

**ETUDE DU PORTAGE OCULAIRE  
DU VIRUS HERPES FELIN  
DANS UNE POPULATION DE CHATS SAINS :  
UTILISATION DE LA METHODE PCR  
QUANTITATIVE EN TEMPS REEL  
AVEC SONDE TAQMAN®**

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**Mathilde, Agnès CAVENE**  
Née, le 13 octobre 1976 à SENS (Yonne)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Alain REGNIER**

**JURY**

PRESIDENT :  
**M. Jean-Louis ARNE**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Alain REGNIER**  
**Mme Corine BOUCRAUT-BARALON**

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

ETUDE DU PORTAGE OCULAIRE DU VIRUS  
HERPES FELIN DANS UNE POPULATION DE  
CHATS SAINS : UTILISATION DE LA METHODE  
6608-2001 1



## REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Louis ARNE ,  
Professeur des Universités,  
Praticien hospitalier,  
*Ophthalmologie*,  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
Nous le prions de croire à notre hommage respectueux

A Monsieur le Professeur Alain REGNIER,  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Physiopathologie oculaire*,  
Qui nous a fait l'honneur de nous proposer ce travail et de nous diriger dans son accomplissement,  
Qui a également su éveiller en nous, par un enseignement rigoureux et passionné, l'intérêt pour l'ophtalmologie,  
Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance

A Madame le Docteur Corine BOUCRAUT-BARALON  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Pathologies infectieuses*,  
Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse et qui nous a aidé dans la réalisation de ce travail,  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude

A toute l'équipe de Scanelis : en particulier madame le Docteur Catherine DOSSIN et monsieur le Docteur Jean-Luc PINGRET,  
Pour leur disponibilité et leur accueil toujours charmant,  
Qu'ils en soient sincèrement remerciés  
A mes Parents,  
Pour leur soutien et leur amour

A ma grand-mère Madeleine,  
Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde affection pour elle

A ma sœur Sophie,  
Pour nos fous rires

A tous mes amis

A Matthieu...

# TABLE DES MATIERES

**INTRODUCTION** p.8

**PREMIER CHAPITRE : L'HERPES OCULAIRE, RAPPELS** p.9

**I. ETIOLOGIE** p.9

1. Morphologie du virus, propriétés physico-chimiques p.9
2. Variabilité antigénique et pouvoir pathogène p.9
3. Pouvoir immunogène p.10

**II. PATHOGENIE** p.11

1. Phase de lyse p.11
2. Latence p.11
3. Immunité et pathogénie p.12

**III. EPIDEMIOLOGIE** p.14

1. Descriptive p.14
2. Analytique p.14
  - a. Sources p.14
  - b. Matières virulentes p.15
  - c. Facteurs de réceptivité p.15
  - d. Transmission p.16

**IV. CLINIQUE** p.16

1. Différentes formes cliniques p.16
  - a. Ophtalmie néonatale p.16
  - b. Infection aiguë p.17
  - c. Infection chronique, récurrence p.18
2. Complications p.19
  - a. Entropion p.19
  - b. Symblépharon p.19
  - c. Kératoconjonctivite sèche p.19
  - d. Séquestre cornéen p.20
  - e. kératite éosinophilique p.21
  - f. Uvéite antérieure p.22

**V. TRAITEMENT** p.22

1. Symptomatique p.22
3. Interféron et lysine p.22
4. Anti-inflammatoires locaux p.24

**DEUXIEME PARTIE : LES DIFFERENTES METHODES DE DIAGNOSTIC** p.26

**I. DIAGNOSTIC CLINIQUE** p.26

**II. CYTOLOGIE** p.28

**III. VIROLOGIE** p.28

**IV. IMMUNOFLUORESCENCE** p.29

**V. SEROLOGIE** p.32

**VI. CAPTURE D'ANTIGENES, IMMUNOENZYMOLOGIE** p.33

**VII. PCR** p.35

1. Principe de la technique p.35
2. Les techniques dérivées : la PCR nichée et la PCR quantitative p.38
3. Sensibilité de la PCR dans le diagnostic de l'herpès virose p.41

**TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE DU TAUX DE PORTAGE LATENT DU FHV1 CHEZ 58 CHATS SAINS, UTILISATION D'UNE NOUVELLE METHODE DE PCR QUANTITATIVE** p.43

**I. MATERIEL ET METHODE** p.44

1. Obtention des échantillons p.44
2. PCR quantitative p.44
3. Traitement statistique utilisé p.48

**II. RESULTATS** p.49

1. Présentation p.49
2. Prévalences observées p.49
3. Analyse statistique des résultats p.52

**III. DISCUSSION** p.53

1. Analyse de nos résultats p.53
  - a. Les prévalences observées p.53
  - b. Les facteurs influençant les prévalences p.55
  - c. La comparaison des deux techniques de PCR p.56
  - d. Les limites de notre étude p.56
2. Positionnement de notre étude par rapport aux études précédentes p.57

**CONCLUSION** p.61

**BIBLIOGRAPHIE** p.62

**ANNEXE** : Tableau de l'ensemble des résultats de l'étude p.65

**TABLE DES ILLUSTRATIONS**

**TABLEAUX**

Tabl. 1 : molécules utilisées dans le traitement de l'herpès virose féline, voies d'administration et posologies **p.25**

Tabl. 2 : comparaison des résultats positifs en PCR classique et en PCR nichée sur des échantillons issus de chats sains, à conjonctivite et à séquestres cornéens **p.40**

Tabl. 3 : comparaison des résultats positifs en PCR nichée, en virologie et en immunofluorescence, sur des échantillons issus de chats sains, à troubles respiratoires et à conjonctivite **p.42**

Tabl. 4 : résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative et par PCR nichée **p.50**

Tabl. 5 : résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative : influence du facteur « âge » **p.51**

Tabl. 6 : résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative : influence du facteur « sexe » **p.51**

Tabl. 7 : résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative : influence du facteur « statut vaccinal » **p.51**

Tabl. 8 : comparaison des études précédentes sur la recherche du FHV1 chez le chat sain  
**p.58**

## **FIGURES**

Fig. 1 : principe de l'immunofluorescence directe **p.30**

Fig. 2 : principe de l'immunofluorescence indirecte **p.31**

Fig. 3 : principe de la méthode immunoenzymologique **p.34**

Fig. 4 : principe de la méthode PCR classique **p.37**

Fig. 5 : principe de la méthode PCR nichée **p.39**

Fig. 6 : principe de la PCR quantitative avec sonde TaqMan®, sonde hybridée sur l'ADN, fluorescence inhibée **p.45**

Fig. 7 : principe de la PCR quantitative avec sonde TaqMan®, libération des groupements par la Taq polymérase, émission de fluorescence **p.46**

## **GRAPHIQUES**

Graph. 1 : PCR quantitative : principe général de détermination des charges virales **p.47**

Graph. 2 : PCR quantitative : détermination des charges virales, exemples d'infections aiguë, chronique et latente **p.54**

# **INTRODUCTION**

L'herpès virose est une maladie infectieuse très répandue dans la population féline. Elle se caractérise par des symptômes respiratoires supérieurs ainsi que par un grand nombre de manifestations oculaires. L'atteinte oculaire va de la simple conjonctivite à des lésions cornéennes plus sévères. La caractéristique principale de l'herpès virus est sa capacité à infecter l'hôte de manière latente. On rencontre ainsi de nombreux chats porteurs asymptomatiques, qui hébergent le virus dans des sites de latence et qui peuvent périodiquement ré-exprimer la maladie. Les données concernant le taux de porteurs latents n'en fournissent qu'une approche, qui varie selon les auteurs. Il est pourtant important de connaître une approximation de cette prévalence pour maîtriser l'épidémiologie de la maladie.

Nous envisagerons tout d'abord les données générales sur l'herpès virus félin, sur les signes cliniques de la maladie et sur ses traitements, puis nous évoquerons les différentes méthodes de diagnostic de l'herpès virose. Enfin, dans la dernière partie, nous présenterons les résultats de notre étude, qui vise à fournir une estimation du taux de porteurs asymptomatiques. Nous avons effectué des raclages conjonctivaux sur les deux yeux de 58

chats sans signes d'herpès virose, présentés à l'école vétérinaire de Toulouse. Les 116 échantillons ainsi collectés ont été analysés par la méthode de PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan®. Les échantillons trouvés positifs ont été testés également en PCR nichée. L'analyse portera donc sur deux grands points, d'une part le taux de porteurs latents rencontré dans cette population de 58 chats et la comparaison avec les études précédentes, et d'autre part l'explication de cette nouvelle méthode de PCR et sa comparaison avec la PCR nichée.

# PREMIER CHAPITRE

## L'HERPES OCULAIRE, RAPPELS

### I. ETIOLOGIE

#### 1. Morphologie du virus, propriétés physico-chimiques

L'herpès virus félin (Feline Herpes Virus-1 ou FHV1) appartient à la famille des *Herpesviridae* et à la sous-famille des *Alphaherpesviridae*, comme l'herpès virus simplex de l'homme. Les deux virus sont d'ailleurs très proches, en structure mais aussi on le suppose sur le plan de la pathogénie.

La structure du FHV1 est celle des herpès virus : il est composé d'un double brin d'ADN entouré d'une capsidie icosaédrique, elle-même enveloppée par une membrane lipidique. Cette dernière enveloppe, très délicate, contient différentes glycoprotéines.

Le caractère peu résistant du FHV1 s'explique par la présence de l'enveloppe lipidique, facilement altérée par la plupart des agents physico-chimiques. Ainsi, le virus ne résiste qu'environ 18 heures à température ambiante, et est détruit par la majorité des détergents classiques (éther ou chloroforme par exemple) (23).

#### 2. Variabilité antigénique et pouvoir pathogène

Le FHV1 est ubiquiste et les différents virus isolés présentent tous une grande similarité. Ils ont donc été regroupés dans un seul sérotype.

Toutefois, on connaît des souches atténuées qui sont celles utilisées pour la vaccination, cela laisse donc penser qu'il doit exister des différences de virulences entre les virus isolés.

Récemment, quatre groupes ont été créés au sein du FHV1, basés sur des critères génomiques. Il est pour l'instant difficile de faire le lien entre ces groupes et un caractère de virulence particulier (23).

### 3. Pouvoir immunogène

La défense de l'organisme face au FHV1 fait en premier lieu intervenir les neutrophiles puis les macrophages, les cellules natural killer et les lymphocytes T (16).

La réponse sérologique qui se met alors en place est assez faible, sûrement du fait du caractère intracellulaire du virus. En effet, une fois la pénétration dans les premières cellules de l'organisme infecté, le virus passe directement de cellules en cellules et est ainsi beaucoup moins exposé aux anticorps circulants (14).

Cette réponse est donc faible mais également incomplète : qu'elle soit naturelle ou vaccinale, elle n'empêche pas la réinfection. Elle dure en moyenne quelques mois après l'infection, environ 6 mois.

En outre, on constate une aggravation des signes cliniques lors de phénomène immunosuppresseur concurrent, type FIV.

## **II. PATHOGENIE**

On décrit classiquement deux phases dans l'action du virus : celle qui accompagne l'infection, qu'elle soit primaire ou réactivée, qui est caractérisée par la lyse, et celle typique

du cycle des herpès virus, la latence. Plus récemment est apparue l'idée qu'une troisième notion mettant en jeu des mécanismes immunopathologiques aurait un rôle important dans la pathogénie (12).

### 1. Phase de lyse

La lyse de la cellule infectée est l'effet cytopathique direct de la réplication virale. Lors de l'infection, cette réplication est très rapide dans les épithéliums des voies respiratoires supérieures ainsi que dans l'épithélium conjonctival. Il y a tout d'abord fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire, la capsid virale se retrouve alors dans le cytoplasme et l'ADN viral pénètre dans le noyau de la cellule. La synthèse des protéines virales est ainsi contrôlée, et s'achève par la lyse de la cellule (15).

Cette lyse qui touche les épithéliums se traduit donc par une forte inflammation suivie d'érosions, de nécrose et rend possible une éventuelle surinfection bactérienne.

### 2. Latence

Ce phénomène de latence est sûrement la caractéristique majeure des herpès virus. La latence vraie se définit par une quiescence virale, c'est-à-dire une absence de signes cliniques ainsi qu'une absence histologique de signes d'inflammation.

Chez le chat, les sites connus de latence du FHV1 sont le ganglion trigéminé, les nerfs optiques, le chiasma optique, les bulbes olfactifs, les glandes lacrymales, la cornée, les tonsilles ainsi que les cornets nasaux (23).

Ce phénomène de latence s'accompagne de réactivations périodiques qu'on explique par un transport antérograde du virus via l'axone. Les facteurs capables de provoquer cette réactivation sont toutes les causes de stress, qu'elles soient naturelles ou artificielles.

Ainsi un chat porteur latent pourra réexcréter le virus après un long transport ou un changement d'habitat, une anesthésie ou une chirurgie. La parturition et la lactation sont

également de grands facteurs de stress. Enfin, l'administration de corticoïdes peut induire la réactivation, tout comme une maladie intercurrente immunosuppressive type FeLV-FIV (22).

On estime que 80% des chats atteints par le FHV1 deviennent porteurs latents, et que parmi ces animaux, 50% réexcréteront un jour le virus. Cette réactivation s'accompagne ou non de signes cliniques. Toutefois si tel est le cas, ils sont généralement atténués.

### 3. Immunité et pathogénie

La présence du FHV1 dans des tissus extra-neuraux comme la cornée, mise en évidence par des examens PCR, entraînerait une stimulation antigénique permanente et serait alors à l'origine des mécanismes immunopathologiques suspectés dans les cas de kératite stromale, de kératite éosinophilique et de séquestre cornéen. Ces trois entités pathologiques constituent des complications majeures de l'infection par le FHV1.

