

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	9
PREMIERE PARTIE : ÉTUDE GÉNÉRALE DE LA RAGE ET DE L'IMPLICATION DU CHIEEN VIVERRIN DANS LE CYCLE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE CETTE MALADIE.....	13
I. Généralités sur la rage	14
1. Répartition mondiale de la rage animale et importance en santé publique	14
2. Eléments de virologie concernant le virus de la rage.....	17
a. Classification.....	17
b. Structure du virus rabique	19
c. Cycle viral	22
3. Pathogénie de la rage chez les carnivores	26
a. Mode de transmission du virus.....	26
b. Etapas de l'infection et excrétion du virus	27
c. Signes cliniques.....	31
II. Rôle du Chien viverrin dans l'épidémiologie de la rage	38
1. Généralités sur le Chien viverrin.....	38
a. Systématique	38
b. Morphologie et anatomie	39
c. Mode de vie.....	41
2. Aire de répartition originelle et aire d'extension du chien viverrin	44
3. Rôle du chien viverrin dans l'épidémiologie de la rage selvatique.....	49
a. Etat des lieux des cas de rage chez le chien viverrin en Europe	49
b. Dissémination du virus rabique par le chien viverrin	51
c. Transmission inter-espèces	53
4. Rage expérimentale du chien viverrin.....	55
a. Sensibilité au virus rabique de cette espèce (virus de chien viverrin).....	55
b. Sensibilité au virus rabique d'origine vulpine.....	56
DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA PATHOGÉNIE DE LA RAGE CHEZ LE CHIEEN VIVERRIN ET DE SON EXCRÉTION SALIVAIRE	59
I. Données expérimentales antérieures	59

1.	Protocole CnV 2007	59
2.	Protocole CnV 2008	60
3.	Protocole CnV 1	61
4.	Protocole CnV 2	62
II.	Matériel et méthodes protocole CnV3.....	65
1.	Animaux	65
2.	Inoculation.....	66
3.	Suivi des animaux	67
4.	Traitement des prélèvements – Analyses	70
III.	Résultats	71
1.	Paramètres de l’infection chez les chiens viverrins inoculés par voie intramusculaire par une souche de virus rabique isolée chez le chien viverrin	71
a.	Mortalité en fonction de la dose de virus inoculé	71
α.	Létalité en fonction de la dilution du stock	71
β.	Délai de survenue de la mort en fonction de la dose inoculée	73
b.	Incubation et symptomatologie	74
c.	Excrétion salivaire du virus.....	77
d.	Sérologie.....	79
e.	Diffusion centrifuge du virus	80
f.	Bilan des inoculations	81
2.	Transmission du virus aux animaux contacts.....	81
a.	Mortalité des animaux contacts.....	81
b.	Durée maximale d’incubation et symptomatologie des animaux contacts	83
c.	Délai de mortalité des animaux contacts.....	86
d.	Excrétion salivaire.....	86
e.	Sérologie.....	88
f.	Diffusion centrifuge du virus	89
3.	Comparaison des paramètres de l’infection des chiens viverrins inoculés lors du protocole CnV3 et des animaux contacts	90
a.	Mortalité des chiens viverrins	90
b.	Durée de la phase clinique	90
c.	Excrétion salivaire du virus.....	91
d.	Sérologie.....	93
e.	Diffusion centrifuge du virus	94
IV.	Discussion.....	95

1. Sensibilité du chien viverrin au virus rabique isolé du chien viverrin	95
a. Infection expérimentale	95
b. Infection naturelle	96
2. Délai de mortalité et phase clinique	97
3. Excrétion salivaire du virus	99
4. Recherche du virus dans les organes	100
5. Réaction immunitaire humorale	101
CONCLUSION	103
BIBLIOGRAPHIE	105
ANNEXES	111

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

Figure 1 : Répartition mondiale de la rage (espèce RABV) chez les animaux sauvages et domestiques, de Janvier à Juin 2012 (<i>source</i> : OIE WAHID, 2013)	14
Figure 2 : Distribution mondiale des mammifères réservoirs et vecteurs de virus rabique	15
Figure 3 : Répartition des cas de rage dans la faune sauvage en Europe en 2012 (447 cas recensés) (<i>source</i> : [www.who-rabies-bulletin.org]).....	16
Figure 4 : Représentation schématique du virus rabique (<i>source</i> : ALBERTINI <i>et al.</i> , 2011)	21
Figure 5 : Représentation schématique du cycle viral du virus rabique (<i>source</i> : DECOSTER <i>et al.</i> [http://www.microbes-edu.org/]).....	22
Figure 6 : Aire d'origine et aire d'extension du chien viverrin (<i>source</i> : KAUALA, 1994).....	44
Figure 7 : Répartition des cas de rage chez les renards (carte de gauche, 5 789 cas) et chez les chiens viverrins (carte de droite, 1 503 cas) entre 2002 et 2012	49
Figure 8: Nombre d'animaux morts par rapport au nombre d'animaux inoculés en fonction de la dilution (données corrigées ne prenant pas en compte l'animal 5A)	72
Figure 9 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des délais de mortalité en fonction de la dilution de l'inoculum	73
Figure 10 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des durées d'incubation en fonction de la dilution de l'inoculum	75
Figure 11 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des durées de la phase clinique en fonction de la dilution.....	76
Figure 12 : Cinétique du titre neutralisant des animaux inoculés lors du protocole CnV3.....	79
Figure 13 : Durée moyenne des symptômes chez les chiens viverrins contacts en fonction des groupes (<i>N.B.</i> : « Total » correspond à l'ensemble des contacts des groupes 1 et 2)	85
Figure 14 : Cinétique de séroconversion des chiens viverrins contacts	88
Figure 15 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution de la durée de la phase clinique en fonction des animaux contacts et inoculés	91
Figure 16 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des durées entre le premier jour de détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition des symptômes en fonction du statut de l'animal (contact ou inoculé).....	92

Figure 17 : Cinétique du titre en anticorps antirabiques neutralisants des chiens viverrins contacts et inoculés ayant présenté une séroconversion.....	93
---	----

Photographies :

Photo 1 : Observation en microscopie électronique de virions rabiques (220 000 x). (source : THOULOZE et LAFON, 2000)	20
Photo 2 : Morphologie en « balle de fusil » du virus rabique. Coloration négative. (source : VERNON).....	20
Photo 3 : Neurone de bovin enragé. Observation d'un corps de Negri en microscopie optique (a) et en microscopie électronique (b) (source : DECOSTER <i>et al.</i> [http://www.microbes-edu.org/].....	25
Photo 4 : Chien viverrin. ANSES, station expérimentale d'Atton (crédits photo J. BARRAT)	39
Photo 5 : Masque facial du chien viverrin (crédits photo J. BARRAT)	40
Photo 6 : Inoculation du virus en intramusculaire dans le muscle temporal (crédits photo E. MARTIN).....	66
Photo 7 : Lecture du transpondeur d'un chien viverrin (crédits photo E. MARTIN)	68
Photo 8 : Mise en place d'une salivette® dans le cul-de-sac gingival gauche (crédits photo E. MARTIN).....	68
Photo 9 : Ecouvillon en fibres synthétiques (à gauche) et tube contenant la solution de lyse (à droite) pour le recueil de la salive pour les analyses par biologie moléculaire (crédits photo E. MARTIN).....	69
Photo 10 : Monovette® sérum de 7,5 ml pour les prélèvements de sang (crédits photo E. MARTIN).....	69

Tableaux :

Tableau 1: les 12 espèces de <i>Lyssavirus</i> , leur distribution géographique actuelle et les espèces animales touchées (<i>sources</i> : www.pasteur.fr, ICTV Master Species List 2012 v2, WHO Technical Report Series 2005).....	18
Tableau 2 : Résultats obtenus lors du protocole CnV 2008	61
Tableau 3 : Résultats obtenus lors du protocole CnV1	62
Tableau 4 : Résultats obtenus lors du protocole CnV2	63
Tableau 5 : Pourcentage de morts en fonction de la dilution de l'inoculum pour déterminer le titre du stock utilisé	64
Tableau 6 : Pourcentages de mortalité des animaux en fonction de la dilution de l'inoculum	71
Tableau 7 : Délais de mortalité moyens des chiens viverrins inoculés en fonction de la dilution de l'inoculum	73
Tableau 8 : Durée moyenne de la phase d'incubation en fonction de la dilution de l'inoculum.....	74
Tableau 9 : Durée moyenne de la phase clinique en fonction de la dilution.....	76
Tableau 10 : Pourcentage de résultats positifs sur les glandes salivaires en fonction de la dilution de l'inoculum.....	77
Tableau 11 : Animaux inoculés lors du protocole CnV3 ayant présenté au moins une culture cellulaire de salive positive avant de mourir.....	78
Tableau 12 : Moyennes des durées entre la première détection du génome viral dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme (biologie moléculaire, protocole CnV3).....	79
Tableau 13 : Recherche de virus rabique dans les reins et les poumons des animaux inoculés morts de rage (IF : immunofluorescence ; CELL : culture cellulaire).....	80
Tableau 14: Bilan de survie des animaux contacts du protocole CnV3. <i>N.B.</i> : les animaux notés comme « morts » dans le tableau sont tous morts de rage (diagnostic positif sur SNC).....	81
Tableau 15 : Pourcentages de mortalité et de survie des animaux contacts en fonction des groupes.	82
Tableau 16 : Nombre de jours entre la mort de l'animal inoculé et la mort de l'animal contact d'une même cage.....	83
Tableau 17 : Durée maximale d'incubation des chiens viverrins contacts.....	83
Tableau 18 : Durée des symptômes des chiens viverrins contacts en fonction des groupes....	84
Tableau 19 : Délais de mortalités supposés des chiens viverrins contacts.....	86

Tableau 20 : Chiens viverrins contacts ayant présenté un résultat positif de leur salive en culture cellulaire	86
Tableau 21 : Délai entre la première détection du génome viral dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme ou de la mort de l'animal (biologie moléculaire)	87
Tableau 22 : Nombre de résultats positifs lors de la recherche de virus rabique dans les reins et les poumons des animaux contacts morts (IF : immunofluorescence ; CELL : culture cellulaire)	89
Tableau 23: Comparaison du pourcentage de mortalité chez les animaux contacts et chez les animaux inoculés (avec retrait des animaux 5A et 5B)	90
Tableau 24 : Comparaison de la durée de la phase clinique chez les animaux contacts et chez les animaux inoculés	90
Tableau 25 : Comparaison des durées entre le premier jour de détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition de symptômes, chez les animaux contacts et les inoculés	92
Tableau 26: Titre maximal en anticorps antirabiques des animaux ayant présenté une séroconversion réelle au cours de l'étude	94
Tableau 27 : Comparaison du nombre de résultats positifs sur rein et poumon des animaux contacts et inoculés (IF : Immunofluorescence, CELL : culture cellulaire)	94

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius

aa : Acides aminés

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ADN : Acide désoxyribonucléique

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

cf. : Confère

cm : Centimètre

DE50 : Dilution efficace 50%

DL₅₀ ICS : Dose létale 50 intracérébrale souris

DL₁₀₀ : Dose létale 100

g (centrifugation) : Force centrifuge relative. $g = (RPM \times 0,10472 \times \text{rayon du rotor en cm})/980$

GS : Glandes salivaires

ha : Hectare

IF : Immunofluorescence

IM : Intramusculaire

j : Jours

kDa : Kilodalton

kg : Kilogramme

km : Kilomètre

log : Logarithme décimal

ml : Millilitre

n : Nombre

N.B. : *Nota bene*

nm : Nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais)

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par polymérase)

RABV : Virus de la rage

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

RPM : Rotation Par Minute (vitesse du rotor exprimée en nombre de tours par minute)

RNP : Ribonucléoprotéine

SNC : Système nerveux central

UI : Unité internationale

vs : *Versus*

VSV : Vesicular Stomatitis Virus

WHO : World Health Organisation (OMS en français)

N.B. : dans cet écrit, le terme « **vecteur** » est employé au sens que le définit l'OMS : « vecteur » s'entend d'un insecte ou de tout animal qui véhicule normalement un agent infectieux constituant un risque pour la santé publique (OMS 2005).

INTRODUCTION

Le chien viverrin est un canidé originaire de l'Est de l'Asie, qui a été introduit dans la partie Ouest de l'ex-URSS entre les années 1930 et 1950. Depuis cette introduction, la taille de son nouveau territoire européen ainsi que la taille des populations de cette espèce invasive ne cessent d'augmenter. Il a été démontré que le chien viverrin est un vecteur du virus rabique dans son aire d'origine.

La rage est un sujet qui a déjà été beaucoup étudié, dans de nombreuses espèces et plus particulièrement chez le renard et le chien. Néanmoins, la pathogénie de la rage du chien viverrin infecté par un virus rabique de chien viverrin est encore mal connue. Or, le chien viverrin est une espèce vectrice et réservoir de la rage reconnue en Europe (notamment dans les pays baltes et en Pologne). Il est donc important d'étudier cette pathogénie chez cette espèce pour pouvoir mieux lutter contre cette maladie mortelle et son expansion possible.

C'est pourquoi, le laboratoire de la Rage et de la Faune sauvage de l'Anses de Nancy a établi une série de protocoles dont le but est d'étudier la pathogénie de l'infection chez le chien viverrin (vecteur et réservoir de la rage) induite par un isolat de virus rabique isolé chez le chien viverrin en Pologne. J'ai ainsi pu participer au dernier protocole de ce projet dont le but était de suivre l'excrétion salivaire lors de contaminations avec des doses "naturelles" en inoculant un animal avec quelques DL_{100} et en le suivant ainsi que l'animal contact qui partage sa cage.

Dans une première partie, nous aborderons les connaissances relatives à la rage et au chien viverrin en nous intéressant plus précisément à l'écologie de cette espèce en Europe et à son importance en tant que vecteur du virus rabique. Dans une seconde partie, nous présenterons l'étude expérimentale réalisée au laboratoire de la Rage et de la Faune Sauvage de Nancy, dans le but de connaître la physiopathologie de la rage du chien viverrin et l'excrétion salivaire du virus chez cette espèce

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE GÉNÉRALE DE LA RAGE ET DE L'IMPLICATION DU CHIEN VIVERRIN DANS LE CYCLE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE CETTE MALADIE

Introduction et historique :

Les effets de la rage étaient probablement déjà bien connus des égyptiens et de toute l'Antiquité, notamment chez les chiens des bergers et bon nombre des grands écrivains de cette époque, tels Virgile ou Ovide, la citent dans leurs écrits. Mais leurs connaissances se limitaient alors aux effets de la rage et à son caractère incurable et non à son origine. Ainsi pensaient-ils que la rage était un phénomène d'origine surnaturelle tant sa pathogénie était mystérieuse et sa symptomatologie épouvantable. C'est avec Hippocrate que cette hypothèse d'origine divine de la rage sera rejetée. Deux observations essentielles sont néanmoins notées au cours de l'Antiquité : les atteintes nerveuses engendrées par la rage chez l'Homme avec Démocrite qui parle « d'incendie des nerfs » et l'hydrophobie avec Polybe, qui nomma la rage d'un mot grec signifiant « fuit l'eau ».

Entre les descriptions cliniques des auteurs de l'Antiquité et le XIXème siècle, avec Pasteur, les connaissances sur la rage évoluèrent peu, à part en matière de contagion durant la Renaissance (Fracastor). Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur que la recherche sur la pathogénie et la prévention de la rage fera un bond en avant, avec l'élaboration d'un vaccin pour l'animal en 1884, puis pour l'homme en 1885 (MOREAU, 1985).

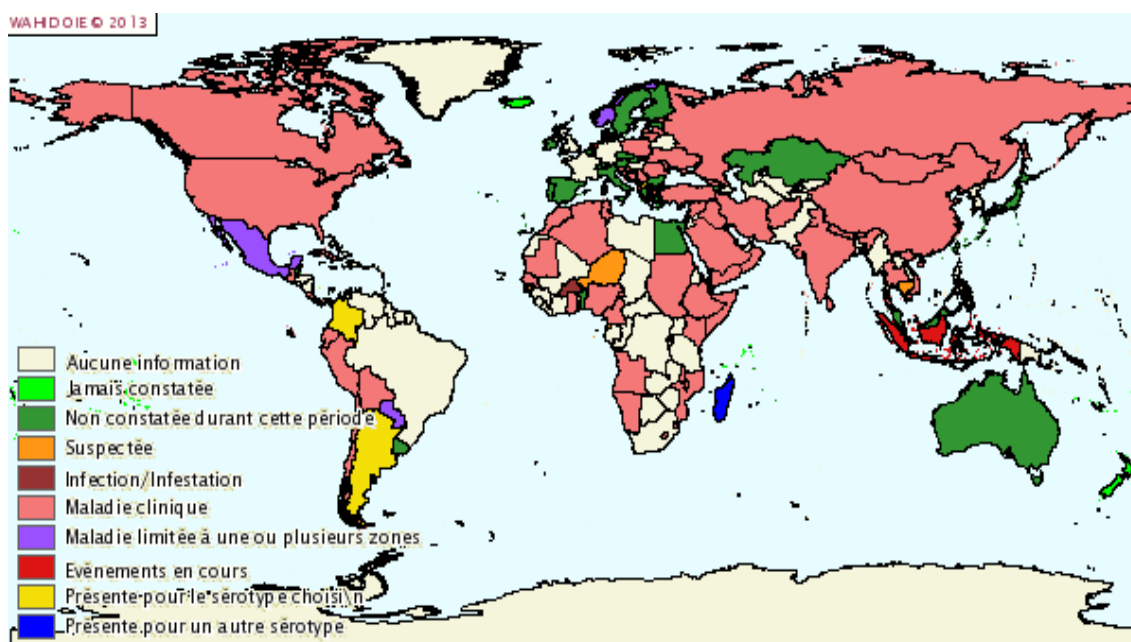
Bien que la Rage soit une maladie connue depuis longtemps, elle n'en reste pas moins d'actualité, causant toujours un nombre très élevé de décès chez l'homme dans de nombreuses régions du monde en particulier en Afrique et en Asie et des pertes économiques dans les cheptels, notamment en Amérique Latine où les bovins sont exposés à la transmission du virus RABV par des chauves-souris hématophages.

