant le diagnostic. Le traitement palliatif vise d'une part à ralentir la progression de l'infection, et d'autre part à maintenir le confort de vie de l'animal en luttant contre les manifestations cliniques. Les principaux traitements et leurs posologies sont récapitulés dans le tableau 2.

Face à une pathogénie centrée sur l'infection des monocytes et macrophages, la thérapeutique fait avant tout appel à des molécules immunosuppressives. La prednisolone est généralement utilisée en première intention. Ce glucocorticoïde limite notamment l'action phagocytaire des macrophages et leur attraction aux sites d'inflammation par chimiotactisme, ralentissant ainsi la progression du virus qui se multiplie dans ces cellules. De plus, la prednisolone présente des propriétés anti-inflammatoires et orexigènes qui peuvent participer à l'amélioration clinique du patient. L'utilisation conjointe d'un autre immunosuppresseur, comme l'azathioprine ou le chlorambucil, peut permettre de diminuer les doses de prednisolone. Les effets indésirables de ces drogues, non étudiés chez le furet

mais connus chez d'autres espèces, doivent être pris en compte dans l'analyse bénéfice/risque de la stratégie thérapeutique (Murray et al., 2010 ; Klaphake, 2011). Toutefois, s'il est généralement contre-indiqué de pratiquer une corticothérapie au long cours en raison d'effets indésirables (ulcères gastro-duodénaux, lymphopénie), le furet fait partie des espèces considérées «résistantes» aux corticoïdes, et en l'absence de molécules plus adaptées il peut être bénéfique de mettre en place une corticothérapie durable (Petritz, Chen, 2018 ; Wills et al., 2018). Il est alors recommandé d'y associer une antibioprophylaxie de couverture (Murray, 2008).

Une thérapie immunomodulatrice a été proposée à travers l'usage d'interférons et de polyisoprénols (Murray et al., 2010). Ces derniers ont fait l'objet d'une étude de terrain chez une soixantaine de chats atteints de la forme sèche de la PIF, avec des résultats prometteurs (Legendre et al., 2017). L'effet thérapeutique d'interférons félines omega et d'interférons humains alpha a également été étudié chez le chat, avec des résultats parfois contradictoires et globalement peu concluants (Ishida et al., 2004 ; Ritz et al., 2007 ; Pedersen, 2014). Des inhibiteurs de réplication virale ont fait l'objet d'études chez le chat (Pedersen et al., 2018 ; 2019), et des auteurs se sont récemment intéressés à l'efficacité d'un inhibiteur de protéase des coronavirus chez le furet, sans aboutir pour l'instant à une solution thérapeutique (Perera et al., 2018).

Bien que l'importance pathogénique, clinique et lésionnelle de la vascularite ne soit pas tout à fait éclaircie, elle peut constituer une cible thérapeutique. Murray et al. (2010) proposent l'utilisation de la pentoxifylline, un inhibiteur des phosphodiésterases qui favorise la microperfusion en augmentant la déformabilité des hématies. De plus, elle présente des effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs théoriquement intéressants (Scagnelli, 2017). D'autres molécules ont été évoquées de manière anecdotique pour lutter contre les lésions vasculaires, notamment la doxycycline, l'ozagrel, l'acide acétylsalicylique et la prednisolone, sans qu'elles aient été étudiées dans le cadre de la FSCD (Murray et al., 2010). L'association de prednisolone, pentoxifylline et doxycycline pourrait avoir un effet synergique dans la modulation de l'inflammation, notamment vasculaire. La doxycycline permettrait alors également d'assurer l'antibioprophylaxie préconisée lors de thérapie immunosuppressive.

L'utilisation de molécules antioxydantes a été proposée pour réduire la production de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène due à l'hyperstimulation immunitaire. L'utilisation de la superoxyde dismutase et de la mélatonine a été suggérée. La seconde

présente également des propriétés anti-inflammatoires, antivirales, immunomodulatrices et orexigènes, qui n'ont pas été évaluées chez le furet (Murray et al., 2010).

Le traitement symptomatique doit être adapté à la présentation clinique. On peut utiliser le sucralfate comme gastroprotecteur, le maropitant ou le métoclopramide comme antiémétiques, et différents antiacides. La cimétidine est préconisée en raison de son action antivirale et pro-immunitaire, mais l'oméprazole ou la ranitidine peuvent également être utilisés (Murray et al., 2010). La consistance des selles peut être améliorée par l'administration de kaolin-pectine ou de lopéramide. Le traitement symptomatique de la diarrhée fait également appel à l'utilisation d'antibiotiques (amoxicilline-acide clavulanique en première intention) et de probiotiques. La déshydratation peut être prise en charge par une fluidothérapie sous-cutanée ou intraveineuse. Dans les cas les plus sévères d'anémie, une transfusion de sang total est envisageable.

Tout comme dans le traitement de l'ECE, le soutien nutritionnel est indispensable. Un aliment hyperdigestible et hyperénergétique, riche en lipides et protéines, doit être proposé. On le préférera sous forme humide, voire liquide, pour en faciliter l'ingestion et pouvoir l'administrer à la seringue si besoin. Une supplémentation vitaminique peut aussi être mise en place ; un apport de cobalamine pourrait notamment améliorer la diarrhée chronique (Murray et al., 2010).

Tableau 2. Posologie des principaux traitements médicamenteux utilisés dans le cadre de FSCD.

IM : voie intra-musculaire ; IV : voie intra-veineuse ; PO : per os ; q : quaque ; SC : voie sous-cutanée.

¹Morrissey et Johnston, 2018. ²Klaphake, 2011.

Traitement	Molécule	Posologie	Remarques
Immunosuppression	Prednisolone	1-2 mg/kg PO q12h ²	Dose immunosuppressive initiale. Diminuer les doses progressivement.
Antibiothérapie	Doxycycline	10 mg/kg PO q12h ^{1,2}	Présente des effets anti-inflammatoires.
Protecteur vasculaire	Pentoxifylline	20 mg/kg PO q12h ¹	Favorise la microcirculation. Présente des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices.
Antiacide	Cimétidine	10 mg/kg PO, IV, SC, IM q8h ^{1,2}	Antiacide à préférer en raison de ses actions antivirale et pro-immunitaire. Peu appétente, privilégier les voies parentérales.
Protecteur gastrique	Sucralfate	25-125 mg/kg PO q12h ¹	Administrer avant les repas et à distance des antiacides.
Antiémétiques	Métoclopramide	0,2-1 mg/kg PO, SC, IM q6-8h ¹	
	Maropitant	1 mg/kg SC q24h ²	

7. Prévention

En l'absence d'une connaissance exhaustive de la pathogénie de l'infection, la prévention consiste à limiter l'exposition au FRCoV. Cela passe en particulier par une bonne hygiène de la litière, avec retrait des selles aussi souvent que possible et désinfection au moins hebdomadaire. L'isolement des individus ayant fait l'objet d'un diagnostic de coronavirose systémique peut être recommandé. Néanmoins, dans les environnements où de nombreux furets se côtoient, il est utopique de vouloir empêcher la diffusion des virus.

Bien qu'un auteur ait suggéré l'utilisation du vaccin dirigé contre la PIF chez le furet (Murray, 2008), les réserves émises quant à l'intérêt de ce vaccin même chez le chat (Addie et al., 2009) ne peuvent conduire à le recommander en l'absence d'études menées spécifiquement chez le furet.

PARTIE 2 - ÉTUDE PROSPECTIVE

I - Objectifs

A - Objectif principal

L'épidémiologie descriptive des coronavirus de furets a été principalement étudiée au Japon (Terada, Minami, et al., 2014) et aux Pays-Bas (Provacia et al., 2011). Les seules publications françaises concernent des rapports de cas (Laprie et al., 2009 ; Linsart et al., 2013 ; Gnirs et al., 2016). L'objectif principal de cette étude est d'appréhender la situation épidémiologique en France et en Belgique, en recherchant et en caractérisant les coronavirus chez des furets de tous statuts sanitaires, provenant de nombreux points géographiques.

B - Objectifs secondaires

Les coronavirus présentent généralement un tropisme digestif ou respiratoire, or aucun FRCoV n'a été détecté dans la sphère respiratoire de furets à ce jour, hors infection expérimentale. Comme suggéré par Terada, Minami, et al. (2014), nous nous sommes donc attachés à rechercher des coronavirus au sein de l'arbre respiratoire de furets.

Face à la suspicion d'une pathogénie d'origine vasculaire, nous nous sommes intéressés à la recherche de coronavirus dans le sang des furets présentant une coronavirose systémique. En effet, il a été proposé que le virus soit détectable dans des monocytes circulants (Murray et al., 2010).

Enfin, face à la proximité génétique des coronavirus de furets et de visons, nous avons voulu explorer la possibilité d'une interface épidémiologique entre le furet domestique et la faune sauvage, en recherchant des coronavirus chez des mustélidés sauvages.

II - Matériels et méthodes

A - Recrutement des prélèvements

Nous avons sollicité 35 vétérinaires exerçant en clientèle NAC en France et en Belgique, au sein d'écoles vétérinaires, de cliniques dédiées aux NAC ou de services NAC de cliniques ou

centres hospitaliers vétérinaires. Les prélèvements analysés, reçus entre novembre 2017 et août 2019, proviennent de 12 structures différentes.

Il a été demandé aux praticiens volontaires de récolter les selles d'autant de furets que possible, quels que soient les motifs de présentation et les signes cliniques, que les animaux soient suspects ou non de coronavirose entérique ou systémique. Chaque prélèvement était accompagné d'une fiche de commémoratifs reproduite en annexe 1. De plus, pour les animaux suspects de FSCD, le prélèvement d'organes atteints d'inflammation granulomateuse et de sang était encouragé. Les prélèvements respiratoires étaient à envisager lors de symptomatologie respiratoire d'étiologie indéterminée.

Pour les mustélidés sauvages, nous avons reçu des fèces d'animaux vivants issus du centre de soins de la faune sauvage de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, et des prélèvements de contenu intestinal et de muqueuse intestinale d'animaux morts provenant du Groupe de Recherche et d'Étude pour la Gestion de l'Environnement (GREGE). Chaque prélèvement devait être accompagné d'une fiche de renseignements, différente pour les animaux vivants et pour les prélèvements d'autopsie. Ces fiches sont reproduites en annexe 2.

B - Prélèvement, transport, réception et stockage

Le choix du support de prélèvement s'est porté sur les cartes FTA® (Flinders Technology Associates). Il s'agit d'une matrice de cellulose imprégnée de dénaturants chimiques et de capteurs de radicaux libres, permettant la conservation du matériel génétique à température ambiante durant plusieurs semaines, assurant un transport facilité (Cardona-Ospina et al., 2019). Il a été vérifié que ce procédé permet l'inactivation et la conservation du *Gammacoronavirus* responsable de la bronchite infectieuse des Gallinacés (IBV) (Moscoso et al., 2005), et est donc adapté au traitement de grands virus à ARN. En proposant un mode de prélèvement permettant un stockage aisé et un délai important entre le prélèvement et l'envoi, nous avons espéré maximiser le nombre de prélèvements reçus. Des cartes FTA® vierges ont été envoyées à tous les vétérinaires partenaires. Certains prélèvements nous sont cependant parvenus conditionnés en tubes secs ou sous forme d'écouvillons.

Les prélèvements étaient traités dans les 48 heures suivant leur arrivée au laboratoire ou stockés à -18 °C jusqu'à leur traitement.

C - Extraction de l'ARN

Les traitements préalables à l'extraction d'ARN diffèrent selon la nature du prélèvement et sont détaillés ci-dessous. L'extraction a été réalisée à l'aide du QIAGEN® QIAamp® Viral RNA Mini Kit selon le protocole par centrifugation recommandé par le fabricant et détaillé en annexe 3. À la suite de l'extraction, les ARN étaient stockés à -80 °C.

1. Prélèvements sur carte FTA®

Un fragment d'environ 4 x 2 mm a été découpé à la lame stérile dans chaque emplacement et élué dans 300 µL de tampon TE (Tris EDTA) sur plateau oscillant à 40 mouvements par minute pendant 12 heures, à 4 °C. Un fragment de carte découpé à l'extérieur de la zone d'apposition du prélèvement a été élué dans les mêmes conditions pour servir de témoin négatif d'extraction. Une étape de digestion protéique a ensuite été réalisée en ajoutant 5 µL de protéinase K à 50 UI/mL pour 135 µL d'éluat. Le produit obtenu après 10 minutes d'incubation au bain-marie à 56 °C et agitation régulière par vortex pulsé a été utilisé comme fluide acellulaire initial dans le protocole d'extraction.

2. Écouvillons de fèces

Les écouvillons ont été plongés dans 500 µL de PBS (Phosphate Buffer Saline) et agités par vortex pulsé pendant 15 secondes. Une protéolyse par la protéinase K a été réalisée sur 135 µL du surnageant obtenu, selon les modalités détaillées en 1. Le témoin négatif a été réalisé à partir de 135 µL de PBS.

3. Fragments d'organes et sang

Pour les prélèvements sanguins et tissulaires, une étape de broyage a été réalisée à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur Precellys®. Cinq cents microlitres de PBS ont été ajoutés à un tube à billes contenant un fragment de tissu ou 200 µL de sang. Le tube a subi deux sessions de broyage de 15 secondes à 5 000 mouvements par minute, espacées de 60 secondes. Cent trente-cinq microlitres de surnageant ont été prélevés pour l'étape de protéolyse telle que décrite en 1. et 135 µL de PBS pour le témoin négatif.

D - Détection d'ARN coronaviral par RT-PCR

Pour tous les échantillons traités, une recherche d'ARN de coronavirus a été effectuée par RT-PCR conventionnelle à l'aide de deux paires d'amorces : IN-6 / IN-7 qui ciblent une séquence conservée de 440 nucléotides de l'ORF rep1b codant pour la protéine RdRp des coronavirus (Chu, 2007) et FRCoV RdRp-F1 / FRCoV RdRp-R1 qui détectent plus sensiblement une séquence de 295 nucléotides incluse dans la précédente, spécifique du FRCoV (Terada, Minami, et al., 2014) (Tableau 3). Le kit QIAGEN® OneStep RT-PCR a été utilisé avec une concentration d'amorces de 0,6 µM dans un volume final de 25 µL (Tableau 4).

Les étapes du cycle et les conditions de température associées sont récapitulées dans le tableau 5. De l'eau nanopure a été utilisée comme témoin négatif. Des prélèvements reçus et détectés positifs ont été utilisés ensuite comme témoins positifs. Les étapes d'extraction d'ARN et de préparation du mix de RT-PCR ont été réalisées sur des paillasses différentes, dans une autre pièce que celle où ont eu lieu les RT-PCR et les électrophorèses.