L'étude de modèles expérimentaux d'infection de chats par le FHV1 tend à démontrer le rôle de l'immunité. Nasisse et son équipe ont étudié les changements histologiques de la cornée de chats infectés (17). Après l'invasion précoce par les polynucléaires neutrophiles, on note une présence importante de lymphocytes B et T dans le stroma cornéen. Il existe donc bien une réponse immunitaire antivirale spécifique, qu'elle soit humorale ou cellulaire, et cette réponse est directement dirigée contre les antigènes viraux présents dans le stroma. L'hypothèse est alors que le système immunitaire fonctionnerait de manière dichotomique, en étant protecteur ou pathogène selon les circonstances.

Les mêmes interrogations se posent en médecine humaine concernant l'infection par l'herpès simplex (Herpes Simplex Virus type 1 ou HSV1). Pourquoi certains individus développent-ils des affections récurrentes type kératite stromale, et d'autres pas? L'hypothèse actuelle fait intervenir deux notions qui semblent avoir toutes deux leur importance: la souche virale et la variabilité de la réponse immunitaire de l'hôte. Pour appuyer ces deux hypothèses, on peut noter que certaines souches d'herpès simplex (HSV1) induisent des kératites stromales et d'autres uniquement des lésions épithéliales. De plus, lors de l'infection expérimentale de souris par le HSV1, on constate que des lignées différentes ne réagissent pas de la même manière.

En médecine humaine, l'intervention de mécanismes immunitaires dans la pathogénie de l'herpès simplex est maintenant démontrée. Pour preuve, des souris sans thymus que l'on infecte par le HSV1 ne développent pas de lésions stromales, alors que celles immunocompétentes en présentent. De plus, si on transfère à ces souris des lymphocytes T de souris immunisées contre le HSV1, elles vont développer des lésions stromales.

Il semble donc que l'immunité cellulaire soit impliquée dans la formation des lésions de kératite stromale. L'équipe formée par Hendricks et Tumpey a tenté de savoir quelle était la population lymphocytaire impliquée dans ces mécanismes (9). Ils ont en effet étudié la formation de lésions cornéennes selon la souche virale impliquée (souche RE ou KOS) chez des souris privées de leur réponse CD4+ ou CD8+. On constate que la souche RE provoque beaucoup moins de kératite stromale quand l'animal n'a pas de lymphocytes CD4+, mais que l'absence de CD8+ ne change rien. Pour cette souche, on peut donc conclure que les mécanismes immunopathologiques reposent essentiellement sur les lymphocytes T CD4+. Pour la souche KOS, la réduction de l'atteinte cornéenne s'observe chez les animaux privés de leur réponse CD8+. On a donc une différence de mécanismes selon la souche virale rencontrée.

### **III. EPIDEMIOLOGIE**

#### 1. Descriptive

Le FHV1 est un virus qui infecte les chats de tous âges, mais qui se traduit par des formes plus graves chez les très jeunes, les plus âgés et les animaux immunodéprimés.

La répartition du virus est ubiquiste.

Concernant sa répartition dans le temps, on peut constater depuis la généralisation de la vaccination, dans le milieu des années 70, une diminution des cas cliniques graves (23).

#### 2. Analytique

##### a. Sources

Les animaux qui expriment cliniquement la maladie constituent la source la plus probable et la plus importante de contamination. Pendant cette phase aiguë, ce sont eux qui transmettent le plus grand nombre de particules virales (22).

Il ne faut toutefois pas oublier un point primordial de l'épidémiologie de l'herpès virose : le portage latent. Ces animaux sont en effet des sources plus insidieuses de dissémination virale, car la réexcrétion ne s'accompagne pas toujours de signes cliniques et peut de plus être provoquée par de nombreux facteurs de stress.

Enfin, bien que le virus ne soit pas très résistant, nous pouvons également citer le milieu extérieur comme source de contamination. Les gamelles ou encore les paniers touchés par des animaux infectés peuvent ainsi constituer pendant quelques heures une source virale.

#### b. Matières virulentes

Elles sont constituées par les sécrétions, en particulier respiratoires (jetage...). Ainsi, en éternuant, le malade crée autour de lui un véritable aérosol de particules virales. Cet aérosol n'est cependant pas très puissant et ne peut propager très loin le virus. On peut se poser la question de la présence de particules virales dans les larmes, puisque l'on sait que le virus provoque une lyse de l'épithélium conjonctival.

Il est important de noter que les sécrétions peuvent rester virulentes pendant une à trois semaines, donc même après la guérison clinique de l'animal (25).

#### c. Facteurs de réceptivité

Le virus se propage plus rapidement dans les concentrations d'animaux, les chatteries en particulier.

L'âge (chatons ou vieux animaux) et l'immunodépression constituent des facteurs défavorables.

#### d. Transmission

Elle peut être directe, par contact. Comme il a été noté précédemment, les aérosols de particules virales ne sont pas très puissants, il y a donc nécessité d'un contact rapproché pour qu'il y ait transmission.

La transmission indirecte est aussi possible, via les mains des personnes manipulant les animaux, ou via les mangeoires et autre matériel.

## IV. CLINIQUE

### 1. Différentes formes cliniques

#### a. Ophtalmie néonatale

Cette affection, qui touche les chatons de 1 à 4 semaines, est caractérisée par une très violente inflammation conjonctivale, avec une atteinte muco-purulente sévère. Lorsqu'elle survient avant 10 à 14 jours, on peut noter une accumulation de pus qui déforme les paupières, alors non encore ouvertes. Elles apparaissent rouges et tendues.

Plusieurs agents peuvent être mis en cause. Le FHV1 en est un, associé ou pas à des *Chlamidiae*, des mycoplasmes ou d'autres bactéries (6).

Le plus souvent, la transmission s'est faite par la mère, qu'elle ait été malade pendant la gestation ou qu'il s'agisse d'une réactivation due au stress. En général, toute la portée est atteinte (14).

Cette violente atteinte oculaire s'accompagne généralement de signes systémiques : atteinte respiratoire, fièvre, anorexie et dégradation de l'état de l'animal plus ou moins marqué. Cela peut se compliquer d'une dissémination virale dans tout l'organisme, en particulier les poumons. La mortalité par surinfection et pneumonie bactérienne est alors importante (22).

### b. Infection aiguë

L'atteinte est en général bilatérale.

Elle est dominée par des signes de conjonctivite aiguë (14). L'animal présente alors une photophobie et un blépharospasme. La douleur est d'ailleurs beaucoup plus marquée que dans les conjonctivites d'étiologie différente, en raison du pouvoir destructeur du virus sur les neurones et les épithéliums. L'hyperhémie conjonctivale est marquée. L'écoulement oculaire, séreux en début d'évolution, devient muqueux à muco-purulent en environ une semaine. Un chémosis peut être noté, mais il n'est pas fréquemment rencontré.

Cette forme s'accompagne le plus souvent de symptômes respiratoires supérieurs, à savoir éternuements et jetage. On peut noter également une atteinte systémique, à des degrés variables, avec fièvre et anorexie.

Chez les chats immunocompétents, les symptômes tendent à disparaître en 10 à 14 jours. L'affection aiguë est donc caractérisée par une faible mortalité.

Les lésions cornéennes sont plus rares dans la phase primaire de l'infection par le FHV1. Elles doivent néanmoins être recherchées car elles peuvent être beaucoup plus graves que l'atteinte conjonctivale.

On considère comme pathognomonique la forme dendritique des ulcères parfois observés. Ces kératites étant plus fréquentes dans les formes chroniques, elles seront présentées dans le paragraphe suivant.

### c. Infection chronique, récurrence

L'atteinte est en général unilatérale.

Dans la majorité des cas, elle ne s'accompagne pas de signes respiratoires. La conjonctivite est la manifestation la plus fréquente de récurrence, mais on peut noter des signes qui vont de la conjonctivite modérée à la kératite stromale (12).

Ainsi, des épisodes répétés d'ulcères de la cornée accompagnés de signes de conjonctivite doivent alerter le praticien et faire penser à des formes de récurrence.

On peut distinguer trois formes de kératites liées au FHV1 (10). Uni ou bilatérales, ces lésions s'accompagnent de blépharospasme, d'hyperhémie conjonctivale et d'un écoulement oculaire variable. La classification est basée sur la profondeur de l'atteinte.

L'ulcère dendritique, pathognomonique de l'herpès virale, correspond à de nombreuses petites ponctuations parfois linéaires, en branche. Il est superficiel et n'est pas forcément associé à une néovascularisation ou à un œdème cornéen. Dans les stades précoces, seules la douleur et l'inflammation conjonctivale marquée peuvent être présentes, conjointement à l'atteinte cornéenne.

Les formes un peu plus chroniques voient ces petits ulcères devenir coalescents et former alors un nouvel ulcère plus large mais toujours superficiel, qu'on nomme ulcère en carte de géographie. On note alors des vaisseaux superficiels et un léger œdème.

Enfin, dans les cas plus sévères, il y a atteinte du stroma cornéen. La néovascularisation ainsi que l'œdème sont alors très importants. Quand la membrane de Descemet est atteinte, cette forme peut aboutir à une perforation de l'œil.

## 2. Complications

### a. Entropion

La formation d'un entropion est due au spasme provoqué par la douleur. Le blépharospasme étant très intense dans les atteintes liées au FHV1, il faut suspecter le virus lorsque l'on rencontre un entropion chez un chat. De plus, contrairement au chien, cette affection est peu fréquemment rencontrée chez les félins et ne connaît pas beaucoup d'autres causes.

### b. Symblépharon

Le symblépharon se définit comme l'adhésion de la conjonctive à la cornée ou à une autre partie conjonctivale proche. On le rencontre lorsqu'il y a eu une ulcération marquée de l'épithélium conjonctival ou de la cornée.

#### c. Kératoconjunctivite sèche

Par rapport au chien, les kératoconjunctivites sèches (KCS) du chat sont peu fréquentes. Aussi faut-il toujours suspecter le FHV1 lorsque l'on en rencontre chez le chat (14).

Elle est mise en évidence par des valeurs abaissées du test de Schirmer (inférieures à 10 mm), associées ou non à des lésions de la cornée. La pigmentation cornéenne est moins fréquente chez le chat que chez le chien, et la néovascularisation cornéenne est moins sévère.

La pathogénie de ces KCS est mal connue. Elles pourraient résulter d'une dacryoadénite. Généralement transitoires, elles peuvent devenir définitives dans les cas d'affection très chroniques.

#### d. Séquestre cornéen

Cette affection cornéenne est spécifique du chat. Les persans, les himalayans, et dans une moindre mesure les siamois, semblent être prédisposés. On peut toutefois l'observer dans toutes les races.

On distingue trois lésions différentes, correspondant en fait aux différents stades de progression (10).

On peut constater initialement une aire brun clair au centre de la cornée, dans l'épithélium et le stroma antérieur. Il peut y avoir présence de vaisseaux cornéens superficiels. Cette lésion ne fixe généralement pas la fluorescéine, mais la dégénérescence de l'épithélium peut retenir le vert de lissamine.

Lorsque l'évolution est plus ancienne, la lésion devient brun-noir. Les vaisseaux superficiels s'étendent alors au limbe.

Enfin, dans sa forme la plus chronique, on constate une plaque agrandie, noire, superficielle et irrégulière. Les vaisseaux superficiels sont présents et la lésion retient la fluorescéine en périphérie.

Le meilleur traitement semble être la kératectomie, qui a d'autant plus de chances de réussir si elle est pratiquée tôt dans l'évolution de la lésion.

La pathogénie de ces séquestres cornéens est elle aussi mal connue. On soupçonne qu'ils soient la réponse à divers traumatismes de la cornée: kératite herpétique, irritations chroniques ou récurrentes, infection ou maladie dégénérative cornéenne. Dans le cas de l'infection par le FHV1, cela pourrait s'expliquer par la nécrose chronique de l'épithélium et l'exposition du stroma cornéen.

Une étude récente, portant sur 156 chats présentant des séquestres cornéens, a montré que plus de 50% des chats évalués étaient porteurs de FHV1 (12).

#### e. Kératite éosinophilique

Cette affection n'est pas fréquente chez le chat. Elle n'a à priori pas de relation avec le complexe éosinophilique félin.

On constate sur la cornée une plaque localisée ou diffuse, brun-roux, d'apparence granuleuse (24). Elle est associée à une néovascularisation superficielle et s'accompagne de différents signes cliniques, blépharospasme, épiphora et érosions cornéennes. Le diagnostic est confirmé par cytologie.

Ces lésions répondent bien à l'administration de corticoïdes ou à celle d'acétate de mégestrol. Avant d'employer ces molécules, il convient toutefois de rechercher l'étiologie, pour ainsi éviter d'appliquer des corticoïdes localement en cas d'herpès virose.

#### f. Uvéite antérieure

L'utilisation récente de la méthode PCR tend à prouver qu'on retrouve le FHV1 dans l'humeur aqueuse de chats atteints d'uvéites idiopathiques (22). Le FHV1 serait donc une des causes possibles d'uvéites chez le chat.

## **V. TRAITEMENT**

### 1. Symptomatique

Même s'il n'est souvent pas suffisant, le traitement symptomatique doit être mis en place, et ce surtout dans les cas d'infection aiguë chez les jeunes animaux. Il convient de lutter contre les surinfections en appliquant localement un collyre antibiotique large spectre. Différentes molécules peuvent être utilisées, l'association bacitracine-néomycine-polymixine B à titre d'exemple. Le nettoyage des sécrétions oculaires et nasales doit être effectué régulièrement. Enfin, une attention particulière devra être portée aux risques de complications: les adhésions conjonctivales débutantes doivent être régulièrement rompues mécaniquement afin d'éviter la formation d'un symblépharon (22).