I. Généralités sur la rage

1. Répartition mondiale de la rage animale et importance en santé publique

La Rage est une maladie virale présente sur tous les continents, à l'exception de l'Antarctique. Elle touche actuellement plus de 150 pays et territoires (*Figure 1*). C'est une zoonose mortelle et cette encéphalite virale tue chaque année plus de 55 000 personnes (cas déclarés) dans le monde, principalement en Asie et en Afrique (ces 2 continents recensent 95% des cas humains mondiaux). La rage est une maladie négligée qui touche souvent des populations pauvres et vulnérables dont les décès sont rarement notifiés, ce qui entraîne une forte sous-estimation du nombre réel de victimes et rend la lutte antirabique plus difficile (WHO, 2013).

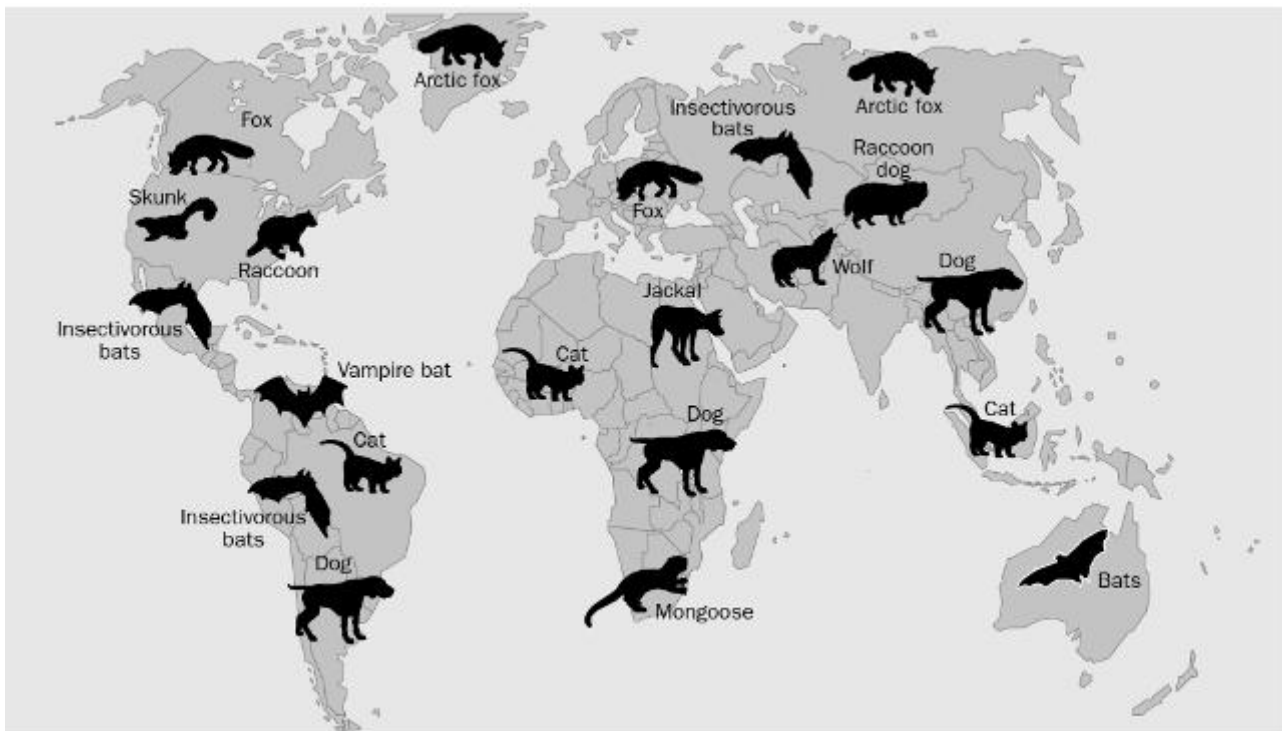
Figure 1 : Répartition mondiale de la rage (espèce RABV) chez les animaux sauvages et domestiques, de Janvier à Juin 2012 (*source* : OIE WAHID, 2013)



Le virus de la rage peut infecter toutes les espèces de mammifères et on peut identifier différents variants au sein de l'espèce RABV, chacun étant étroitement adapté à un vecteur/hôte particulier. Ainsi, dans l'espèce RABV, chez les animaux domestiques, le chien, *Canis lupus familiaris*, est l'hôte principal (HOLMALA et KAUALA, 2006). Il est le réservoir et vecteur principal du virus rabique, causant la majorité des cas humains. Dans la faune sauvage, les principaux réservoirs sont, pour les canidés, les différentes espèces de

renards, les coyotes, les chacals, et les chiens viverrins (cf. Figure 2). Les loups sont également vecteurs de virus rabique pour l'Homme et les animaux mais, du fait de leur faible nombre, ne peuvent pas être considérés comme un réel réservoir. Les mangoustes, rats laveurs et mouffettes sont également susceptibles d'être vecteurs du virus. Enfin, les rongeurs et les lagomorphes sont de bons modèles de laboratoire pour étudier la rage mais ils ne semblent pas jouer un rôle dans l'épidémiologie de la maladie, tout comme les mammifères herbivores. Pour finir, les oiseaux peuvent être infectés expérimentalement, mais aucun cas de rage naturelle n'a jamais été documenté chez ces espèces (RUPPRECHT *et al.*, 2002).

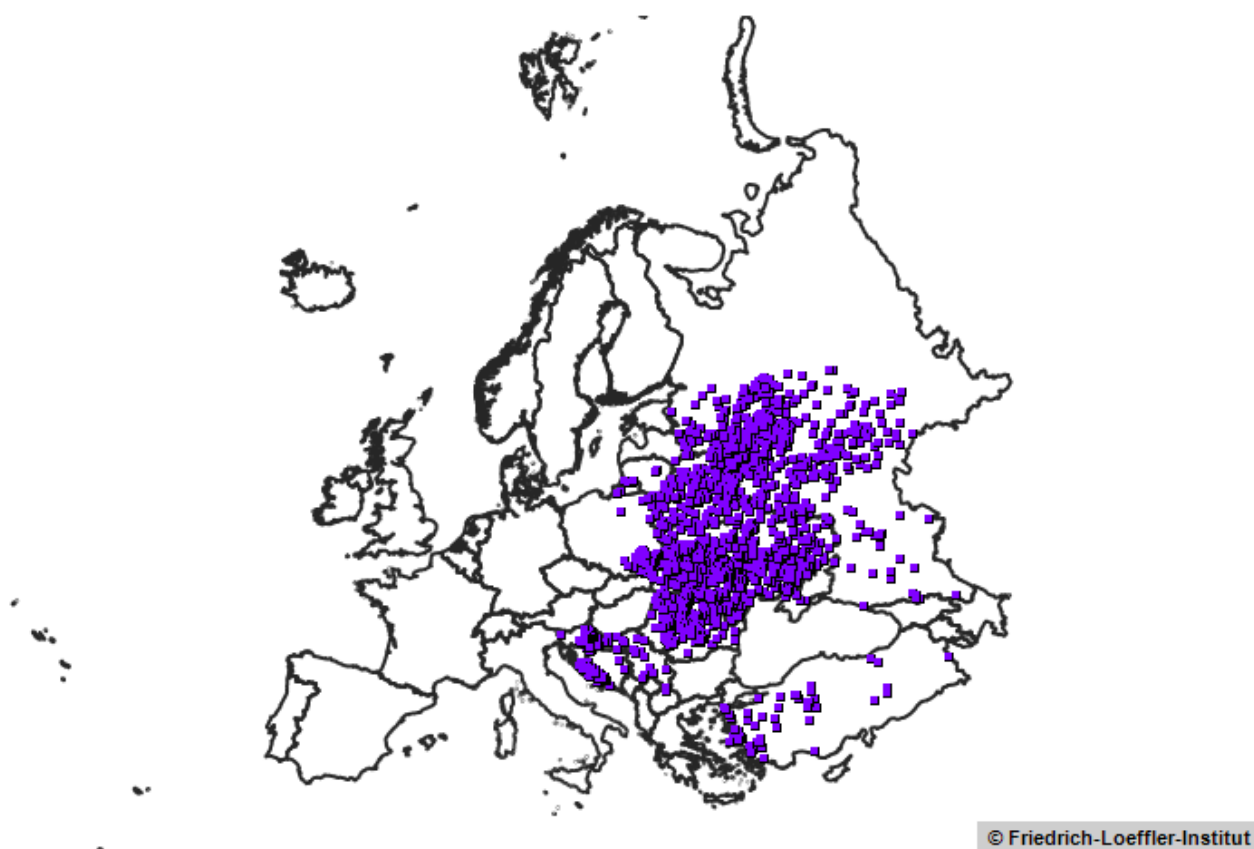
Figure 2 : Distribution mondiale des mammifères réservoirs et vecteurs de virus rabique
(source : Rupprecht *et al.*, 2002)



La rage sylvatique terrestre a été éradiquée de nombreux pays de l'Europe Occidentale grâce à des campagnes de vaccination orale (HOLMALA et KAUALA, 2006). Néanmoins, cette maladie reste au premier rang des zoonoses mortelles en nombre de cas dans plusieurs pays d'Afrique et d'Asie ([www.oie.int] 2013). Même dans les zones où la rage terrestre est éradiquée, il ne faut pas en négliger la surveillance, notamment du fait des changements continus au sein des populations animales et du risque d'introduction. En effet, certaines migrations ou introductions d'espèces nouvelles peuvent permettre la réintroduction du virus

dans des zones auparavant indemnes. Tel pourrait être le cas du Chien viverrin qui a colonisé l'Europe de l'Est au cours des 50 dernières années et qui occupe une part de plus en plus importante dans le nombre de cas de rage dans la faune sauvage en Europe orientale. Les cas de rage recensés dans la faune sauvage en Europe en 2012 sont représentés sur la *Figure 3*.

Figure 3 : Répartition des cas de rage dans la faune sauvage en Europe en 2012 (447 cas recensés) (*source* : [www.who-rabies-bulletin.org])



2. Eléments de virologie concernant le virus de la rage

a. Classification

Le virus de la rage appartient à l'ordre des *Mononegavirales*, à la famille des *Rhabdoviridae* (du grec «Rhabdos» : baguette, faisant allusion à la forme en bâtonnet de ces virus) et au genre *Lyssavirus* (du grec «lyssa» : folie, rage, en raison des symptômes qu'entraîne cette maladie) (CHANTAL et BLANCOU, 1985).

Tous les rhabdovirus ont une apparence soit bacilliforme (particule cylindrique aux extrémités coniques), soit en balle de fusil (une extrémité ronde et l'autre plane ou concave). La plupart des rhabdovirus végétaux sont connus comme bacilliformes alors que la forme en balle de fusil domine parmi les rhabdovirus animaux (IWASAKI, 1985).

Le virus rabique possède un génome à ARN négatif simple brin non segmenté. L'ensemble des virus possédant un tel génome forme l'ordre des *Mononegavirales*, comprenant 4 familles : *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bornaviridae* et *Rhabdoviridae*. Les *Rhabdoviridae* infectent de très nombreux hôtes, allant des insectes aux poissons et aux mammifères. Cette famille est divisée en 4 genres principaux : *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* et *Novirhabdovirus* (RUPPRECHT *et al.*, 2002). L'espèce type du genre *Vesiculovirus* est le *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV). Le VSV est le virus à ARN négatif le plus étudié et sert ainsi de modèle aux *Rhabdoviridae*. En dépit du fait que le virus rabique est souvent comparé au VSV, d'importantes différences permettent de les différencier. La première différence se situe au niveau de leur tropisme, le virus rabique étant bien plus neurotrope que le VSV. Une autre différence concerne les réponses à l'infection virale *in vitro* : le VSV induit une réelle inhibition des synthèses au sein des cellules macrophagiques alors que le virus rabique montre un faible effet inhibiteur ou une absence d'effet inhibiteur. De plus, le cycle de réplication du virus rabique est beaucoup plus lent que celui du VSV (TORDO et POCH, 1988).

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques du gène de la nucléoprotéine permet de distinguer au sein du genre *Lyssavirus* 12 espèces différentes, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant (*Tableau 1*).

Tableau 1: les 12 espèces de *Lyssavirus*, leur distribution géographique actuelle et les espèces animales touchées (*sources* : www.pasteur.fr, ICTV Master Species List 2012 v2, WHO Technical Report Series 2005)

Espèce	Distribution	Espèces animales
1. Virus de la rage (RABV)	Le monde entier sauf Océanie, Japon, Antarctique, Europe Occidentale	Hommes, carnivores domestiques et sauvages, chauves-souris insectivores et hémato-phages
2. Virus Lagos bat (LBV)	Nigéria, République Centrafricaine, Afrique du Sud, Egypte, Zimbabwe, Guinée, Sénégal, Ethiopie	Chauves-souris frugivores, chats, chiens
3. Virus Duvenhage (DUVV)	Afrique du Sud, Zimbabwe	Hommes, chauves-souris insectivores
4. <i>Lyssavirus</i> de chauves-souris européennes de type 1 (EBLV-1)	Europe	Hommes, chauves-souris insectivores, fouines, chats, moutons
5. <i>Lyssavirus</i> de chauves-souris européennes de type 2 (EBLV-2)	Suisse, Pays-Bas, Royaume-Uni	Hommes, chauves-souris insectivores
6. <i>Lyssavirus</i> de chauves-souris australiennes (ABLV)	Australie	Hommes, chauves-souris insectivores et frugivores
7. Virus Aravan (ARAV)	Asie centrale	Chauves-souris insectivores
8. Virus Irkut (IRKV)	Est de la Sibérie	Chauves-souris insectivores
9. Virus Khujand (KHUV)	Asie centrale	Chauves-souris insectivores

Espèce	Distribution	Espèces animales
10. Virus de chauve-souris de l'Ouest du Caucase (WCBV)	Région du Caucase	Chauves-souris insectivores
11. Shimoni bat virus	Kenya	Chauves-souris insectivores (<i>Hipposideros commersoni</i>)

Les *Lyssavirus* sont assez fragiles et ne persistent pas dans l'environnement. Leur transmission ne peut donc se faire que par contact direct (RUPPRECHT *et al.*, 2002).

b. Structure du virus rabique

Morphologie du virion :

Les premières visualisations du virus rabique, en microscopie électronique, ont eu lieu dans les années 1950, lors de l'examen des corps de Negri observés dans le cerveau d'animaux infectés. La technique de microscopie électronique à section fine, en 1962, a permis à Roots et Matsumoto de rapporter la première observation du virus dans la corne d'Ammon d'un cerveau de souris. Un an plus tard, l'adaptation du virus à des cultures cellulaires variées a augmenté son taux de multiplication, permettant sa purification et menant à la première description de ses aspects morphologiques. Depuis, d'autres études ont permis de définir précisément la morphologie du virus (TORDO et POCH, 1988).

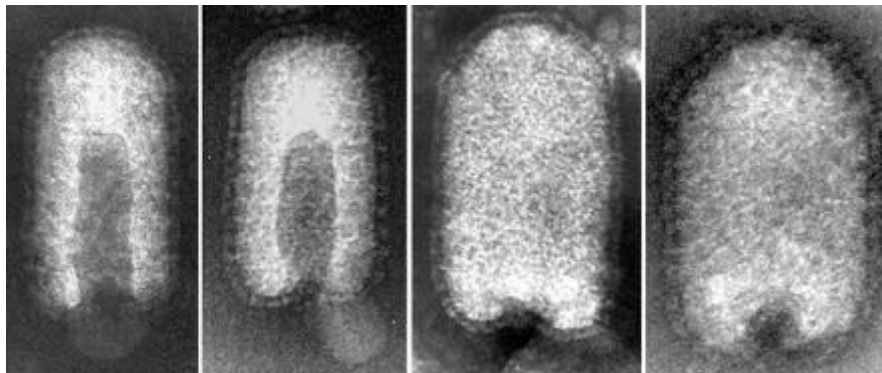
Le virus rabique présente une forme générale allongée, cylindro-conique, rappelant celle d'un obus avec une extrémité conique et une autre plane (*cf. Photo 1 et Photo 2*). Le diamètre de la particule virale est relativement constant et mesure 75 nm. La longueur est quant à elle plus variable, allant de 100 à 300 nm selon la souche du virus et l'état défectif ou non des particules.

La morphologie des particules virales a surtout été décrite d'après les images de préparation en coloration négative, de virions produits en culture cellulaire (IWASAKI, 1985).

Photo 1 : Observation en microscopie électronique de virions rabiques (220 000 x). (source : THOULOZE et LAFON, 2000)



Photo 2 : Morphologie en « balle de fusil » du virus rabique. Coloration négative. (source : VERNON)



Structure du virion :

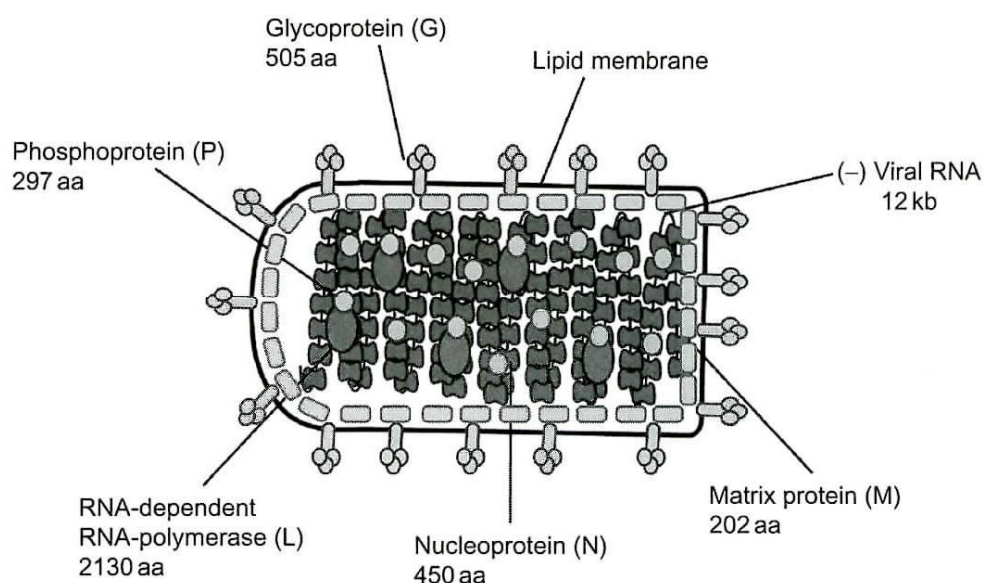
La coloration négative révèle l'agencement de la particule et permet de distinguer :

- Une nucléocapside centrale, formée d'un filament enroulé en spirale de révolution droite (74Å de périodicité, 150Å et 100Å de diamètre externe et interne), d'une longueur pouvant atteindre 4 nm après déroulement. Il est constitué d'un axe nucléique protégé par des sous-unités protéiques de 25 à 40 Å, en disposition périphérique hélicoïdale ;
- Une enveloppe à double paroi, s'invaginant par l'extrémité plate dans l'axe de la particule, sur la moitié ou les trois-quarts de la longueur. Sa face externe présente une structure en « nid d'abeilles » correspondant à une disposition symétrique de couches sous-jacentes. Elle est aussi le lieu d'émergence de protubérances boutonnées ou « spicules » (6 à 8 nm) donnant à la surface de la particule un aspect régulièrement strié. Ces striations apparaissent espacées de 4,5 à 5 nm (CHANTAL et BLANCOU, 1985 ; IWASAKI, 1985).