Tableau 3. Récapitulatif des amorces utilisées.

pb : paires de bases.

Virus ciblés	Gène cible	Amorces sens		Amorces antisens		Taille du produit
		Nom	Séquence (5' → 3')	Nom	Séquence (5' → 3')	
Coronavirus	RdRp (ORF 1b)	IN-6	5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'	IN-7	5'-CCATCATCAGATAGAATCATCATA-3'	440 pb
FRCoV	RdRp (ORF 1b)	FRCoV RdRp-F1	5'-GTTGGTTGCTGCACACATAG-3'	FRCoV RdRp-R1	5'-GGAGAAGTGCTTACGCAAATA-3'	295 pb
FRCoV génotype 1	S (ORF 2)	FRSCV MSU-1 forward	5'-CTGGTGTGTTGTGCAACATCTAC-3'	FRSCV MSU-1 reverse	5'-TCTATTTGCACAAAATCAGACA-3'	157 pb
FRCoV génotype 2	S (ORF 2)	FRECV MSU-2 forward	5'-GGCATTGTTTTGATAACGTTG-3'	FRECV MSU-2 reverse	5'-CTATTAATTCGCACGAAATCTGC-3'	146 pb

Tableau 4. Composition du mix de RT-PCR.

Réactif	Volume (µL)
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5
dNTP (10 mM)	1
Amorce sens (10 µM)	1,5
Amorce anti-sens (10 µM)	1,5
RNaseOUT	0,2
Eau	11,8
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1
ARN	3
Volume total	25

Tableau 5. Étapes et conditions de durée et température de RT-PCR.

Étape		Température	Durée
Transcription inverse		48 °C	10 min
Dénaturation initiale		95 °C	15 min
40 cycles	Dénaturation	94 °C	30 s
	Hybridation	53 °C	30 s
	Polymérisation	72 °C	2 min
Élongation finale		72 °C	10 min

Les produits de RT-PCR ont subi une électrophorèse sur gel à 1,5 % d'agarose contenant un intercalant de l'ADN (SYBR® Safe DNA Gel Stain) utilisé au 1/10 000^{ème}. Les résultats ont été visualisés par transillumination en lumière bleue. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire a permis la vérification de la taille des amplicons (Figure 11).

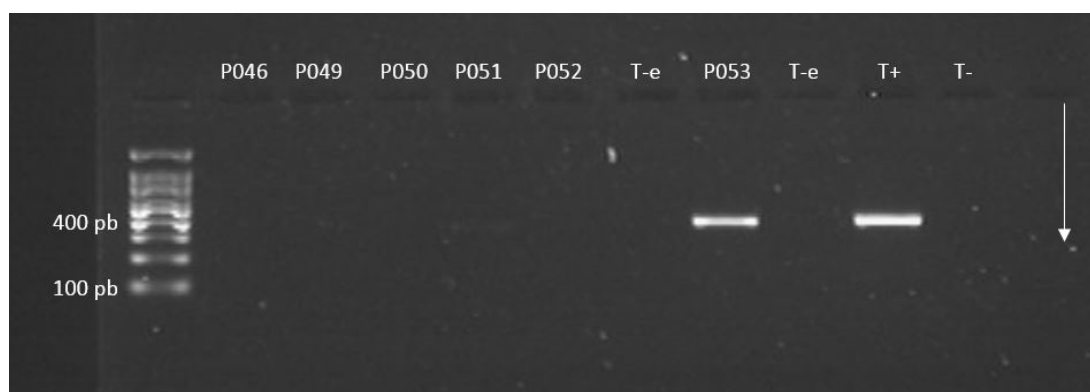


Figure 11. Exemple de lecture d'un gel d'électrophorèse.
T-e : témoin négatif d'extraction ; T+ : témoin positif de RT-PCR ; T- : témoin négatif de RT-PCR ; pb : paires de bases. Flèche : sens de migration.

Deux RT-PCR supplémentaires ont été réalisées sur tous les prélèvements positifs pour au moins une des deux RT-PCR précédentes. Les amorces utilisées sont celles développées par Wise et al. (2010), amplifiant une séquence codant pour une portion de la protéine S, spécifique de chaque génotype (voir Partie 1 – II – A – Étiologie). Les RT-PCR détectant les génotypes 1 et 2 amplifient respectivement des fragments de 157 et 146 pb (paires de bases) (Tableau 3). Les conditions précédemment décrites ont été utilisées pour l'amplification (Tableaux 4 et 5) et la détection. Un prélèvement détecté positif a été utilisé comme témoin positif pour le génotype 1. Pour le génotype 2, une séquence témoin synthétisée par un laboratoire prestataire a été utilisée. De l'eau nanopure a été utilisée comme témoin négatif.

E - Séquençage partiel

Pour tous les résultats positifs en RT-PCR, l'ADN de l'amplicon a été extrait en utilisant le kit QIAGEN® QIAquick® DNA Gel Extraction selon les recommandations du fabricant (voir annexe 4), et séquencé par méthode Sanger dans un laboratoire prestataire.

F - Traitement des données génomiques

Les séquences brutes obtenues ont été éditées à l'aide du logiciel BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999). L'aspect des chromatogrammes a été évalué visuellement pour déterminer les séquences retenues (Figure 12). Les séquences sens et antisens issues d'un même prélèvement ont ensuite été alignées avec le programme ClustalW Multiple Alignment (paramètres par défaut) (Thompson et al., 1994), les erreurs d'appariement ont été arbitrées par observation des chromatogrammes, et une séquence consensus a été créée pour chaque amplicon. Pour une seule séquence (P107, génotype 1), la qualité des données de séquençage n'a permis l'exploitation que de la séquence antisens.

Le logiciel MEGA version 10.1.5 (Kumar et al., 2018) a été utilisé pour déterminer le meilleur modèle à appliquer et construire les arbres phylogénétiques.

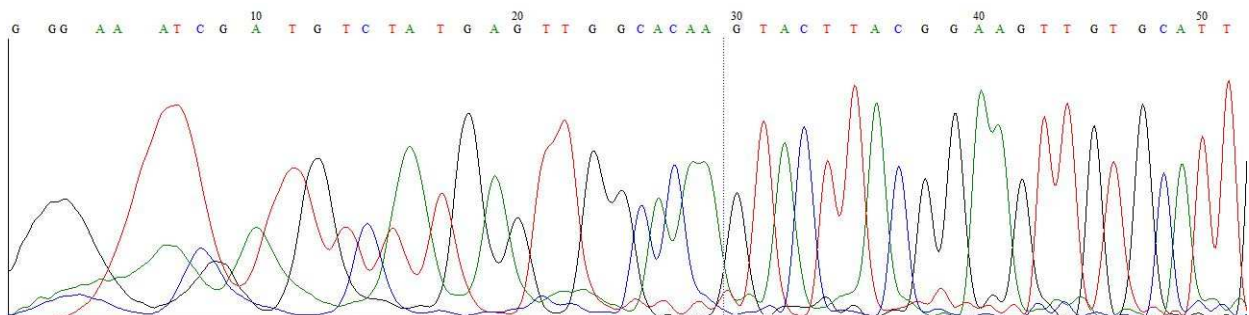


Figure 12. Chromatogramme obtenu par séquençage Sanger de l'ADN amplifié par RT-PCR du prélèvement P027 (amorce FRCov RdRp-F1).

La séquence retenue commence au trentième nucléotide.

III - Résultats

A - Bilan des prélèvements reçus

Nous avons reçu des prélèvements provenant de 138 furets en France et en Belgique, parmi lesquels 135 ont pu être inclus dans l'étude. Ces prélèvements comprenaient 141 prélèvements de fèces provenant de 133 animaux, 29 prélèvements sanguins, 6 prélèvements tissulaires provenant de 4 animaux (foie, nœud lymphatique mésentérique, biopsie de masse digestive, péritoine, intestin) et 10 prélèvements respiratoires (3 lavages broncho-alvéolaires provenant de 2 animaux et 7 écouvillons trachéaux). Pour les mustélidés sauvages, nous avons reçu 4 prélèvements d'animaux vivants et 66 prélèvements d'autopsie. La répartition des prélèvements reçus par espèce est présentée en figure 13.

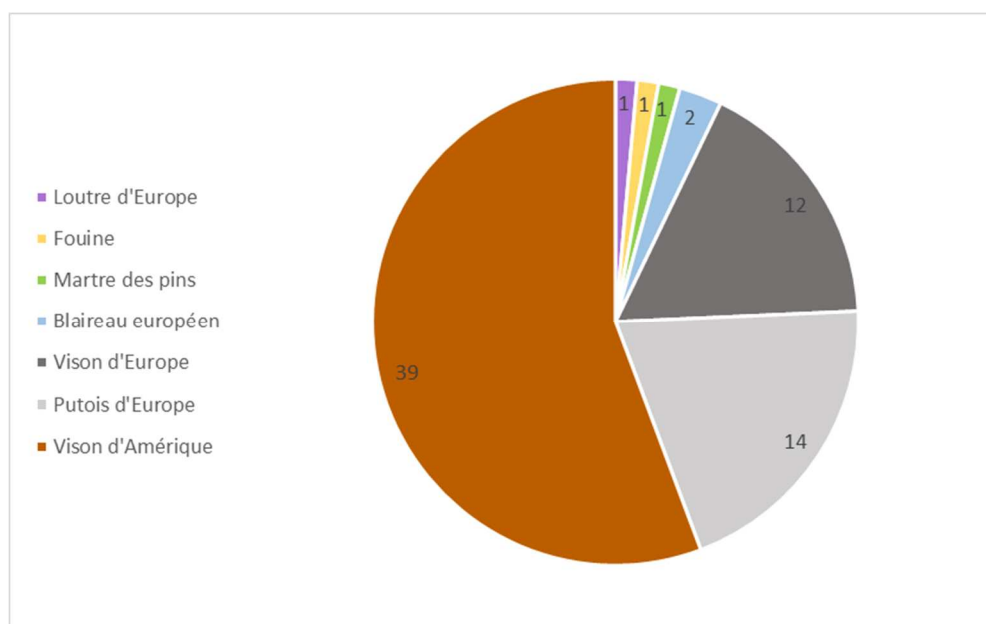


Figure 13. Répartition des prélèvements reçus de mustélidés sauvages par espèce.

B - Caractérisation de la population de furets

Les animaux ont été prélevés dans 12 structures vétérinaires différentes. Leur répartition géographique est représentée en figure 14. Sur 135 furets, nous avons dénombré 70 mâles (52 %), 57 femelles (42 %) et 8 (6 %) dont le sexe n'a pas été renseigné. L'âge de 16 animaux était inconnu ou non précisé, les autres sont répartis par classe d'âge dans la figure 15.

Les furets provenaient d'élevages ou de particuliers (63 animaux, 47 %), d'animaleries (27 animaux, 20 %), ou avaient été adoptés en refuge ou trouvés (15 animaux, 11 %). Pour 30 furets (22 %), l'origine était inconnue ou non renseignée. L'alimentation n'a pas été

renseignée pour 14 furets (10 %). Parmi les autres, 50 (41 %) recevaient uniquement une alimentation industrielle, 28 (23 %) recevaient exclusivement une alimentation fraîche (proies entières et/ou ration ménagère), et 43 (36 %) étaient nourris de manière mixte. Quarante-sept furets vivaient en communauté avec au moins un congénère (75 % des furets pour lesquels l'information était disponible), 32 (31 %) vivaient avec au moins un chat et 45 (44 %) vivaient avec d'autres animaux. Soixante-trois animaux (58 %) étaient susceptibles d'accéder à l'extérieur.

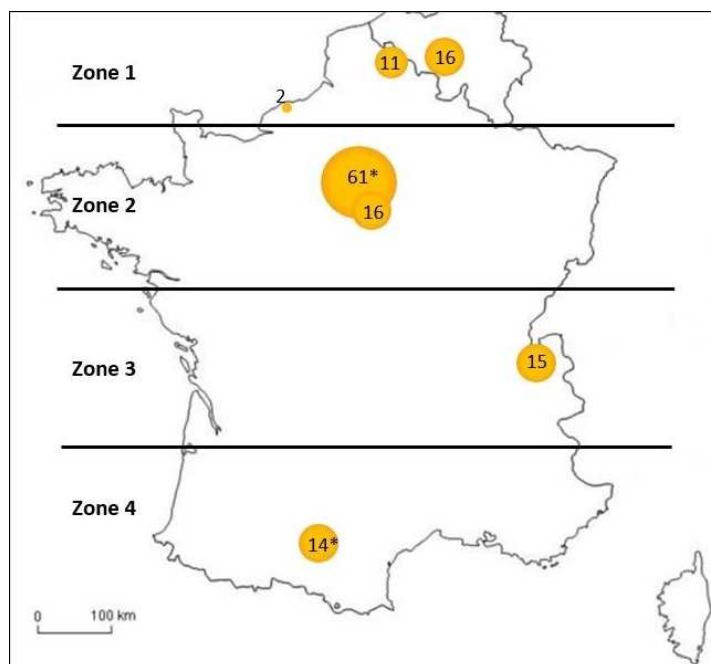


Figure 14. Répartition géographique des furets par lieu de prélèvement. Les nombres suivis d'un astérisque regroupent plusieurs structures géographiquement proches. Les zones sont celles retenues pour l'analyse statistique. (Fond de carte modifié d'après europeansectionlgm.typepad.fr)

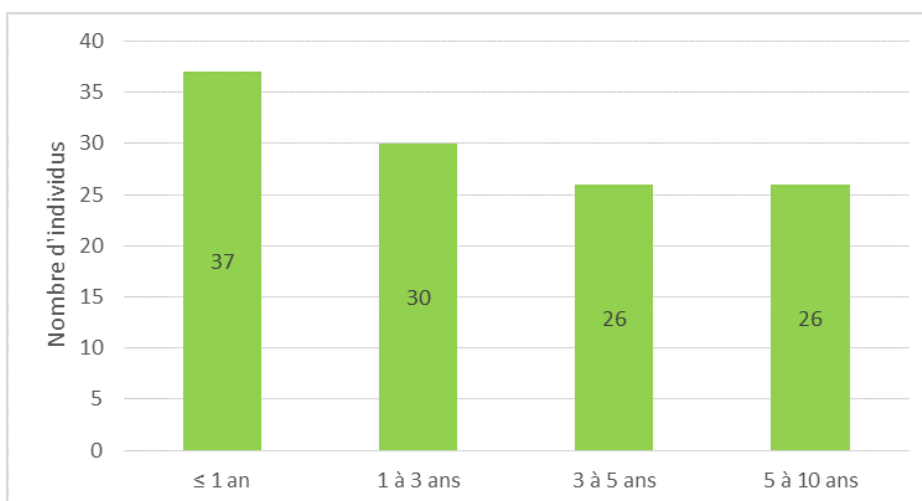


Figure 15. Répartition des furets par classe d'âge.