### 2. Anti-viraux

Ces molécules sont utilisées localement dans les cas sévères d'affection primaires et lors des atteintes chroniques accompagnées de signes cliniques (23). Ce sont des agents virostatiques, qu'il faut appliquer fréquemment. En médecine humaine, on recommande de les appliquer toutes les 1 à 2 heures le premier jour du traitement. Si la même observance est plus difficile à obtenir en médecine vétérinaire, elle est toutefois aussi importante pour la réussite du traitement.

L'application locale permet d'éviter les effets secondaires systémiques (atteinte hépatique, gastro-intestinale ou leucopénie). Ces produits peuvent toutefois être irritants localement. Si des manifestations d'irritation cornéenne apparaissent, il convient de changer de molécule.

La trifluridine est l'agent qui présente la meilleure efficacité in vitro. Elle est cependant chère et souvent mal tolérée. Aussi lui préfère-t-on souvent l'idoxuridine, moins efficace mais plus sûre d'utilisation. Pour les doses et la fréquence d'application, on pourra se rapporter au tableau 1.

Les molécules fréquemment utilisées en médecine humaine, comme l'acyclovir ou le valacyclovir, ne peuvent pas être prescrites chez le chat. En effet, elles sont peu efficaces et peuvent être toxiques pour la moelle osseuse.

### 3. Interféron et lysine

On utilise également ces deux types de molécules pour limiter la réplication virale dans les cas d'atteinte chronique. Leur utilisation peut se faire par voie locale et systémique.

Les interférons sont des polypeptides produits par les leucocytes et les fibroblastes en réponse à une infection, virale en particulier. Ils se lient à des récepteurs cellulaires qui leur sont spécifiques et activent ainsi des enzymes qui inhibent la synthèse du virus. Ce sont des molécules virostatiques. On trouve en pharmacie des préparations peu onéreuses d'interféron alpha (INF- $\alpha$ ) humain recombinant. L'efficacité est supposée mais n'a pas encore été véritablement démontrée (23). Les doses et les voies d'administration se trouvent dans le tableau 1.

La L-lysine est utilisée en médecine humaine avec succès dans les cas d'herpès oculaire. Elle agit en antagonisant l'arginine produite par le virus et nécessaire à sa réplication. Là aussi, aucune étude ne démontre la véritable efficacité de son utilisation chez le chat.

### 4. Anti-inflammatoires locaux

La réponse au traitement anti-viral est souvent décevante. Il peut alors être utile dans certains cas réfractaires d'utiliser des anti-inflammatoires. C'est le cas en particulier des kératites stromales et des conjonctivites chroniques, qui répondent mal aux molécules anti-

virales. L'utilisation de corticoïdes est toutefois déconseillée en raison du risque d'exacerber la maladie. Il conviendra donc d'utiliser préférentiellement des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

**Tabl.1 : Molécules utilisées dans le traitement de l'herpès virose féline : voies d'administration et posologies.**

<b>MOLECULE</b>	<b>VOIE D'ADMINISTRATION</b>	<b>DOSES</b>
<u>Idoxuridine</u>	locale	1 goutte toutes les deux heures les 2 premiers jours, puis 1 goutte toutes les 4 à 6 heures, pendant 3 semaines maximum
<u>Trifluridine</u>	locale	Idem idoxuridine
<u>l-Lysine</u>	orale	250 à 500 mg toutes les 12 heures pour les adultes, 1 fois par jour pour les chatons

<u>Interféron-<math>\alpha</math></u>	Orale ou locale	-30 UI par jour par voie orale -10000 UI/ kg 2 fois par jour localement
---------------------------------------	-----------------	--

## DEUXIEME CHAPITRE

### DIFFERENTES METHODES DE DIAGNOSTIC

#### I. DIAGNOSTIC CLINIQUE

Les signes cliniques ne sont qu'un moyen d'orientation diagnostique, et ce essentiellement dans la phase aiguë de la maladie. Le FHV1 doit en effet être soupçonné quand on rencontre l'association de problèmes oculaires et respiratoires sur un animal plutôt jeune. Comme nous l'avons vu dans la partie clinique, le symptôme oculaire majeur est la conjonctivite. Aussi une hyperhémie conjonctivale, un écoulement oculaire ainsi qu'une douleur importante doivent faire penser à l'herpès virose, surtout lorsqu'ils sont associés à des signes d'atteinte respiratoire. Il faut néanmoins prendre soin de faire un recueil précis des commémoratifs car parfois la phase de problèmes respiratoires peut précéder celle des symptômes oculaires (16).

La seule lésion considérée comme pathognomonique de l'herpès virose est l'ulcère dendritique. Pour la mettre en évidence, le praticien devra prendre soin d'utiliser le vert de lissamine, car ces ulcères épithéliaux fixent mal la fluorescéine.

Dans la forme chronique de la maladie, le diagnostic clinique est beaucoup plus difficile à effectuer. Il convient toutefois de songer à rechercher le FHV1 dans un contexte de problèmes oculaires récurrents, surtout s'ils accompagnent des périodes de stress.

Cette suspicion clinique d'herpès virose doit évidemment s'inscrire dans un diagnostic différentiel (4). Les autres causes de troubles oculaires semblables, accompagnés ou non de troubles respiratoires, sont:

- la calicivirose : on a alors des symptômes buccaux beaucoup plus marqués, tels une stomatite lymphoplasmocytaire ou des ulcères buccaux. Les symptômes oculaires sont sinon relativement semblables à ceux de l'herpès virose, exception faite des symptômes cornéens que l'on ne retrouve pas dans la calicivirose.
  
- les mycoplasmes : l'affection est en général unilatérale. Contrairement à l'infection aiguë du FHV1 qui rétrocede généralement spontanément en 10 à 15 jours, les signes de conjonctivite tendent ici à s'aggraver en l'absence de traitement. En outre, on ne décrit pas de lésions cornéennes associées à cette maladie.
  
- La chlamydie : en général unilatéraux, les symptômes sont ceux d'une conjonctivite. Un diagnostic thérapeutique consiste en l'administration de doxycycline pendant 3 semaines.

Le diagnostic différentiel peut être compliqué par le fait que plusieurs affections peuvent être associées.

## **II. CYTOLOGIE**

La cytologie oculaire, prélèvement de cellules conjonctivales, ne peut absolument pas être retenue comme un bon moyen diagnostique. En effet, les inclusions virales intranucléaires sont inconstantes et ne peuvent de toute façon être visualisées par les colorants utilisés en routine.

La cytologie peut toutefois donner des éléments d'orientation, bien que peu spécifiques. On observe en effet lors de l'infection par le FHV1 un infiltrat inflammatoire lymphocytaire en début d'évolution, puis qui devient neutrophilique (18). Elle peut permettre également d'observer des inclusions intracytoplasmiques dans les cellules épithéliales conjonctivales lors de chlamydie et de mycoplasmoses. Cela peut être utile pour le diagnostic différentiel.

## **III. VIROLOGIE**

L'isolement du virus a longtemps été considéré comme la méthode de choix, la plus sensible.

Il faut pour cette méthode prélever des cellules sur la conjonctive ou l'oropharynx, à l'aide d'un écouvillon préalablement humidifié. Ce serait d'ailleurs le prélèvement de cellules oropharyngées qui donnerait les meilleurs résultats (23).

Des précautions doivent être prises concernant le prélèvement et le transport, car le virus est très fragile. Ainsi, si l'échantillon n'est pas immédiatement transféré sur culture cellulaire, il est nécessaire de le transporter dans de la glace. Il faut également prendre soin à ne pas utiliser de colorants avant d'effectuer le prélèvement, car on soupçonne qu'ils aient une activité antivirale.

La culture se fait sur des cellules monoclonales de rein de chat. La réplication du virus est très rapide et les effets cytopathiques produits sont caractéristiques (18). On les visualise

en moyenne au bout de 3 à 5 jours. Toutefois, la seule observation de l'effet cytopathique ne peut suffire à émettre un diagnostic de certitude. Il faut alors compléter la méthode par des techniques de fluorescence.

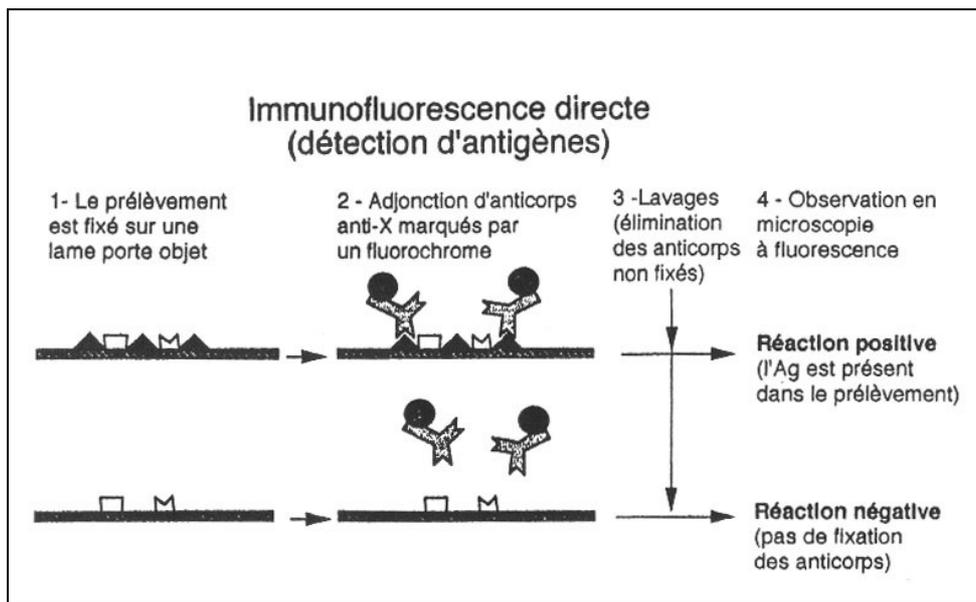
La méthode d'isolement du virus est maintenant très peu utilisée en routine. Elle présente en effet trois inconvénients majeurs: elle est longue, deux semaines minimum, onéreuse et elle donne souvent des résultats négatifs lors d'atteinte uniquement cornéenne, c'est-à-dire dans certaines formes chroniques (14).

#### **IV. IMMUNOFLUORESCENCE**

Les réactions d'immunofluorescence ont elles aussi été longtemps utilisées pour le diagnostic d'herpès virose. Les échantillons doivent être collectés par raclage de la conjonctive ou de la cornée s'il existe des lésions. Il faut que ce raclage soit assez " agressif " afin de collecter une quantité suffisante de cellules. On laisse alors sécher l'échantillon à l'air avant de l'envoyer au laboratoire. Si toutefois l'envoi doit être différé, il convient de sécher le prélèvement à l'acétone afin de protéger les épitopes (14).

Il existe deux techniques d'immunofluorescence, une directe et une indirecte (18). Dans les deux cas, le principe consiste en l'utilisation de molécules marqueuses, les fluorochromes. Couplées à des anticorps, ces molécules seront ensuite révélées par microscopie à fluorescence ou grâce à un cytomètre en flux. Les deux tests sont praticables pour le diagnostic du FHV1.

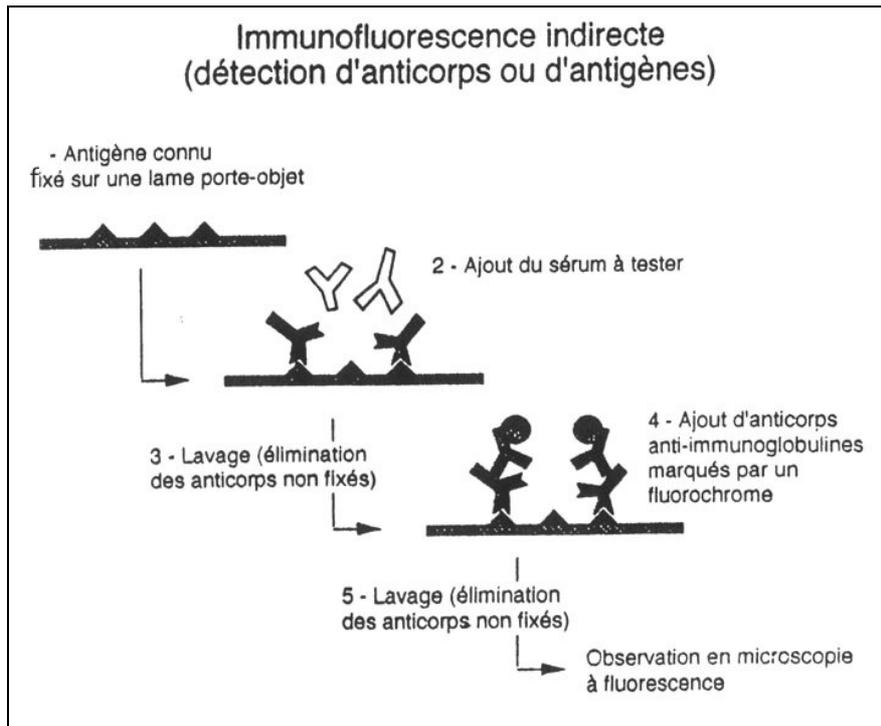
Dans le test direct, on fixe le prélèvement sur une lame et on ajoute des anticorps anti-herpès virus marqués par un fluorochrome, l'isothiocyanate de fluorescéine. On lave et on observe la lame au microscope à fluorescence. Si la réaction est positive, l'antigène est présent dans le prélèvement (voir figure 1).



**Fig. 1 :** Principe de l'immunofluorescence directe (source : Pr. Millon, ENVT)

Dans le test indirect, on fait d'abord réagir l'échantillon avec un antigène viral connu. On ajoute alors des anticorps anti-immunoglobulines marqués par un fluorochrome. On lave et on observe comme pour le test direct (voir figure 2). Cette méthode indirecte est considérée comme plus sensible. Elle permet en outre au laboratoire de n'utiliser qu'un fluorochrome conjugué pour mettre en évidence un grand nombre de couples antigènes-anticorps.