Le fractionnement et l'analyse par électrophorèse des protéines permettent de distinguer les 5 constituants essentiels du virion (cf. Figure 4) :

- La **glycoprotéine G** (PM=80 kDa) (505 aa), protéine transmembranaire qui constitue les spicules hérissant l'enveloppe virale. Elle intervient dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte et dans le bourgeonnement des nouveaux virions. Elle est responsable de l'induction et de la liaison aux anticorps neutralisants ainsi que de la stimulation des cellules T, deux propriétés menant à l'établissement de la réponse immune humorale et cellulaire contre l'infection virale *in vivo* ;
- La **nucléoprotéine N** (PM=62 kDa) (450 aa), constituant structural majeur, est associée à la nucléocapside. Elle est fortement liée à l'ARN viral. Chaque protomère de N se lie à 9 nucléotides, formant une nucléocapside hélicoïdale ;
- La **phosphoprotéine P** (297 aa) est liée à la nucléocapside. Son implication dans la multiplication virale a été démontrée par blocage par des anticorps monoclonaux ;
- La **longue protéine L** (PM=160 kDa) (2130 aa), liée à la nucléocapside, est le composant enzymatique du complexe L-P polymérase. Cette protéine géante possède la majorité des activités enzymatiques nécessaires à la transcription et à la réplication du génome ;
- La **protéine de la matrice M** (20-25 kDa) (202 aa), localisée en dessous de la membrane virale et qui relie la nucléocapside et la double couche lipidique. Composant structural important du virion, elle joue un rôle dans la condensation de la ribonucléoprotéine (ALBERTINI *et al.*, 2011 ; TORDO et POCH, 1988).

Figure 4 : Représentation schématique du virus rabique (*source* : ALBERTINI *et al.*, 2011)



Aspects quantitatifs :

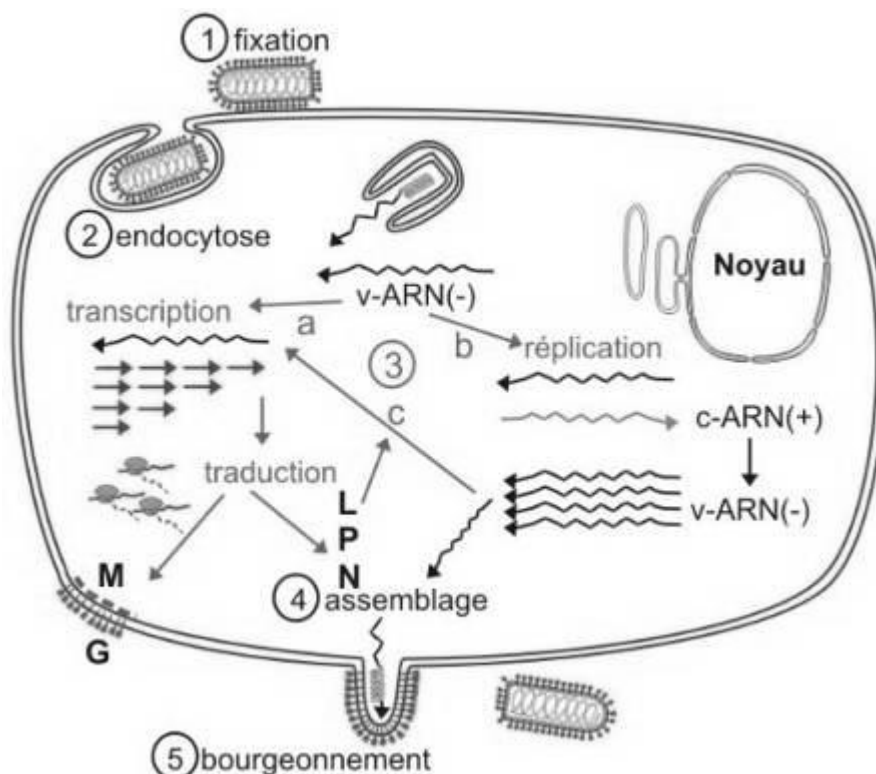
Chaque virion contient une seule molécule d'ARN génomique. Le nombre de copies de chaque protéine virale dans le virion a été analysé : 1800 N, 950 P, 1500 M, 1800 G et 60 L.

Le génome à ARN :

Le génome rabique est une molécule d'ARN non segmenté simple brin, dont le poids moléculaire a été pour la première fois estimé par Sokol *et al.* à $4,6 \cdot 10^6$ daltons. Le séquençage complet des 11932 nucléotides a déjà été réalisé et a montré que le génome code pour les 5 protéines virales dans l'ordre suivant : 3'-N-P-M-G-L-5' (ALBERTINI *et al.*, 2011). L'ARN génomique a une polarité négative, indiquant qu'il est incapable d'être infectant seul. C'est pourquoi, immédiatement après la pénétration dans la cellule, il doit être transcrit en un brin complémentaire positif, capable de produire les protéines virales. Cette étape obligatoire de transcription est assurée par une enzyme codée par le génome, l'ARN polymérase, ARN dépendante (protéine L), que le virion apporte avec lui dans la cellule infectée (TORDO et POCH, 1988).

c. Cycle viral

Figure 5 : Représentation schématique du cycle viral du virus rabique (*source* : DECOSTER *et al.* [<http://www.microbes-edu.org/>])



Cycle viral (cf. Figure 5):

Le cycle du virus rabique est intra-cytoplasmique. Les *Lyssavirus* peuvent utiliser différents composants de la surface des cellules pour pénétrer dans la cellule hôte, incluant les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, les récepteurs au facteur de croissance des nerfs à faible affinité et des gangliosides (RUPPRECHT *et al.*, 2002). Après liaison avec le récepteur de la cellule cible, le virus entre dans la cellule par endocytose. L'environnement acide de l'endosome provoque une modification de la conformation de la protéine G du virus, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire. La ribonucléoprotéine (composant actif de la transcription et de la réplication) est alors libérée dans le cytoplasme et constitue le brin matrice pour l'expression des gènes viraux et la réplication virale par l'ARN polymérase (complexe polymérase L-P). La transcription et la réplication virales ont lieu dans les corps de Negri qui sont des corps d'inclusion formés durant l'infection virale. Lors de la transcription, un ARN positif et 5 ARN messagers coiffés et polyadénylés sont synthétisés. La réplication produit des nucléocapsides contenant un ARN complet négatif qui servira à produire un ARN positif. Lors de la synthèse, le génome et l'anti-génome créés sont encapsidés par la protéine N. La ribonucléoprotéine néo-synthétisée sert de matrice pour une transcription secondaire ou est transportée vers la membrane cellulaire pour un assemblage avec les protéines M et G afin de produire de nouveaux virions. Ce cycle de réplication virale se fait en 18 heures pour le virus de la rage, RABV.

Transcription et réplication:

Elles sont assez similaires à celles des autres virus à ARN négatif. La matrice pour la transcription et la réplication virales est un complexe hélicoïdal comprenant l'ARN et la nucléoprotéine N. L'ARN viral est donc protégé et caché dans cette structure hélicoïdale.

-Transcription : La façon dont le complexe polymérase a accès à l'ARN est encore peu comprise. Ce complexe est supposé reconnaître un promoteur spécifique à l'extrémité 3' du génome et progresse vers l'extrémité 5' par un mécanisme de « stop and start », produisant 6 transcrits consécutifs : l'ARN leader puis les 5 ARNm codant pour les protéines N, P, M, G et L. Contrairement aux ARNm, l'ARN leader n'est ni coiffé ni polyadénylé par la polymérase. Pour contrôler la progression séquentielle de la synthèse des ARNm, la polymérase reconnaît des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription et de polyadénylation flanquant les cistrons. Le complexe se dissocie de la matrice à tout codon « stop » et se ré-initie au signal « start » suivant. Le processus se poursuit jusqu'à ce que l'enzyme atteigne la fin du gène L et aboutit en un gradient de concentration de chaque ARNm dépendant de la distance qui le sépare de l'extrémité 3' : ARN leader>N>P>M>G>L.

C'est seulement après la traduction des messagers monocistroniques en protéines rabiques que l'étape de réplication peut débuter.

-Réplication : A l'inverse de la transcription, la réplication nécessite une synthèse protéique continue pour procurer une source de protéine soluble N permettant l'encapsidation de l'ARN créé. L'activité de la polymérase passe de l'activité transcription à l'activité réplication pour produire un ARN positif simple brin. Cet ARN positif est encapsidé par N et est utilisé comme matrice pour faire produire l'ARN négatif par le complexe L-P. La présence d'un promoteur vers l'extrémité 5' est supposée initier l'encapsidation des ARN naissants. Les nouvelles protéines N se lient à l'ARN naissant, prévenant la reconnaissance des signaux de fin. Cette association des protéines N au génome viral ou à l'anti-génome est régulée par la phosphoprotéine P, qui joue le rôle de chaperonne en formant un complexe N-P, inhibant la liaison de N à l'ARN cellulaire et l'agrégation. La réplication est asymétrique, produisant un excès de génome de l'ordre de 50 fois par rapport à l'anti-génome pour le virus rabique.

Régulation de la synthèse de l'ARN viral et de l'expression génique :

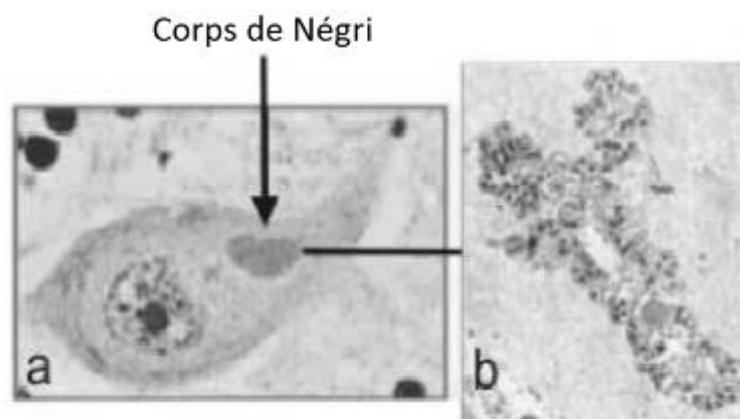
Une régulation adéquate de l'expression des gènes viraux est nécessaire au succès de l'infection rabique. L'expression du gène rabique et la réplication du génome diffèrent de celles du VSV par certains aspects. Alors que le VSV, très cytopathique, se réplique très vite, le virus rabique régule l'expression de ses gènes pour produire des virions à des taux suffisants pour répandre l'infection, mais restant assez faibles pour maintenir la cellule vivante et échapper ainsi aux réponses antivirales de l'hôte. Le virus rabique a ainsi subi une évolution des différents mécanismes pour réguler l'expression de ses gènes.

Aspects cellulaires de la transcription et de la réplication rabiques :

L'infection rabique induit la formation de corps d'inclusion dits Corps de Negri (*cf. Photo 3 ci-dessous*). Ces structures étant quasi-spécifiques de l'infection du cerveau par le virus rabique, elles ont donc un intérêt diagnostique d'un point de vue de l'histologie. Ces structures arrondies de 2 à 10 µm de diamètre sont retrouvées dans le cytoplasme des cellules nerveuses infectées ainsi que dans certaines cellules non nerveuses. Ces inclusions acidophiles sont colorables avec le colorant de Mann (bleu de méthyle/éosine) ou le colorant de Sellers (bleu de méthyle/fuchsine basique). Ces corps de Negri renferment une grande quantité de nucléoprotéine N et de phosphoprotéine P. Ils contiennent aussi de la protéine L mais pas les protéines G et M. Des observations au microscope électronique montrent que les

corps de Negri s'associent progressivement à une double membrane issue du réticulum endoplasmique granuleux. Les corps de Negri ont pendant longtemps été considérés comme un lieu de stockage passif des protéines produites en excès lors de l'infection. Il est maintenant prouvé que ces structures sont des structures fonctionnelles où la réplication et la transcription prennent place. Des marquages par immunofluorescence *in situ* ont montré la présence d'ARNm, du génome et de l'anti-génome dans les corps de Negri. Les ARN viraux synthétisés apparaissent entourés de protéines N qui les protègent de la dégradation. Jusqu'à maintenant, la signification de la compartimentation de la machinerie de réplication du virus dans les corps de Negri n'est pas élucidée. On ne sait pas si elle sert à concentrer les différents éléments viraux et de l'hôte dans un seul site pour faciliter la transcription et la réplication, à l'abri des protéines potentiellement inhibitrices de l'infection ou si, au contraire, c'est une réponse cellulaire à l'infection. Il est intéressant de noter que ce confinement cellulaire avec recrutement de facteurs cellulaires peut expliquer l'échec de la réalisation *in vitro* de la transcription avec des ribonucléoprotéines purifiées issues de cellules infectées par le virus rabique (ALBERTINI *et al.*, 2011 ; TORDO et POCH, 1988).

Photo 3 : Neurone de bovin enragé. Observation d'un corps de Negri en microscopie optique (a) et en microscopie électronique (b) (*source* : DECOSTER *et al.* [<http://www.microbes-edu.org/>])



Assemblage des protéines et bourgeonnement des nouveaux virions :

Des études ont mis en évidence l'importance majeure de la protéine matrice M dans l'assemblage et le bourgeonnement des nouveaux virions alors que la glycoprotéine G semble plutôt avoir un rôle secondaire.

La protéine N interagit avec l'ARN génomique nouvellement synthétisé pour former la nucléocapside. La polymérisation de la protéine N sur le squelette de l'ARN est facilitée par la libération de protéines N par les dimères N-P dans le cytoplasme. La protéine M est également capable de reconnaître et d'interagir avec les structures RNP nouvellement formées dans le cytoplasme. Simultanément à la formation des RNP, la glycoprotéine G s'ancre dans la membrane plasmique, site de formation des virions et de leur bourgeonnement. La protéine M s'accumule au niveau des micro-domaines de la membrane plasmique riches en glycoprotéines G. A ce même moment, les RNP se condensent en structure spiralées en interagissant avec la protéine M (OKUMURA et HARTY, 2011).

3. Pathogénie de la rage chez les carnivores

a. Mode de transmission du virus

Le virus rabique doit nécessairement entrer par effraction dans l'organisme pour le contaminer, la transmission naturelle de la rage se faisant essentiellement par morsure, ou à travers des lésions de la peau, et exceptionnellement par la voie aérienne (cas de spéléologues contaminés dans des grottes par des aérosols virulents produits par des chauves-souris atteintes de rage, voie d'inoculation confirmée par la suite expérimentalement). Des cas de contamination par greffe d'organes et de cornée provenant de personnes n'ayant pas présenté de signes cliniques de rage ont été également rapportés dans différents pays (TSIANG, 1985). En 2004 au Texas, quatre receveurs d'organes (deux reins, un foie et un segment d'artère iliaque) provenant d'un donneur commun sont morts d'encéphalite moins de 30 jours après leur transplantation respective. Des recherches (analyses sérologiques, cultures cellulaires et inoculation à des souris) ont permis de diagnostiquer la présence du virus rabique chez les 4 receveurs. *A posteriori*, l'entourage du donneur a rapporté que celui-ci s'était fait mordre par une chauve-souris quelque temps avant son décès par hémorragie subarachnoïde (SRINIVASAN *et al.*, 2005). De même, toujours aux Etats-Unis, en février 2013, un patient ayant reçu une greffe d'un rein est décédé de rage, 18 mois après sa transplantation alors qu'il n'avait jamais été exposé à des animaux suspects de rage. Le virus rabique a par la suite été

mis en évidence dans d'autres organes du donneur et notamment dans son système nerveux central. Le séquençage de l'ARN du virus extrait des tissus du donneur a permis une comparaison phylogénétique du virus : le gène codant pour la protéine N du virus du donneur était à 99,9% identique à celui du virus de raton-laveur. *A posteriori*, les symptômes présentés par le donneur peu de temps avant sa mort cérébrale sont apparus comme concordant avec une encéphalite causée par le virus rabique (vomissements, paresthésie des membres supérieurs, puis fièvre, dysphagie et dysfonctionnement du système nerveux autonome ayant conduit à la mort). Ce cas est donc semblable au cas rapporté précédemment, bien que la durée d'incubation soit beaucoup plus longue qu'en 2004 (18 mois vs moins de 30 jours) (VORA *et al.*, 2013)

La morsure est donc le mode de transmission principal du virus (RUPPERCHT *et al.*, 2002). Cependant, il faut également prendre en compte le léchage (notamment celui d'une muqueuse) ainsi que le simple contact avec une peau ou une muqueuse présentant des érosions ou excoriations même mineures.

b. Etapes de l'infection et excrétion du virus

-Multiplication locale du virus : Le virus rabique peut se multiplier localement dans les cellules musculaires au point d'inoculation, avant de migrer vers le système nerveux central (SNC) qui est son site privilégié de multiplication. La présence du virus peut être détectée pendant 2 à 3 jours au point d'inoculation périphérique. Par la suite, la présence de particules virales infectieuses n'est plus mise en évidence localement.

-Pénétration dans le système nerveux périphérique : La phase neurotrope de l'infection rabique commence quand les particules virales sont internalisées, vraisemblablement au niveau des terminaisons nerveuses du système nerveux périphérique. L'implication des terminaisons sensorielles ou motrices dans la dissémination complète du virus n'est pas bien déterminée. Ainsi que cela a été indiqué plus haut (cf. cycle viral p.24), le récepteur nicotinique de l'acétylcholine joue le rôle de co-récepteur pour le virus rabique.