C - Caractérisation des prélèvements

Les prélèvements de fèces ont été reçus sur carte FTA® (74 %) ou sous forme d'écouvillons frais (26 %). Ils provenaient de 133 animaux dont 51 (38 %) ne présentaient pas de signes cliniques, 40 (30 %) présentaient uniquement des signes digestifs, et 31 (23 %) présentaient d'autres signes. Pour les 11 furets restants, l'information n'était pas disponible. Une coronavirose entérique était suspectée dans 21 cas (16 %) et une coronavirose systémique dans 9 cas (7 %).

Les prélèvements sanguins ont été reçus sur cartes FTA® (79 %) ou en tube sec (21 %). Ils étaient issus de 29 furets, non suspects de coronavirose (21 animaux, 72 %), ou suspects de coronavirose entérique (4 animaux, 14 %) ou systémique (5 animaux, 17 %).

Les prélèvements tissulaires ont été reçus sous forme fraîche (cinq prélèvements) ou comme empreinte sur carte FTA® (un prélèvement). Ils provenaient de quatre animaux dont trois étaient suspects de coronavirose systémique.

Les écouvillons trachéaux ont été reçus sur cartes FTA®, et l'un des animaux présentait des signes respiratoires. Les LBA, reçus sous forme liquide, provenaient de deux animaux à symptomatologie respiratoire.

Les prélèvements de contenu intestinal et de muqueuse intestinale de mustélidés sauvages ont été réalisés sur cartes FTA®. Les fèces ont été récupérées fraîches.

D - Résultats de RT-PCR

Tous les prélèvements de faune sauvage se sont révélés négatifs avec les amorces consensuelles et spécifiques de FRCoV. Les résultats présentés ici ne concernent donc que les prélèvements de furets domestiques.

L'utilisation des amorces consensuelles IN-6 et IN-7 a permis l'identification de cinq prélèvements de fèces et un prélèvement de nœud lymphatique mésentérique positifs, issus de cinq animaux différents dont deux provenaient du même foyer. Le furet dont les selles et le nœud lymphatique mésentérique ont été détectés positifs était suspect de coronavirose systémique, et un autre était suspect de coronavirose entérique. Les trois derniers ne présentaient pas de signes cliniques.

Les amorces FRCoV RdRp-F1 et FRCoV RdRp-R1 ont permis la détection de FRCoV dans 11 prélèvements appartenant à 10 animaux, dont les 6 testés positifs avec les amorces consensuelles. Ils comprennent trois prélèvements de fèces issus d'animaux non suspects de coronavirose, une biopsie de masse provenant d'un furet à signes évocateurs de FSCD mais ne présentant pas d'autres granulomes visibles à la laparotomie, et un écouvillon trachéal de furet sain. Aucun prélèvement de sang ni de LBA ne s'est révélé positif. L'ensemble des résultats selon le type de prélèvement est présenté dans le tableau 6.

Quatre prélèvements issus de trois animaux répartis dans deux foyers se sont révélés positifs avec la RT-PCR spécifique du génotype 1 : trois prélèvements de fèces et un nœud lymphatique mésentérique. Toutes les RT-PCR sur le génotype 2 ont donné des résultats négatifs. Les résultats positifs sont synthétisés dans le tableau 7.

Tableau 6. Synthèse des prélèvements reçus et résultats (amorces RdRp).

Support	Prélèvement	Positifs	Négatifs	Total
Carte FTA®	Fèces	1	103	104
	Sang	0	23	23
	Écouvillon trachéal	1	6	7
	Organe	0	1	1
Prélèvement brut	Fèces	7	30	37
	Sang	0	6	6
	Organe	2	3	5
	LBA	0	3	3
Total		11	175	186

Tableau 7. Synthèse des résultats positifs.

ECV : coronavirose entérique ; ID : identification du prélèvement ; NL : nœud lymphatique ; SCV : coronavirose systémique.

ID	Animal	Prélèvement	Support	Clinique et épidémiologie	Suspicion	IN-6/IN-7	FRCoV RdRp	Génotype 1	Génotype 2
P003	A001	Écouvillon trachéal	Carte FTA®	Sain		-	+	-	-
P025	A009	Fèces	Écouvillon	Diarrhées, cachexie progressive, affaiblissement, adénomégalie mésentérique, symptômes nerveux. Animal décédé.	SCV	+	+	+	-
P027		NL mésentérique	Tube sec			+	+	+	-
P032	A012	Fèces	Écouvillon	Maigreux, alopecie bilatérale. Suspicion de maladie surrénalienne.		-	+	-	-
P040	A017	Fèces	Écouvillon	Diarrhée verte, anorexie. Arrivée récente d'un nouvel individu.	ECV	+	+	-	-
P053	A025	Fèces	Écouvillon	Sain, congénère d'un furet décédé suspect de SCV.		-	+	-	-
P066	A035	Fèces	Carte FTA®	Hyperthermie		-	+	-	-
P106	A071	Fèces	Écouvillon	Furets sains issus du même foyer, congénères d'un furet décédé suspect de SCV.		+	+	+	-
P107	A072	Fèces	Écouvillon		+	+	+	-	
P124	A088	Biopsie de masse digestive	Tube sec	Maigreux. Masse abdominale adhérente à l'estomac et à l'intestin grêle. Absence de granulomes abdominaux à la laparotomie.		-	+	-	-
P133	A094	Fèces	Écouvillon	Sain		+	+	-	-

E - Approche statistique

Afin d'étudier la corrélation entre les caractéristiques épidémiologiques retenues et les résultats de RT-PCR, nous avons décidé de considérer les animaux plutôt que les prélèvements. Le seul furet ayant été prélevé à plusieurs reprises avec des résultats différents a été considéré positif en raison de l'excrétion intermittente du virus. Un autre animal présentait des signes digestifs lors d'un premier prélèvement, et une absence de signes lors du second ; il a été exclu de l'analyse s'intéressant aux signes cliniques. Enfin, les animaux dont plusieurs prélèvements contemporains ont donné des résultats négatifs et positifs ont été considérés positifs. Aucun des paramètres ne satisfaisant à l'indépendance des variables nécessaire à l'application du test du khi-deux, le test de Fisher exact a été utilisé pour l'analyse univariée (Tableau 8). Le faible taux de positivité n'a pas permis d'effectuer une analyse multivariée en raison d'un manque de puissance.

Tableau 8. Récapitulatif des variables et résultats du test de Fisher exact.

Les zones géographiques font référence à la figure 14.

Variables		Nombre de positifs	Nombre total	Pourcentage de positifs	p-value
Support	Cartes FTA®	2	98	2 %	< 0,01
	Ecouvillons	8	37	22 %	
Présence de chats	Oui	6	32	19 %	0,03
	Non	3	70	4 %	
Localisation géographique	Zone 1	0	29	0 %	0,07
	Zone 2	6	77	8 %	
	Zone 3	1	15	7 %	
	Zone 4	3	14	21 %	
Sexe	Mâle	3	70	4 %	0,11
	Femelle	7	57	12 %	
Origine	Elevage ou particulier	7	63	11 %	0,15
	Animalerie	0	27	0 %	
	Refuge	2	15	13 %	
Symptômes	Digestifs	2	41	5 %	0,70
	Autres	3	32	9 %	
	Aucun	5	51	10 %	
Présence d'autres furets	Oui	7	91	8 %	0,71
	Non	3	30	10 %	
Accès à l'extérieur	Oui	4	63	6 %	0,72
	Non	4	45	9 %	
Présence d'autres animaux	Oui	3	45	7 %	0,73
	Non	6	57	11 %	
Classe d'âge	≤ 1 an	4	37	11 %	0,97
	1 à 3 ans	2	30	7 %	
	3 à 5 ans	2	26	8 %	
	5 à 10 ans	2	26	8 %	
Suspicion de coronavirose	Oui	2	27	7 %	1,00
	Non	8	108	7 %	

F - Analyse génétique

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été comparées à celles de la banque de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) grâce à l'outil *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) et identifiées comme séquences de FRCoV, avec une identité de 95,25 % à 98,64 % avec les séquences publiées les plus proches. Les souches correspondant à ces séquences ont été nommées comme indiqué dans le tableau 9. Les séquences ne correspondant pas au génome de coronavirus de furet n'ont pas été considérées.

En raison de la plus grande sensibilité des amorces FRCoV RdRp-F1 et FRCoV RdRp-R1 et de la proximité des séquences obtenues par les amorces IN-6 / IN-7, seules les séquences obtenues par le premier couple d'amorces ont été analysées phylogénétiquement.

Les arbres phylogénétiques (Figures 16 et 17) ont été construits selon la méthode du maximum de vraisemblance par le modèle Tamura 3 paramètres (Tamura, 1992), en intégrant les séquences de FRCoV publiées disponibles dans la base de données du NCBI¹. Des séquences de MCoV et FCoV ont été ajoutées en tant qu'extra-groupe. Pour des raisons de lisibilité, la figure 17 ne comporte qu'une sélection des séquences disponibles, représentatives des principaux clusters observés. Le dendrogramme complet est représenté en annexe 5.

Tableau 9. Dénomination des souches positives.
ID : identification du prélèvement ; NL : nœud lymphatique.

ID	Animal	Prélèvement	FRCoV RdRp	Génotype 1	Souche
P003	A001	Ecouvillon trachéal	+	-	FRCoV 003 FR 2017
P025	A009	Fèces	+	+	FRCoV 025 FR 2017
P027		NL mésentérique	+	+	FRCoV 027 FR 2017
P032	A012	Fèces	+	-	FRCoV 032 FR 2017
P040	A017	Fèces	+	-	FRCoV 040 FR 2018
P053	A025	Fèces	+	-	FRCoV 053 FR 2018
P066	A035	Fèces	+	-	FRCoV 066 FR 2018
P106	A071	Fèces	+	+	FRCoV 106 FR 2018
P107	A072	Fèces	+	+	FRCoV 107 FR 2018
P124	A088	Biopsie de masse digestive	+	-	FRCoV 124 FR 2019
P133	A094	Fèces	+	-	FRCoV 133 FR 2019

¹ Consultée le 10/12/2019 à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

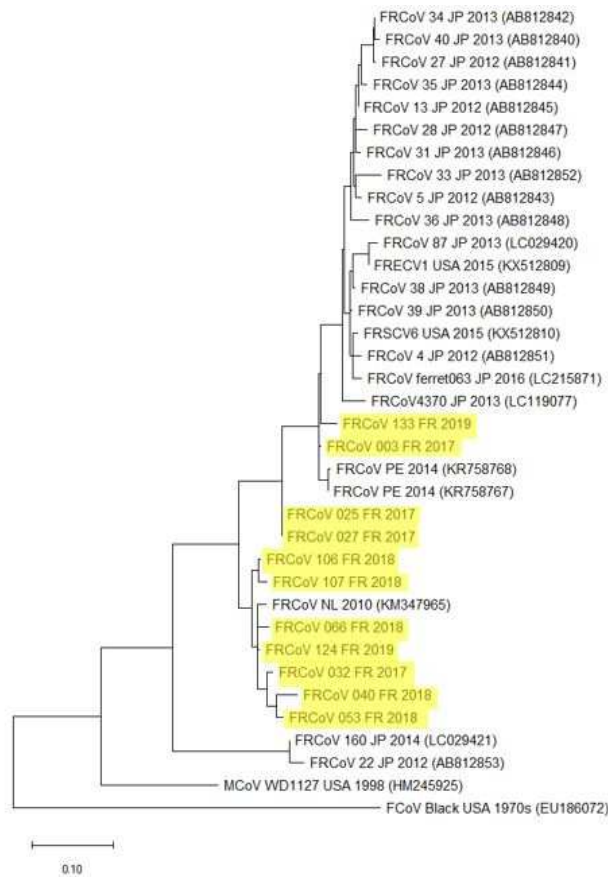


Figure 16. Arbre phylogénétique construit sur la base de séquences partielles du gène RdRp. Les séquences issues de cette étude sont surlignées en jaune. Les numéros d'accension GenBank® sont indiqués entre parenthèses. Méthode utilisée : maximum de vraisemblance, modèle Tamura 92 (G).
FR : France ; JP : Japon ; NL : Pays-Bas ; PE : Pérou ; USA : États-Unis. Échelle : substitutions par nucléotide.

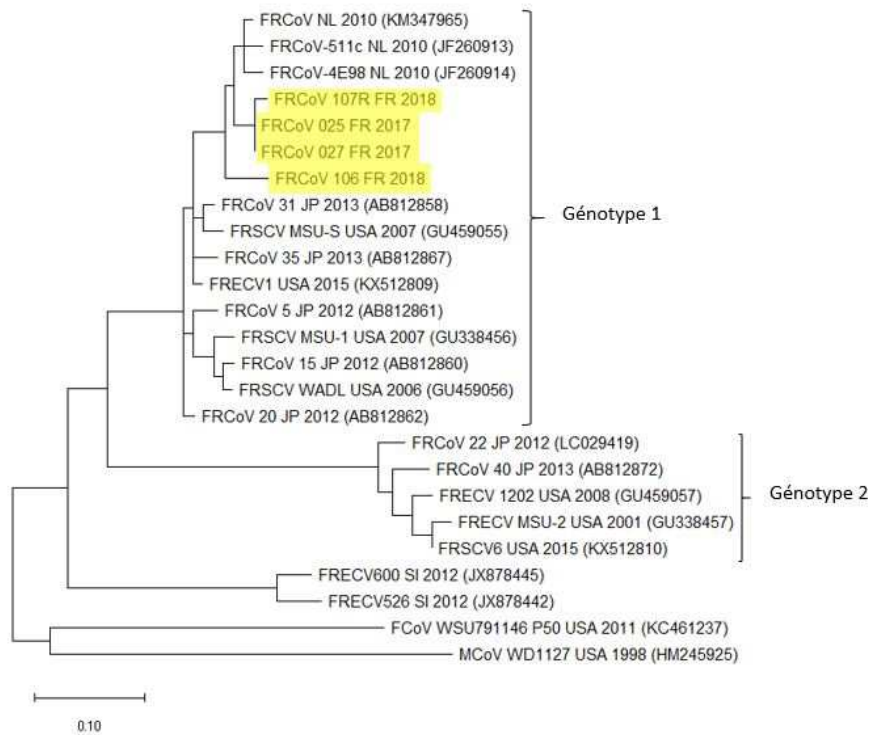


Figure 17. Arbre phylogénétique construit sur la base de séquences partielles du gène S. Les séquences issues de cette étude sont surlignées en jaune. Les numéros d'accension GenBank® sont indiqués entre parenthèses. Méthode utilisée : maximum de vraisemblance, modèle Tamura 92 (G+I).
FR : France ; JP : Japon ; NL : Pays-Bas ; PE : Pérou ; USA : États-Unis ; SI : Slovénie. Échelle : substitutions par nucléotide.