Ces deux méthodes présentent l'avantage d'être simples et peu onéreuses. Leur utilisation est tout de même remise en question car elles posent des problèmes, de sensibilité surtout.



**Fig. 2 :** Principe de l'immunofluorescence indirecte (source : Pr. Millon, ENVT)

Ce manque de sensibilité constitue en effet la principale limite à l'utilisation de ces tests. Dans une étude portant sur des chats infectés expérimentalement par le FHV1, les auteurs ont comparé les résultats des tests d'immunofluorescence et de l'isolation virale. Ils ont alors constaté qu'après 12 jours d'infection 20% seulement des chats apparaissaient positifs alors qu'ils étaient 95% à l'être avec la virologie.

Les raisons de ce manque de sensibilité sont nombreuses. Tout d'abord, la méthode de lecture est très subjective, elle s'effectue à l'oeil et peut varier d'un individu à l'autre. Ensuite, le prélèvement examiné doit être riche en cellules, or la majorité des échantillons analysés n'en contient qu'un faible nombre. C'est là une source très importante de faux négatifs. Il faut également que les épitopes viraux soient capables de se lier aux anticorps, or dans le cas d'infections chroniques, la probabilité qu'ils soient déjà liés aux anticorps de l'hôte est grande. Le problème de la détection lors de maladie chronique repose aussi sur le fait que les glycoprotéines immunogènes virales sont essentiellement présentes lors de réplication active.

Outre le manque de sensibilité, on peut aussi reprocher à ces tests leur manque de spécificité. En effet, des faux positifs peuvent être possibles car il est très difficile de

distinguer fluorescence non spécifique et vrai positif. Ceci peut être rencontré surtout si le praticien a appliqué de la fluorescéine avant d'effectuer le prélèvement<sup>28(5)</sup>. Dans ce cas, même un rinçage de l'oeil ne peut suffire à éviter les faux positifs. Il faut prévenir le laboratoire afin qu'il puisse utiliser un autre fluorochrome, tel que l'isothiocyanate de rhodamine.

## **V. SEROLOGIE**

Le diagnostic sérologique est peu fiable dans le cas de l'herpès virose, il n'est pratiquement pas utilisé.

On utilise la technique de séroneutralisation qui consiste à mélanger un sérum inconnu à différentes dilutions avec un virus à concentration connue et constante. Le titre sérologique est alors évalué en prenant l'inverse de la dernière dilution capable d'inhiber les effets cytopathiques du virus.

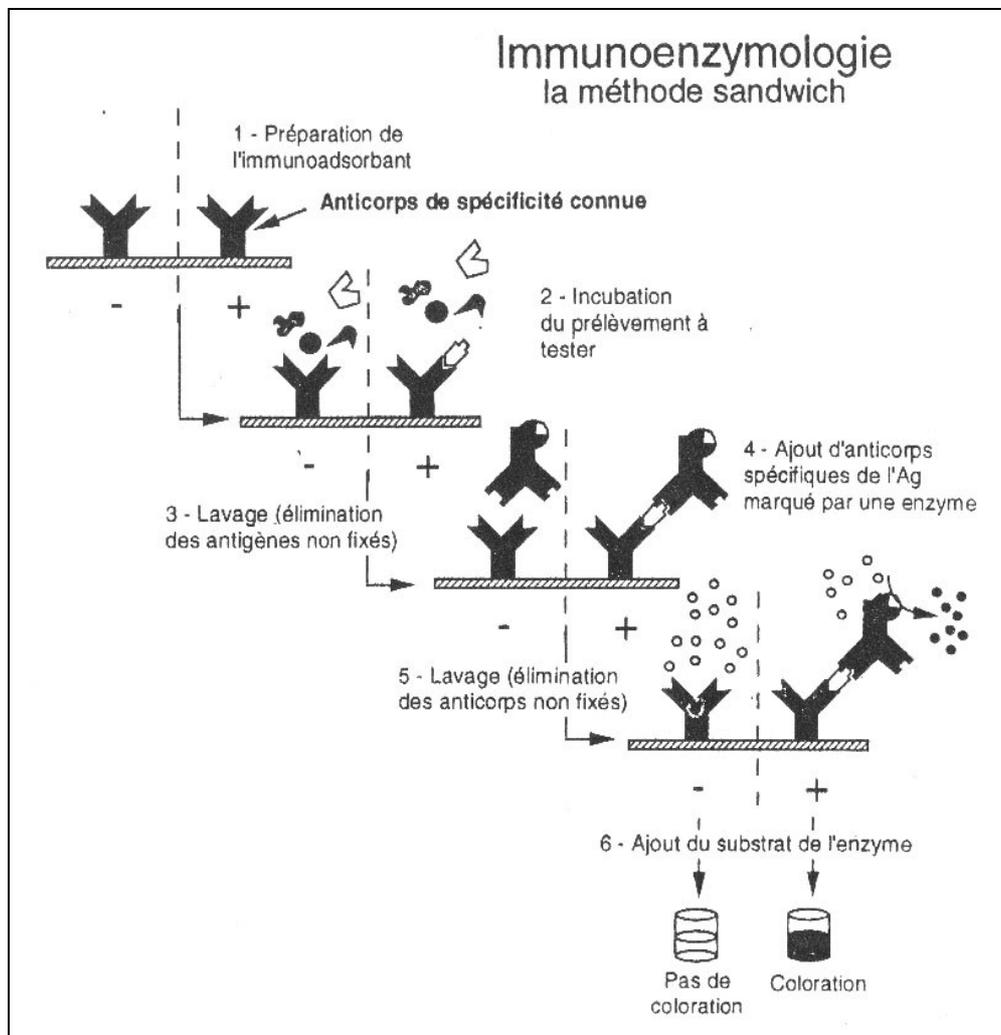
Le problème dans le cas du FHV1 est que les titres restent plutôt stables lors d'infection chronique (18). L'utilisation de sérologies couplées à 15 jours d'intervalle ne présente donc pas d'intérêt. De plus, la variation et l'amplitude de ces titres restent difficiles à interpréter. On constate en effet que les titres augmentent très peu après une vaccination ou lors d'une infection primaire, alors qu'ils tendent à être fortement augmentés lors des périodes de réactivation. En outre, il existe de nombreuses méthodes de laboratoire différentes, et on ne peut donc interpréter un titre isolé que lorsque l'on connaît très bien son laboratoire. La seule chose que l'on peut finalement avancer est que plus le titre viral est élevé, plus on a de chance d'être dans une période de réactivation.

## **VI. CAPTURE D'ANTIGENES, IMMUNOENZYMOLOGIE**

La méthode couramment utilisée pour la détection du FHV1 est la méthode sandwich (18). On fixe un anticorps de capture sur un immunoadsorbant en phase solide. On ajoute alors l'échantillon à tester puis on lave. Si l'antigène s'est fixé, il est alors pris en capture par

un deuxième anticorps conjugué à une enzyme marquée par un fluorochrome. Ainsi, lorsque l'on rajoute le substrat de l'enzyme, il y a coloration de l'échantillon (voir figure 3).

Ce test présente une bonne sensibilité, mais moindre que celle de la PCR, il reste donc peu utilisé.



**Fig. 3 :** Principe de la méthode immunoenzymologique (source : Pr. Millon, ENVT)

## VII. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

### 1. Principe de la technique

Le principe de la PCR consiste à amplifier *in vitro* un fragment de l'ADN viral afin d'obtenir en une à deux heures plusieurs millions de copies de ce fragment. Ces produits peuvent alors être facilement détectés et identifiés.

Pour le FHV1, on amplifie une partie d'un gène bien décrit qui est celui de la thymidine kinase (7). Ce fragment compte 320 paires de bases. La taille du fragment est importante. En effet si elle est trop petite, cela pose des problèmes techniques de visualisation de la bande lors de l'électrophorèse. Si au contraire le fragment est trop grand, l'efficacité de la PCR diminue et donc la sensibilité du test également.

Cette technique d'amplification utilise la propriété de l'ADN polymérase de synthétiser un brin d'ADN complémentaire d'un autre, et ce uniquement à partir d'une amorce.

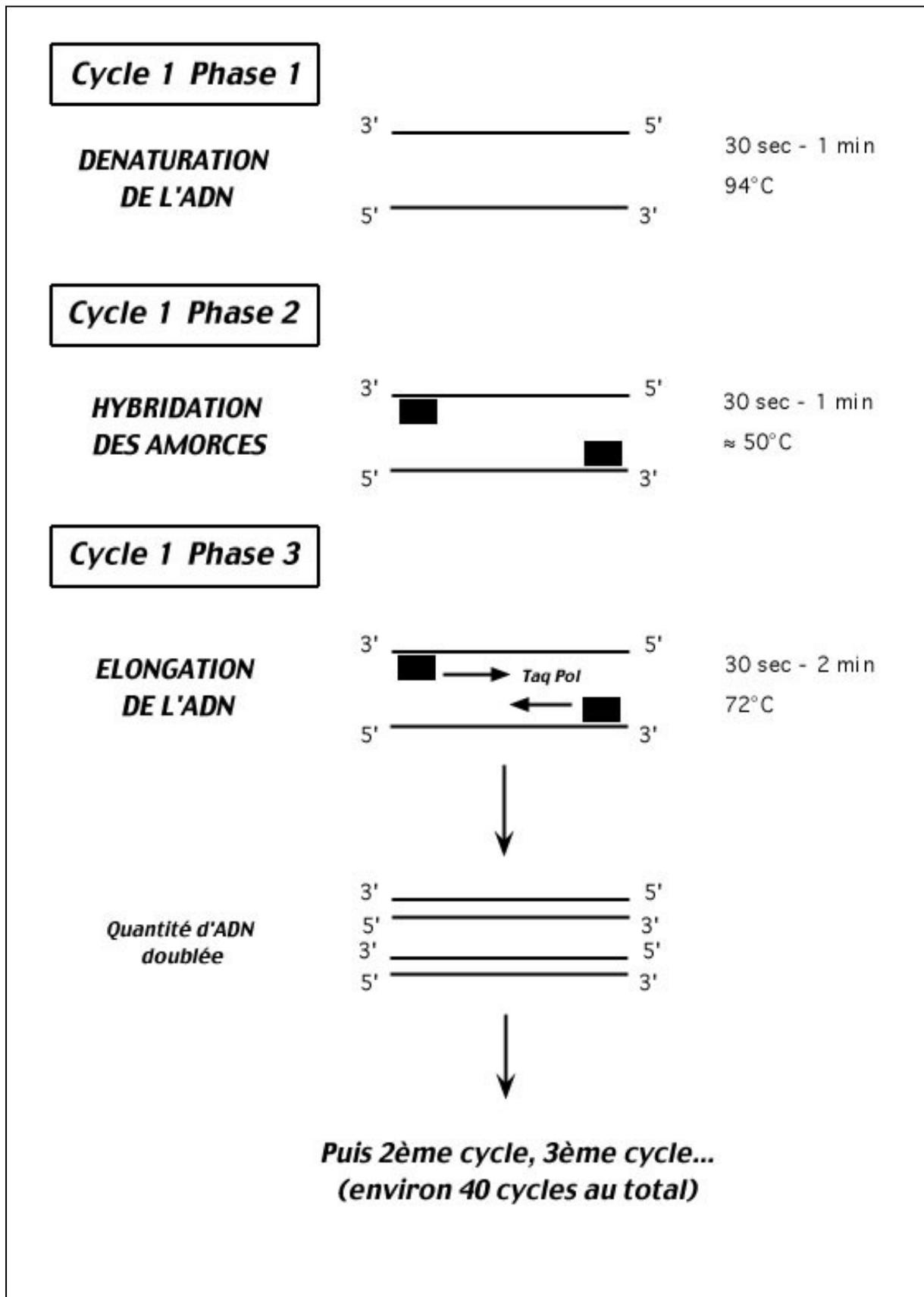
Les composants de la réaction sont (1) :

- l'échantillon, qui peut être constitué par toute sorte de support biologique (frottis conjonctival, raclage de cornée, produit de kératectomie ou tout autre tissu). Cet échantillon est traité de manière à ce que les acides nucléiques en soient extraits.
- les amorces, qui sont de courtes séquences de nucléotides d'environ 20 à 25 paires de bases et qui sont complémentaires des deux extrémités de l'ADN cible.
- La Taq ADN polymérase, une enzyme thermorésistante extraite d'une bactérie vivant dans des sources chaudes.

- Les précurseurs trinuécléotidiques (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- La solution tampon, avec une attention particulière portée à la concentration en ions magnésiums, indispensables au bon fonctionnement de la réaction et qui représentent un facteur critique de l'amplification.

Le principe de la réaction repose sur l'alternance cyclique de trois étapes (voir figure 4 en page suivante). La première est la phase de dénaturation. On utilise la chaleur pour séparer les deux brins de l'ADN, par destruction des liaisons hydrogène. C'est pendant cette phase qu'est appliquée la température la plus élevée de la réaction, soit 94°C. Cette température est supérieure à la température de dénaturation de l'ADN ( $T_m$ ) et elle permet donc d'obtenir des simples brins d'ADN. La seconde phase est la phase d'hybridation des amorces. Ces courtes séquences vont permettre de déterminer les bornes de la séquence à amplifier. En fonction de la longueur des amorces et de leur séquence, la température de cette phase varie entre 45°C et 70°C. Enfin, la troisième phase est celle de l'élongation, c'est-à-dire la synthèse d'un nouveau brin d'ADN dans le sens 5'-3' par la Taq-polymérase. La température optimale de cette dernière phase est de 72°C. Ces trois cycles sont alors répétés 20 à 40 fois en moyenne.