-Migration centripète du virus rabique : Contrairement à la plupart des infections virales, la dissémination du virus vers le SNC se fait sans intervention d'une phase virémique infectante. De nombreuses expériences ont permis de montrer que le virus migre du point d'inoculation périphérique vers le SNC à travers le flux axoplasmique rétrograde passif. Cependant, on ne sait pas sous quelle forme moléculaire le virus est transporté dans le système nerveux périphérique. Au cours de la dissémination du virus vers le SNC, certains ganglions nerveux

et la moelle épinière sont fortement infectés. Le mécanisme de passage du virus d'un neurone à un autre (passage trans-synaptique) n'est pas élucidé.

-Infection du système nerveux central : Pasteur et ses collaborateurs en 1881 ont été les premiers à montrer le rôle du SNC dans l'infection rabique : « le système nerveux central, et spécialement le bulbe qui lie la moelle épinière au cerveau, sont particulièrement concernés et actifs dans le développement de la maladie ». A ce jour, le problème du transport du virus rabique dans le SNC n'a pas encore été résolu. Parmi les hypothèses pour expliquer la diffusion du virus dans le SNC, l'intervention du liquide céphalo-rachidien comme véhicule des particules virales a été évoquée. Mais il est plus généralement admis que le virus rabique bourgeonne à partir de la membrane plasmique des cellules infectées et qu'une fois libéré dans l'espace extracellulaire, il réinfecterait d'autres cellules. Il est vraisemblable que le virus emprunte des voies nerveuses spécifiques pour la dissémination au cours des phases précoces d'envahissement du SNC. Les neurones du SNC sont les cellules cibles pour la multiplication du virus rabique. Les neurones infectés sont identifiables par la présence de corps de Negri présents exclusivement dans le cytoplasme.

Mais il a également été démontré, plus récemment, que le sang pouvait constituer une voie d'introduction alternative du virus rabique dans le système nerveux central. Cette entrée du virus dans le SNC par voie sanguine est confirmée par les cas de rage humaine déclarés suite à des greffes d'organes provenant d'une personne infectée. En effet, dans ces cas de greffe, l'organe transplanté est dépourvu d'innervation pendant plusieurs mois. Le virus emprunte alors certainement la voie hématogène pour accéder au SNC (MAIER *et al.*, 2010).

-Migration centrifuge du virus : Après multiplication dans le SNC, le virus va migrer de façon centrifuge et infecter le système nerveux périphérique ainsi que différents organes. La diffusion centrifuge se fait vraisemblablement par la voie axonale. Peu d'organes sont infectés de façon constante, en particulier le virus ne semble pas infecter le système des phagocytes mononucléés. Les glandes salivaires sont infectées, ce qui permet la transmission *via* la salive lors d'une morsure et donc le maintien de la rage dans la nature.

-Mort rabique : L'étude histopathologique au cours de la rage ne montre pas de grandes altérations cellulaires. Les réactions inflammatoires sont souvent discrètes et parfois absentes et il n'y a pas ou peu de lésions de démyélinisation. La congestion des méninges est souvent la seule anomalie visible à l'autopsie et les modifications cellulaires observées dépendent de la souche du virus rabique en cause (FEKADU *et al.*, 1982). Ces observations ont fait penser que des mécanismes pathogènes non décelables morphologiquement peuvent être la cause de l'effet léthal du virus rabique. En particulier, il a été suggéré que l'altération des fonctions nerveuses pourrait être à l'origine de la maladie, ces altérations provoquant des désordres

dans le fonctionnement général du SNC. De telles altérations ont effectivement pu être mises en évidence au niveau des récepteurs de certains neurotransmetteurs (TSIANG, 1985). De fait, des études plus récentes suggèrent fortement un effet apoptotique du virus rabique (BABAULT *et al.*, 2011).

Un certain nombre d'aspects physiopathologiques et cliniques doivent être considérés comme communs à l'Homme et à tous les animaux, qu'ils soient domestiques ou sauvages, car ils varient plus entre individus d'une même espèce qu'ils ne varient entre ces espèces. Il s'agit de la durée d'incubation, de la durée de la maladie, de l'excrétion salivaire du virus et de certains symptômes généraux.

La durée d'incubation est en général fonction directe de la quantité de virus inoculé et du site de morsure. Cette dernière est d'autant plus grave qu'elle affecte des zones richement innervées (extrémités des membres, organes génitaux) ou proches du cerveau (tête). Les morsures à la tête, au cou ou aux membres antérieurs sont donc souvent suivies de périodes d'incubation plus courtes que lorsque la morsure se situe plus bas sur le tronc ou sur les membres postérieurs. La période d'incubation varie également beaucoup en fonction de l'espèce atteinte. Elle dure en moyenne de 15 à 60 jours chez le chien alors que chez les ruminants elle varie entre 30 et 90 jours. Chez l'Homme, l'incubation est comprise entre 35 et 90 jours dans 85% des cas (TOMA *et al.*, 2012). L'incubation est donc très variable, en moyenne de 2 à 3 mois, mais pouvant aller de 10 jours (minimum) à plusieurs mois voire plusieurs années (WHO Technical Report Series, 2005). Si l'incubation peut être très longue, la maladie en elle-même est beaucoup plus courte puisqu'elle dure en moyenne 4 à 6 jours. Elle peut même être extrêmement courte (12h) et ne dépasse jamais 2 semaines, tout au moins dans les cas expérimentaux. Expérimentalement, la durée d'incubation dépend de la souche virale inoculée, de la dose et du site d'inoculation (intramusculaire *versus* intracérébrale). FEKADU et SHADDOCK ont inoculé des chiens avec des doses variables de virus de deux souches différentes (une souche éthiopienne et une souche mexicaine). Aux doses élevées, une courte période d'incubation était observée, les chiens mouraient rapidement et le titre en virus de leur système nerveux central était faible. En revanche, à des doses plus faibles, les chiens présentaient une incubation et une phase clinique plus longues, le titre en virus de leur SNC était plus élevé et le taux d'antigènes dans les différents organes analysés était également plus élevé (FEKADU et SHADDOCK, 1984). Ces différences ont été retrouvées expérimentalement chez le renard (BLANCOU *et al.*, 1979).

Quant à l'excrétion salivaire, elle semble plus varier selon la co-adaptation entre souche virale et espèce hôte que de façon intrinsèque à la souche ou à l'espèce contaminée. Ainsi, elle est de 85 à 100% chez le renard contaminé par une souche vulpine et le chien contaminé par une souche canine, mais beaucoup plus faible si l'on intervertit les souches ou si l'on s'adresse à d'autres espèces (BARRAT et ROLLIN, 1985). En effet, dans l'étude de WANDELER *et al.* (1974), 93% des renards enragés (diagnostic positif sur SNC) présentaient des cultures cellulaires positives des glandes salivaires alors que ce pourcentage diminuait à 83% pour les blaireaux enragés et seulement 50% pour les fouines enragées (WANDELER *et al.*, 1974).

Le virus peut être présent dans la salive des animaux avant et après le développement des signes cliniques et la durée de cette excrétion salivaire est propre à chaque espèce (RUPPRECHT *et al.*, 2002). Cette excrétion salivaire pré-symptomatique du virus constitue un réel risque de transmission pour l'homme qui ne se doute pas que l'animal mordeur est contagieux puisqu'il ne présente pas encore de signe clinique (BARRAT et ROLLIN, 1985).

L'AFSSA, dans sa saisine n° 2009-SA-0007, a résumé ces durées moyennes d'excrétion salivaire pré-symptomatique du virus rabique, chez différentes espèces. Ainsi, pour le **chien**, dans 80% des cas, cette excrétion varie entre quelques heures et trois jours. Dans 15% des cas elle peut varier entre 4 et 5 jours, et enfin, dans 5% des cas, entre 5 et 8 jours. La durée maximale connue d'excrétion pré-symptomatique chez le chien est de 13 jours, chez un chien inoculé expérimentalement. Chez le **chat**, le virus est en général isolé plus tardivement dans la salive, le plus souvent dans les vingt-quatre heures avant l'apparition des premiers symptômes. Quant au furet, relativement résistant, le virus n'est que peu souvent retrouvé dans la salive, en général 2 jours avant les premiers symptômes. C'est pourquoi, pour les carnivores domestiques, on retient une période à risque d'excrétion salivaire potentielle du virus rabique de 15 jours avant l'apparition des symptômes et de 20 jours avant la mort, prenant en compte une durée d'excrétion salivaire pré-symptomatique maximale de 15 jours et une évolution clinique moyenne de 5 jours avant la mort (Arrêté AGRG1122472A du 9 août 2011).

Pour ce qui est des carnivores sauvages et plus particulièrement du renard roux (*Vulpes vulpes*), la période d'excrétion salivaire pré-symptomatique peut atteindre 29 jours et la durée moyenne de la phase clinique est de 3 à 4 jours (intervalle de 1 à 14 jours). C'est pour cela que la période maximale à risque d'excrétion salivaire chez le renard infecté (fenêtre épidémiologique) est fixée à 30 jours avant l'apparition des symptômes et à 40 jours avant la mort (AFSSA, 2009 ; Arrêté AGRG1122472A du 9 août 2011).

Le virus peut également être retrouvé dans d'autres organes que les glandes salivaires et le système nerveux. En effet, des inoculations à des chiens ont permis de mettre en évidence le virus viable dans la cornée, le cœur, la langue et le pancréas de certains animaux. Des antigènes viraux ont également été mis en évidence dans la peau, les muscles, les ovaires, les testicules et les intestins des certains chiens inoculés et morts de rage. Néanmoins, la présence de virus dans ces organes ne joue pas un rôle aussi important dans l'épidémiologie de la rage que dans les glandes salivaires, car ces organes ne permettent pas une excrétion et une transmission du virus. De plus, il faudrait être certain que les virions isolés n'étaient pas dans des fibres nerveuses présentes dans ces organes, mais bien dans le tissu même de l'organe (FEKADU et SHADDOCK, 2010).

c. Signes cliniques

Le virus se multipliant essentiellement dans le système nerveux central, il occasionne des désordres dans le fonctionnement de ses différentes zones de contrôle. Ainsi, que ce soit chez l'homme ou chez les animaux, on pourra noter comme symptômes généraux :

-des **troubles psychiques**, se traduisant par un changement de comportement ou de caractère : tendance inhabituelle soit à des manifestations d'affection exagérée ou inversement de fuite de tout contact humain, soit à l'agressivité. Cette dernière se déclenche surtout lorsque l'on dérange le malade ;

-des **troubles de l'appétit**, perversion du goût, voire refus total de s'alimenter ou de boire. Attention, l'hydrophobie caractéristique chez l'Homme n'existe pas chez l'animal qui essaie encore de boire ou de manger mais ne parvient pas à déglutir à cause d'une paralysie du carrefour pharyngé ;

-des **troubles neuromusculaires** qui se traduisent soit par des difficultés de motricité générale allant jusqu'à une paralysie totale (qui peut s'installer d'emblée), soit par des difficultés de déglutition entraînant une salivation permanente et exagérée soit par des difficultés vocales : voix ou cris de tonalité anormale émis avec une fréquence inhabituelle, ou inexistantes (rage muette).

Mais il faut bien savoir que tous ces signes généraux peuvent ne pas coexister, voire ne pas exister du tout, dans certains cas d'évolution foudroyante par exemple. Ils peuvent également ne pas être remarqués si l'on n'observe pas régulièrement l'animal atteint (animaux sauvages ou cas des chats qui se cachent, etc.) (BARRAT et ROLLIN, 1985).

Outre les signes généraux détaillés ci-dessus, chaque espèce peut présenter des symptômes plus particuliers.

Animaux domestiques :

La salivation est parfois abondante, d'abord claire et hyaline puis spumeuse. Les animaux émettent des cris, fréquents et anormaux (aboiement bitonal du chien, très évocateur). Lorsqu'ils sont infectés avec une souche vulpine, les carnivores domestiques présentent rarement une forme furieuse. Le chat cherche en général un refuge mais réagit parfois violemment lorsqu'on essaie de l'en déloger. Comme chez le renard, on note souvent une proci-dence de la troisième paupière ou une anisocorie. En général, l'évolution se poursuit par des paralysies, l'animal maigrit et la mort survient en 5 à 7 jours (BARRAT et ROLLIN, 1985).

-Chien : Chez le chien, comme chez l'Homme, le premier symptôme est souvent une sensation anormale au site de morsure, même si la plaie est complètement cicatrisée. Cela se manifeste chez le chien par du prurit, un frottement, le léchage et même le mordillement du lieu d'inoculation, souvent de manière importante, allant même parfois jusqu'à rouvrir la plaie. D'un point de vue clinique, la rage peut être « furieuse », avec prédominance de paroxysmes de colère sans aucune provocation, ou « muette », quand la paralysie apparaît précocement et se poursuit progressivement jusqu'à la mort.

BLANCOU *et al.* (1985) ont étudié la symptomatologie de la rage chez le chien. Sur six Beagles inoculés avec une souche vulpine dont cinq sont morts de rage, les cinq ont montré une anorexie accompagnée d'une prostration, trois ont présenté des myoclonies et une incoordination motrice. Chez deux chiens, une dyspnée, du ptyalisme et des larmoiements ont été observés et un seul chien a présenté des aboiements plaintifs, du jeu avec ses aliments et du méléna. Tous ces symptômes étaient parfois précédés de signes d'agitation ou d'anxiété, mais aucun des individus enragés n'a montré des signes d'agressivité et les chiens cherchaient plutôt à se cacher (BLANCOU *et al.*, 1985).

Mais dans tous les cas (forme furieuse ou forme muette), la maladie débute par des manifestations d'un chien « fou ». Le premier symptôme observé est donc habituellement un changement de comportement. Ainsi, un chien normalement vif et sociable peut devenir prostré et se retirer dans des endroits calmes, aura tendance à se cacher dans des endroits sombres ou sous des meubles et semblera évidemment dérangé. Lors de ces premières étapes de la maladie, l'animal peut collecter de petits objets comme des morceaux de bois, des

jouets, *etc.* et les emporter avec lui. Il peut également montrer une tendance à lécher des pierres, du métal ou les autres animaux. Il ne montre alors pas de tendance particulière à mordre, il continue à obéir à son maître, bien que moins rapidement qu'habituellement.

Graduellement, l'animal se repose de moins en moins et devient de plus en plus agité : il bouge continuellement, gratte le sol et renifle dans les angles... Mais à cette étape, le chien peut encore retrouver un comportement normal, comme par exemple, lorsque son maître l'appelle, et bien qu'excité, le chien n'est pas encore « furieux ». En effet, il peut même apparaître comme plus affectueux que d'habitude, voulant lécher les mains et même le visage de son maître, ce qui peut s'avérer dangereux puisqu'à ce moment sa salive peut déjà contenir du virus.

Quand le chien commence à entrer dans la phase furieuse, il mord tout ce qu'il voit. Il peut également à cette étape, chercher à s'enfuir et parcourir de grandes distances, attaquant les autres animaux et les humains qu'il croise, même sans provocation. Il peut aussi réagir très violemment lorsqu'on essaie de l'attraper, sans que ce soit réellement une forme furieuse de la maladie.

A en juger par les automutilations que le chien peut s'infliger lors de rage furieuse, l'animal semble avoir une importante diminution de sa sensibilité aux stimuli douloureux.

Durant les paroxysmes de colère, l'animal attaque tout ce qui se trouve dans son entourage, sans discrimination, même son propriétaire. Entre ces phases d'excitation, le chien semble calme, apparemment endormi, mais le moindre stimulus comme un simple bruit le replonge dans un excès d'excitation.

L'aboiement d'un chien enragé est typiquement rauque, ce qui correspond aux premiers symptômes de la phase paralytique. Durant cette phase paralytique, l'animal n'est plus capable d'avaler de l'eau ou de la nourriture (à ne pas confondre avec l'hydrophobie décrite chez les cas de rage humaine). La mâchoire et la langue se paralysent et le chien bave beaucoup car il n'arrive plus à avaler sa salive. La paralysie progresse en direction de l'arrière train, jusqu'à la mort de l'animal.

Seulement 25% des chiens atteints de rage développent vraiment la forme furieuse de la maladie. Pour le reste, c'est surtout la forme paralytique qui est observée. L'animal semble tranquille, mais à mesure que la maladie progresse, des difficultés de déglutition apparaissent, les propriétaires rapportant un chien qui semble s'étouffer, comme s'il avait un os coincé dans la gorge.

La durée entre l'apparition des signes cliniques et la mort dépasse rarement 10 jours, même si des périodes plus longues ont été occasionnellement rapportées. De manière plus habituelle, le

chien meurt généralement entre 4 à 6 jours après l'apparition des premiers symptômes (KAPLAN *et al.*, 1986).

-Chat : la forme furieuse est plus souvent observée et les chats enragés sont souvent plus sauvages et plus dangereux que les chiens enragés. Les premiers symptômes observés sont de l'agitation, un changement d'appétit et de la dépression. Rapidement après ces premiers signes, le chat se met à attaquer, utilisant plutôt ses dents que ses griffes. Les chats enragés, lors des phases de fureur deviennent sauvagement féroces. Comme le chien, le chat enragé fuit souvent son domicile et peut parcourir de longues distances. Il s'arrête de manger ou mâche des objets dépourvus de qualité nutritive et devient rapidement émacié. Sa voix change également, devenant rauque et désagréable. La paralysie apparaît rapidement et l'animal meurt habituellement moins de 4 jours après l'apparition des premiers signes, même si certains cas décrits ont survécu jusqu'à 8 jours (KAPLAN *et al.*, 1986).

Animaux sauvages :

Les animaux sauvages perdent en général leur instinct de conservation, ils ne craignent pas l'Homme, s'approchent des habitations, sans réflexe de fuite et se déplacent en plein jour, même les animaux nocturnes. Ils peuvent rechercher la présence d'autres animaux, sans se montrer spontanément agressifs.

La forme furieuse de la maladie au cours de laquelle l'animal attaque spontanément des objets animés ou inanimés est rare. Mais une fois sur deux, le renard enragé se montre irritable et réagit anormalement à des stimuli : « l'attaque » est alors en fait une réaction de défense disproportionnée au stimulus déclenchant. Ce type de réaction a aussi été décrit chez le blaireau, la fouine et le chat sauvage.