IV - Discussion

A - Méthodologie

Le choix de la détection des virus dans les fèces nécessite d'être prudent dans l'interprétation des résultats. En effet, l'excrétion digestive de virus peut être intermittente, et l'absence d'ARN viral dans les matières fécales ne permet pas de conclure que l'animal testé n'est pas infecté (Kiupel, Perpiñán, 2014). À l'inverse, un test sérologique a été développé, détectant les anticorps dirigés contre une portion de la protéine N (Minami, Terada, et al., 2016). S'il est d'une pertinence clinique limitée, car un résultat de sérologie positif ne traduit qu'une exposition passée de l'animal testé à un FRCoV sans préjuger de son excrétion actuelle ni de son implication dans d'éventuels signes cliniques, il pourrait revêtir un intérêt lors d'études épidémiologiques. Au Japon, la séroprévalence a été estimée à 89 % (31/35) pour une viroprévalence de 55,7 % (44/79) (Terada, Minami, et al., 2014).

Malgré ses limites, la méthode choisie permet de détecter les animaux excréteurs et de confronter les résultats à ceux obtenus dans d'autres pays selon une méthodologie similaire. Au Japon, les fèces de 55,7 % des 79 furets testés se sont révélées positives au FRCoV (amorces FRCoV RdRp F1 / FRCoV RdRp R1) (Terada, Minami, et al., 2014). Aux Pays-Bas, l'utilisation de deux autres paires d'amorces, amplifiant respectivement une séquence conservée de l'ORF1 et une portion du gène N, a permis la détection de FRCoV dans 61 % des 90 écouvillons de fèces issus de furets asymptomatiques (Provincia et al., 2011). Lors d'une étude portant sur l'analyse métagénomique du virome fécal de furets néerlandais et suédois (Smits et al., 2013), une proportion moindre de coronavirus a été détectée (14/39, 36 %). Avec un plus grand nombre de cas, nous n'avons détecté le FRCoV que dans les prélèvements de 6,0 % des furets testés sur selles (8/133), et 7,4 % de l'ensemble des furets testés (10/135).

Pour expliquer un tel écart, il est important d'exclure un biais méthodologique. Les principales différences de méthode entre notre étude et les précédentes résident dans le choix de la population cible (voir partie B – Épidémiologie) et dans l'utilisation des cartes FTA®. Comme précisé en partie II - B, ce support a été validé pour la détection de coronavirus par RT-PCR, et il a permis d'alléger les contraintes pour les vétérinaires partenaires. En effet, pour la conservation et le transport d'échantillons destinés à la détection de coronavirus par RT-PCR, l'OMS préconise un envoi au froid positif (4 °C) dans les 72 heures suivant le prélèvement, ou à -80 °C au-delà (Organisation mondiale de la Santé, 2015). La mise en place de telles

contraintes aurait été extrêmement délétère au nombre d'échantillons récoltés. Cependant, les cartes FTA® sont un mode de prélèvement peu connu des praticiens, et il est à noter que malgré les explications fournies, certains prélèvements n'ont pas été réalisés de manière optimale (Figure 18). En particulier, le dépôt d'une épaisseur conséquente de matières fécales au lieu d'une simple trace pourrait avoir favorisé l'apport d'inhibiteurs de PCR contenus dans les fèces, comme des sels biliaires et des polysaccharides (Lantz et al., 1997 ; Monteiro et al., 1997). Néanmoins, le seul prélèvement de selles positif sur carte FTA® faisait partie de ceux présentant une surabondance de matériel. De plus, le protocole d'extraction de l'ARN comprend des étapes dédiées à l'élimination des contaminants, incluant ces inhibiteurs (voir annexe 3). Pour de futurs travaux, il serait pertinent de s'attacher à comparer les résultats obtenus avec un même échantillon suite à sa conservation sur carte FTA®, au froid positif et à température ambiante. Cela n'a pas été fait ici afin d'alléger la charge pour les vétérinaires participant bénévolement.

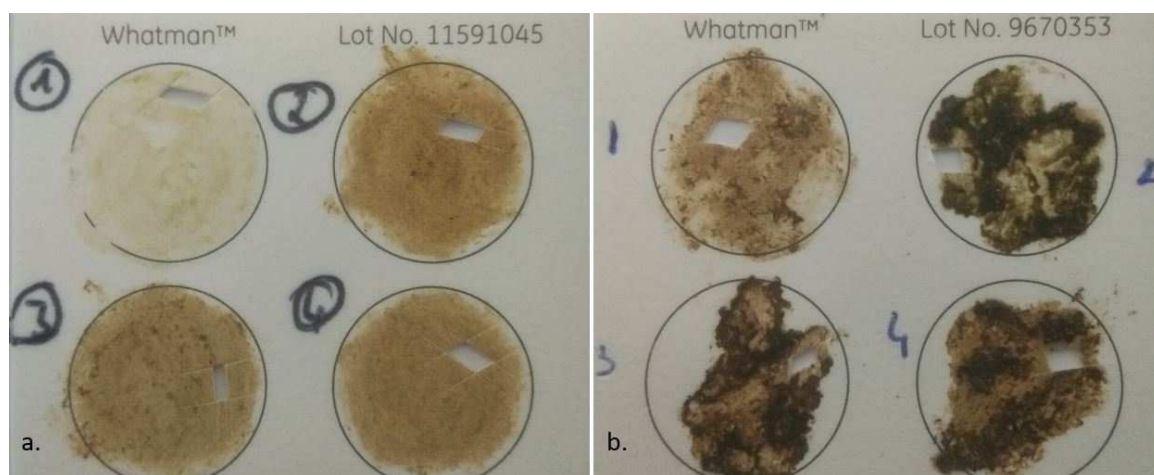


Figure 18. Prélèvements de fèces sur cartes FTA®.

a. Prélèvements réalisés correctement. b. Prélèvements présentant une surabondance de matières fécales.

Il a été montré que les cartes FTA® sont adaptées à la détection par RT-PCR de faibles charges de coronavirus contenues dans du liquide allantoïdien (Moscoso et al., 2005), mais les charges excrétées dans les fèces de furet ne sont pas précisément connues. Il est donc envisageable que de faux négatifs soient dus à une trop faible charge virale dans les échantillons. Cette même étude démontre que les amplicons de petite taille, similaires aux nôtres (383 pb), supportent mieux des conditions de température défavorables ou un délai important avant le traitement des prélèvements que des amplicons de grande taille (1 700 pb). Enfin, même si l'utilisation de ces cartes nécessite de rester prudent dans l'analyse, il est à souligner que parmi les seuls écouvillons de selles le taux de positivité est de 19 % (7/37), ce qui reste inférieur aux taux décrits.

B - Épidémiologie

Le choix de la population cible peut expliquer au moins en partie le faible taux de positivité par rapport aux chiffres précédemment décrits : en nous adressant à des vétérinaires NAC, nous avons sélectionné une population de furets *a priori* bien médicalisés, c'est-à-dire dans laquelle on peut supposer que les propriétaires sont davantage sensibilisés à la gestion sanitaire de leurs animaux. De plus, il s'agit principalement de furets vivant seuls ou en communauté réduite, contrairement aux animaux d'élevage ou de laboratoire. Il est également possible que les quelques années d'écart entre les études aient vu une évolution de la population de furets domestiques impactant la circulation du virus. Les vétérinaires praticiens en NAC déclarent en effet recevoir moins de furets en consultation qu'il y a une dizaine d'années. Enfin, il est à noter que les filières de production de furet de compagnie sont très différentes en France et aux Pays-Bas : alors que quelques élevages néerlandais de grande taille fournissent en grande partie les animaleries d'Europe, les éleveurs français ont tout au plus une centaine de reproducteurs et leur production est majoritairement destinée aux particuliers (Riondet, 2019). Ce fractionnement de la filière pourrait être en partie responsable d'une moindre circulation de virus parmi les furets des foyers français.

Ainsi, le partenariat avec des vétérinaires NAC a permis d'étudier une population au plus près de la réalité clinique des praticiens mais ne permet pas d'extrapoler les résultats à la population totale des furets, car il exclut les individus non ou peu médicalisés. De plus, l'échantillon d'animaux étudié a été déterminé par les choix de prélèvement des vétérinaires. Afin de limiter le biais dû au recrutement des cas, il a été demandé aux praticiens de prélever indifféremment les furets présentés à eux, qu'ils soient suspects ou non d'infection par un coronavirus. Si certains vétérinaires ont en effet prélevé un grand nombre d'animaux sains, d'autres ont envoyé une majorité d'échantillons issus d'animaux suspects. Bien que l'influence de cette sélection soit probablement limitée, car aucun lien n'a été mis en évidence entre suspicion et positivité (Tableau 8), nous ne pouvons prétendre extrapoler les résultats à l'ensemble de la population des furets domestiques de France et de Belgique.

Une caractérisation de la population des furets français a été proposée par Blanchard et al., 2018. Le tableau 10 compare les paramètres communs à cette étude et à la nôtre. Les deux populations semblent présenter des différences en termes d'alimentation et présentent une distribution très différente de l'âge des animaux étudiés, avec une surreprésentation des

animaux de moins d'un an et de plus de cinq ans dans notre étude. Cette différence est aisément explicable par le recrutement des cas en cliniques vétérinaires, où sont principalement rencontrés des animaux malades.

Tableau 10. Comparaison des populations de furets étudiées par Blanchard et al., 2018 et par la présente étude.

¹Bourassin, 2014.

Variables	Blanchard et al. 2018	Étude présente
Nombre total d'individus	1 205	135
Sexe (pourcentage de mâles)	58,5 %	55,1 %
Âge (≤ 1 an)	19,7 %	31,1 %
Âge (1 - 3 ans)	47,0 %	25,2 %
Âge (3 - 5 ans)	21,2 %	21,8 %
Âge (> 5 ans)	12,1 %	21,8 %
Accès à l'extérieur	53,0 % ¹	58,3 %
Alimentation strictement fraîche	28,6 %	23,1 %
Alimentation mixte (industrielle / fraîche)	52,4 %	35,5 %

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la positivité des résultats et la présence de signes cliniques ou la suspicion de coronavirose, confirmant que les seules données cliniques sont insuffisantes pour diagnostiquer une coronavirose et soulignant l'importance du portage asymptomatique. Notons que la suspicion ou non de coronavirose a été laissée à l'entière discrétion du vétérinaire ayant effectué le prélèvement.

La détection de coronavirus chez un individu de l'échantillon étudié est également sans lien avec l'âge, l'accès à l'extérieur ou la présence d'autres furets ou d'animaux autres que des chats (Tableau 8). Le taux de positivité chez les mâles est plus faible que chez les femelles, contrairement à ce qui a été relevé à plusieurs reprises chez le chat (Pesteanu-Somogyi et al., 2006 ; Sharif et al., 2010). Dans l'espèce féline, il a été suggéré que la différence soit imputable à une différence de comportement ou à une influence génétique du sexe sur la mise en place de la réponse immunitaire (Worthing et al., 2012). Il est également rapporté une prévalence plus élevée de coronavirose chez les chats stérilisés, mâles comme femelles (Rohrbach et al., 2001 ; Pesteanu-Somogyi et al., 2006). Pour les furets étudiés, nous n'avons pas pris en compte le statut de stérilisation, en raison d'une ambiguïté liée aux pratiques de stérilisation dans cette espèce. En effet, la stérilisation chimique par pose d'un implant sous-cutané d'agoniste de la GnRH est généralement préférée à la stérilisation chirurgicale qui est un facteur favorisant de maladie surrénalienne (Bielinska et al., 2006). Nous avons reçu des fiches de prélèvement indiquant un animal non stérilisé et précisant «implanté», soulignant cette ambiguïté dont nous avons préféré nous affranchir.

Sans qu'il s'agisse d'une association significative, une tendance semble se dégager entre le taux de positivité et l'origine géographique des animaux (Tableau 8). Elle est à interpréter avec prudence en raison d'une forte association entre l'origine géographique et le support de prélèvement ($p < 0,01$, données non représentées). En effet, aucune carte FTA® n'a été utilisée pour les prélèvements issus de la zone 4, en raison de la proximité avec le laboratoire, ne nécessitant pas la conservation du matériel génétique viral sur une longue période. Si l'utilisation de ces cartes était en cause, il se pourrait que le taux de positivité détecté dans cette zone soit le plus proche de la prévalence réelle. Inversement, il est possible qu'une prévalence plus forte dans le sud de la France crée artificiellement cette association apparente avec le support de prélèvement.

La présence d'un chat dans le foyer est significativement associée à la détection de coronavirus chez un furet (Tableau 8). Cette association a été rapportée ponctuellement à plusieurs reprises (Perpinan, Lopez, 2008 ; Laprie et al., 2009) mais il s'agit, à notre connaissance, de la première fois qu'elle est appuyée par des données statistiques. Les coronavirus sont connus pour être sujets à des taux importants de mutation et de recombinaison (Masters, Perlman, 2013, voir Partie 1 - I - E). Des phénomènes de recombinaison entre des coronavirus félin (FCoV-I) et canin (CCoV-II) ont notamment donné naissance à un nouveau sérotype félin (FCoV-II), et il semble que ces événements aient eu lieu à de multiples reprises (Le Poder et al., 2013 ; Terada, Matsui, et al., 2014). Comme l'a souligné l'émergence récente du SARS-CoV-2, la proximité physique d'espèces sensibles constitue un environnement favorable à la transmission inter-espèces de coronavirus (Zhang, Holmes, 2020). Il est donc tout à fait envisageable que des recombinaisons similaires aient pu avoir lieu entre coronavirus de chat et de furet, et il serait pertinent d'étudier la question en recherchant des coronavirus chez les chats vivant au contact des furets positifs. Nous avons proposé cette recherche aux propriétaires de deux des furets, sans qu'il y soit donné suite.

Face au faible taux de positivité relevé, il serait intéressant de disposer de résultats de séroprévalence afin de déterminer si la situation épidémiologique est celle d'une présence endémique de virus dans la population avec une faible excrétion ou plutôt d'une faible exposition au virus. Dans ce dernier cas, la relative naïveté de la population vis-à-vis de l'agent pathogène pourrait exposer à un risque d'épizootie en cas de diffusion rapide de souches pathogènes, comme lors des premiers épisodes d'ECE aux États-Unis dans les années 1990 (Williams et al., 2000).