A chaque cycle, on double le nombre de copies. Aussi le rendement de la réaction est, au bout de  $n$  cycles, de  $2^n$  copies. Ce rendement n'est toutefois que théorique car d'une part le rendement même de chaque cycle n'atteint jamais 100%, et d'autre part on assiste à la fin de la réaction à un phénomène de plateau. Le nombre de cycles à partir duquel s'installe ce plateau est très variable, il est fonction de la quantité de cible au départ. Ce phénomène a plusieurs explications, entre autres la diminution d'enzyme disponible et l'inactivation progressive des réactifs.



**Fig. 4 :** Principe de la méthode PCR classique

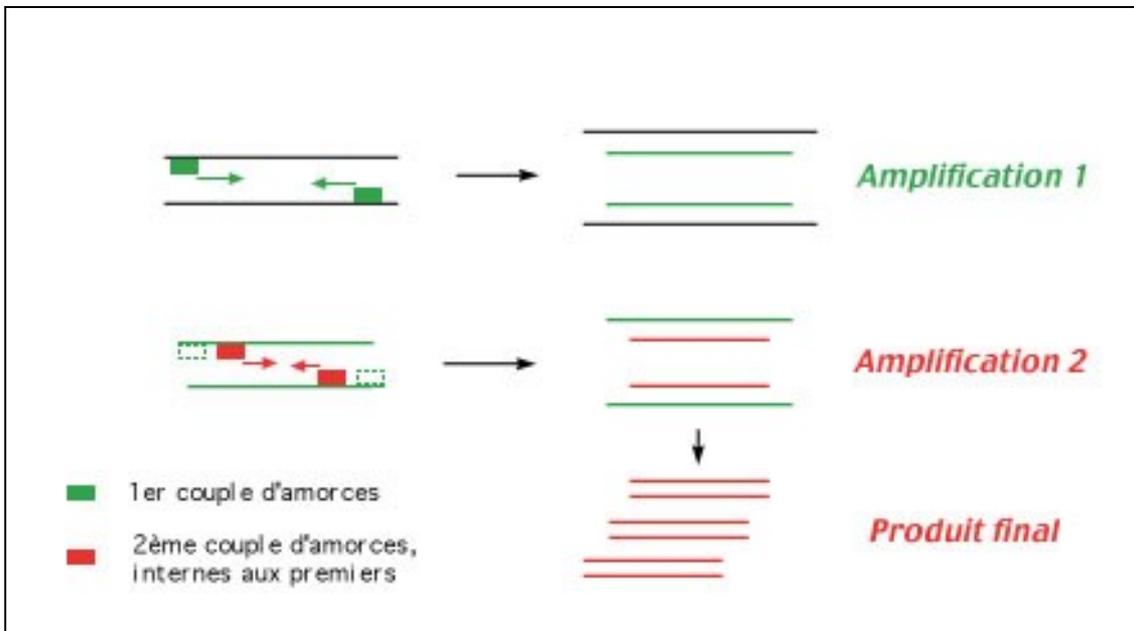
A la fin des cycles, on révèle les produits obtenus. Comme la taille des fragments copiés est toujours nettement plus petite que celle de la molécule d'ADN de départ, la séparation est aisée. On utilise le plus souvent les techniques de migration en gel d'agarose qui s'effectue selon la taille des fragments amplifiés.

## 2. Les techniques dérivées: la PCR nichée et la PCR quantitative

Un des problèmes majeurs de la technique PCR classique est l'amplification parasite. En effet, les amorces spécifiques de la séquence à amplifier sont courtes et peuvent parfois s'hybrider ailleurs que sur leur cible. Une technique dérivée a donc été mise au point, la PCR nichée (1).

Dans cette technique, on commence par amplifier le fragment entre deux amorces, comme dans la méthode classique, pendant 30 à 40 cycles. On transfère alors un échantillon de l'amplificat dans un tube pour une seconde PCR, avec des amorces internes aux premières. Après une nouvelle série de 30 à 40 cycles, l'élément amplifié est donc raccourci (voir figure 5, page suivante).

Du fait d'un nombre de cycles d'amplification plus important, la sensibilité de cette méthode est augmentée. De plus, quatre amorces doivent reconnaître le fragment et non deux, ce qui diminue les risques d'hybridation parasite et donc augmente la spécificité.



**Fig. 5 :** Principe de la méthode PCR nichée

Pour illustrer cette supériorité de la PCR nichée en terme de sensibilité, on peut citer l'expérience de Jean Stiles qui a appliqué les deux méthodes sur des échantillons conjonctivaux ou cornéens de chats sains ou non. Les résultats sont rapportés dans le tableau 2 (20).

**Tabl. 2 :** Comparaison des résultats positifs en PCR classique et en PCR Classique et en PCR nichée sur des échantillons issus de chats sains, à Conjonctivites ou à séquestres cornéens. D'après Stiles, (20)

	Nombre d'échantillons positifs en <b>PCR</b>	Nombre d'échantillons positifs en <b>PCR NICHEE</b>
Frottis conjonctivaux ( sur 50 chats présentant une conjonctivite)	9	27
Frottis conjonctivaux ( sur 50 chats sains)	0	6
Produits de kératectomie ( sur 28 chats présentant un séquestre cornéen)	0	3
Produits de kératectomie ( sur 13 chats sains)	1	6

Des avancées plus récentes portent sur la quantification des produits obtenus. Une de ces techniques, le système Taq-Man®, sera décrite dans la troisième partie car c'est cette méthode qui a été utilisée afin de traiter les échantillons de notre étude. On pourra alors effectuer une comparaison avec les techniques plus anciennes.

### 3. Sensibilité de la PCR dans le diagnostic de l'herpès virose féline

Ces récentes avancées dans le domaine de la PCR ont révolutionné le diagnostic de l'herpès virose. Cette méthode est actuellement considérée comme la plus sensible. Là aussi, l'équipe de Jean Stiles a mené des expériences tendant à le démontrer (21). Ils ont comparé l'efficacité de trois différentes méthodes de diagnostic du FHV1. Ainsi, le virus a été recherché par PCR nichée, par virologie et par immunofluorescence sur des échantillons conjonctivaux et oropharyngés chez trois populations de chats. Pour le classement des animaux, l'équipe a utilisé des critères cliniques, à savoir présence de symptômes oculaires, respiratoires ou absence de symptômes. Les résultats sont regroupés dans le tableau 3 (page suivante), et ils confirment bien que la méthode PCR permet une meilleure détection du virus,

surtout chez les animaux apparemment sains, ce qui est intéressant pour évaluer le portage latent.

**Tabl. 3 : Comparaison des résultats positifs en PCR nichée, en virologie et En immunofluorescence, sur des échantillons issus de chats sains, à troubles Respiratoires et à conjonctivite d'après Stiles, (21)**

	PCR NICHEE		VIROLOGIE		IMMUNOFLUORESCENCE	
	Nombre de positifs sur écouvillon conjonctival	Nombre de positifs sur écouvillon oro-pharyngé	Nombre de positifs sur écouvillon conjonctival	Nombre de positifs sur écouvillon oro-pharyngé	Nombre de positifs sur écouvillon conjonctival	Nombre de positifs sur écouvillon oro-pharyngé
16 chats présentant une conjonctivite	8	8	0	0	0	0
15 chats présentant des problèmes respiratoires	13	12	1	3	1	0
15 chats sains	2	2	0	0	0	0

**TROISIEME CHAPITRE**

**ETUDE EXPERIMENTALE DU TAUX DE PORTAGE LATENT DU FHV1 CHEZ 58 CHATS SAINS, UTILISATION D'UNE NOUVELLE METHODE DE PCR QUANTITATIVE**

Comme il a été vu précédemment, les herpès virus ont la propriété d'infecter leur hôte à l'état latent et ce de manière chronique. Il en résulte alors un portage asymptomatique. Le but de l'étude que nous avons menée était justement de quantifier le nombre d'animaux

atteints de manière asymptomatique, c'est-à-dire finalement d'estimer le portage latent de l'herpès virus dans la population féline.

Dans le deuxième chapitre, nous évoquons les différentes méthodes de diagnostic de l'herpès virose, en concluant sur le fait que la plus sensible était la technique PCR. Il existe plusieurs types de PCR et la majorité des études précédentes de prévalence du FHV1 ont été menées avec la PCR nichée. Nous avons choisi d'utiliser une méthode plus récente d'analyse quantitative de l'ADN. Cependant, nous avons passé également les échantillons en utilisant une technique PCR nichée (13). Nous pourrions ainsi au terme de l'étude proposer une comparaison des deux méthodes.

## **I. MATERIEL ET METHODE**

### 1. Obtention des échantillons

Les prélèvements ont été effectués durant l'année scolaire 2000-2001 parmi les chats présentés à l'école vétérinaire de Toulouse, essentiellement en chirurgie. Ainsi les animaux étaient anesthésiés et les prélèvements étaient plus faciles à réaliser, donc faits dans de meilleures conditions. Les chats prélevés ont tous été d'abord examinés, afin d'écartier de l'étude les animaux présentant des symptômes oculaires ou respiratoires. Cette étude porte donc exclusivement sur des animaux cliniquement sains. L'âge, le sexe et la race des animaux ont été notés, ainsi que le statut vaccinal. Cette dernière information n'a toutefois pas pu être connue pour tous les animaux. Cinquante-huit animaux ont été testés pour réaliser cette étude.

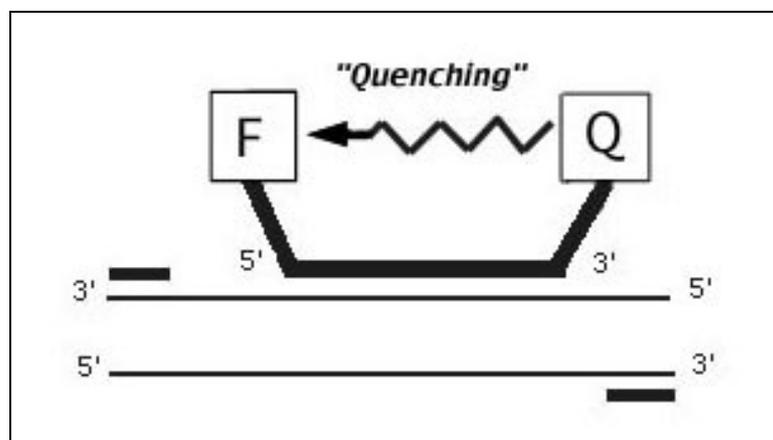
Les échantillons ont été prélevés par raclages conjonctivaux dans le cul-de-sac inférieur, à l'aide de cytobrosses individuelles et stériles. Les deux yeux ont été prélevés sur

chaque animal. L'extrémité de la cytobrosse était alors coupée, et déposée dans un tube sec stérile. Les prélèvements étaient réfrigérés en attendant l'analyse PCR.

## 2. PCR quantitative

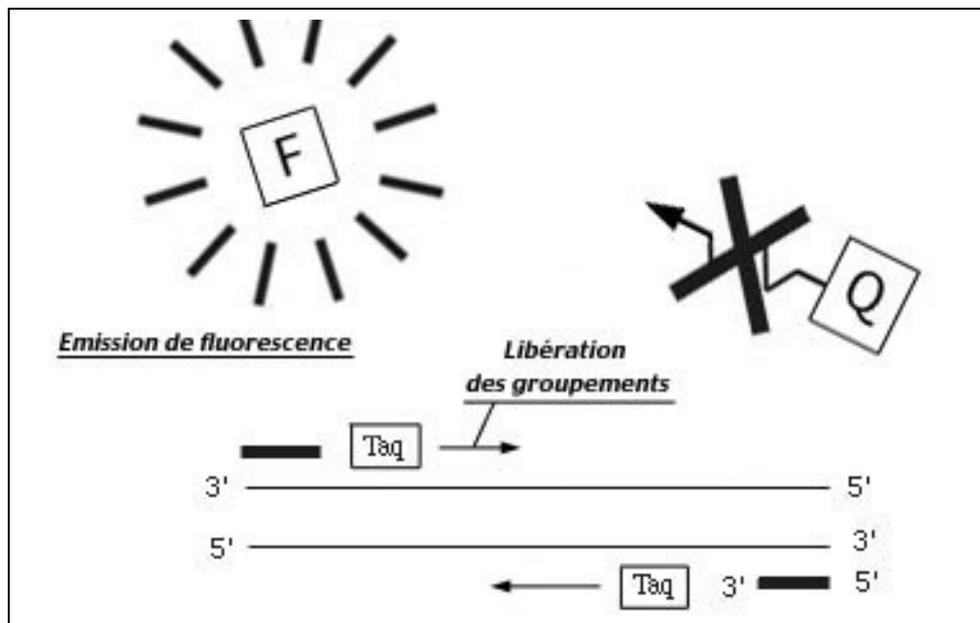
La technique de PCR quantitative que nous avons utilisée pour notre étude est appelée « PCR en temps réel avec sonde TaqMan® » (11). Une sonde fluorescente appelée TaqMan® s'hybride sur les produits de PCR durant l'amplification. La fluorescence de la sonde est mesurée à chaque cycle d'amplification et analysée grâce à un logiciel spécifique. On évite ainsi le temps de révélation des produits de la PCR.

Les composants de la réaction sont les mêmes que ceux cités dans la technique PCR classique ( échantillon à tester, dNTP, tampon, amorces et ADN-polymérase) mais on leur rajoute ici une sonde, la sonde reporter, qui s'hybride entre les deux amorces. Cette sonde va donc s'hybrider avec la séquence à amplifier. Elle est marquée à son extrémité 5' par un fluorophore et à son extrémité 3' par un groupement dérivé de la rhodamine qui joue le rôle de « quencher » de fluorescence. En effet, du fait de la petite taille de cette sonde, la propriété de fluorescence de la fluorescéine est inhibée par la rhodamine qui absorbe l'énergie émise. Ce phénomène est appelé le « quenching », du verbe anglais « quench », éteindre. La température d'hybridation de la sonde est supérieure à celle des amorces, ainsi elle s'hybride en premier et permet d'éviter que des produits soient formés sans émission de fluorescence (voir figure 6).