-Renard roux : à la différence du loup ou du chien, il ne semble pas susceptible de « fugues » qui sont l'occasion d'une dissémination à longue distance du virus, car sa mort survient souvent après une phase d'immobilité terminale. Dans les conditions naturelles, il reste dans son territoire ou à la bordure de celui-ci. Ainsi, ANDRAL *et al.* (1982) ont suivi par radiopistage trois renards sauvages qui ont été attrapés, inoculés avec une souche de virus rabique « renard » et relâchés à l'endroit de leur capture. Cette étude n'a pas mis en évidence d'importantes modifications de l'aire d'activité des renards. En revanche, la répartition topographique était modifiée, avec une activité en phase clinique qui se déroulait plus souvent dans les zones boisées qu'avant inoculation. Le rythme d'activité était également modifié, avec une augmentation importante de l'activité diurne, signe constant, quasi-

pathognomonique au début de la phase symptomatique. Aucun déplacement en ligne droite sur de grandes distances n'a cependant été observé, les renards augmentant leurs déplacements à l'intérieur des limites de leur aire d'activité habituelle ou tout au moins au voisinage de ces limites. Enfin, une période d'immobilité finale ou sub-finale, parfois entrecoupée de déplacements brefs d'une centaine de mètres a été observée. Cette séquence, qui correspond à la parésie qui gagne progressivement le renard, se situe le plus souvent en bordure de l'aire d'activité, voire à l'intérieur de l'aire d'un individu voisin. Ce type de comportement en phase finale semble favorable à un contact avec des congénères voisins facilité par le fait qu'il se déroule à la périphérie de l'aire d'activité habituelle, zone dans laquelle ont lieu habituellement les rencontres qui permettent d'établir la limite entre deux domaines individuels. Dans ce cas, on obtient un modèle de transmission de la rage entre renards dans lequel l'individu sain vient se contaminer en repoussant un renard malade qui n'aurait plus respecté les limites de son domaine (ANDRAL *et al.*, 1982).

Le signe le plus marquant chez le renard enragé est la perte de sa peur des hommes. Il approche et, parfois même, entre dans les habitations ou les bâtiments agricoles durant la journée. Les signes cliniques ressemblent fortement à ceux observés chez les espèces domestiques. Les premiers symptômes correspondent à une phase d'excitation croissante. Certains renards enragés sont prostrés et se cachent, du début de la maladie jusqu'à leur mort. D'autres, au contraire, montrent des comportements étranges comme la volonté de partager la niche d'un chien. Ils deviennent hyperactifs et sont parfois observés en ville en plein jour. Certains deviennent agressifs, attaquant des chiens, des renards, d'autres animaux ou des hommes et parfois même des objets se déplaçant comme des tracteurs ou des voitures. Expérimentalement, sur des renards en captivité inoculés par voie intramusculaire avec une souche renard, la mort survient entre le 1^{er} et le 14^{ème} jour après le début des symptômes (BLANCOU *et al.*, 1979).

AUBERT *et al.* (1991) ont étudié la pathogénie et la transmission de la rage chez le renard roux en inoculant différents isolats de virus à des renards placés en cage avec des renards contacts. Les symptômes classiquement observés dans ces expériences étaient une perte d'appétit, de l'agitation, des glapissements et des mordillements ou des morsures convulsives du grillage de leur cage ou de tout autre objet.

BLANCOU *et al.* (1979) ont également étudié expérimentalement les symptômes de la rage chez le renard roux. Ils ont ainsi observé un schéma évolutif de la maladie avec :

- des prodromes marqués par un changement de comportement de l'animal, une perte d'appétit et parfois des plaintes, surtout nocturnes.

- une phase d'état pendant laquelle le changement de comportement s'accroît. Les renards perdent la notion de distance de fuite et cherchent à mordre l'objet qui leur est présenté. Cette tendance à mordre ne se transforme en agressivité caractérisée que dans des cas assez rares. Mais dans ce dernier cas, la forme « furieuse » est spectaculaire, les animaux pouvant déchirer les tôles de fer de leur cage et se briser les dents ou la mâchoire sur leurs abreuvoirs. Les troubles nerveux sont surtout locomoteurs. C'est le train arrière qui est atteint en premier, gênant l'animal lorsqu'il veut se dresser sur ses postérieurs pour atteindre les objets tendus. L'animal ne bave pas mais semble parfois avoir des troubles visuels. La procidence de la membrane nictitante est un signe très caractéristique de rage. Elle survient, tôt ou tard, chez le renard enragé. Elle est généralement unilatérale, du côté où a été inoculé le virus rabique et souvent accompagnée de mydriase du même œil.

- une phase finale qui peut survenir assez brutalement. L'évolution moyenne dans cette expérience était de 3 à 4 jours, mais parfois le renard meurt dans la nuit sans aucun prodrome net. Parfois, au contraire, l'agonie est longue et peut durer plusieurs jours. C'est la paralysie totale qui, accompagnée de conjonctivite, en est le signe le plus caractéristique. L'animal meurt en décubitus latéral, les mâchoires souvent crispées sur un objet.

-Blaireau : Le comportement des blaireaux enragés se rapproche beaucoup de celui des renards enragés. Ils peuvent être vus en pleine journée dans des endroits découverts ou en pleine ville. Certains attaquent les troupeaux, les chiens et même les hommes.

-Martre des pins et autres mustélidés : lorsqu'ils sont enragés, ils sont également vus en pleine journée. Ils deviennent vraiment sauvages et attaquent les chats, les chiens et même les hommes.

-Mouffette : Environ deux-tiers des cas de rage chez des mammifères rapportés sur le territoire américain sont des mouffettes. Chez cet animal, la symptomatologie de la rage est similaire à celle observée chez les autres animaux. Pendant les périodes d'excitation furieuse, la mouffette devient extrêmement agressive et attaque tout ce qui bouge. Les mouffettes sont normalement des animaux nocturnes, mais il n'est pas rare que des mouffettes enragées soient observées en plein jour, parfois près des habitations humaines et des villes. Les mouffettes enragées peuvent être agressives jusqu'à cinq jours puis se paralysent et deviennent comateuses avant de mourir.

-Raton laveur : Une différence majeure est à noter chez les rats laveurs par rapport aux autres animaux sauvages : chez eux, la rage ne semble pas uniformément létale. Néanmoins, comme les autres animaux sauvages, les rats laveurs enragés présentent une altération de leur comportement. Comme les renards, ils perdent leur peur de l'homme et des chiens, sont retrouvés près des habitations et développent un comportement d'agressivité non justifiée. Les

résultats de l'étude sérologique dans une population de rats laveurs aux Etats-Unis (McLEAN 1972) suggèrent qu'une infection latente par le virus rabique pourrait être présente chez une proportion significative de la population. La réactivation de l'infection latente se ferait à la faveur d'un stress physiologique, comme par exemple, la période de reproduction, ou à la faveur d'un stress social, comme en cas de surpopulation. Le mécanisme épidémiologique chez les rats laveurs pourrait donc dépendre de l'existence de réservoirs d'infectés de façon latente et par conséquent différerait de l'épidémiologie habituelle chez les autres espèces (BARRAT et ROLLIN, 1985 ; KAPLAN *et al.*, 1986).

Mais attention, si dans la grande majorité des cas, l'infection rabique aboutit à la mort de l'animal infecté, des cas de chiens ayant présenté des symptômes de rage et excrété le virus dans leur salive mais qui ne sont pas morts de rage ont été observés en Ethiopie. En effet, ANDRAL et SERIE (1957), ont étudié le cas d'un caniche en Ethiopie, jamais vacciné contre la rage, ayant présenté une symptomatologie classique de rage, n'ayant pas succombé à la maladie et ayant présenté une augmentation significative des globulines α_2 . Ce caniche leur avait été présenté le 25 mai 1955 avec une paralysie complète de la mâchoire (préhension impossible des aliments) mais une démarche normale. Le 30 mai, cette paralysie commença à rétrocéder et le premier juin, elle avait entièrement disparu. Vingt mois plus tard, ce caniche était toujours en excellente santé. Le contrôle électrophorétique des globulines α_2 sur ce chien a montré une augmentation progressive de ces globulines puis une diminution, suivant la courbe de l'évolution de la paralysie mais avec un léger retard. Des prélèvements de salive ont été effectués le 27 et le 31 mai et des animaux de laboratoire ont été inoculés par passages successifs. Cette expérience a permis de réaliser, pour la première fois, la fixation et l'identification biologique et sérologique d'une souche de virus rabique provenant de la salive d'un chien ayant présenté comme seul symptôme rabiforme, une paralysie de la mâchoire inférieure spontanément guérie. C'est la première confirmation expérimentale de l'existence de chiens « porteurs » qui sont également des excréteurs du virus (ANDRAL et SERIE, 1957).

Dans la suite de leurs études, ANDRAL et SERIE ont démontré qu'une partie importante de la population de chiens errants d'Ethiopie possédait dans leur sérum des anticorps virucides vis-à-vis du virus rabique. La présence de ces anticorps implique que ces chiens ont à un moment donné développé une infection rabique inapparente (ou non détectée cliniquement), transitoire et qui leur a conféré une immunité naturellement acquise contre le virus rabique.

II. Rôle du Chien viverrin dans l'épidémiologie de la rage

1. Généralités sur le Chien viverrin

a. Systématique

Le Chien viverrin ou *Nyctereutes procyonoides* est un mammifère de l'ordre des *Carnivora*, sous-ordre *Caniformia*, appartenant à la famille des *Canidae*. Le genre *Nyctereutes* est monotypique. Corbet (1978) reconnaît 3 sous-espèces valides :

- *Nyctereutes procyonoides procyonoides*
- *Nyctereutes procyonoides viverrinus*
- *Nyctereutes procyonoides albus*

La sous-espèce *Nyctereutes procyonoides procyonoides* réunit en fait 7 autres sous-espèces :

- *N. p. amurensis*
- *N. p. koreensis*
- *N. p. orestes*
- *N. p. sinensis*
- *N. p. stegmanni*
- *N. p. ussuriensis*, qui est l'espèce qui a été introduite dans la partie européenne de l'URSS
- *N. p. kalinensis*

La position systématique du Chien viverrin n'a pas toujours été bien établie et a longtemps soulevé des difficultés. En 1959, FRECHKOP le considérait comme un maillon intermédiaire entre les *Procyonidés* et les *Canidés*. En 1971, FOX suggère qu'en fonction de ses caractères comportementaux et anatomiques, le Chien viverrin devrait être reclassé dans la sous-famille des *Octocyoninés*. Mais il faudra attendre 1976 et les travaux de CLUTTON-BROCK *et al.* pour permettre de démontrer que *Nyctereutes* n'a que très peu d'affinités avec les autres *Canidés* et qu'il se détache nettement comme un genre parmi les *Canidae* (DUCHENE, 1987).

b. Morphologie et anatomie

-Aspect général :

Le chien viverrin est une espèce dont l'aspect n'est pas encore très familier en Europe, du fait de son introduction relativement récente sur ce continent. Ainsi, peut-il être parfois confondu avec d'autres espèces de Carnivores, mieux connues. En effet, sa taille est sensiblement comparable à celle du Renard, mais son corps est nettement plus trapu et massif, évoquant de ce fait le Blaireau. Les pattes, les oreilles et la queue sont courtes. Une de ses caractéristiques remarquables est son masque facial noir, qui entoure les yeux. De ce fait, il présente une analogie avec le Raton-laveur dont la fourrure est assez ressemblante (LEGER et RUETTE, 2005).

Néanmoins, certains caractères lui sont propres et permettent de le distinguer des espèces qui lui ressemblent. Ces caractères sont les suivants :

- La couleur de sa fourrure qui est fauve à gris, avec des mouchetures noires, élimine toute confusion possible avec le Renard (*cf. Photo 4 ci-dessous*) ;
- Les bandes faciales noires du Blaireau sont verticales alors que le masque du chien viverrin est plutôt orienté horizontalement (*cf. Photo 5 ci-dessous*) ;
- Le Raton-laveur possède une longue queue annelée alors que la queue du chien viverrin est plus courte, plus touffue et de couleur unie ;
- De plus, le Raton-laveur présente 5 doigts bien distincts à la main alors que les empreintes des antérieurs du Chien viverrin ne laissent apparaître que 4 doigts.

Photo 4 : Chien viverrin. ANSES, station expérimentale d'Atton (*crédits photo J. BARRAT*)



Photo 5 : Masque facial du chien viverrin (*crédits photo J. BARRAT*)



-Biométrie :

La longueur tête+corps varie de 50 à 70 cm et la longueur de la queue de 10 à 25 cm. La hauteur au garrot oscille entre 20 et 30 cm. Les oreilles sont courtes et mesurent environ 5 cm, de même que les pattes qui mesurent 11 à 12 cm pour les postérieurs. Le poids varie beaucoup entre les saisons, le sexe et les auteurs : de 3 à 10 kg (4 à 6 kg en été et 6 à 10 kg en hiver selon LEGER et RUETTE, 2005). DRYGALA *et al.* ont étudié les chiens viverrins en Allemagne, dans la région de Brandebourg. Ils ont pesé 77 chiens viverrins capturés. Le poids moyen des chiens viverrins adultes était de $7,279 \pm 0,229$ kg et la comparaison entre le poids des femelles et celui des mâles n'a pas montré de différence significative. (DRYGALA *et al.*, 2000)

Le chien viverrin possède une formule dentaire commune à la plupart des Canidés : $I \frac{2}{3}, C \frac{1}{1}, PM \frac{4}{4}, M \frac{2}{3} = 42$ (DUCHENE, 1987).

c. Mode de vie

Le chien viverrin est un carnivore nocturne et crépusculaire. Les études de radiopistage de KAUHALA *et al.* dans 2 provinces de Finlande (Evo 1990-1993 et Virolahti 2000-2003), ont permis d'étudier l'activité des chiens viverrins. Ceux-ci se déplacent plus durant la nuit que durant la journée. De plus, la lune semble affecter leurs activités. En effet, les nuits de pleine lune, les chiens viverrins se déplacent moins, évitant sûrement la lumière trop importante qui les rend plus visibles par les prédateurs. A l'opposé, les nuits sans lune, les chiens viverrins réduisent également leurs déplacements, certainement par manque de lumière (KAUHALA *et al.*, 2007).

Le chien viverrin vit généralement en solitaire ou en couple. Mais parfois, il est possible de rencontrer de petits groupes familiaux. Durant la journée, le chien viverrin se repose, enroulé sur lui-même, le plus souvent dans un terrier abandonné de Renard ou de Blaireau, plus rarement dans une tanière qu'il a creusée lui-même ou encore dans des arbres creux ou des gîtes à même le sol. Des blocs de rochers, des greniers à foin ou des tas de branchages peuvent également lui servir d'abri. Ces sites lui servent de gîtes d'hivernage et d'élevage des jeunes (LEGER et RUETTE, 2005). En moyenne, la durée de vie du chien viverrin est d'un peu moins de sept ans (BARRAT *et al.*, 2010).

La taille de son domaine vital varie en fonction de sa localisation : de 10 à 50 ha au Japon, et en moyenne de 100 à 200 ha en Europe. Les domaines vitaux des chiens viverrins ont été étudiés en Finlande et en Allemagne, par radiopistage. Au Sud de la Finlande, la taille moyenne du domaine vital varie entre 260 ha dans les zones agricoles et 700 ha dans les zones forestières. En Allemagne, la taille de son habitat est de seulement 150 ha dans les zones humides avec de nombreux prés, quelques petites forêts et de grands fossés bordés d'une épaisse végétation. Ce type d'endroit représente probablement l'habitat idéal pour les chiens viverrins (HOLMALA et KAUHALA, 2006).

Il est le seul représentant de la famille des Canidés chez lequel on a pu enregistrer, dans son aire de répartition d'origine, une période d'hibernation partielle, de fin octobre-décembre (selon la météo) à février, dont il émerge durant les jours les plus chauds. A cette occasion, son métabolisme peut diminuer d'environ 25% et sa température corporelle diminue de quelques degrés.

Les études de radiopistage de KAUHALA *et al.* ont permis de classer les animaux en 2 groupes : les **animaux inactifs**, qui ne s'éloignent pas de plus de 150 m de leur terrier, et les **animaux actifs** qui au contraire se déplacent plus loin. Ainsi, ces chercheurs ont pu observer que les chiens viverrins adaptaient leur activité en fonction des conditions météorologiques. Les chiens viverrins étaient inactifs lorsque la température passait en dessous de 10°C, ou lorsque la hauteur de neige dépassait les 35 cm ou encore lorsque la longueur des journées était inférieure à 7 heures. Au contraire, les animaux étaient actifs lorsqu'il n'y avait pas de neige, que la température était positive et lorsque les journées duraient plus de 10 heures. Le fait que les chiens viverrins ne sortent pas lorsqu'il y a une épaisse couverture neigeuse s'explique par leur anatomie et leurs courtes pattes. Néanmoins, quand la neige n'est plus fraîche et a bien durci, on peut voir des chiens viverrins ressortir car ils ne s'enfoncent plus dans cette neige transformée.

Enfin, même s'ils restent dans leurs terriers lors des périodes d'hiver rudes, ils bougent cependant dans ces terriers et ne tombent dans un sommeil profond que pour de courtes périodes (KAUHALA *et al.*, 2007).

Le Chien viverrin est un bon nageur et il affectionne les cours d'eau bordés de buissons et de roseaux. Il apprécie également les sous-bois denses et humides des forêts de feuillus ou des forêts mixtes alternant avec des espaces découverts. Il évite les régions dont l'altitude dépasse 700 m, les grandes forêts de conifères et les contrées sèches. A la différence de la plupart des autres canidés, le Chien viverrin effectue des dépôts de fèces à proximité du gîte, comportement qui s'apparente à celui du Blaireau. Ainsi, à proximité du terrier, des lieux de défécation sont utilisés et entretenus régulièrement (LEGER et RUETTE, 2005).