C - Phylogénie

L'arbre phylogénétique construit sur la base des séquences partielles du gène RdRp témoigne de la relative originalité des souches détectées par rapport aux séquences précédemment publiées. On observe en effet un cluster regroupant la quasi-totalité des nouvelles souches, bien distinct des séquences originaires du Japon et des États-Unis (Figure 16). Les séquences les plus proches sont celles provenant de virus détectés aux Pays-Bas et au Pérou. Notons que les souches péruviennes ont été détectées chez un individu importé d'Espagne, et probablement infecté avant son importation (Lescano et al., 2015). L'analyse de ces séquences semble donc mettre en évidence une unité phylogénétique des souches d'origine européenne. Ce résultat se retrouve dans l'analyse phylogénétique basée sur les séquences partielles du gène S (Figure 17) : les nouvelles souches détectées en France sont plus proches des souches néerlandaises que des souches nord-américaines et japonaises. Les souches d'origine slovène constituent un cluster à part entière. Ces observations corroborent celles de Xu (2020) qui décrit une lignée européenne et une lignée américaine de FRCoV, cette dernière comprenant les souches japonaises. Il est intéressant de noter qu'une différence génétique entre les populations de furets européenne et américaine a déjà été mise en évidence (Gustafson et al., 2018). On peut donc supposer que l'identification de lignées différentes de coronavirus découle du très faible taux d'échanges génétiques entre ces populations, et d'une co-évolution hôte-pathogène entre furets et FRCoV. Par ailleurs, un regroupement phylogénétique correspondant à l'origine géographique plutôt qu'au caractère pathogène a également été mis en évidence pour les coronavirus félines (Battilani et al., 2010).

La projection sur le premier dendrogramme des génotypes identifiés par la séquence partielle du gène S ne met pas en évidence de relation entre les deux regroupements (Figure 19). De plus, l'intégration des séquences détectées en Slovénie à l'analyse phylogénétique des séquences partielles du gène S suggère l'existence d'un troisième génotype (Figure 17). En outre, suite à la description d'au moins un génotype supplémentaire (Minami, Kuroda, et al., 2016) et au rejet des hypothèses de corrélation entre génotype et pathogénie (Provacia et al., 2011 ; Terada, Minami, et al., 2014), l'identification génotypique sur la base des séquences proposées par Wise et al. (2010) semble désormais peu pertinente.

L'identification du contexte clinique sur l'arbre phylogénétique montre que la position d'une souche sur cet arbre n'est pas plus prédictive de sa pathogénie que son génotype

(Figure 19). La séquence étudiée n'est donc pas discriminante pour distinguer les pathotypes FRSCV et FRECV. Notons que les souches prélevées sur animaux asymptomatiques ne sont pas nécessairement dénuées de pouvoir pathogène chez ces individus : il est possible que le prélèvement ait été réalisé au cours de la phase de latence. Le cas des souches FRCoV-106-FR-2018 et FRCoV-107-FR-2018 est particulièrement intéressant. Les deux congénères prélevés vivaient en compagnie d'un furet décédé ayant présenté des signes cliniques et des lésions nécropsiques compatibles avec une FSCD. La proximité des deux souches et le contexte épidémiologique suggèrent une propagation horizontale du virus, ayant pu concerner également l'animal décédé, pourtant seul à avoir présenté des signes cliniques. Cette observation suggère que le pouvoir pathogène d'une souche de FRCoV n'est pas inhérent à celle-ci mais dépend de facteurs individuels de l'hôte, comme démontré pour les coronavirus félines (Kipar, Meli, 2014). Un quatrième furet, chez lequel il n'a pas été détecté de FRCoV, vivait au contact des précédents. Il est possible qu'il ait échappé à la diffusion horizontale, ou que l'excrétion intermittente soit responsable du résultat négatif. Deux chats étaient également présents dans ce foyer.

Parmi les prélèvements positifs sur carte FTA[®], un écouvillon trachéal représente, à notre connaissance, la première détection d'un FRCoV dans l'arbre respiratoire d'un furet. Néanmoins, le mode de prélèvement rend possible une contamination salivaire lors de l'écouvillonnage trachéal, et l'on sait qu'une excrétion salivaire de coronavirus entérique est possible chez le furet (Wise et al., 2006 ; Terada, Minami, et al., 2014). L'animal avait moins d'un an et ne présentait pas de signes cliniques. Il a été impossible de le prélever à nouveau pour s'assurer de l'origine respiratoire du virus, car il avait quitté son élevage d'origine. L'analyse phylogénétique sur la base d'une séquence partielle du gène RdRp montre que cette souche (FRCoV-003-FR-2017) est plus proche de certaines souches de coronavirus identifiées comme systémiques (Lescano et al., 2015) que des autres souches issues de notre étude (Figure 16), suggérant éventuellement le portage respiratoire d'un coronavirus systémique davantage que la présence d'un virus à tropisme strictement respiratoire.

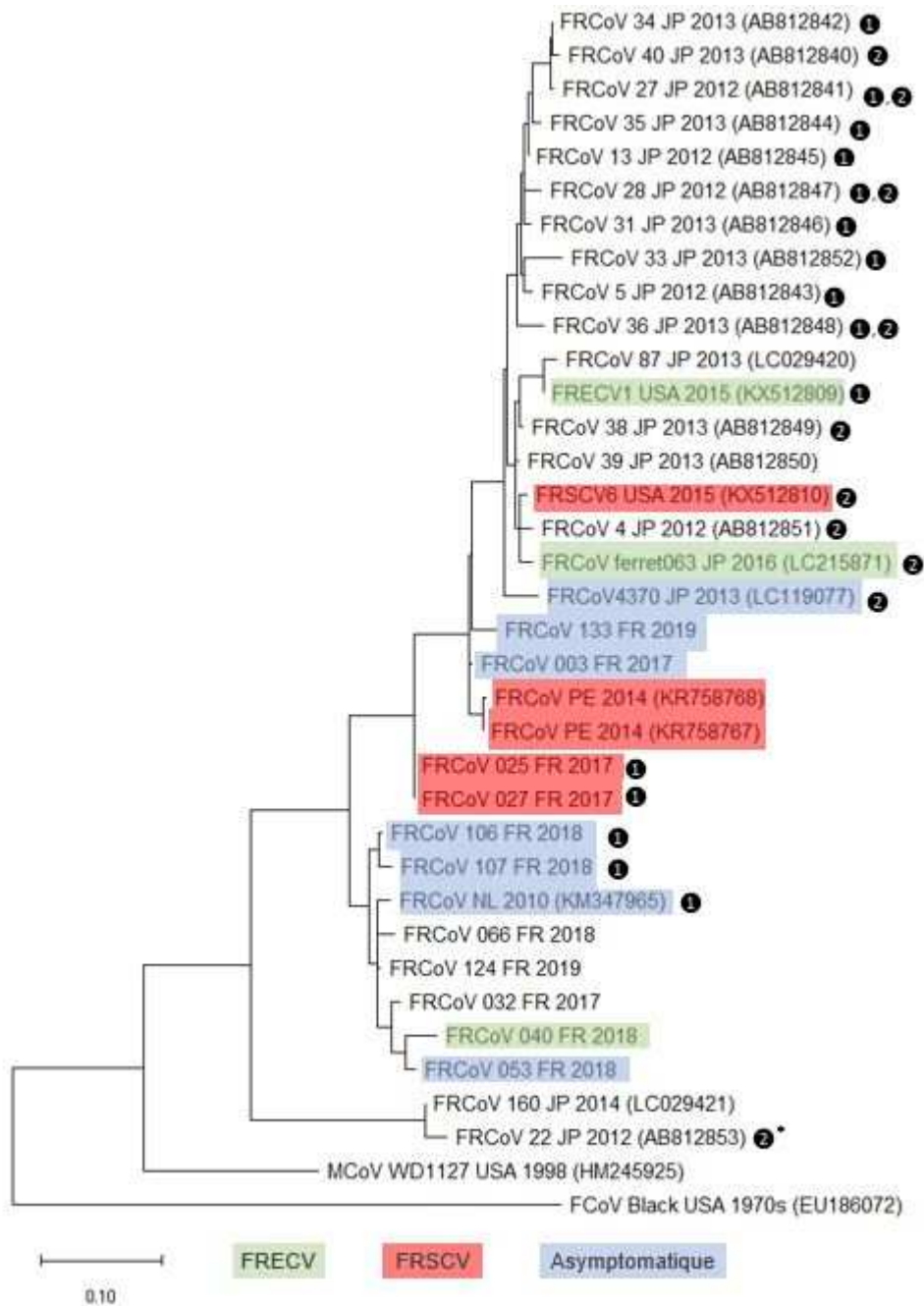


Figure 19. Arbre phylogénétique construit sur la base de séquences partielles du gène RdRp.

Les génotypes identifiés sont indiqués par les numéros ① ou ②. Le pathotype correspondant aux signes cliniques exprimés ou le caractère asymptotique de l'animal sont indiqués par la couleur de surlignage. Les numéros d'accèsion GenBank® sont indiqués entre parenthèses. Méthode utilisée : maximum de vraisemblance, modèle Tamura 92 (G).

* : Souche d'abord identifiée comme appartenant au génotype 2 (Terada, Minami, et al., 2014), puis requalifiée en nouveau génotype suite à un séquençage plus complet du gène S mettant en évidence des phénomènes de recombinaisons avec d'autres souches (Minami, Kuroda, et al., 2016).

FR : France ; JP : Japon ; NL : Pays-Bas ; PE : Pérou ; USA : États-Unis. Échelle : substitutions par nucléotide.

CONCLUSION

Notre travail met en évidence un taux d'excrétion de FRCoV moindre dans la population de furets domestiques français et belges d'intérêt que dans les autres populations étudiées (Japon, Pays-Bas, Suède). Ce faible taux de positivité est assorti d'un portage asymptomatique important. Le séquençage partiel du gène codant pour la protéine RdRp révèle des souches relativement originales par rapport aux données existantes, et une phylogénie recoupant l'origine géographique mais pas le pathotype. La découverte d'une association significative entre la détection de FRCoV et la présence d'au moins un chat dans le foyer ouvre une nouvelle perspective dans l'analyse phylogénique de ces coronavirus : les prochains travaux devraient s'attacher à étudier les relations génétiques entre coronavirus portés par différentes espèces vivant en contact étroit, et en particulier à rechercher des phénomènes de recombinaison entre FCoV et FRCoV. Dans le contexte pandémique actuel, de tels travaux sur la transmission interspécifique de coronavirus auraient également des implications en santé publique humaine.

Il serait également pertinent de procéder au séquençage complet du génome de certaines souches, afin d'étudier de manière plus détaillée les liens phylogéniques entre les souches détectées ici et celles dont les génomes sont disponibles. La caractérisation de l'ORF 3c, suggéré comme un marqueur de virulence de FIPV et de FRSCV (Chang et al., 2010 ; Wise et al., 2010), serait particulièrement intéressante à explorer. L'aspect épidémiologique pourrait être complété par une étude de séroprévalence, afin de déterminer le niveau d'exposition de la population au virus. À terme, la compréhension exhaustive de la pathogénie des infections coronavirales du furet nécessitera probablement la mise en culture de FRCoV et l'étude détaillée des spécificités individuelles de la réponse immunitaire déployée.

BIBLIOGRAPHIE

ADDIE, Diane, BELÁK, Sándor, BOUCRAUT-BARALON, Corine, EGBERINK, Herman, FRYMUS, Tadeusz, GRUFFYDD-JONES, Tim, HARTMANN, Katrin, HOSIE, Margaret J, LLORET, Albert, LUTZ, Hans, MARSILIO, Fulvio, PENNISI, Maria Grazia, RADFORD, Alan D, THIRY, Etienne, TRUYEN, Uwe et HORZINEK, Marian C, 2009. Feline Infectious Peritonitis: ABCD Guidelines on Prevention and Management. In : *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Juillet 2009. Vol. 11, n° 7, p. 594-604. DOI 10.1016/j.jfms.2009.05.008.

BATTILANI, Mara, BALBONI, Andrea, BASSANI, Milena, SCAGLIARINI, Alessandra, PALTRINIERI, Saverio et PROSPERI, Santino, 2010. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of feline coronaviruses circulating in Italy. In : *The New Microbiologica*. Octobre 2010. Vol. 33, n° 4, p. 387-392.

BIELINSKA, M., KIIVERI, S., PARVIAINEN, H., MANNISTO, S., HEIKINHEIMO, M. et WILSON, D. B., 2006. Gonadectomy-induced Adrenocortical Neoplasia in the Domestic Ferret (*Mustela putorius furo*) and Laboratory Mouse. In : *Veterinary Pathology*. Mars 2006. Vol. 43, n° 2, p. 97-117. DOI 10.1354/vp.43-2-97.

BLANCHARD, Géraldine, MARSOT, Maud, BOURASSIN, Roselyne, PARAGON, Bernard-Marie, BENET, Jean-Jacques et LINSART, Adeline, 2018. Characterisation of the French ferret population, husbandry, reported medical care and feeding habits. In : *Journal of Nutritional Science*. 2018. Vol. 7, p. e4. DOI 10.1017/jns.2017.51.

BODEY, Thomas W., BEARHOP, Stuart et MCDONALD, Robbie A., 2011. The diet of an invasive nonnative predator, the feral ferret *Mustela furo*, and implications for the conservation of ground-nesting birds. In : *European Journal of Wildlife Research*. Février 2011. Vol. 57, n° 1, p. 107-117. DOI 10.1007/s10344-010-0404-y.

BOURASSIN, Roselyne, 2014. *Caractérisation de la population de furets en France et de ses habitudes alimentaires*. Thèse de doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire d'Alfort : Faculté de médecine de Créteil.

BURGESS, Mark E., 2007. Ferret gastrointestinal and hepatic diseases. In : LEWINGTON, John H. (éd.), *Ferret Husbandry, Medicine and Surgery*. 2nd ed. S.l. : Elsevier Saunders. p. 203-223. ISBN 978-0-7020-2827-4.

CARDONA-OSPINA, Jaime A., VILLALBA-MIRANDA, Manuel F., PALECHOR-OCAMPO, Leidy A., MANCILLA, Lida I. et SEPÚLVEDA-ARIAS, Juan C., 2019. A systematic review of FTA cards® as a tool for viral RNA preservation in fieldwork: Are they safe and effective? In : *Preventive Veterinary Medicine*. Novembre 2019. Vol. 172, p. 104772. DOI 10.1016/j.prevetmed.2019.104772.

CHANG, H.-W., DE GROOT, R. J., EGBERINK, H. F. et ROTTIER, P. J. M., 2010. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. In : *Journal of General Virology*. 1 février 2010. Vol. 91, n° 2, p. 415-420. DOI 10.1099/vir.0.016485-0.

CHU, Ka-wing, 2007. *Novel coronaviruses in bats of the genus Miniopterus* [en ligne]. Master of Philosophy. Pokfulam Road, Hong Kong SAR : The University of Hong Kong. [Consulté le 20 août 2019]. Disponible à l'adresse : <http://hdl.handle.net/10722/52156>.