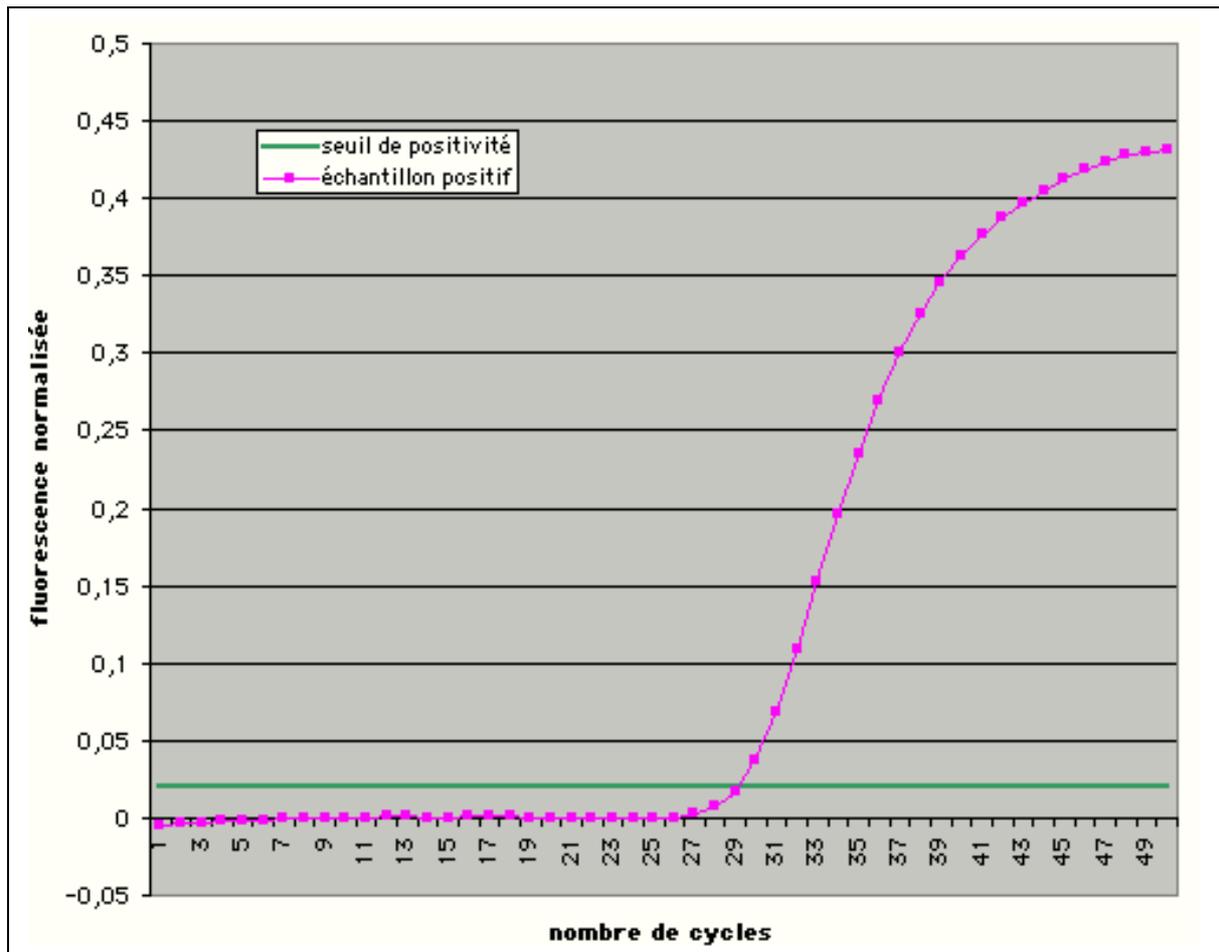
**Fig. 6 : Principe de la PCR quantitative avec sonde TaqMan®, sonde hybridée sur l'ADN, fluorescence inhibée** (avec : F = groupement fluorophore ; Q = « quencher », groupement dérivé de la rhodamine, qui inhibe la fluorescence émise par le groupement F).

Le principe de la réaction est basé sur l'activité exonucléase dans le sens 5' - 3' de la Taq polymérase (2). En effet, pendant la phase d'extension, l'enzyme va rencontrer l'extrémité 5' de la sonde et va alors l'attaquer. Les deux groupements sont ainsi libérés ce qui permet au dérivé de la fluorescéine d'exprimer à nouveau sa fluorescence (voir figure 7). On peut alors quantifier les produits de PCR formés car ils sont directement proportionnels à la fluorescence émise. L'automatisation de la technique est permise par l'utilisation d'appareils combinant thermocycleur pour la réaction PCR et fluorimètre pour la quantification immédiate de la fluorescence émise.



**Fig. 7 : Principe de la PCR quantitative avec sonde TaqMan®**  
**Libération des groupements par la Taq polymérase, émission de fluorescence**

La courbe représentant la fluorescence émise en fonction du nombre de cycles est calquée sur la courbe de rendement de la réaction PCR. Le graphique 1 présente l'allure générale de cette courbe ainsi que les outils que l'on utilise pour évaluer le statut de l'animal.



**Graph. 1 :** PCR quantitative : principe général de détermination des charges virales

On réalise toujours au moins deux mesures pour un même échantillon. Le résultat annoncé est donc toujours issu de l'analyse de deux courbes, et en particulier de leur Ct (« Cycle threshold »), soit de leur cycle seuil. Le Ct est défini comme le point d'intersection entre la ligne du seuil de positivité et la courbe des valeurs de fluorescence en fonction du

nombre de cycles. Il peut être directement corrélé à la charge virale initiale et donne donc une information assez fiable sur le taux de portage viral.

Pour analyser ces courbes, on commence par regarder si l'échantillon est positif pour les deux mesures ou seulement une fois sur deux. Dans ce dernier cas, on peut en conclure que l'on est à la limite du seuil de détection et que donc la charge virale n'est pas très importante. On analyse ensuite la valeur du Ct. Plus celui-ci est bas, c'est-à-dire plus la valeur seuil de fluorescence est dépassée rapidement, plus l'échantillon était au départ riche en particules virales. De faibles valeurs de Ct, retrouvées aux deux mesures, sont donc fortement en faveur d'une infection aiguë. A l'inverse, des valeurs plus élevées du Ct seront plus en faveur d'un phénomène chronique ou de portage latent.

### 3. Traitement statistique utilisé

Les différents résultats ont tout d'abord été analysés d'une manière simple, en calculant le pourcentage de chats et d'yeux positifs au sein de l'ensemble de l'échantillon. L'influence de différents facteurs sur la prévalence du portage latent a ensuite été étudiée : le sexe, l'âge et le statut vaccinal. Pour conclure sur le fait que les différences observées étaient significatives ou non, nous avons utilisé un test de  $\chi^2$  bilatéral avec un risque  $\alpha$  fixé à 5% pour des comparaisons de deux données entre elles et 1,6% pour les comparaisons de trois classes d'animaux.

## **II. RESULTATS**

### 1. Présentation

On trouvera en annexe l'ensemble de nos résultats regroupés dans un tableau. A chaque prélèvement a été attribué un code d'identification, comportant la référence de

l'animal ( par exemple CT 1 pour le premier prélèvement) et l'œil testé ( droit : D et gauche : G). Sont également notés l'âge de l'animal, son sexe, son statut vaccinal ainsi que d'éventuelles remarques. Deux PCR quantitatives avec système TaqMan® ont été effectuées sur chaque échantillon, permettant ainsi une double détermination. C'est seulement dans le cas de résultats positifs avec cette méthode que l'on a procédé également à une PCR nichée. En effet, le seuil de détection est inférieur pour la PCR quantitative. Les prélèvements trouvés négatifs sont notés N. Pour les positifs avec le système quantitatif, deux informations sont fournies. L'existence de la positivité tout d'abord, puisque l'on réalise à chaque fois deux PCR. Ainsi les échantillons ne donnant un résultat positif qu'une fois sur deux ont été notés P 1/2. Cela veut dire que les prélèvements analysés sont vraiment à la limite du seuil de détection de la technique. Nous avons également noté la valeur du cycle seuil Ct pour chaque prélèvement positif. Ainsi un résultat positif aux deux cycles de PCR avec un Ct égal à 40 était noté P40. Pour les échantillons positifs une fois sur deux, la valeur du Ct a été précisée entre parenthèse. Par exemple un animal positif une fois sur deux avec un Ct égal à 39 sera noté P1/2 (39).

## 2. Prévalences observées

Nous avons choisi de distinguer deux types de prévalence, en calculant d'une part le nombre de résultats positifs parmi le nombre de chats testés et d'autre part le nombre de positifs parmi le nombre d'yeux prélevés. Pour chacune de ces deux approches, nous présenterons les résultats obtenus avec la PCR quantitative ainsi qu'avec la PCR nichée.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.

**Tabl. 4 : résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative et par PCR nichée**

	PCR quantitative	PCR nichée
nombre d'animaux testés / nombre d'yeux testés	58 / 116	21 / 21
nombre d'animaux positifs / nombre d'yeux positifs	12/12	0 / 0
pourcentage d'animaux positifs / pourcentage d'yeux positifs	20.7 / 10,3	0 / 0

Comme on peut le constater dans les résultats fournis en annexe, les animaux porteurs du virus ne le sont à chaque fois que sur un œil.

Nous avons ensuite étudié ces résultats selon différents facteurs que l'on peut suspecter d'influencer la prévalence du FHV1 : l'âge, le sexe et le statut vaccinal. Ces résultats sont présentés dans les trois tableaux 5, 6 et 7.

**Tabl. 5 : résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative,  
Influence du facteur « âge »**

	nombre d'animaux testés	nombre d'animaux positifs	pourcentage de positivité
≤ 1 an	29	8	27,60%
de 1 à 10 ans	21	2	9,50%
≥ 10 ans	8	2	25%

**Tabl. 6 : résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative,**

### Influence du facteur « sexe »

	nombre d'animaux testés	nombre d'animaux positifs	pourcentage de positivité
femelles	29	3	10,30%
mâles	29	9	31%

**Tabl. 7 :** résultats de la recherche du FHV1 par PCR quantitative, Influence du facteur « statut vaccinal »

	nombre d'animaux testés	nombre d'animaux positifs	pourcentage de positivité
vaccinés	26	4	15,40%
non vaccinés	8	2	25%
statut vaccinal inconnu	24	6	25%

### 3. Analyse statistique des résultats

L'étude des résultats selon les facteurs âge, sexe et statut vaccinal aboutit à des prévalences différentes selon l'appartenance à telle ou telle classe. Afin de vérifier si les différences observées étaient significatives ou pas, nous avons effectué un test de  $\chi^2$  bilatéral. Il consiste finalement à tester l'hypothèse « les deux pourcentages sont égaux » contre l'hypothèse « les deux pourcentages sont différents ».

Pour la distinction mâles/ femelles, on a fixé le risque  $\alpha$  du test à 5%. En appliquant le test de  $\chi^2$ , on peut dire que la prévalence des mâles est significativement différente de celle des femelles. De plus, au vu des résultats, on note que cette prévalence est plus élevée.

Pour l'analyse du facteur âge, les animaux ont été classés en trois catégories. Aussi le risque  $\alpha$  a été choisi plus petit et fixé à 1,6% pour cette comparaison multiple. On constate

que les animaux les plus atteints dans notre étude sont les jeunes et les vieux. Le test de  $\chi^2$  montre que la différence est bien significative.

En appliquant le test de  $\chi^2$  aux pourcentages observés chez les animaux vaccinés ou pas, on conclut que la différence observées n'est pas significative.