-Alimentation :

Que ce soit dans son aire d'origine ou dans son aire d'acclimatation, le Chien viverrin possède un régime alimentaire omnivore qui connaît d'importantes variations selon les saisons, les années et l'habitat. Il s'adapte facilement aux ressources alimentaires disponibles localement et se nourrit aussi bien d'aliments d'origine animale que végétale. Dans l'aire d'origine asiatique, les aliments les plus consommés sont les insectes et les végétaux. Dans sa zone d'acclimatation européenne, pour la part carnée, le Chien viverrin consomme des rongeurs, notamment les campagnols, des mollusques, des poissons, des amphibiens, des reptiles, des oiseaux et leurs œufs ainsi que des charognes (LEGER et RUETTE, 2005).

DRYGALA *et al.* ont étudié le contenu stomacal de 78 chiens viverrins tués par des chasseurs ou des accidents de la voie publique, collectés dans la région de Brandenburg en

Allemagne, entre 1997 et 1999, en toutes saisons. Les végétaux, les charognes et les restes des poubelles constituent la majeure partie des aliments retrouvés dans ces estomacs : maïs et fruits représentent 54,1% de la biomasse du contenu stomacal et les déchets 23%. En parts moins importantes, des petits mammifères (8,8%) et des oiseaux (6,2%) ont également été retrouvés. Enfin, des insectes (2,1%) et des amphibiens (3,2%) constituaient des sources secondaires d'alimentation.

En résumé de l'étude, des plantes (75,5% des animaux), des insectes (67,7%), des petits mammifères (41%) et des charognes et des détritiques (poubelles) (35,1%) étaient le plus souvent consommés. La diversité et la composition de son alimentation indiquent que, sous nos latitudes européennes, le chien viverrin est un opportuniste cueilleur et charognard plutôt qu'un prédateur actif. En Allemagne, le chien viverrin semble également profiter des appâts dispersés pour les sangliers et autres gibiers (DRYGALA *et al.*, 2000).

-Reproduction :

Le Chien viverrin est une espèce monogame qui met bas une portée par an. Selon la région et le climat, le rut débute entre février et avril, à la fin de la période de repos hivernal, et dure en général 2 à 3 semaines. Au terme d'une gestation de 61 jours en moyenne [59 à 70 jours], la femelle met bas, en mai, de 5 à 7 petits aveugles et pourvus d'un pelage laineux (LEGER et RUETTE, 2005).

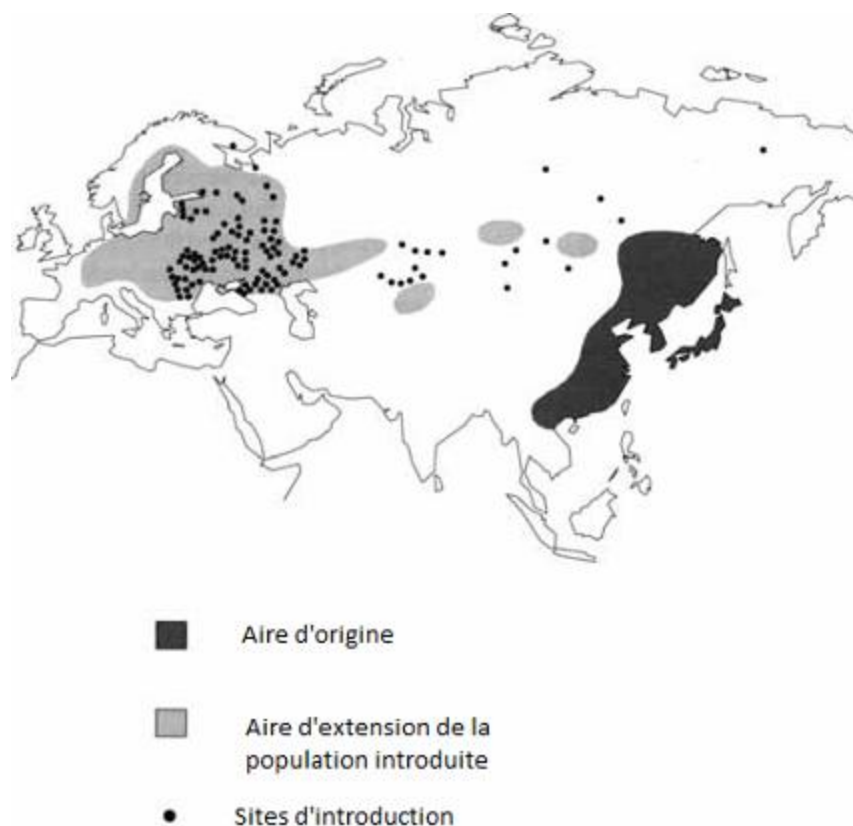
Les petits restent dans le terrier pendant les 6 premières semaines de leur vie, les mâles passant plus de temps avec eux que les femelles. Ils commencent à sortir avec leurs parents fin juin ou début juillet. Les jeunes commencent à quitter définitivement le terrier familial en août, mais la plupart d'entre eux ne le quittent qu'en septembre ou octobre. Les jeunes atteignent la maturité sexuelle à la fin de leur première année (KAUHALA *et al.*, 2007).

-Prédateurs :

En Russie, son prédateur principal est le loup. En Pologne, ce sont surtout les chiens errants qui lui causent du tort. Le renard peut également parfois s'attaquer aux jeunes individus. Enfin, certains oiseaux de proie, tels les Aigles royaux ou les Hiboux Grands-Ducs, peuvent jouer le rôle de prédateurs mais ne capturent en général que les très jeunes animaux (BARRAT *et al.*, 2010 ; DUCHENE, 1987).

2. Aire de répartition originelle et aire d'extension du chien viverrin

Figure 6 : Aire d'origine et aire d'extension du chien viverrin (source : KAUALA, 1994)



L'aire de répartition naturelle du Chien Viverrin se limite à l'Asie orientale : du Sud de l'Amour et de l'Oussouri, le Nord-Est de la Chine (Mandchourie) jusqu'au Nord du Vietnam, la péninsule de Corée et les îles du Japon (*cf. Figure 6 ci-dessus*) (LEGER et RUETTE, 2005). Mais entre 1929 et 1955, des chiens viverrins ont été introduits à l'état sauvage dans la partie Ouest de l'URSS, pour l'exploitation de leur fourrure (SINGER, 2008). En effet, celle-ci était très prisée dans leur aire d'origine et utilisée, entre autres, pour la fabrication de vêtements pour l'armée russe. Les premières introductions ont ainsi eu lieu en Ukraine. Puis d'autres lâchers ont suivi dans les régions européennes et quelques régions asiatiques de l'ancienne URSS, depuis la Carélie jusqu'en Moldavie en passant par la Baltique et la Biélorussie, ainsi que dans des secteurs de la fédération russe, le Caucase, le Kazakhstan et l'île de Sakhaline en Asie extrême-orientale (LEGER et RUETTE, 2005).

La plupart de ces introductions ont été des succès et la population de chiens viverrins a rapidement augmenté, la taille de son aire de répartition gagnant 40 km par an (KAUALA, 1994).

Les populations nouvellement créées ont été renforcées par une nouvelle vague d'importation d'animaux pour la création de nombreuses fermes d'élevage dans la partie Ouest de l'ex-URSS, entre 1940 et 1950. Durant la Seconde Guerre Mondiale, des relâchés accidentels ont eu lieu suite à la destruction de certaines de ces fermes (BARRAT *et al.*, 2010). Au total, plus de 9000 animaux ont été lâchés au cours des années 1948 à 1955, période de la grande majorité des introductions.

Le Chien viverrin est généralement sédentaire, mais des changements dans son environnement peuvent le conduire à se déplacer sur d'assez longues distances (20 à 80 km) pour trouver un nouvel environnement qui lui sera plus favorable (BARRAT *et al.*, 2010). Ainsi, à partir de ces aires d'introduction en Europe orientale et suite à l'expansion naturelle de son aire de répartition vers l'Ouest, l'espèce est apparue dans plusieurs pays européens limitrophes de l'ex-URSS, pour gagner par la suite des contrées plus éloignées. Vers le milieu des années 1930, les premiers individus sont observés en Finlande et dans les années 1940 en Suède. Dans les années 1950, c'est au tour de la Roumanie et de la Pologne. Des chiens viverrins sont observés depuis le début des années 1960 dans l'ex-Tchécoslovaquie, en Allemagne, en Autriche, en Hongrie et en Bulgarie. Ce n'est qu'au cours des années 1970 que le chien viverrin fait son apparition en France et en ex-Yougoslavie. La Norvège et les Pays-Bas le verront apparaître au début des années 1980 et la Suisse seulement à la fin des années 1990. Au total, entre 1935 et 1984, le chien viverrin a colonisé 1,4 millions de km² à travers l'Europe (LEGER et RUETTE, 2005).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer le succès et la rapidité de cette colonisation : sa taille relativement petite, son caractère omnivore et opportuniste, sa capacité à vivre près des habitations humaines, son haut niveau de reproduction et enfin sa grande capacité d'adaptation. De plus, le chien viverrin tombant en léthargie durant tout l'hiver, cette semi-hibernation est un grand avantage dans les régions où l'hiver est rude et les quantités de nourriture faibles. Cette période de léthargie hivernale apparaît donc comme le meilleur moyen de survie aux hivers rigoureux des pays nordiques.

Un des facteurs majeurs affectant le taux de croissance d'une population est le taux de reproductivité de l'espèce. Ce taux est très élevé chez le chien viverrin. En effet, dans certaines régions comme le Sud de la Finlande, la taille moyenne des portées est de 9 petits avec un maximum de 16. On retrouve des moyennes similaires au niveau du delta du Danube, en Lituanie et dans la partie Est de la Russie. La taille moyenne des portées chez la plupart des carnivores se situant entre 4 et 6 petits, le chien viverrin a donc en moyenne des portées

beaucoup plus nombreuses que les autres espèces de la famille des *Canidae*. De même, en comparant le poids relatif des portées (poids de la portée/poids de la femelle), on s'aperçoit que celui du chien viverrin est le plus élevé de tous les canidés de même taille (24% pour le chien viverrin contre 11% chez la majorité des autres canidés de taille équivalente).

Il existe plusieurs raisons à ce fort potentiel de reproductivité. La première est que le chien viverrin est une espèce strictement monogame (à l'exception de la sous-espèce japonaise). En effet, durant la première semaine post-partum, le mâle et la femelle s'occupent conjointement des petits dans le terrier. Ensuite, c'est la femelle qui habituellement part à la recherche de nourriture, car elle a des besoins énergétiques accrus pour la lactation, pendant que le mâle reste au terrier pour s'occuper des petits. Or, si le mâle ne jouait pas ce rôle, la femelle ne pourrait pas se procurer assez d'aliments pour assurer une bonne lactation à une aussi grande portée. Ainsi, grâce à ce partage des tâches, la femelle peut manger suffisamment pour nourrir tous ses petits uniquement au lait pendant leur premier mois de vie.

La deuxième explication à son haut potentiel de reproductivité est son caractère omnivore. En effet, comme le chien viverrin peut se contenter d'aliments très variés (notamment dans les endroits proches des habitations humaines), il dispose toujours de nourriture, même durant les périodes de disette.

Enfin, sa période de léthargie hivernale lui permet de traverser sans encombre cette saison critique pour de nombreux autres mammifères vivant sous les latitudes nord. Les chiens viverrins adultes sont très gras à la fin de l'automne et sont capables de survivre pendant tout l'hiver, dans de bonnes conditions. En mars, lorsqu'ils reprennent leur activité, ils possèdent encore des réserves graisseuses, leur permettant de s'investir entièrement dans leur reproduction (KAUHALA, 1994).

Les limites de l'aire de distribution :

Bien que le chien viverrin ait très largement étendu son aire de vie, il n'a toutefois pas réussi à coloniser les régions de l'extrême Nord. En effet, les limites nord de son aire de distribution se situent entre le 65°N et le cercle arctique. Le climat affecte donc la distribution du chien viverrin, l'abondance et le taux de croissance de sa population.

Le climat semble également affecter la productivité de la population de chiens viverrins et plus spécifiquement la proportion de femelles reproductives. La durée de la fonte des neiges, relative à la hauteur de neige à la fin mars, détermine quand les animaux vont entrer en chaleurs et donner naissance à des petits. Le poids des jeunes femelles détermine combien d'entre elles se reproduiront au printemps suivant. Finalement, cela détermine la

proportion de femelles reproductrices dans la population car les jeunes animaux de moins d'un an représentent plus de 40% de la population au printemps. Ainsi, dans les régions où l'hiver est très long et l'été court, comme en Laponie, les petits n'ont pas le temps de grandir et d'accumuler assez de réserves graisseuses pour survivre à l'hiver. Cette mortalité des jeunes explique les limites nord de l'aire de répartition du chien viverrin et pourquoi il n'a pas été capable de coloniser le Laponie.

Le climat est également un facteur déterminant la densité de population. Par exemple, au Sud de la Finlande, la reprise de la production végétale au printemps est plus importante que dans les régions plus au Nord. Cela affecte naturellement la quantité de nourriture disponible pour les animaux. Les territoires des animaux sont donc plus petits et la densité de population plus élevée au Sud que dans les zones où le climat est plus rude. Ainsi, la taille moyenne des territoires au Nord-Ouest de la Russie (climat continental avec des hivers longs et très froids) est de 10 à 20 km². En revanche, toujours en Russie, dans la région de Novgorod, où les hivers sont plus courts et moins froids, la taille moyenne des territoires est de 1,5 km² (KAUHALA, 1994).

L'effectif des populations animales est directement influencé par la disponibilité des ressources de nourriture. L'abondance de la nourriture, en particulier celle des baies en automne, est largement responsable de la variation annuelle du nombre de chiens viverrins en Finlande. Elle affecte probablement l'accumulation de réserves graisseuses en automne car les baies sont une des principales sources de nourriture du chien viverrin. Les juvéniles en particulier comptent sur cette source de nourriture pour construire leurs réserves et survivre à l'hiver. La mortalité juvénile est en effet le facteur de mortalité le plus important pour la population et semble être directement dépendante de l'abondance des baies.

L'abondance des campagnols aurait également un tel effet, spécialement près de la limite Nord de son aire de distribution, car le nombre de campagnols fluctue de façon plus importante au Nord qu'au Sud de la Finlande.

Le climat peut également affecter la densité de population annuelle dans les parties Nord de l'aire de distribution, en causant une mortalité élevée, spécialement chez les jeunes lors des hivers très difficiles (KAUHALA, 1994). En effet, le taux de mortalité des jeunes chiens viverrins augmente si les ressources en baies sont faibles à la fin de l'été et en automne, lorsqu'ils constituent leurs réserves graisseuses pour l'hiver. De plus, si l'hiver est trop long, les jeunes auront particulièrement du mal à survivre car ils n'accumulent pas assez de graisses pour une longue période. Les hivers rigoureux limitent donc la croissance des populations (SINGER *et al.*, 2009).

Une autre explication au succès de la colonisation du chien viverrin en Europe serait qu'il occupe une niche écologique vacante. Aucune compétition réelle entre le chien viverrin et les autres carnivores de même taille (renard et blaireau) n'a été observée. En effet, les densités de population de blaireaux et de renards ont continué à augmenter dans la première moitié des années 1980, même si simultanément, le nombre de chiens viverrins augmentait rapidement dans la même zone.

Les régimes alimentaires du renard, du blaireau et du chien viverrin se recouvrent puisque tous les trois sont en partie carnivores et se nourrissent de petits mammifères, d'invertébrés mais aussi de plantes. Néanmoins, le renard se nourrit plus spécifiquement de petits mammifères (campagnols), le chien viverrin de végétaux (baies) et le blaireau d'invertébrés. Ainsi, chaque espèce a un régime légèrement différent qui lui permet d'éviter toute compétition.

De plus, aux latitudes Nord, c'est durant l'hiver que la compétition alimentaire est la plus sévère, quand les sources de nourritures se font rares. Or, le blaireau comme le chien viverrin passent cette saison en « pseudo-hibernation ». Ils ne subissent donc pas les conséquences d'une telle compétition.

Ces trois mêmes espèces pourraient également entrer en compétition pour leur terrier. Le chien viverrin utilise souvent de vieux terriers de renards ou de blaireaux, mais ceux-ci ont tendance à le chasser. Néanmoins, des chiens viverrins sont parfois retrouvés dans les mêmes terriers que des blaireaux en hiver. Cela peut s'expliquer par le fait que le blaireau rentre en hibernation dans son terrier plus tôt en automne et en sort plus tard au printemps et ne verrait ainsi pas qu'il partage son terrier avec un chien viverrin.

Le chien viverrin semble donc avoir vraiment trouvé une niche écologique vacante dans sa nouvelle aire de distribution européenne, trouvant assez de nourriture, sans compétition réelle avec les autres carnivores de même taille et avec une prédation du chien viverrin probablement non suffisante (KAUHALA, 1994).

Le Chien viverrin en France :

En France, les observations de Chien viverrin restent encore marginales. Depuis le milieu des années 1970, celles qui ont eu lieu dans les régions Alsace, Lorraine et Franche-Comté pourraient provenir d'une dispersion d'individus provenant d'Europe centrale, vers le Nord-Est de la France. Pour les autres régions de France, les observations seraient plutôt la conséquence d'évasions d'animaux détenus par des parcs zoologiques, des cirques ambulants ou encore des particuliers. A compter de l'arrêté du 26 juin 1987, le Chien viverrin a été

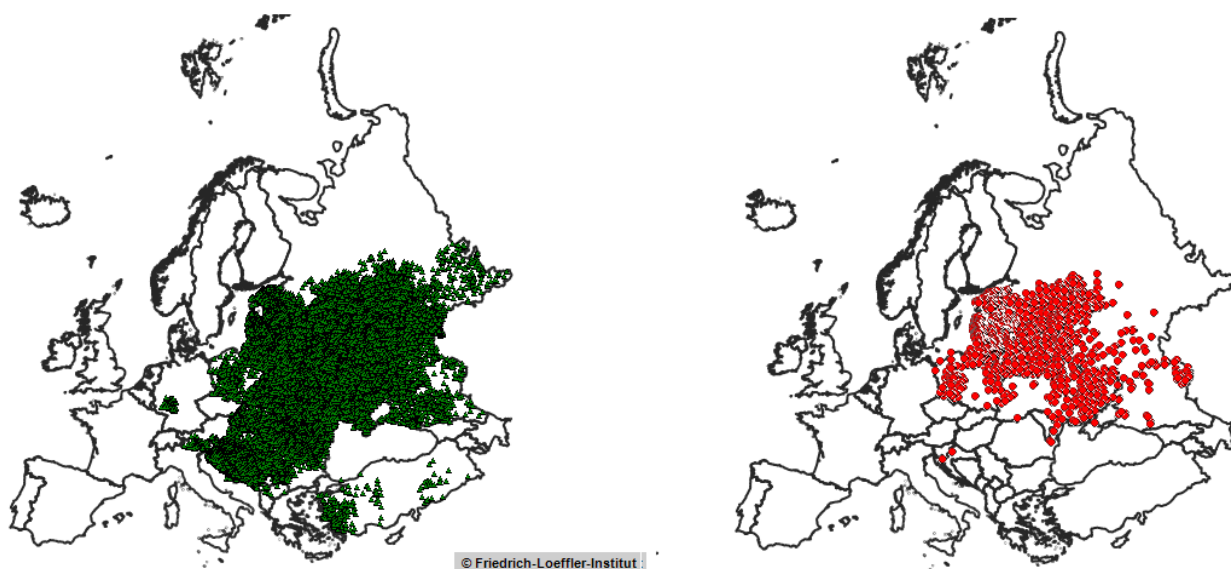
classé dans les espèces gibier dont la chasse est autorisée. Par la suite, l'arrêté du 30 septembre 1988 l'a intégré dans la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles (LEGER et RUETTE, 2005).