DOMINGUEZ, E., NOVELLAS, R., MOYA, A., ESPADA, Y. et MARTORELL, J., 2011. Abdominal radiographic and ultrasonographic findings in ferrets (*Mustela putorius furo*) with systemic coronavirus infection. In : *Veterinary Record*. 27 août 2011. Vol. 169, n° 9, p. 231-231. DOI 10.1136/vr.d4705.

DORIA-TORRA, G., VIDAÑA, B., RAMIS, A., AMARILLA, S. P. et MARTÍNEZ, J., 2016. Coronavirus Infection in Ferrets: Antigen Distribution and Inflammatory Response. In : *Veterinary Pathology*. Novembre 2016. Vol. 53, n° 6, p. 1180-1186. DOI 10.1177/0300985816634809.

ECKERLE, Lance D., BECKER, Michelle M., HALPIN, Rebecca A., LI, Kelvin, VENTER, Eli, LU, Xiaotao, SCHERBAKOVA, Sana, GRAHAM, Rachel L., BARIC, Ralph S., STOCKWELL, Timothy B., SPIRO, David J. et DENISON, Mark R., 2010. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-Exonuclease Mutant Virus Replication Is Revealed by Complete Genome Sequencing. In : EMERMAN, Michael (éd.), *PLoS Pathogens*. 6 mai 2010. Vol. 6, n° 5, p. e1000896. DOI 10.1371/journal.ppat.1000896.

FOX, James G., 2014. Taxonomy, History and Use. In : FOX, James G. et MARINI, Robert P., *Biology and diseases of the ferret*. Third edition. Ames, Iowa : John Wiley & Sons Inc.

GARNER, M. M., RAMSELL, K., MORERA, N., JUAN-SALLÉS, C., JIMÉNEZ, J., ARDIACA, M., MONTESINOS, A., TEIFKE, J. P., LÖHR, C. V., EVERMANN, J. F., BASZLER, T. V., NORDHAUSEN, R. W., WISE, A. G., MAES, R. K. et KIUPEL, M., 2008. Clinicopathologic Features of a Systemic Coronavirus-Associated Disease Resembling Feline Infectious Peritonitis in the Domestic Ferret (*Mustela putorius*). In : *Veterinary Pathology*. Mars 2008. Vol. 45, n° 2, p. 236-246. DOI 10.1354/vp.45-2-236.

GNIRS, K., QUINTON, J. F., DALLY, C., NICOLIER, A. et RUEL, Y., 2016. Cerebral pyogranuloma associated with systemic coronavirus infection in a ferret. In : *Journal of Small Animal Practice*. Janvier 2016. Vol. 57, n° 1, p. 36-39. DOI 10.1111/jsap.12377.

GOUILH, Meriadeg Ar, PUECHMAILLE, Sébastien J., GONZALEZ, Jean-Paul, TEELING, Emma, KITTAYAPONG, Pattamaporn et MANUGUERRA, Jean-Claude, 2011. SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory. In : *Infection, Genetics and Evolution*. Octobre 2011. Vol. 11, n° 7, p. 1690-1702. DOI 10.1016/j.meegid.2011.06.021.

GRAHAM, Elizabeth, LAMM, Catherine, DENK, Daniela, STIDWORTHY, Mark F., CARRASCO, Daniel Calvo et KUBIAK, Marie, 2012. Systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in ferrets in the UK. In : *Veterinary Record*. 25 août 2012. Vol. 171, n° 8, p. 200-200. DOI 10.1136/vr.e5652.

GUSTAFSON, Kyle D., HAWKINS, Michelle G., DRAZENOVICH, Tracy L., CHURCH, Robert, BROWN, Susan A. et ERNEST, Holly B., 2018. Founder events, isolation, and inbreeding: Intercontinental genetic structure of the domestic ferret. In : *Evolutionary Applications*. Juin 2018. Vol. 11, n° 5, p. 694-704. DOI 10.1111/eva.12565.

HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In : *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. Vol. 41, p. 95-98.

I-CAD, 2020. *Baromètre de la population des carnivores domestiques - Chiffres 2019* [en ligne]. 2020. [Consulté le 30 mai 2020]. Disponible à l'adresse : https://www.i-cad.fr/uploads/Barometre.I_CAD.Population.2019.pdf.

ICTV, 2019. *ICTV Master Species List 2018b.v2* [en ligne]. 31 mai 2019. S.l. : International Committee on Taxonomy of Viruses. [Consulté le 22 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266>.

ICTV, 2020. *ICTV Master Species List 2019.v1* [en ligne]. 24 avril 2020. S.l. : International Committee on Taxonomy of Viruses. [Consulté le 26 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/9601>.

ISHIDA, T, SHIBANAI, A, TANAKA, S, UCHIDA, K et MOCHIZUKI, M, 2004. Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. In : *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Avril 2004. Vol. 6, n° 2, p. 107-109. DOI 10.1016/j.jfms.2003.08.011.

KIPAR, A., MAY, H., MENGER, S., WEBER, M., LEUKERT, W. et REINACHER, M., 2005. Morphologic Features and Development of Granulomatous Vasculitis in Feline Infectious Peritonitis. In : *Veterinary Pathology*. Mai 2005. Vol. 42, n° 3, p. 321-330. DOI 10.1354/vp.42-3-321.

KIPAR, A. et MELI, M. L., 2014. Feline Infectious Peritonitis: Still an Enigma? In : *Veterinary Pathology*. Mars 2014. Vol. 51, n° 2, p. 505-526. DOI 10.1177/0300985814522077.

KIUPPEL, Matti et PERPIÑÁN, David, 2014. Viral Diseases of Ferrets. In : FOX, James G. et MARINI, Robert P., *Biology and diseases of the ferret*. Third edition. Ames, Iowa : John Wiley & Sons Inc.

KLAPHAKE, Eric, 2011. Ferret Systemic Coronavirus. In : OGLESBEE, Barbara (éd.), *Blackwell's five-minute veterinary consult: small mammal*. 2nd ed. S.l. : Wiley-Blackwell. Five minute veterinary consult. p. 105-106. ISBN 978-0-8138-2018-7.

KUMAR, Sudhir, STECHER, Glen, LI, Michael, KNYAZ, Christina et TAMURA, Koichiro, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. In : BATTISTUZZI, Fabia Ursula (éd.), *Molecular Biology and Evolution*. 1 juin 2018. Vol. 35, n° 6, p. 1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096.

LA DÉPÊCHE, 2010. Le furet : il court, court... dans les foyers des Français [en ligne]. 12 janvier 2010. [Consulté le 26 décembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.ladepeche.fr/article/2010/01/12/754114-le-furet-il-court-court-dans-les-foyers-des-francais.html>.

LAMERS, Mart M., SMITS, Saskia L., HUNDIE, Gadissa B., PROVACIA, Lisette B., KOOPMANS, Marion, OSTERHAUS, Albert D. M. E., HAAGMANS, Bart L. et RAJ, V. Stalin, 2016. Naturally occurring recombination in ferret coronaviruses revealed by complete genome characterization. In : *Journal of General Virology*. 1 septembre 2016. Vol. 97, n° 9, p. 2180-2186. DOI 10.1099/jgv.0.000520.

LANTZ, Pär-Gunnar, MATSSON, Mikael, WADSTRÖM, Torkel et RÅDSTRÖM, Peter, 1997. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-

phase system for sample preparation prior to PCR. In : *Journal of Microbiological Methods*. Mars 1997. Vol. 28, n° 3, p. 159-167. DOI 10.1016/S0167-7012(97)00979-2.

LAPRIE, C., DUBOY, J. et MARTINEZ, J., 2009. Coronavirose systémique chez le furet (*Mustela putorius*) : intérêt de l'analyse histologique et immunohistochimique. À propos de trois cas. In : *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. Octobre 2009. Vol. 44, n° 4, p. 111-115. DOI 10.1016/j.anicom.2009.07.004.

LE PODER, Sophie, PHAM-HUNG D'ALEXANDRY D'ORANGIANI, Anne-Laure, DUARTE, Lidia, FOURNIER, Annie, HORHOGEA, Cristina, PINHAS, Carine, VABRET, Astrid et ELOIT, Marc, 2013. Infection of cats with atypical feline coronaviruses harbouring a truncated form of the canine type I non-structural ORF3 gene. In : *Infection, Genetics and Evolution*. Décembre 2013. Vol. 20, p. 488-494. DOI 10.1016/j.meegid.2013.09.024.

LEE, Sandra, 2002. *Pet ferrets to be banned* [en ligne]. 28 mars 2002. S.I. : The official website of the New Zealand Government. [Consulté le 26 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.beehive.govt.nz/release/pet-ferrets-be-banned>.

LEGENDRE, Alfred M., KURITZ, Tanya, GALYON, Gina, BAYLOR, Vivian M. et HEIDEL, Robert Eric, 2017. Polyprenyl Immunostimulant Treatment of Cats with Presumptive Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis In a Field Study. In : *Frontiers in Veterinary Science* [en ligne]. 14 février 2017. Vol. 4. [Consulté le 5 novembre 2019]. DOI 10.3389/fvets.2017.00007. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2017.00007/full>.

LESCANO, J., QUEVEDO, M., GONZALES-VIERA, O., LUNA, L., KEEL, M. K. et GREGORI, F., 2015. First Case of Systemic Coronavirus Infection in a Domestic Ferret (*Mustela putorius furo*) in Peru. In : *Transboundary and Emerging Diseases*. Décembre 2015. Vol. 62, n° 6, p. 581-585. DOI 10.1111/tbed.12407.

LI, Tian-Cheng, YOSHIZAKI, Sayaka, KATAOKA, Michiyo, DOAN, Yen Hai, AMI, Yasushi, SUZAKI, Yuriko, NAKAMURA, Tomofumi, TAKEDA, Naokazu et WAKITA, Takaji, 2017. Determination of Ferret Enteric Coronavirus Genome in Laboratory Ferrets. In : *Emerging Infectious Diseases*. Septembre 2017. Vol. 23, n° 9, p. 1568-1570. DOI 10.3201/eid2309.160215.

LI, Xingguang, ZAI, Junjie, ZHAO, Qiang, NIE, Qing, LI, Yi, FOLEY, Brian T. et CHAILLON, Antoine, 2020. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. In : *Journal of Medical Virology*. 11 mars 2020. p. jmv.25731. DOI 10.1002/jmv.25731.

LINDEMANN, Dana M., ESHAR, David, SCHUMACHER, Loni L., ALMES, Kelli M. et RANKIN, Amy J., 2016. Pyogranulomatous panophthalmitis with systemic coronavirus disease in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*). In : *Veterinary Ophthalmology*. Mars 2016. Vol. 19, n° 2, p. 167-171. DOI 10.1111/vop.12274.

LINSART, A., NICOLIER, A. et SAUVAGET, S., 2013. Unusual presentation of systemic coronavirus in a ferret. In : *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. Octobre 2013. Vol. 48, n° 4, p. 123-128. DOI 10.1016/j.anicom.2013.09.001.

MA, Yuanmei, ZHANG, Yu, LIANG, Xueya, LOU, Fangfei, OGLESBEE, Michael, KRAKOWKA, Steven et LI, Jianrong, 2015. Origin, Evolution, and Virulence of Porcine Deltacoronaviruses in

the United States. In : PARKER, John et GRIFFIN, Diane E. (éd.), *mBio*. 10 mars 2015. Vol. 6, n° 2, p. e00064-15. DOI 10.1128/mBio.00064-15.

MARTÍNEZ, J., MARTORELL, J., ABARCA, M.L., OLVERA, A., RAMIS, A., WOODS, L., CHEVILLE, N., JUAN-SALLÉS, C., MOYA, A., RIERA, A. et SOTO, S., 2012. Pyogranulomatous Pleuropneumonia and Mediastinitis in Ferrets (*Mustela putorius furo*) associated with *Pseudomonas luteola* Infection. In : *Journal of Comparative Pathology*. Janvier 2012. Vol. 146, n° 1, p. 4-10. DOI 10.1016/j.jcpa.2011.03.014.

MARTINEZ, J., RAMIS, A. J., REINACHER, M. et PERPINAN, D., 2006. Detection of feline infectious peritonitis virus-like antigen in ferrets. In : *Veterinary Record*. 15 avril 2006. Vol. 158, n° 15, p. 523-523. DOI 10.1136/vr.158.15.523-b.

MARTÍNEZ, J., REINACHER, M., PERPIÑÁN, D. et RAMIS, A., 2008. Identification of Group 1 Coronavirus Antigen in Multisystemic Granulomatous Lesions in Ferrets (*Mustela putorius furo*). In : *Journal of Comparative Pathology*. Janvier 2008. Vol. 138, n° 1, p. 54-58. DOI 10.1016/j.jcpa.2007.10.002.

MASTERS, Paul S. et PERLMAN, Stanley, 2013. Coronaviridae. In : *KNIFE, David M. et HOWLEY, Peter M. (éd.), Fields Virology*. 6th. S.l. : Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.

MICHIMAE, Yoshiko, MIKAMI, Shin-ichi, OKIMOTO, Kazuo, TOYOSAWA, Kaoru, MATSUMOTO, Izumi, KOUCHI, Mami, KOUJITANI, Takatoshi, INOUE, Tadashi et SEKI, Takaki, 2010. The First Case of Feline Infectious Peritonitis-like Pyogranuloma in a Ferret Infected by Coronavirus in Japan. In : *Journal of Toxicologic Pathology*. 2010. Vol. 23, n° 2, p. 99-101. DOI 10.1293/tox.23.99.

MINAMI, Shohei, KURODA, Yudai, TERADA, Yutaka, YONEMITSU, Kenzo, VAN NGUYEN, Dung, KUWATA, Ryusei, SHIMODA, Hiroshi, TAKANO, Ai et MAEDA, Ken, 2016. Detection of novel ferret coronaviruses and evidence of recombination among ferret coronaviruses. In : *Virus Genes*. Décembre 2016. Vol. 52, n° 6, p. 858-862. DOI 10.1007/s11262-016-1365-3.

MINAMI, Shohei, TERADA, Yutaka, SHIMODA, Hiroshi, TAKIZAWA, Masaki, ONUMA, Mamoru, OTA, Akihiko, OTA, Yuichi, AKABANE, Yoshihito, TAMUKAI, Kenichi, WATANABE, Keiichiro, NAGANUMA, Yumiko, KANAGAWA, Eiichi, NAKAMURA, Kaneichi, OHASHI, Masanari, TAKAMI, Yoshinori, MIWA, Yasutsugu, TANOUE, Tomoaki, OHWAKI, Masao, OHTA, Jouji, UNE, Yumi et MAEDA, Ken, 2016. Establishment of serological test to detect antibody against ferret coronavirus. In : *Journal of Veterinary Medical Science*. 2016. Vol. 78, n° 6, p. 1013-1017. DOI 10.1292/jvms.16-0059.