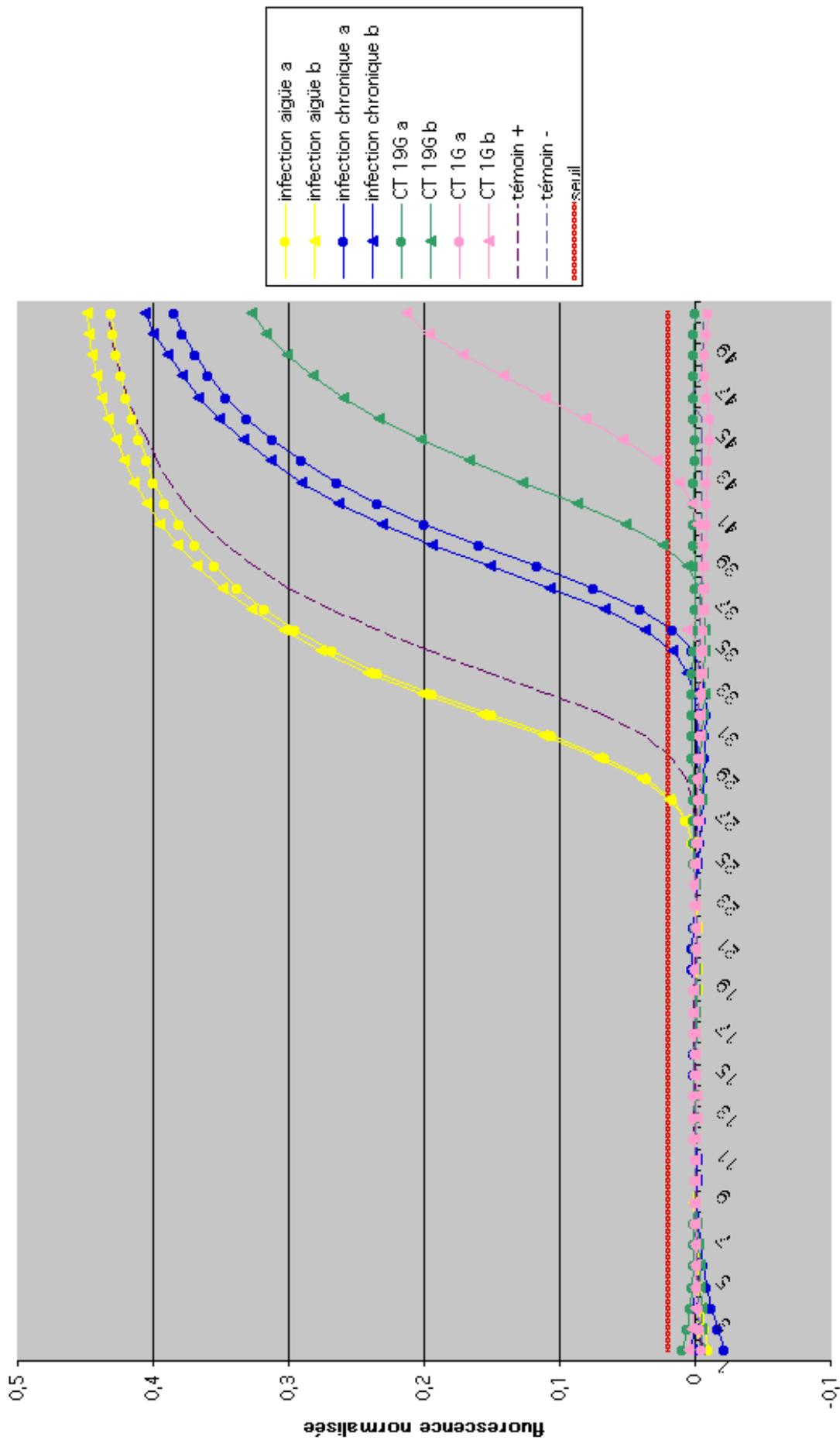
### III. DISCUSSION

#### 1. Analyse de nos résultats

##### a. les prévalences observées

Le pourcentage d'animaux positifs dans notre étude est donc de 20,6%. Nous pouvons pour plusieurs raisons penser que ces animaux sont des porteurs latents. D'une part, l'étude a été menée sur des animaux ne présentant pas de symptômes. De plus, la PCR quantitative est pour ces animaux toujours positive seulement sur un des deux yeux, elle est pour beaucoup positive une fois sur deux, et ce toujours avec des valeurs de Ct élevées. Cela montre que la charge virale n'est pas très importante, comme elle pourrait l'être par exemple en cas d'infection aiguë. On trouverait dans ce cas des Ct aux alentours de 20 ou 25. On peut pour comprendre l'analyse de ces résultats se reporter au graphique 2 (page suivante). Les courbes représentées sont celles de la fluorescence normalisée en fonction du nombre de cycles de PCR. Deux PCR, notées a et b, ont été réalisées pour chaque échantillons. Nous avons représenté différents cas de figure sur ce schéma : le cas d'un animal qui présente une herpès virose en phase aiguë, celui d'un chat qui présente des troubles chroniques, kératite par exemple, ainsi que le cas de deux animaux de notre étude. On constate bien que le

prélèvement du chat qui présente des troubles aigus est positif lors des deux analyses, et que les valeurs de son Ct sont relativement faibles, aux alentours de 27. L'animal qui souffre de troubles chroniques est lui aussi détecté positif les deux fois, avec des valeurs de Ct un peu plus élevées, entre 30 et 35. Quant aux deux animaux de notre étude, les chats notés CT 1 et CT 19 dans le tableau de résultats présenté en annexe, cette courbe confirme bien qu'il s'agit de porteurs latents. On pouvait déjà constater que les résultats étaient positifs sur un seul œil, le gauche. De plus, comme le montre le schéma, les échantillons de l'œil gauche de ces deux



animaux ne sortent positifs qu'une fois sur les deux mesures avec des valeurs de Ct élevées, 40 voire 43.

Nous arrivons donc, à travers cette étude, à une estimation du taux de portage latent de l'herpès virus dans la population féline. Il convient toutefois de rester prudent dans nos conclusions et d'analyser cette estimation en gardant à l'esprit les limites de notre étude, qui seront évoquées plus loin.

Dans la partie résultats, la prévalence du portage du FHV1 a aussi été calculée pour chaque échantillon. Elle est alors de 10,3%. Cette donnée peut être importante en pratique pour le vétérinaire qui désire faire tester en PCR quantitative un animal qu'il suspecte atteint d'herpès virus. En effet, dans ce cas le praticien effectue bien souvent le prélèvement uniquement sur l'œil atteint. Donc si cet échantillon revient positif, il convient de garder à l'esprit qu'il peut s'agir de portage latent, et ce dans environ 10% des cas. Le résultat peut donc tout à fait être positif alors que l'herpès n'est pas à l'origine des troubles cliniques rencontrés. Dans ce cas, l'information sur la quantification est un élément important à prendre en compte, puisque comme il a été dit précédemment, on peut évaluer le statut clinique de l'animal grâce à l'analyse de la valeur du Ct.

#### b. les facteurs influençant les prévalences

Dans notre étude, les chats mâles ainsi que les jeunes et les vieux animaux sont plus porteurs asymptomatiques d'herpès que les autres classes de population. Ces différences sont statistiquement significatives. On peut tenter d'expliquer ces observations. En effet, les mâles sont souvent plus bagarreurs que les femelles, et ainsi plus exposés à la transmission de virus.

#### c. la comparaison des deux techniques de PCR

La PCR quantitative est connue pour être plus sensible que la PCR nichée. C'est pour cela que nous n'avons testé en PCR nichée que les échantillons positifs avec le système TaqMan®. Nous n'avons pas obtenu un seul résultat positif avec la PCR nichée. Le système quantitatif en temps réel semble donc plus sensible. Cette différence s'explique surtout par les

faibles charges virales que présentent les porteurs latents. Le seuil de détection de la méthode TaqMan® étant plus bas que celui de la PCR nichée, nous avons pu trouver positifs ces animaux. Les prélèvements sont d'ailleurs nombreux à n'être sortis positifs qu'une fois sur deux, ce qui montre bien qu'ils étaient même à la limite du seuil de détection de la PCR quantitative.

La sensibilité supérieure de la méthode TaqMan® est due au fait qu'elle peut amplifier des fragments beaucoup plus courts que la PCR nichée. Cette méthode est en effet limitée par le fait que les produits de la réaction doivent être révélés par migration sur gel d'agarose, et que pour cela les fragments ne peuvent pas être trop petits pour pouvoir être différenciés.

#### d. les limites de notre étude

Nos résultats nous permettent donc d'estimer le taux de porteurs latents d'herpès virus dans la population féline, 20,6%, et de conclure sur la supériorité en terme de sensibilité de la PCR quantitative sur la PCR nichée. Il faut toutefois rester prudents et relativiser ces conclusions. En effet, nous sommes conscient que notre étude présente des limites qui peuvent remettre en doute nos résultats.

Tout d'abord, cette étude a été faite sur 58 animaux. Sans le qualifier de faible, cet échantillon n'est tout de même pas très important et l'étude aurait gagné à être réalisée à plus grande échelle. La taille moyenne de l'échantillon peut donc constituer un biais important.

La seconde critique principale porte sur le recueil de commémoratifs, malheureusement pas assez complet. Nous avons essayé d'être le plus rigoureux possible et de collecter un maximum d'informations sur les animaux que nous avons prélevés, mais de nombreuses données n'ont pu être connues. C'est le cas en particulier du statut vaccinal. Nous n'avons également pas pu obtenir de renseignements sur d'éventuelles maladies oculaires antérieures ou sur des troubles oculaires récurrents. De même, nous aurions aimé avoir accès aux informations concernant l'environnement de l'animal. L'herpès virus félin étant en effet très contagieux, on risque d'avoir une surestimation de la prévalence si l'on a sans le savoir dans notre étude une majorité d'animaux issus de collectivités ou d'élevage. Enfin, pour les chats castrés, il aurait été intéressant de connaître l'âge de la castration. En effet, on peut supposer qu'un chat castré très jeune se comporte pratiquement comme une femelle, et que donc l'explication donnée pour la différence mâles/ femelles n'est pas valable.

Toutes ces informations ont été difficiles à collecter dans le contexte d'une école vétérinaire, où les dossiers sont souvent incomplets et où on ne voit pas forcément les propriétaires, si les animaux sont hospitalisés ou au bloc chirurgical. Cette étude serait sûrement plus facile à mener dans une clientèle, où le praticien suit l'animal souvent depuis sa primovaccination.

## 2. Positionnement de notre étude par rapport aux études précédentes

Plusieurs études précédentes portent elles aussi sur la recherche du FHV1 dans des populations de chats sains. Nous en proposons ici un récapitulatif afin de savoir si nos résultats diffèrent beaucoup des autres. Ces études sont tout d'abord celles de l'équipe de J. Stiles. Dans la première, la PCR nichée est appliquée à des prélèvements issus de chats sains (20). Le FHV1 est recherché dans 50 échantillons. Dans la seconde, la PCR nichée est effectuée à partir de 15 échantillons prélevés sur chats sains (21). Nous citerons également l'étude de Nasisse et al (19), effectuée sur 17 raclages cornéens de chats sains, celle de Burgesser et al (3) sur 84 prélèvements de chats sains, toutes réalisées avec la méthode PCR. Enfin, nous comparerons nos résultats avec l'étude d'Harbour et al (8), qui ont recherché pendant 9 ans le FHV1 par virologie parmi 601 chats. Les résultats de ces différentes études ainsi que les techniques diagnostiques utilisées sont rassemblés dans le tableau 8. Un test de  $\chi^2$  bilatéral avec un risque  $\alpha=5\%$  a été appliqué à ces différents résultats afin de comparer s'ils étaient significativement différents des nôtres. Nous les comparerons avec notre pourcentage trouvé par PCR quantitative sur le nombre total de prélèvements, soit 10,3%. En effet, les études précitées sont effectuées à chaque fois sur un seul œil par chat, et raisonnent en terme de prélèvement et non d'animal.

**Tabl. 8 : Comparaison des études précédentes sur la recherche du FHV1 chez le chat sain** d'après Stiles (20), (21), Burgesser (3), Nasisse (19) et Harbour (8)

	ETUDES PRECEDENTES				
	Stiles, 96	Stiles, 96	Burgesser, 97	Nasisse, 97	Harbour
nombre d'échantillons testés	50	15	84	17	601
nombre d'échantillons positifs/ pourcentage de positivité	6/12%	2/13,3%	26/30,9%	1/5,9%	1/0,2%
type de prélèvement	biopsies de conjonctive	écouvillon conjonctival	écouvillon conjonctival	raclage cornéen	écouvillon oro-pharyngé
méthode diagnostique	PCR nichée	PCR nichée	PCR nichée	PCR classique	virologie +/- immunofluorescence
statistique : étude de la différence avec l'étude personnelle	non significative	non significative	non significative	non significative	significative

Pour la majorité des résultats, les différences observées ne sont donc pas significatives. Toutefois, les différences de protocoles entre ces études méritent d'être soulignées pour relativiser cette comparaison.

Le point le plus important à noter est la différence de techniques utilisées pour mettre en évidence le virus. A l'exception d'une étude qui a détecté le FHV1 par virologie, toutes les autres y compris la nôtre ont effectué la recherche par PCR. C'est d'ailleurs avec la détection par virologie que l'on trouve le taux le plus bas de porteurs, ce qui suggère bien que cette méthode est bien moins sensible que la PCR. Comme il a été vu précédemment, il existe différentes méthodes PCR. La majorité des études auxquelles nous nous comparons ont été effectuées avec la PCR nichée, alors que nous avons utilisée une méthode quantitative connue pour être plus sensible. Si l'on reprend nos résultats obtenus en PCR nichée, notre taux de prévalence tombe à 0% et devient alors bien inférieur à ceux cités précédemment. Il semble qu'il y ait clairement une influence de la méthode utilisée. Il faut donc rester prudent quant à

la comparaison avec ces autres études. Certes nous n'avons pas observé de différence, mais nous avons utilisé une méthode PCR différente et théoriquement plus sensible.

On peut également suspecter une influence du type de prélèvement. Nous avons choisi d'utiliser des cytobrosses conjonctivales mais la recherche d'herpès virus peut se faire sur d'autres supports et avec un autre matériel. Par exemple, les écouvillons conjonctivaux, largement utilisés, raclent moins de cellules et ne sont donc pas aussi efficaces que les cytobrosses. Dans les autres études, on peut retrouver ce type de prélèvements mais certains auteurs choisissent également d'autres supports, à savoir des biopsies conjonctivales, des raclages de cornée ou encore des écouvillonnages oro-pharyngés. A priori, tout type de support biologique est valable pour effectuer une recherche PCR. Ce facteur ne devrait donc pas avoir d'influence pour les études qui ont utilisé cette technique. Il faut cependant que le prélèvement soit suffisamment riche en cellules, et c'est peut-être en cela que certaines techniques de prélèvement sont meilleures que d'autres. En effet, une pièce de biopsie a sûrement plus de chances de contenir une grande quantité de cellules qu'un écouvillon conjonctival.

De plus, toutes les études préalables ont été effectuées dans des pays anglo-saxons, Etats-Unis et Angleterre. La question qui se pose est celle-ci : y a-t-il une différence de prévalence du FHV1 liée au pays ? Cette interrogation demeure, même si des études tendent à prouver que les taux de portage latent seraient plus élevés outre Atlantique. Nos résultats obtenus en PCR nichée, montrant une prévalence apparente bien inférieure à celle des études américaines effectuées avec la même technique, tendent à aller dans ce sens.