3. Rôle du chien viverrin dans l'épidémiologie de la rage selvatique

a. Etat des lieux des cas de rage chez le chien viverrin en Europe

Figure 7 : Répartition des cas de rage chez les renards (carte de gauche, 5 789 cas) et chez les chiens viverrins (carte de droite, 1 503 cas) entre 2002 et 2012

(source : [www.who-rabies-bulletin.org])



Le chien viverrin est un hôte du virus rabique dans son territoire d'origine, l'Asie. Mais il est également vecteur de cette zoonose dans la partie Ouest de la Russie et en Europe de l'Est (cf. Figure 7 ci-dessus) et est sensible au virus rabique du renard européen. La présence d'un second vecteur de rage pose quelques problèmes. En effet, le contrôle et l'élimination de la maladie peut devenir plus difficile, pour différentes raisons. Tout d'abord, cela pourrait créer de nouvelles voies d'introduction de la maladie. De plus, l'infection inter-espèces peut permettre la réintroduction du virus dans une espèce de laquelle il avait été éliminé (SINGER *et al.*, 2009).



Entre 1999 et 2003, le nombre de cas de rage dans la faune sauvage a augmenté en Europe, particulièrement au Nord et à l'Est du continent (4269 cas rapportés en 1999 pour 7095 en 2003). Bien que le Renard roux, *Vulpes vulpes* reste le principal vecteur de la rage depuis les années 1945, le nombre et la proportion de cas de rage chez le Chien viverrin ont rapidement augmenté. Ainsi, en 2004, en Europe, 500 cas de rage étaient rapportés sur des chiens viverrins, représentant 15% de la totalité des cas recensés. Entre 1990 et 2010, 9438 cas de rage chez des chiens viverrins ont été rapportés en Europe, principalement dans les pays baltes (BARRAT *et al.*, 2010). Le chien viverrin est maintenant la 2^{ème} espèce sauvage la plus touchée par la rage en Europe, après le renard roux. En 1999, 8% des cas de rage dans la faune sauvage en Europe correspondaient à des chiens viverrins et 85% à des renards. En 2003, ces pourcentages sont passés respectivement à 16% et 77%. Des cas de chiens viverrins enrégés ont plus particulièrement été rapportés en Pologne, en Lettonie, en Lituanie, en Estonie, en Biélorussie, en Allemagne, en Russie, en Ukraine et en République Tchèque. La plupart des cas ont été rapportés en Pologne et dans les pays baltes, reflétant la distribution et la densité des populations de chiens viverrins. Par exemple, en Lettonie, 23% (n=120 cas) des cas de rage dans la faune sauvage en 1999 étaient des chiens viverrins. Ce pourcentage a atteint 34% (n=828) en 2003. Les chiffres correspondant en Estonie étaient de 33% (n=89) en 1999 et de 52% (n=697) en 2003 (KAUHALA *et al.*, 2007). En Estonie, le chien viverrin est le premier vecteur de rage depuis 2002, comptant pour plus de 54% des cas de rage en 2004 (CLIQUET *et al.*, 2006).

La présence de ces deux importants vecteurs de rage pourrait constituer un risque non négligeable d'apparition d'une nouvelle épizootie de rage dans les pays d'Europe de l'Ouest et du Centre, pays redevenus indemnes de rage terrestre grâce aux campagnes de vaccination orale des renards. C'est pourquoi il est important d'étudier la pathogénie de la rage chez le chien viverrin et le rôle de cette espèce exogène dans la dissémination de la maladie (KAUHALA *et al.*, 2007).

b. Dissémination du virus rabique par le chien viverrin

La dispersion des jeunes animaux est une phase critique dans la dissémination de la maladie. En effet, les jeunes, lorsqu'ils quittent le nid familial, peuvent transporter le virus dans de nouvelles zones. A l'automne, les jeunes chiens viverrins quittent le gîte des parents et se dispersent sur de nouveaux territoires. Contrairement aux renards qui se dispersent sur de courtes distances, surtout là où les densités de populations sont élevées, les jeunes chiens viverrins sont capables de parcourir de longues distances avant de s'établir dans un nouvel habitat. Ainsi, dans l'étude de KAUHALA et HELLE en 1994, certains chiens viverrins ont été retrouvés à environ 150 km du lieu où ils avaient été marqués par une boucle à l'oreille. 32% des jeunes se dispersent à plus de 10 km de leur territoire natal et 54% s'en vont à plus de 5 km. Enfin, dans cette étude en Finlande, 17% des jeunes partent à plus de 40 km. Les jeunes chiens viverrins pourraient donc transmettre la rage loin de leurs territoires natifs. De plus, lorsque les jeunes se cherchent un nouveau territoire, on observe classiquement un phénomène d'accroissement des contacts plus ou moins agressifs. Il résulte de ce phénomène une augmentation des cas de rage six semaines après la période de dispersion des jeunes animaux.

Comme cité plus haut, dans les régions où l'hiver est froid, les chiens viverrins sont inactifs pendant leur phase de dormance hivernale. L'hibernation des chiens viverrins en Europe dépend des conditions climatiques et de la latitude. En Allemagne, les chiens viverrins sont actifs pendant tout l'hiver alors qu'en Pologne, ils hibernent de décembre à février-mars. En Finlande, les animaux se réfugient dans leur terrier de fin novembre à mars et n'en sortent qu'aux jours les plus chauds. Il arrive que parfois un chien viverrin utilise plusieurs terriers différents au cours d'un même hiver. D'après les résultats de radiopistage en Finlande, chaque chien viverrin change en moyenne 3 fois de terrier par hiver (KAUHALA *et al.*, 2007).

Pendant l'hiver, le taux de transmission du virus entre chiens viverrins entrés en léthargie devrait facilement tomber en dessous du niveau critique et conduire à terme à la fin de l'éventuelle épizootie. Le devenir du virus rabique lors de cette période hivernale est encore mal connu, certains auteurs pensant que le chien viverrin pourrait devenir un réservoir du virus pendant cette période d'hibernation (HOLMALA et KAUHALA, 2006).

BOTVINKIN *et al.* (1985) ont étudié expérimentalement la durée de la phase d'incubation de la rage chez des rongeurs qui hibernent. Les périodes d'incubation étaient les plus courtes pour les animaux infectés en mai. A l'opposé, les animaux infectés à la fin Novembre avaient une période d'incubation étonnamment longue. L'hibernation semble donc provoquer

l'allongement de la période d'incubation de la rage chez les rongeurs hétérothermes et aurait donc une influence inhibitrice sur le développement de la rage, en rallongeant la période d'incubation chez les mammifères hétérothermes. La température corporelle du chien viverrin chutant de quelques degrés durant sa léthargie hivernale, le chien viverrin pourrait jouir de cet allongement de la période d'incubation et devenir ainsi un réservoir du virus (BOTVINKIN *et al.*, 1985).

Le virus rabique pourrait survivre à l'hiver en phase latente. Si l'hiver est long, les chiens viverrins restent longtemps dans leur terrier donc le taux de contact entre animaux est très faible ce qui conduit à la fin de l'épizootie. Au contraire, si l'hiver est plus court et peu froid, la période de léthargie sera plus courte, il y aura plus de phases d'activité et des changements de terriers plus fréquents. Ainsi, le taux de contact sera suffisant pour maintenir une épizootie de rage ou toute autre maladie.

Deux pics annuels du nombre de cas de rage chez les chiens viverrins sont donc observés :

- un à la fin de l'hiver, vers mars-avril, correspondant à la période de fin de léthargie, lorsque les animaux se déplacent beaucoup pour la reproduction et la recherche de nourriture
- un deuxième à l'automne, lors de la dispersion des jeunes.

L'activité et les déplacements des chiens viverrins, dépendant des conditions météorologiques, influencent donc directement la dissémination de la rage dans leur population (KAUHALA *et al.*, 2007).

Avec une rétention latente du virus rabique durant sa période d'hibernation, le chien viverrin peut intensifier le processus de l'épizootie en permettant de la maintenir jusqu'à la saison suivante (CERKASSKIJ, 1980).

KAUHALA et HOLMALA (2006), ont montré que les chiens viverrins d'un couple avaient de nombreux contacts et que leurs territoires se superposaient largement, facilitant la transmission de la rage d'un animal à l'autre. En revanche, les différents couples ont plutôt tendance à éviter les contacts avec les autres couples, ce qui aurait plutôt tendance à maintenir bas le taux de transmission du virus. Mais, comme il a été montré que le renard enragé pouvait changer de comportement et se déplacer sur des territoires appartenant à d'autres renards, il se pourrait que l'infection du chien viverrin par le virus rabique le pousse à plus se déplacer, augmentant ainsi la possibilité de rencontrer d'autres chiens viverrins.

c. Transmission inter-espèces

L'infection d'un animal par un virus rabique dont le réservoir est une autre espèce conduit généralement à une infection fatale pour l'animal mais limitée à cet individu. Mais occasionnellement, cette infection d'un nouvel animal peut conduire à une nouvelle infection enzootique stable dans cette espèce (BOURHY *et al.*, 1999).

Pour que la rage persiste dans une population animale, une densité minimale de cette espèce est nécessaire et en deçà de celle-ci, l'épizootie ne peut perdurer. L'existence de forts liens épidémiologiques entre le chien viverrin et le renard permet la circulation du virus rabique entre ces espèces. L'augmentation de la taille de la population des chiens viverrins et l'extension de son territoire lui confèrent un rôle plus important dans la dispersion de la rage dans la faune sauvage.

De plus, le nombre de prédateurs naturels des chiens viverrins et des renards ayant tendance à diminuer, cela entraîne une augmentation de la taille de ces deux populations. Des densités de renards et de chiens viverrins importantes favorisent les contacts entre ces espèces, facilitant la transmission du virus rabique entre espèces (CHERKASSKIY, 1988).

SINGER *et al.* (2009) ont étudié le risque d'épizootie de rage en fonction des densités de renards et de chiens viverrins. Ils ont montré qu'avec une densité de chiens viverrins croissante, le rôle du renard passe de vecteur essentiel à la dissémination du virus à hôte secondaire, non nécessaire à la propagation de la maladie. Dans ce scénario d'une faible population de renards et d'un grand nombre de chiens viverrins, ils ont observé que la rage s'éteignait souvent dans la population de renards, mais que les chiens viverrins réintroduisaient le virus chez les populations de renards, même si ces populations restent réduites.

Les territoires des renards et des chiens viverrins se superposant et leurs déplacements nocturnes se croisant souvent, il est probable qu'ils se transmettent le virus entre espèces. Ainsi, une épizootie de rage diffuserait plus rapidement dans une communauté mixte de renards et de chiens viverrins que dans une population composée uniquement de renards. Durant l'épizootie en Europe Centrale (1940-1980), le taux de transmission R_0 , correspondant au nombre moyen d'animaux susceptibles d'être infectés par chaque animal enragé, a été estimé à 1,9 alors qu'en Finlande ou en Estonie, là où il y a des populations mixtes de renards et de chiens viverrins, ce taux de transmission pourrait être de plus de 3,0 (KAUHALA et HOLMALA, 2006).

De plus, BOURHY *et al.* (1999) ont étudié l'évolution du virus rabique en Europe (phylogénie des différentes souches) par séquençage des gènes codant pour la nucléoprotéine N et la glycoprotéine G ainsi que par typage RFLP des souches. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que les deux espèces (renard roux et chien viverrin) sont des réservoirs effectifs pour un groupe de variants du virus rabique retrouvés dans le Nord-Est de l'Europe (Pologne, Estonie, Lituanie et Finlande). Dans cette région, il existe une souche de virus « chien viverrin » mais la relation phylogénétique de ce virus avec la souche renard est incertaine. BOURHY *et al.* ont également démontré que les virus d'une même région peuvent être regroupés génétiquement, comme peuvent l'être les isolats issus d'une même espèce, mais de façon moins importante. De plus, l'infection d'une nouvelle espèce hôte dans la nature ne pourrait nécessiter qu'un faible nombre de changements génétiques du virus rabique, correspondant au simple remplacement de quelques acides aminés (BOURHY *et al.*, 1999). Ces considérations génétiques confirment que les renards et les chiens viverrins d'une même région pourraient facilement se transmettre leur virus rabique.

Les chiens viverrins et les blaireaux semblent apprécier le même type d'habitat. Leurs territoires se chevauchent souvent et leurs chemins se croisent souvent. Le risque de contact est donc plutôt élevé. Les blaireaux et les chiens viverrins partagent parfois le même terrier. En effet, comme indiqué ci-dessus, le blaireau entrant en hibernation plus tôt que les chiens viverrins et en sortant plus tard, il n'est pas rare de trouver des chiens viverrins hivernant dans le terrier d'un blaireau. Ce partage de terrier augmente donc largement ce risque de contact et de transmission du virus. Il semblerait qu'un blaireau contaminerait plus de chiens viverrins qu'un chien viverrin ne contaminerait d'individus de sa propre espèce. En effet, comme le territoire des blaireaux est plus étendu, celui-ci va croiser plusieurs territoires de chiens viverrins et pourra donc possiblement contaminer un grand nombre de chiens viverrins, alors que les contacts entre chiens viverrins voisins sont plutôt rares. De même, il semble que les territoires des chats sauvages se superposeraient avec ceux des chiens viverrins, avec un taux de contacts relativement élevé.

Ainsi, il est fortement probable qu'une maladie, telle la rage, se propagerait facilement d'une espèce à l'autre (blaireau vers chien viverrin essentiellement), en supposant bien évidemment que les contacts avec un animal infecté aboutissent à des morsures (KAUHALA et HOLMALA, 2006).

La rage chez les chiens viverrins en Europe est donc surtout retrouvée dans la partie Nord-Est du continent, là où la population de chiens viverrins est la plus importante. Entre 1990 et 2001, le nombre de cas de rage diagnostiqués chez le chien viverrin en Europe a été multiplié par 10 (de 70 à 700 cas). Le pourcentage de chiens viverrins enragés par rapport à la population totale d'animaux sauvages enragés et au nombre de renards enragés en Europe a également augmenté de manière drastique durant cette période, passant de moins de 1% à 10% et 12% respectivement. Le nombre de cas de rage chez les chiens viverrins ainsi que la proportion de cas chez le chien viverrin parmi les cas d'animaux sauvages enragés augmentant et les informations sur cette espèce étant assez limitées, il est important d'explorer davantage la biologie du chien viverrin et l'épidémiologie de la rage chez cette espèce (POTZSCH, 2002).

4. Rage expérimentale du chien viverrin

a. Sensibilité au virus rabique de cette espèce (virus de chien viverrin)

BOTVINKIN *et al.* (1984) ont inoculé des chiens viverrins et des renards par voie intramusculaire (muscles temporaux) avec une souche de virus provenant du cerveau d'un chien viverrin naturellement infecté par le virus rabique (Est de l'Europe). Pour chaque dose (respectivement 5000, 500, 50 et 5 DL₅₀IC pour la souris), quatre animaux (deux de chaque espèce) étaient inoculés, soit 16 animaux au total (huit renards et huit chiens viverrins).

Cette expérience a montré une grande sensibilité du chien viverrin à « son » virus rabique. Ainsi, même une dose minimale de 5 DL₅₀ IC pour la souris entraîne la maladie avec tous ses symptômes caractéristiques (irritabilité, agressivité et paralysie). Les huit chiens viverrins inoculés sont morts de rage entre 14 et 33 jours après leur inoculation. En revanche, trois renards sur les huit inoculés n'ont manifesté aucun symptôme trois mois après l'inoculation (renards inoculés avec les doses différentes de 500, 50 et 5 DL₅₀IC pour la souris). Le virus a été retrouvé à une exception près dans le cerveau et les glandes salivaires des chiens viverrins morts de rage. Dans la moitié des cas, le virus a également été isolé des reins et/ou des poumons de chiens viverrins mais pas des viscères des renards morts. Les différences obtenues entre les chiens viverrins et les renards s'expliqueraient par l'adaptation du virus à son hôte. Ainsi, le chien viverrin serait plus sensible à la souche « chien viverrin » du virus que le renard.

b. Sensibilité au virus rabique d'origine vulpine

Une épreuve d'inoculation de chiens viverrins et de renards roux a été réalisée au CNERPAS (centre national d'étude de la rage et de la pathologie des animaux sauvages, Nancy) en 1987. Le virus inoculé en intramusculaire profonde dans les muscles temporaux provenait d'un broyat de glandes salivaires de renards morts de rage naturelle.

Six renards répartis en trois groupes de deux ont été inoculés avec le broyat des glandes salivaires à la dose respectivement pour chaque groupe de $10^{-0,5}$, 10^4 et $10^{6,5}$ DL₅₀IC pour la souris. De même, trois groupes de deux chiens viverrins ont été inoculés avec les mêmes doses de ce broyat.