MINSKAIA, E., HERTZIG, T., GORBALENYA, A. E., CAMPANACCI, V., CABBILLAU, C., CANARD, B. et ZIEBUHR, J., 2006. Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 28 mars 2006. Vol. 103, n° 13, p. 5108-5113. DOI 10.1073/pnas.0508200103.

MOMBERG-JØRGENSEN, H. C., 1951. Enzootic Malignant Granulomatosis In Ferrets. In : *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 1951. Vol. 29, n° 3, p. 297-306. DOI 10.1111/j.1699-0463.1951.tb00132.x.

MONTEIRO, Lurdes, BONNEMAISON, Dominique, VEKRIS, Antoine, PETRY, Klaus G, BONNET, Jacques, VIDAL, Rui, CABRITA, Jose et GRAUD, Francis Me, 1997. Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model. In : *J. CLIN. MICROBIOL.* 1997. p. 4.

MORRISEY, James K. et JOHNSTON, Matthew S., 2018. Ferrets. In : Exotic animal formulary. Fifth edition. St. Louis, Missouri : Elsevier. p. 532-557. ISBN 978-0-323-44450-7.

MOSCOSO, Hugo, RAYBON, Erine O., THAYER, Stephan G. et HOFACRE, Charles L., 2005. Molecular Detection and Serotyping of Infectious Bronchitis Virus from FTA® Filter Paper. In : *Avian Diseases.* Mars 2005. Vol. 49, n° 1, p. 24-29. DOI 10.1637/7220.

MURRAY, Jerry, 2008. Clinical management of systemic coronavirus in domestic ferrets. In : *Proceedings of the 29th Annual AAV Conference & Expo with AEMV.* Savannah (GA) : Association of Avian Veterinarians. 11 août 2008. p. 51-55.

MURRAY, Jerry, KIUPEL, Matti et MAES, Roger K., 2010. Ferret Coronavirus-Associated Diseases. In : *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice.* Septembre 2010. Vol. 13, n° 3, p. 543-560. DOI 10.1016/j.cvex.2010.05.010.

OGLESBEE, Barbara, 2011. Epizootic Ctarrhal Enteritis. In : *OGLESBEE, Barbara (éd.), Blackwell's five-minute veterinary consult: small mammal.* 2nd ed. S.l. : Wiley-Blackwell. Five minute veterinary consult. p. 101-102. ISBN 978-0-8138-2018-7.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 2015. *Dépistage en laboratoire du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV).* 2015.

PEDERSEN, Niels C., 2014. An update on feline infectious peritonitis: Diagnostics and therapeutics. In : *The Veterinary Journal.* Août 2014. Vol. 201, n° 2, p. 133-141. DOI 10.1016/j.tvjl.2014.04.016.

PEDERSEN, Niels C, KIM, Yunjeong, LIU, Hongwei, GALASITI KANKANAMALAGE, Anushka C, ECKSTRAND, Chrissy, GROUTAS, William C, BANNASCH, Michael, MEADOWS, Juliana M et CHANG, Kyeong-Ok, 2018. Efficacy of a 3C-like protease inhibitor in treating various forms of acquired feline infectious peritonitis. In : *Journal of Feline Medicine and Surgery.* Avril 2018. Vol. 20, n° 4, p. 378-392. DOI 10.1177/1098612X17729626.

PEDERSEN, Niels C, PERRON, Michel, BANNASCH, Michael, MONTGOMERY, Elizabeth, MURAKAMI, Eisuke, LIEPNIKS, Molly et LIU, Hongwei, 2019. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. In : *Journal of Feline Medicine and Surgery.* Avril 2019. Vol. 21, n° 4, p. 271-281. DOI 10.1177/1098612X19825701.

PERERA, Krishani Dinali, GALASITI KANKANAMALAGE, Anushka C., RATHNAYAKE, Athri D., HONEYFIELD, Amanda, GROUTAS, William, CHANG, Kyeong-Ok et KIM, Yunjeong, 2018. Protease inhibitors broadly effective against feline, ferret and mink coronaviruses. In : *Antiviral Research.* Décembre 2018. Vol. 160, p. 79-86. DOI 10.1016/j.antiviral.2018.10.015.

PERPINAN, D. et LOPEZ, C., 2008. Clinical aspects of systemic granulomatous inflammatory syndrome in ferrets (*Mustela putorius furo*). In : *Veterinary Record.* 9 février 2008. Vol. 162, n° 6, p. 180-183. DOI 10.1136/vr.162.6.180.

PESTEANU-SOMOGYI, Loretta D., RADZAI, Christina et PRESSLER, Barrak M., 2006. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. In : *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Février 2006. Vol. 8, n° 1, p. 1-5. DOI 10.1016/j.jfms.2005.04.003.

PETRITZ, Olivia A. et CHEN, Sue, 2018. Therapeutic Contraindications in Exotic Pets. In : *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. Mai 2018. Vol. 21, n° 2, p. 327-340. DOI 10.1016/j.cvex.2018.01.004.

PROVACIA, Lisette B.V., SMITS, Saskia L., MARTINA, Byron E., RAJ, V. Stalin, V.D. DOEL, Petra, V. AMERONGEN, Geert, MOORMAN-ROEST, Hanneke, OSTERHAUS, Albert D. M. E. et HAAGMANS, Bart L., 2011. Enteric Coronavirus in Ferrets, the Netherlands. In : *Emerging Infectious Diseases*. Août 2011. Vol. 17, n° 8, p. 1570-1571. DOI 10.3201/eid1708.110115.

QUESENBERRY, Katherine E. et CARPENTER, James W. (éd.), 2012. Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery. 3rd ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders. ISBN 978-1-4160-6621-7. SF997.5.F47 F47 2012, p.37.

QUINTON, Jean-François et GAILLOT, Hugues, 2015. *Atlas des nouveaux animaux de compagnie: Petits mammifères*. S.l. : Elsevier Masson. ISBN 978-2-294-74443-3.

RIONDET, Sylvestre, 2019. *Communication personnelle d'un éleveur professionnel français*. Décembre 2019.

RITZ, Susanne, EGBERINK, Herman et HARTMANN, Katrin, 2007. Effect of Feline Interferon-Omega on the Survival Time and Quality of Life of Cats with Feline Infectious Peritonitis. In : *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Novembre 2007. Vol. 21, n° 6, p. 1193-1197. DOI 10.1111/j.1939-1676.2007.tb01937.x.

ROHRBACH, Barton W., LEGENDRE, Alfred M., BALDWIN, Charles A., LEIN, Donald H., REED, Willie M. et WILSON, Ronald B., 2001. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. In : *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Avril 2001. Vol. 218, n° 7, p. 1111-1115. DOI 10.2460/javma.2001.218.1111.

SCAGNELLI, Alyssa, 2017. Pentoxifylline. In : *Journal of Exotic Pet Medicine*. Juillet 2017. Vol. 26, n° 3, p. 238-240. DOI 10.1053/j.jepm.2017.04.006.

SHARIF, Saeed, ARSHAD, Siti S, HAIR-BEJO, Mohd, OMAR, Abdul R, ZEENATHUL, Nazariah A, FONG, Lau S, RAHMAN, Nor-Alimah, ARSHAD, Habibah, SHAMSUDIN, Shahirudin et ISA, Mohd-Kamarudin A, 2010. Descriptive distribution and phylogenetic analysis of feline infectious peritonitis virus isolates of Malaysia. In : *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2010. Vol. 52, n° 1, p. 1. DOI 10.1186/1751-0147-52-1.

SMITS, Saskia L., RAJ, V. Stalin, ODUBER, Minoushka D., SCHAPENDONK, Claudia M. E., BODEWES, Rogier, PROVACIA, Lisette, STITTELAAR, Koert J., OSTERHAUS, Albert D. M. E. et HAAGMANS, Bart L., 2013. Metagenomic Analysis of the Ferret Fecal Viral Flora. In : KAPOOR, Amit (éd.), *PLoS ONE*. 20 août 2013. Vol. 8, n° 8, p. e71595. DOI 10.1371/journal.pone.0071595.

TAMURA, Koichiro, 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. In : *Molecular Biology and*

Evolution [en ligne]. Juillet 1992. [Consulté le 10 décembre 2019]. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752. Disponible à l'adresse : <https://academic.oup.com/mbe/article/9/4/678/1254082/Estimation-of-the-number-of-nucleotide>.

TERADA, Yutaka, MATSUI, Nobutaka, NOGUCHI, Keita, KUWATA, Ryusei, SHIMODA, Hiroshi, SOMA, Takehisa, MOCHIZUKI, Masami et MAEDA, Ken, 2014. Emergence of Pathogenic Coronaviruses in Cats by Homologous Recombination between Feline and Canine Coronaviruses. In : THIEL, Volker (éd.), *PLoS ONE*. 2 septembre 2014. Vol. 9, n° 9, p. e106534. DOI 10.1371/journal.pone.0106534.

TERADA, Yutaka, MINAMI, Shohei, NOGUCHI, Keita, MAHMOUD, Hassan Y.A.H., SHIMODA, Hiroshi, MOCHIZUKI, Masami, UNE, Yumi et MAEDA, Ken, 2014. Genetic Characterization of Coronaviruses from Domestic Ferrets, Japan. In : *Emerging Infectious Diseases*. Février 2014. Vol. 20, n° 2, p. 284-287. DOI 10.3201/eid2002.130543.

THOMPSON, Julie D., HIGGINS, Desmond G. et GIBSON, Toby J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In : *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22, n° 22, p. 4673-4680. DOI 10.1093/nar/22.22.4673.

THOMSON, Alexander P. D., 1951. A History of the Ferret. In : *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. 1951. Vol. VI, n° Autumn, p. 471-480. DOI 10.1093/jhmas/VI.Autumn.471.

VINKE, Claudia M. et SCHOEMAKER, Nico J., 2012. The welfare of ferrets (*Mustela putorius furo* T). In : *Applied Animal Behaviour Science*. Juillet 2012. Vol. 139, n° 3-4, p. 155-168. DOI 10.1016/j.applanim.2012.03.016.

VLASOVA, A. N., HALPIN, R., WANG, S., GHEDIN, E., SPIRO, D. J. et SAIF, L. J., 2011. Molecular characterization of a new species in the genus *Alphacoronavirus* associated with mink epizootic catarrhal gastroenteritis. In : *Journal of General Virology*. 1 juin 2011. Vol. 92, n° 6, p. 1369-1379. DOI 10.1099/vir.0.025353-0.

WANG, Leyi (éd.), 2016. *Animal coronaviruses*. New York : Humana Press. Springer protocols handbooks. ISBN 978-1-4939-3412-6. QR399 .A55 2016

WELLE, Kenneth R., 2016. Gastrointestinal System. In : *Current Therapy in Exotic Pet Practice*. 1. St. Louis, Missouri : Elsevier. p. 221-276. ISBN 978-1-4557-4084-0.

WILLIAMS, Bruce H., KIUPEL, Matti, WEST, Keith H., RAYMOND, James T., GRANT, Christopher K. et GLICKMAN, Lawrence T., 2000. Coronavirus-associated epizootic catarrhal enteritis in ferrets. In : *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Août 2000. Vol. 217, n° 4, p. 526-530. DOI 10.2460/javma.2000.217.526.

WILLS, Sarah E, BEAUFRÈRE, Hugues H, BRISSON, Brigitte A, FRASER, Russell S et SMITH, Dale A, 2018. Pancreatitis and Systemic Coronavirus Infection in a Ferret (*Mustela putorius furo*). In : *Comparative Medicine*. 1 juin 2018. Vol. 68, n° 3, p. 208-211. DOI 10.30802/AALAS-CM-17-000109.

WISE, Annabel G., KIUPEL, Matti, GARNER, Michael M., CLARK, April K. et MAES, Roger K., 2010. Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and

an enteric ferret coronavirus. In : *Virus Research*. Avril 2010. Vol. 149, n° 1, p. 42-50. DOI 10.1016/j.virusres.2009.12.011.

WISE, Annabel G., KIUPEL, Matti et MAES, Roger K., 2006. Molecular characterization of a novel coronavirus associated with epizootic catarrhal enteritis (ECE) in ferrets. In : *Virology*. Mai 2006. Vol. 349, n° 1, p. 164-174. DOI 10.1016/j.virol.2006.01.031.

WORTHING, Kate A, WIGNEY, Denise I, DHAND, Navneet K, FAWCETT, Anne, MCDONAGH, Phillip, MALIK, Richard et NORRIS, Jacqueline M, 2012. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. In : *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Juin 2012. Vol. 14, n° 6, p. 405-412. DOI 10.1177/1098612X12441875.

XU, Yifei, 2020. Genetic diversity and potential recombination between ferret coronaviruses from European and American lineages. In : *Journal of Infection*. Mars 2020. Vol. 80, n° 3, p. 350-371. DOI 10.1016/j.jinf.2020.01.016.

ZHANG, Tao, WU, Qunfu et ZHANG, Zhigang, 2020. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. In : *Current Biology*. Mars 2020. p. S0960982220303602. DOI 10.1016/j.cub.2020.03.022.

ZHANG, Yong-Zhen et HOLMES, Edward C., 2020. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. In : *Cell*. Avril 2020. Vol. 181, n° 2, p. 223-227. DOI 10.1016/j.cell.2020.03.035.