Enfin, la taille de l'échantillon varie selon les études. Notre population comporte 58 chats, celles des études citées vont de 15 à 601 chats. Ce facteur peut être important, puisque si notre échantillon est trop petit, il risque de ne pas être représentatif. Refaire cette étude avec un échantillon plus important permettrait donc d'affiner ce résultat et de le conforter.

## CONCLUSION

Au terme de cette étude, nous arrivons à la conclusion que 20,7% des chats de notre échantillon sont porteurs latents d'herpès virus félin, et que 10,3% des prélèvements analysés sont positifs. Ce résultat ne peut être pris de manière catégorique comme estimation de la prévalence de porteurs de FHV1 au sein de toute la population féline. Il faut en effet garder à l'esprit toutes les réserves que l'on a pu émettre sur notre étude. Il serait en particulier intéressant de refaire ce même type de travail avec un échantillon d'animaux bien plus important. Néanmoins, l'utilisation d'une nouvelle méthode de PCR, la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan® différencie clairement cette étude de celles effectuées auparavant. Cette nouvelle technique est, comme nous l'avons montré, plus sensible que la PCR nichée. A terme, ces résultats devront donc être confrontés à ceux des études qui utiliseront ces nouvelles méthodes de PCR. A l'avenir, ces techniques quantitatives, encore peu utilisées pour l'instant, seront donc très certainement des techniques diagnostiques de choix.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BELAK, S., BALLAGI-PORDANY, A.  
Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology  
*Veterinary Research Communications*, 1993, **17** : 55-72
2. BOGARD, M., LAMORIL, J.  
Analyse quantitative des acides nucléiques  
In : *Biologie moléculaire en biologie clinique, I) méthodes*. Nancy : elsevier, 1998. 119-136
3. BURGESSER, K.M., HOTALING, S., SCHIEBEL, A., et al  
Comparison of PCR, virus isolation and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring Feline Herpesvirus-1 infections  
In : *Twenty-eighth Annual Meeting American College of Veterinary Ophthalmologists*, Santa Fe, New Mexico, 15-18 november 1997
4. CAMPBELL, L.H.  
Ocular changes associated with mycoplasmal, chlamydial and herpesvirus infections in the cat  
*Modern veterinary practice*, 1983, **64** : 529-531
5. DA SILVA CUIRIEL, J.M.A., NASISSE, M.P., HOOK, R.R, et al  
Topical fluorescein dye: effects on immunofluorescent antibody test for feline herpesvirus keratoconjunctivitis  
*Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology*, 1991, **1** : 99-104
6. FRIEDMAN, D.S  
Infectious feline keratoconjunctivitis  
In : *Kirk's Current Veterinary Therapy, XII, Small Animal Practice*  
J.D. BONAGURA. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1995 : 1227-1231
7. HARA, M., FUKUYAMA, M et al  
Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction  
*Veterinary Microbiology*, 1996, **48** : 345-352
8. HARBOUR, D.A., HOWARD, P.E., GASKELL, R.M.  
Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989  
*The Veterinary Record*, 1991, **128** : 77-80
9. HENDRICKS, R.L., TUMPEY, T.M.  
Contribution of virus and immune factors to herpes simplex virus type 1-induced corneal pathology  
*Investigative ophthalmology and visual science*, 1990, **31** : 1929-1938
10. KETRING, K.L.

Selected corneal diseases

Proceedings of the American Animal Hospital Association, 1996 : 391-393

11. LEUTENEGGER, C.

The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine  
*Veterinary Science Tomorrow* [ On line]. January 2001.

12. MAGGS, D.J.

Update on feline herpesvirus (FHV-1). Proceedings of the 16th ACVIM forum  
San diego, 1998

13. MONTAUT, L.

Mise au point du diagnostic par PCR de l'herpès virus félin  
Th. : Med.vet. : Toulouse : 2002

14. NASISSE, M. P.

Manifestations, diagnosis, and treatment of ocular herpesvirus infection in the cat  
*The compendium on Continuing Education*, 1982, **4** : 962-970

15. NASISSE, M.P., GUY, J.S, et al

Experimental Ocular Herpesvirus Infection in the Cat  
*Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1989, **30** : 1758-1768

16. NASISSE, M. P.

Feline herpesvirus ocular disease

*Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 1990, **20** : 667-680

17. NASISSE, M.P., ENGLISH, R.V., TOMPKINS, M.B et al

Immunologic, histologic, and virologic features of herpesvirus-induced stromal keratitis in  
cats

*American Journal of Veterinary Research*, 1995, **56** : 51-54

18. NASISSE, M.P., WEIGLER, B.J.

The diagnosis of ocular feline herpesvirus infection

*Veterinary and comparative ophthalmology*, 1997, **7** : 44-51

19. NASISSE, M.P., GLOVER, T.L., MOORE, C.P., et al

Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal  
sequestration

*American Journal of Veterinary Research*, 1998, **59** : 856-858

20. STILES, J., McDERMOTT, M., BIGSBY, D., et al

Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from  
clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis

*American Journal of Veterinary Research*, 1997, **58** : 338-342

21. STILES, J., McDERMOTT, M., BIGSBY, D., et al

Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody  
testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis

*American Journal of Veterinary Research*, 1997, **58** : 804-807

22. STILES, J.

Feline herpesvirus

*Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2000, **30** : 1001-1014

23. SYKES, J.E.

Feline upper respiratory tract pathogens: herpesvirus-1 and calicivirus

*The Compendium on Continuing Education* , 2001, **23** : 166-175

24. WHITLEY, R.D, WHITLEY, E.M., McLAUGHLIN, S.A.

Diagnosing and treating disorders of the feline conjunctiva and cornea

*Veterinary medicine*, 1993, **88** : 1138-1149

25. WILLIS, A.M.

Feline herpesvirus-related ocular disease

*Veterinary Technician*, 1995, **16** : 311-317

# ANNEXE

## TABLEAU DE L'ENSEMBLE DES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE

code du chat testé	âge	sexe	vaccination	remarque	PCR quantitative	PCR nichée
CT 1 D CT 1 G	5 ans	mâle castré	non		N P 1/2 (43)	N
CT 2 D CT 2 G	2 ans	mâle castré	inconnue		N N	
CT 3 D CT 3 G	8 ans	mâle castré	non		N N	
CT 4 D CT 4 G	9 ans	femelle	non		N N	
CT 5 D CT 5 G	6 mois	femelle	oui		N N	
CT 6 D CT 6 G	7 mois	femelle	oui		N N	
CT 7 D CT 7 G	7 mois	femelle	oui		N N	
CT 8 D CT 8 G	10 ans	mâle castré	inconnue		N N	
CT 9 D CT 9 G	7 mois	mâle castré	inconnue		N N	
CT 10 D CT 10 G	3 ans	mâle castré	oui	FeLV +	N N	
CT 11 D CT 11 G	2 ans	mâle	inconnue		N N	

CT 12 D	7 ans	femelle	oui		N	
CT 12 G					N	
CT 13 D	13 ans	femelle castrée	inconnue		N	
CT 13 G					N	
CT 14 D	2 ans	femelle	inconnue	signes respiratoires supérieurs	N	
CT 14 G					N	
CT 15 D	4 ans	femelle castrée	oui		N	
CT 15 G					N	
CT 16 D	3 ans	femelle	oui		N	
CT 16 G					N	
CT 17 D	9 mois	mâle	oui		N	
CT 17 G					N	
CT 18 D	9 mois	mâle	oui		N	
CT 18 G					N	
CT 19 D	1 an	mâle	inconnue		N	
CT 19 G					P 40	N
CT 20 D	13 ans	femelle castrée	interrompue		N	
CT 20 G					N	
CT 21 D	7 ans	mâle castré	inconnue		N	
CT 21 G					N	
CT 22 D	1 an	mâle	inconnue		N	
CT 22 G					N	
CT 23 D	7 mois	femelle	oui		N	
CT 23 G					N	
CT 24 D	3 ans	femelle	oui		N	
CT 24 G					N	
CT 25 D	9 mois	femelle	oui		N	
CT 25 G					N	
CT 26 D	7 mois	femelle	inconnue		N	
CT 26 G					N	
CT 27 D	1 an	mâle	inconnue		N	
CT 27 G					P 1/2 (40)	N
CT 28 D	2 ans	femelle	oui		N	
CT 28 G					N	
CT 29 D	7 mois	femelle	oui		N	
CT 29 G					N	
CT 30 D	2 ans	femelle	inconnue		N	
CT 30 G					N	
CT 31 D	1 an	mâle	inconnue		N	
CT 31 G					N	

CT 32 D CT 32 G	5 ans	mâle castré	inconnue		N N	
CT 33 D CT 33 G	10 ans	mâle castré	oui		N N	
CT 34 D CT 34 G	1 an	mâle	inconnue		N N	
CT 35 D CT 35 G	13 ans	mâle castré	inconnue		N N	
CT 36 D CT 36 G	3 ans	mâle castré	oui		P 1/2 (40) N	N
CT 37 D CT 37 G	1 an	mâle	oui		P 39 N	N
CT 38 D CT 38 G	1 an	femelle	oui		P 1/2 (39) N	N
CT 39 D CT 39 G	11 ans	femelle	non		N P 1/2 (39)	N
CT 40 D CT 40 G	1 an	mâle	inconnue		N N	
CT 41 D CT 41 G	10 ans	femelle	inconnue		N N	
CT 42 D CT 42 G	3 ans	mâle castré	non		N N	
CT 43 D CT 43 G	9 ans	femelle castrée	oui	lymphome	N N	
CT 44 D CT 44 G	1 an	mâle	inconnue		N N	
CT 45 D CT 45 G	1 an	mâle	interrompue		N N	
CT 46 D CT 46 G	6 mois	femelle	oui		N N	
CT 47 D CT 47 G	7 mois	femelle	oui		N N	
CT 48 D CT 48 G	9 ans	femelle	oui		N N	
CT 49 D CT 49 G	5 ans	femelle	inconnue		N N	
CT 50 D CT 50 G	1 an	femelle	oui		N N	
CT 51 D CT 51 G	7 mois	femelle	oui		N P 1/2 (41)	N

CT 52 D CT 52 G	7 mois	femelle	oui		N N	
CT 53 D CT 53 G	1 an	femelle	oui		N N	
CT 54 D CT 54 G	15 ans	mâle	inconnue	calicivirose	P 1/2 (41) N	N
CT 55 D CT 55 G	9 ans	mâle castré	interrompue		N N	
CT 56 D CT 56 G	1 an	mâle	inconnue		P 1/2 (43) N	N
CT 57 D CT 57 G	1 an	mâle	inconnue		N P 1/2 (39)	N
CT 58 D CT 58 G	1 an	mâle	inconnue		P 1/2 (39) N	N

Toulouse 2001

NOM : CAVENE

PRENOM : Mathilde

**TITRE DE LA THESE :**

**ETUDE DU PORTAGE OCULAIRE DU VIRUS HERPES FELIN DANS UNE POPULATION DE CHATS SAINS : UTILISATION DE LA METHODE PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL AVEC SONDE TAQMAN®**

**RESUME :**

Après un rappel sur l'herpès virus félin (Feline Herpes Virus 1, FHV1) et ses méthodes d'identification, nous présentons une étude menée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse sur la prévalence du portage oculaire du virus dans une population de chats sains. Pour cela, nous avons prélevé 58 animaux cliniquement sains, soit 116 yeux, en effectuant des frottis conjonctivaux. Les échantillons ont été testés avec une méthode de PCR nichée et avec une nouvelle méthode de PCR : " la PCR quantitative avec sonde TaqMan® ". Cette technique ayant un seuil de détection plus bas que celui de la PCR nichée, nous avons contrôlé les échantillons trouvés positifs en PCR quantitative avec la PCR nichée. Nous proposons également une comparaison des deux techniques.

Sur les 58 animaux, on a trouvé 12 sujets positifs en PCR quantitative, et ce toujours sur un seul des deux yeux, soit 12 positifs sur les 116 échantillons. La méthode quantitative indique que la charge virale est faible et qu'il s'agit donc bien de portage latent. Notre estimation du taux de porteurs latent du FHV1 parmi ces 58 chats est ainsi de 20,7%. Aucun des échantillons analysé n'a été trouvé positif en PCR nichée. Au vu de ces résultats, la PCR quantitative semble bien plus sensible que la PCR nichée.

**MOTS CLES :** CHAT, ŒIL, FHV1, PORTEUR SAIN, PCR QUANTITATIVE

---

**ENGLISH TITLE :**

**STUDY OF OCULAR FELINE HERPES VIRUS WITHIN A POPULATION OF HEALTHY CATS, BY USE OF A QUANTITATIVE PCR METHOD : THE REAL-TIME PCR WITH TAQMAN® PROBE**

**ABSTRACT :**

The purpose of this study was to describe the Feline Herpes Virus 1 (FHV1) and its current diagnostic methods, and also to assess the percentage of FHV1 carriers within a population of healthy cats. Conjunctival swabs of 58 cats free of ocular disease were performed and were evaluated by a new PCR quantitative method : " the Real-Time PCR with TaqMan® probe ". The positive swabs found with quantitative PCR were also tested with nested PCR, therefore providing a comparison between both techniques.

FHV1 DNA was found in 12 cats out of 58 with the quantitative PCR. All the positive cats were positive with a low initial amount of virus, and only one of both eye was positive. Furthermore, none of these cats was positive with nested PCR. As a conclusion, this study shows that the prevalence of FHV1 healthy carriers is 20.7% as determined with a quantitative method of PCR, and it suggests that this method is more sensitive than nested PCR.

**KEY WORDS :** CAT, EYE, FHV1, HEALTHY CARRIERS, QUANTITATIVE PCR