ANNEXE 1 – FICHE DE PRÉLÈVEMENT

Ne rien inscrire dans ce cadre

Date de prélèvement : ___/___/___

Nom de l'animal : _____

Nom du propriétaire : _____

Nature du prélèvement : Matières fécales LBA Sang total Autre : _____

Sexe : Mâle Femelle Stérilisé(e) Age : _____ Département : _____

Sain Malade – symptômes digestifs Malade – autres symptômes

Commémoratifs

Origine : Elevage Refuge Animalerie Autre : _____

Alimentation : Croquettes Proies Ration ménagère Autre : _____

Accès à l'extérieur (même sorties occasionnelles) : Oui Non

Autres furets dans le foyer : Non Oui – âge et date d'arrivée : _____

Autres animaux dans le foyer : Non Oui – espèces : _____

Anamnèse

Symptômes digestifs : _____

Anomalies à la palpation abdominale : _____

Autres éléments (examen clinique, examens complémentaires, chronicité...) : _____

Suspicion de coronavirose : Oui Non

ANNEXE 2 – FICHES DE PRÉLÈVEMENT FAUNE SAUVAGE

Fiche de prélèvement faune sauvage

Ne rien inscrire dans ce cadre

Date de prélèvement : ___ / ___ / ___

Espèce : _____

Sexe : Mâle Femelle

Département : _____

Stade : Nouveau-né Juvénile Jeune adulte Adulte Agé

Age estimé : _____

Nature du prélèvement : Matières fécales Autre : _____

Sain Symptômes digestifs Symptômes respiratoires Autres symptômes

Détails des symptômes : _____

Fiche de prélèvement faune sauvage – animal mort

Ne rien inscrire dans ce cadre

Identification du prélèvement : _____

Espèce : _____ Date de prélèvement : _____

Estimation du délai mort-prélèvement : _____

Sexe : Mâle Femelle

Lieu de découverte : _____

Stade : Nouveau-né¹ Juvénile² Adulte Agé Etat corporel : _____

1 : avant sevrage

2 : avant puberté

Nature du prélèvement : Contenu intestinal Muqueuse Autre : _____

Conservation avant prélèvement : Aucune Congélation Réfrigération

Etat de conservation du cadavre : Bon Moyen Mauvais

Principales lésions (en particulier lésions intestinales ou de péritonite granulomateuse) :

ANNEXE 3 – PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ARN

1. Pipet 560 µl prepared Buffer AVL containing carrier RNA into a 1.5 ml microcentrifuge tube.

Note: If the sample volume is larger than 140 µl, increase the amount of Buffer AVL–carrier RNA proportionally (e.g., a 280 µl sample will require 1120 µl Buffer AVL–carrier RNA) and use a larger tube.

2. Add 140 µl plasma, serum, urine, cell-culture supernatant or cell-free body fluid to the Buffer AVL–carrier RNA in the microcentrifuge tube. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

Note: To ensure efficient lysis, it is essential that the sample is mixed thoroughly with Buffer AVL to yield a homogeneous solution. Frozen samples that have only been thawed once can also be used.

3. Incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min.

Note: Viral particle lysis is complete after lysis for 10 min at room temperature. Longer incubation times have no effect on the yield or quality of the purified RNA.

4. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.

5. Add 560 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the tube to remove drops from inside the lid.

Note: Use only ethanol, since other alcohols may result in reduced RNA yield and purity. Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. If the sample volume is greater than 140 µl, increase the amount of ethanol proportionally (e.g., a 280 µl sample will require 1120 µl ethanol). To ensure efficient binding, it is essential that the sample is mixed thoroughly with the ethanol to yield a homogeneous solution.

6. Carefully apply 630 µl of the solution from step 5 to the QIAamp Mini column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.

Note: Close each spin column to avoid cross-contamination during centrifugation.

Note: Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) to limit microcentrifuge noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the viral RNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all of the solution has passed through.

7. Carefully open the QIAamp Mini column, and repeat step 6.

If the sample volume was greater than 140 µl, repeat this step until all of the lysate has been loaded onto the spin column.

8. Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl Buffer AW1. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Note: It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 even if the original sample volume was larger than 140 µl.

9. Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl Buffer AW2. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Continue directly with step 11, or to eliminate possible Buffer AW2 carryover, perform step 10 and then continue with step 11.

Note: Residual Buffer AW2 in the eluate may cause problems in downstream applications. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in flow-through, containing Buffer AW2, contacting the QIAamp Mini column.

Removing the QIAamp Mini column and collection tube from the rotor may also cause flow-through to come into contact with the QIAamp Mini column. In these cases, the optional step 10 should be performed.

10. Recommended: Place the QIAamp Mini column in a new 2 ml collection tube (not provided), and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

11. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Discard the old collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column and add 60 µl Buffer AVE equilibrated to room temperature. Close the cap, and incubate at room temperature for 1 min.

12. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

A single elution with 60 µl Buffer AVE is sufficient to elute at least 90% of the viral RNA from the QIAamp Mini column. Performing a double elution using 2 x 40 µl Buffer AVE will increase yield by up to 10%. Elution with volumes of less than 30 µl will lead to reduced yields and will not increase the final concentration of RNA in the eluate.

Viral RNA is stable for up to one year when stored at –30 to –15°C or at –90 to –65°C.

QIAamp® Viral RNA Mini Handbook, QIAGEN®, mars 2018, 28-30.

ANNEXE 4 – PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN

1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.

Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.

2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg, or approximately 100 µl).

For example, add 300 µl of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg, use more than one QIAquick column.

3. Incubate at 50°C for 10 min or until the gel slice has completely dissolved. To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.

IMPORTANT: Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.

4. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).

If the color of the mixture is orange or violet, add 10 µl of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.

The adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH ≤7.5. Buffer QG contains a pH indicator that is yellow at pH ≤7.5 and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

5. Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.

For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100 µl isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments ≤500 bp and ≥4 kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield.

Do not centrifuge the sample at this stage.

6. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.

7. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and then centrifuge for 1 min.

The maximum volume of the column reservoir is 800 µl. For sample volumes >800 µl, simply load the remainder and spin again.

8. Discard flow-through and place QIAquick column back into the same collection tube.

Collection tubes are reused to reduce plastic waste.

9. Recommended: Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min.

This step will remove all traces of agarose. This is only required if the DNA will be used for direct sequencing, in vitro transcription or microinjection.

10. To wash, add 0.75 ml of Buffer PE into the QIAquick column and centrifuge for 1 min.

Note: If the DNA will be used for salt-sensitive applications such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE before centrifuging.

11. Discard the flow-through and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at 7,900 x g (13,000 rpm).

IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation step.

12. Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.

13. To elute DNA, add 50 µl of Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane, and then centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 µl elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min. After the addition of Buffer EB to the QIAquick membrane, increasing the incubation time to up to 4 min can increase the yield of purified DNA.

IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volumes are 48 µl from 50 µl elution buffer volume and 28 µl from 30 µl. Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at –20°C because DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

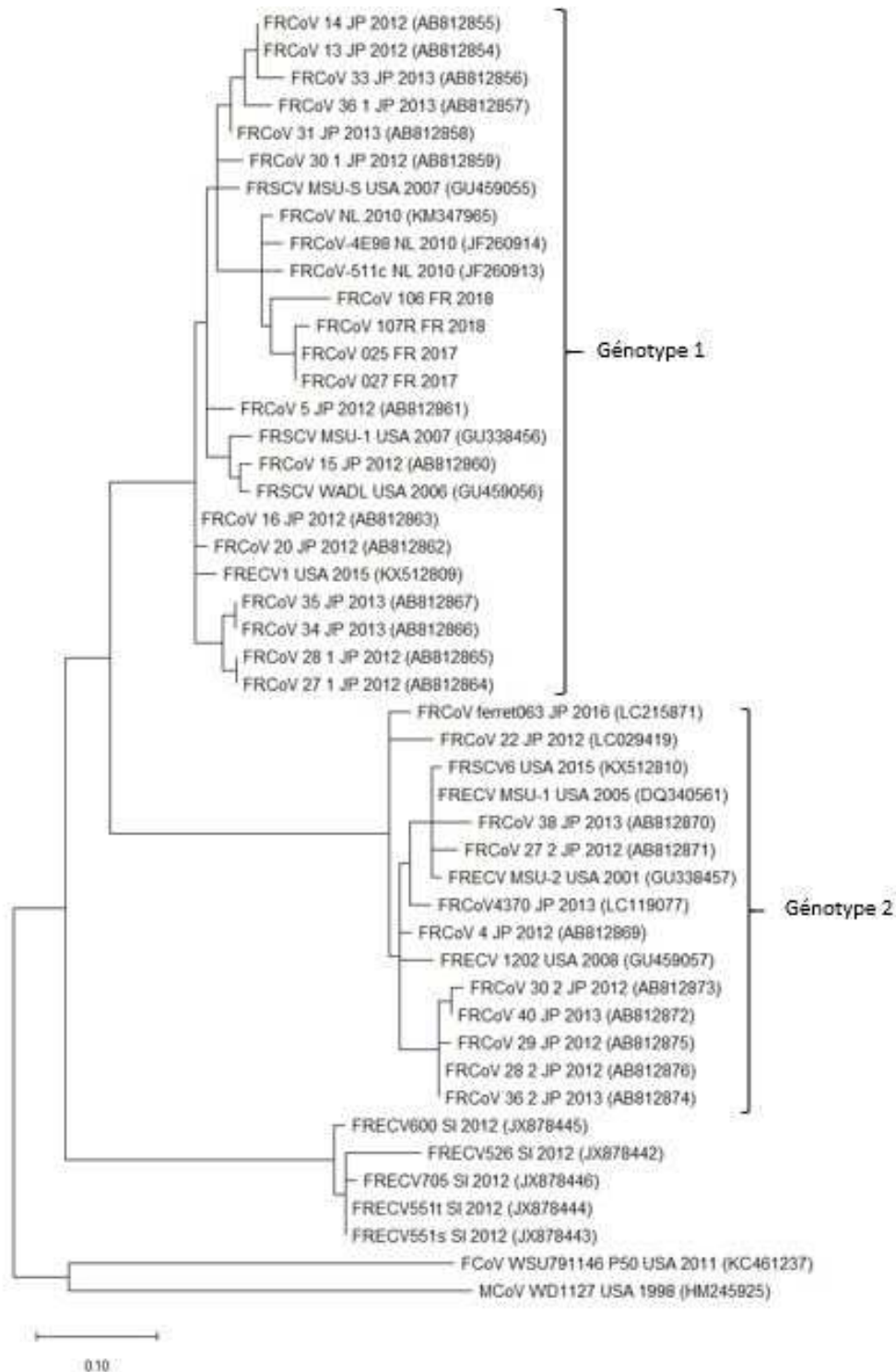
14. If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting it up and down before loading the gel.

Loading Dye contains 3 marker dyes – bromophenol blue, xylene cyanol and orange G – that facilitate the estimation of DNA-migration distance and the optimization of the agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 17) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.

QIAquick® Spin Handbook, QIAGEN®, novembre 2018, 30-32.

ANNEXE 5 – ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE COMPLET

Arbre phylogénétique construit sur la base de séquences partielles du gène S. Les numéros d'accèsion GenBank® sont indiqués entre parenthèses. Méthode utilisée : maximum de vraisemblance, modèle Tamura 92 (G+I). FR : France ; JP : Japon ; NL : Pays-Bas ; PE : Pérou ; USA : États-Unis ; SI : Slovénie. Échelle : substitutions par nucléotide. Séquences obtenues sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> le 12/12/2019.



AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné(e), Guillaume LE LOC'H, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Clément BERCKER intitulée « Etude des coronavirus du furet domestique (*Mustela putorius furo*) en France et en Belgique : éléments d'épidémiologie et diversité génétique » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 16 juillet 2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Docteur Guillaume LE LOC'H



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS

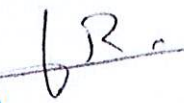


Vu :
Le Président du jury
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO




Le Président
Jean-Marc BROTO

M. Clément BERCKER
a été admis(e) sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

ÉTUDE DES CORONAVIRUS DU FURET DOMESTIQUE (*MUSTELA PUTORIUS FURO*) EN FRANCE ET EN BELGIQUE :
ÉLÉMENTS D'ÉPIDÉMIOLOGIE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

Les coronavirus du furet (FRCoV) sont responsables de deux affections : l'entérite catarrhale épizootique et la coronavirose systémique. Les liens phylogénétiques entre les virus de pathotypes entérique (FRECV) et systémique (FRSCV) ne sont pas entièrement élucidés. La situation épidémiologique concernant ces virus a été étudiée dans plusieurs pays mais n'est pas connue en France et en Belgique.

Nous avons reçu des prélèvements fécaux et tissulaires issus de 135 furets et détecté la présence de FRCoV dans ces échantillons par RT-PCR conventionnelle ciblant une portion du gène codant pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Pour les prélèvements positifs, nous avons également recherché deux séquences du gène S associées à des génotypes précédemment décrits. Tous les amplicons ont été séquencés par méthode Sanger et analysés phylogénétiquement.

La population étudiée présente un taux de positivité de 7,4 % (10/135), ce qui est bien inférieur aux taux décrits au Japon (55,7 %), aux Pays-Bas (61 %) et dans une population mixte néerlandaise et suédoise (36 %). La détection de FRCoV s'est révélée sans association significative avec l'âge, le sexe, l'accès à l'extérieur ou la suspicion clinique de coronavirose. La moitié des animaux positifs ne présentaient pas de signes cliniques, ce qui souligne l'importance du portage asymptomatique. Le taux de positivité chez les furets vivant avec au moins un chat est significativement supérieur (19 %, $p=0,03$), ce qui suggère une possible transmission inter-espèces.

L'analyse phylogénétique des séquences détectées et des séquences disponibles démontre une relative proximité des souches d'origine européenne entre elles, à distance de celles provenant du Japon et des États-Unis. Elle met également en évidence l'absence de corrélation entre le génotype (sur la séquence étudiée) et le pathotype identifié cliniquement.

Mots-clés : Furet ; *Mustela putorius* ; coronavirus ; FRCoV ; coronavirus entérique du furet ; coronavirus systémique du furet ; phylogénie ; épidémiologie moléculaire.

CORONAVIRUS IN THE DOMESTIC FERRET (*MUSTELA PUTORIUS FURO*) IN FRANCE AND BELGIUM:
ELEMENTS OF EPIDEMIOLOGY AND GENETIC DIVERSITY

Ferret coronaviruses (FRCoV) are responsible for two diseases: epizootic catarrhal enteritis (ECE) and systemic coronavirus. Phylogenetic links between enteric (FRECV) and systemic (FRSCV) pathotypes remain unclear. FRCoV epidemiology has been studied in a few countries but the situation in France and Belgium is currently unknown.

We received faecal and tissue samples from 135 ferrets and detected FRCoV by conventional RT-PCR targeting a partial sequence of the RNA-dependant RNA polymerase (RdRp) gene. Positive samples were also screened for two S gene sequences corresponding to previously described genotypes. All amplicons were sequenced by Sanger method and analysed phylogenetically.

The population studied has a 7.4% positivity rate, which is much lower than rates documented in Japan (55.7%), the Netherlands (61%) and in a mixed Dutch-Swedish population (36%). No significant correlation was found between FRCoV detection and age, sex, outdoor access or clinically suspected coronavirus. Half of the positive ferrets showed no clinical signs, underlining the importance of asymptomatic carriage. Positivity rate in ferrets living with at least one cat is significantly higher (19%, $p=0.03$), suggesting a possible cross-species transmission.

Phylogenetical analysis of detected and published sequences demonstrates that European strains cluster rather closely together, away from American and Japanese strains. It also shows the absence of correlation between genotypes (for the sequence studied) and clinically identified pathotypes.

Keywords: Ferret; *Mustela putorius*; coronavirus; FRCoV; ferret enteric coronavirus; ferret systemic coronavirus; phylogeny; molecular epidemiology.