Résultats : 100% des renards sont morts aux doses $10^{6,5}$ et 10^4 DL₅₀ICS et 50% à la dose $10^{0,5}$ DL₅₀ICS. 100% des chiens viverrins sont morts à la dose 10^4 DL₅₀ICS, mais seulement 50% à la dose $10^{6,5}$ DL₅₀ICS et aucun à $10^{-0,5}$ DL₅₀ICS. Les principaux symptômes observés chez les chiens viverrins étaient de l'anorexie, une prostration, de l'agressivité sans pour autant pouvoir parler de forme furieuse, une paralysie et du ptyalisme. Néanmoins, le nombre d'animaux malades étant trop réduit dans cette expérience, il n'a pas été possible de généraliser quant à la fréquence réelle de ces symptômes. Aucun diagnostic ne s'est révélé positif sur les glandes salivaires des chiens viverrins. Cette absence de virus détectable dans les glandes salivaires des chiens viverrins morts rend peu probable la transmission salivaire d'une souche vulpine par un chien viverrin enragé.

Il y a donc pour ces deux espèces une linéarité dose-effet vis-à-vis de la souche propre de l'espèce, comme si en « s'adaptant » à une espèce particulière la souche devenait plus « efficace » pour cette espèce (DUCHENE, 1987).

Le chien viverrin est donc devenu en quelques années la deuxième espèce sauvage la plus touchée par la rage en Europe et même la première dans certains pays de l'Est. Sa sensibilité au virus rabique, sa capacité à parcourir de grandes distances et son éventuelle rétention latente du virus durant sa période d'hivernation en font un bon vecteur du virus rabique.

De plus, les territoires des chiens viverrins se superposent largement avec ceux des renards et les chiens viverrins ont souvent été observés en train de partager les terriers de blaireaux lors de leur léthargie hivernale. Ces deux facteurs sont en faveur d'une éventuelle dissémination inter-espèces du virus rabique.

Néanmoins, dans les pays européens concernés par la rage selvatique, il n'est pas explicitement précisé si les chiens viverrins sont essentiellement infectés par une souche « chien viverrin » et/ou par une souche « renard » qu'ils contribuent à entretenir dans le cadre de la circulation de ce virus entre chien viverrin et renard. En effet, la littérature évoque souvent la capacité du chien viverrin à entretenir le virus « renard », en interagissant avec cette espèce. Mais il a également été montré qu'une souche « chien viverrin » circule chez cette espèce. Or, actuellement, très peu de choses sont connues sur la rage chez le chien viverrin, notamment lorsqu'il est infecté par une souche « chien viverrin ». Mis à part l'essai de BOTVINKIN *et al.* en 1984 et les travaux réalisés à l'Anses de Nancy, il n'y a pas eu d'études d'autres équipes sur les paramètres de l'infection « homologue » du chien viverrin (délais d'incubation, excrétion salivaire du virus, issue de l'infection, capacité de transmission intra-espèce...). Or, la connaissance de ces paramètres est extrêmement importante pour une bonne maîtrise de l'émergence de la rage chez cet animal.

DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA PATHOGÉNIE DE LA RAGE CHEZ LE CHIEN VIVERRIN ET DE SON EXCRÉTION SALIVAIRE

J'ai été accueillie à l'Anses Nancy du 3 juillet 2012 au 15 août 2012 pour la réalisation d'une expérimentation, « CnV3 », dont l'objectif était de permettre une estimation des paramètres de l'infection du chien viverrin par une souche de virus rabique isolée du chien viverrin et d'étudier la transmission de cette souche par contact entre individus.

Ce travail s'inscrit dans la continuité logique des quatre études antérieures (CnV 2007, CnV 2008, CnV1 et CnV2) déjà réalisées à l'ANSES Nancy. Les résultats de ces quatre études, qui étaient nécessaires à l'élaboration du protocole de l'expérience CnV3, sont présentés ci-dessous dans un premier temps.

I. Données expérimentales antérieures

Toutes les expérimentations décrites ci-dessous ont été réalisées à la station expérimentale d'Atton du laboratoire de la Rage et de la Faune sauvage de Nancy, entre 2007 et 2012.

1. Protocole CnV 2007

Dans la mesure où un virus isolé d'un chien viverrin naturellement infecté ne tue pas nécessairement un chien viverrin inoculé avec cette souche, le but de cette expérience était de tester cinq souches de virus rabique isolées de chiens viverrins en Pologne sur des chiens viverrins et de constituer un stock à partir d'une de ces souches si elle s'avérait pathogène, en vue des expériences suivantes. Ainsi, cinq chiens viverrins ont été inoculés avec des broyats de cerveau de cinq chiens viverrins polonais reconnus enragés, en intramusculaire. Chaque chien viverrin a été inoculé avec un isolat différent. Comme pour toute inoculation expérimentale, un titrage de la suspension virale a été effectué par voie intracérébrale sur des souris pour chacun des cinq isolats testés. Des prélèvements de salive étaient réalisés deux fois par semaine sur les chiens viverrins et des prises de sang une fois par semaine. Quand un animal mourait, un diagnostic de rage était réalisé et les glandes salivaires sous-maxillaires

étaient prélevées pour le test d'immunofluorescence. Si les animaux n'étaient pas morts trois mois après inoculation, ils étaient euthanasiés et un diagnostic de rage était réalisé.

Résultats : Sur les cinq chiens viverrins inoculés, quatre sont morts de rage et un a survécu. Le cerveau du chien viverrin mort le plus rapidement a été prélevé pour réaliser le stock de virus qui est utilisé dans toutes les expériences suivantes.

Remarque importante : tout au long de ce travail expérimental, les titres infectieux des suspensions virales préparées à partir d'un broyat d'organes sont toujours rapportés à l'organe « pur ». Par défaut, les stocks utilisés pour l'inoculation des animaux sont préparés à la dilution de 1/5 en poids par volume, soit -0,7 en logarithmes décimaux. Ce qui signifie que pour un stock titrant 10^5 DL₅₀IC souris/ml, le titre du liquide contenu dans l'ampoule est en fait de $10^{4,3}$ DL₅₀IC souris/ml à cause du facteur de dilution.

2. Protocole CnV 2008

Le but de cette expérience était d'étudier la pathogénie de la souche de virus rabique polonaise sélectionnée à l'issue du protocole CnV 2007. Pour cela, 19 chiens viverrins répartis en 5 groupes ont été inoculés par voie intramusculaire avec le stock issu du protocole CnV 2007. Des observations cliniques étaient réalisées tous les jours, des prises de salive et de sang trois fois par semaine pour la virologie et des prises de sang une fois par semaine pour la sérologie. Quand un animal mourait, le système nerveux central était prélevé pour le diagnostic de rage et les glandes salivaires sous-maxillaires et parotides prélevées pour faire un test d'immunofluorescence. Si trois mois après l'inoculation des animaux étaient toujours vivants, le suivi sérologique devenait mensuel.

Résultats : les résultats sont consignés dans le *Tableau 2* ci-dessous. Ce protocole a permis une première estimation de la DL₅₀ pour le chien viverrin par voie intramusculaire de ce stock.

Tableau 2 : Résultats obtenus lors du protocole CnV 2008

groupe	transpondeur	-log (dilution)	délai mortalité (j)	nombre jours avant 1ers signes (j)	durée phase clinique (j)	diagnostic SNC	Diagnostic GS	bilan survie
N°1	646-6321	0,7	21	14	7	POS	POS	Mort
N°1	634-96DC	0,7	27	18	9	POS	POS	Mort
N°1	633-8CF74	0,7	17	17	0	POS	POS	Mort
N°2	646-71BC	2,2	40	22	18	POS	POS	Mort
N°2	633-6A67	2,2	24	12	12	POS	POS	Mort
N°2	635-29F9	2,2	23	18	5	POS	POS	Mort
N°2	646-1E2D	2,2	23	23	0	POS	POS	Mort
N°3	634-A96E	3,7	47	25	22	POS	POS	Mort
N°3	633-8A90	3,7	28	27	1	POS	POS	Mort
N°3	634-B050	3,7	35	26	9	POS	POS	Mort
N°3	633-91FC	3,7	31	26	5	POS	POS	Mort
N°4	633-6932	5,2	-	-	-			Vivant
N°4	646-A2D3	5,2	-	-	-			Vivant
N°4	633-6E6A	5,2	-	-	-			Vivant
N°4	634-B7F8	5,2	-	-	-			Vivant
N°5	646-7CDF	6,7	-	-	-			Vivant
N°5	646-1B0B	6,7	-	-	-			Vivant
N°5	633-90E1	6,7	-	-	-			Vivant
N°5	633-7786	6,7	-	-	-			Vivant

3. Protocole CnV 1

Le but de cette expérience était de produire un stock d'épreuve à partir des glandes salivaires inoculées, les stocks d'épreuve étant en général constitués à partir d'un broyat des glandes salivaires sous-maxillaires et parfois aussi des parotides. Pour cela, le surnageant d'un broyat au 1/5 de cerveau de chien viverrin mort lors du protocole CnV 2007 et ayant servi aux inoculations du protocole CnV 2008 a été utilisé. Une dilution à 10^{-3} de ce stock a ainsi été utilisée pour inoculer cinq chiens viverrins par voie intramusculaire (muscle temporal), ce qui

correspond après le titrage de contrôle sur souris à $10^{2,5}$ DL₅₀ICS. Un suivi clinique était réalisé quotidiennement. Pendant la période de suivi intensif, des prélèvements de salive étaient effectués tous les jours et des prises de sang une fois par semaine. Par la suite, ces prélèvements n'étaient réalisés plus qu'une fois par mois. Quand un animal mourait, le système nerveux central, les glandes salivaires sous-maxillaires et parotides étaient prélevés pour le diagnostic par immunofluorescence. Si 90 jours après inoculation des animaux étaient toujours vivants, ils étaient euthanasiés et un prélèvement de salive et de sang était réalisé avant la mort.

Afin d'avoir le plus grand effectif possible d'animaux inoculés à partir d'un stock unique, le stock préparé lors de l'expérience CnV2007 a continué à être utilisé. Cet effectif important et l'utilisation de dilutions différentes du stock facilite le calcul du titre de ce stock pour le chien viverrin.

Résultats : les résultats sont consignés dans le *Tableau 3* ci-dessous.

Tableau 3 : Résultats obtenus lors du protocole CnV1

transpondeur	-log (dilution)	délai mortalité (j)	nombre jours avant 1ers signes (j)	durée phase clinique (j)	diag SNC	diag GS	bilan survie	dose inoculée log(DL50ICS) Réelle
695-AD53	3	-	-	-			Vivant	2,5
695-870A	3	25	21	4	POS	POS	Mort	2,5
695-B27C	3	35	31	4	POS	POS	Mort	2,5
695-A0BD	3	20	18	2	POS	NEG	Mort	2,5
695-B304	3	142	142	0	POS	POS	Mort	2,5

4. Protocole CnV 2

Le but de cette expérience était d'affiner la détermination de la DL₅₀ par voie intramusculaire du stock constitué lors du protocole CnV2007. Pour cela, 15 chiens viverrins répartis en 4 groupes ont été inoculés par voie intramusculaire avec les dilutions suivantes : 10^{-1} , $10^{-2,5}$, 10^{-4} et $10^{-5,5}$. Un chien viverrin n'a pas été inoculé et a servi de témoin. Un suivi clinique quotidien était réalisé. Pendant la période de suivi intensif de un mois, des

prélèvements de salive étaient effectués tous les lundis, mercredis et vendredis et des prises de sang une fois par semaine. Par la suite, pendant deux mois, ces prélèvements n'étaient réalisés plus qu'une fois par mois. Quand un animal mourait, le système nerveux central, les glandes salivaires sous-maxillaires et parotides étaient prélevés pour le diagnostic de rage. Si 90 jours après inoculation des animaux étaient toujours vivants, ils étaient euthanasiés et un prélèvement de salive et de sang était réalisé avant la mort.

Résultats : les résultats sont consignés dans le *Tableau 4* ci-dessous. Ce protocole a permis la détermination de façon précise de la DL₅₀ intramusculaire de cette souche.

Tableau 4 : Résultats obtenus lors du protocole CnV2

groupe	transpondeur	-log (dilution)	délai mortalité (j)	nombre jours avant 1ers signes	durée phase clinique (j)	diag SNC	diag GS	bilan survie	dose inoculée log(DL50ICS) REELLE
1	695-8E86	1	-	-	-			Vivant	3,9
1	695-9B8C	1	-	-	-			Vivant	3,9
1	695-A0F4	1	18	18	0	POS		Mort	3,9
1	695-B080	1	33	33	0	POS	NEG	Mort	3,9
2,5	695-AA22	2,5	33	33	0	POS	POS	Mort	2,4
2,5	695-AB9B/ 695-8FB7	2,5	38	38	0	POS	POS	Mort	2,4
2,5	695-AD85	2,5	29	29	0	POS	NEG	Mort	2,4
2,5	695-82F0	2,5	19	18	1	POS		Mort	2,4
4	695-ABD8	4	41	41	0	POS	POS	Mort	0,9
4	695-AB1D	4	44	42	2	POS	POS	Mort	0,9
4	695-A277	4	-	-	-			Vivant	0,9
4	695-A0D2	4	54	54	0	POS	POS	Mort	0,9
5,5	695-A97B	5,5	-	-	-			Vivant	-0,6
5,5	695-8F19	5,5	-	-	-			Vivant	-0,6
5,5	695-AA2C	5,5	-	-	-			Vivant	-0,6

En combinant ces résultats et ceux obtenus lors de l'expérience CnV2008, on obtient le tableau suivant (*Tableau 5*) :

Tableau 5 : Pourcentage de morts en fonction de la dilution de l'inoculum pour déterminer le titre du stock utilisé

-log(dilution)	Nombre d'animaux inoculés	Nombre de morts	Pourcentage de morts
0,7	3	3	100%
1,0	4	2	50%
2,2	4	4	100%
2,5	4	4	100%
3,7	4	4	100%
4,0	4	3	75%
5,2	4	0	0%
5,5	3	0	0%
6,7	4	0	0%

II. Matériel et méthodes protocole CnV3

Le protocole CnV3 est celui auquel j'ai participé. Cette expérience a consisté à inoculer un chien viverrin avec une dose correspondant à quelques DL_{100} alors que l'animal qui partageait sa cage recevait un placebo. Le but de cette expérience était de suivre l'excrétion salivaire et la séroconversion lors de contamination dans des conditions « naturelles ».

Ce protocole a été soumis à un comité d'éthique (saisine du Cometh Anses/ ENVA/ UPEC) et a reçu un agrément.

1. Animaux

L'étude comprend 24 chiens viverrins, tous nés en 2009. Ces animaux sont originaires de l'élevage de Mme Maarit Mohaibes, en Finlande, et sont arrivés au centre d'expérimentation de l'ANSES Nancy le 31 Décembre 2009. A la station expérimentale, les animaux sont vermifugés, et vaccinés une fois par an contre la maladie de Carré, l'hépatite de Rubarth, la parvovirose, le virus para-influenza 3 et la leptospirose.

Le 25 Mai 2012, ces chiens viverrins ont été répartis aléatoirement en 11 groupes de 2 dans des cages deux fois plus grandes que celles dans lesquelles ils sont logés d'habitude, pour leur permettre de s'habituer l'un à l'autre avant inoculation. Les deux chiens viverrins servant de témoin sont restés dans des cages individuelles. Les cages individuelles mesurent 94x110x74cm (largeur x profondeur x hauteur) ce qui fait une surface au sol d'un peu plus de 1m². Chaque cage est équipée d'une caisse en bois qui sert d'abri.

L'âge et le sexe ne sont pas considérés comme importants dans cette expérience.

N.B. : Initialement, l'expérience prévoyait 25 chiens viverrins répartis en 12 groupes et un seul témoin, mais les chiens viverrins d'une cage s'étant violemment battus au moment où ils ont été mis dans la même cage, l'animal blessé a été isolé et retiré de l'expérience (le 19 Juin 2012), et son compagnon de cage est devenu le second témoin du protocole.

2. Inoculation

Le stock de virus utilisé est le surnageant d'un broyat au 1/5 du cerveau du chien viverrin n° 634-AABD, inoculé avec l'isolat polonais n° 11993-2804-06RD obtenu sur un chien viverrin naturellement enragé (protocole CnV2007).

Dans chaque cage, un animal est inoculé avec la suspension virale et l'animal contact reçoit une injection identique de diluant (DMEM avec antibiotiques). Les animaux reçoivent une injection intramusculaire profonde de 0,5 ml dans chaque muscle temporal (soit 1 ml au total pour chaque animal) (*cf. Photo 6 ci-dessous*).

L'animal inoculé est tiré au sort dans chaque cage. Un tirage à pile ou face est effectué sur le premier chien viverrin attrapé dans la cage : Pile = le chien est inoculé ; Face = le chien reçoit le placebo.

Les 2 animaux témoins ne reçoivent pas d'injection.

Deux dilutions du stock sont utilisées pour l'inoculation : $10^{-2,2}$ et $10^{-3,6}$.

Aléatoirement (par tirage à pile ou face lors de la capture du premier chien viverrin de la cage), les chiens viverrins inoculés des 5 groupes dans les cages à gauche en entrant dans le bâtiment sont inoculés avec la dilution à $10^{-2,2}$ (groupe 1) et les chiens viverrins inoculés des 6 groupes des cages à droite reçoivent la dilution à $10^{-3,6}$ (groupe 2).

Lors de la préparation des dilutions, le matin même des inoculations, soit le vendredi 6 Juillet 2012, 100 µl de la dilution initiale ($10^{-0,7}$) sont prélevés pour la caractérisation de la souche (séquençage de 600 paires de bases du gène correspondant à la protéine N).

Photo 6 : Inoculation du virus en intramusculaire dans le muscle temporal (*crédits photo E. MARTIN*)



3. Suivi des animaux

Cette expérience a duré 3 mois. Du 16 juillet 2012 au 24 août 2012, un suivi intensif a été réalisé, avec des prélèvements de salive et un suivi clinique journalier ainsi que des prises de sang hebdomadaires (le mercredi). Par la suite, le suivi a été allégé et seul le suivi clinique quotidien est réalisé ainsi que les prélèvements *post-mortem*.

Suivi clinique :

Une observation clinique quotidienne est effectuée par défaut lors du nourrissage des animaux. Lorsque les signes cliniques débutent, les animaux sont contrôlés au moins 2 fois par jour. Lors de ces observations, tout signe semblant anormal ou inhabituel est enregistré. Pendant la période de suivi intensif, les observations quotidiennes sont notées sur le formulaire de suivi clinique.

Les signes considérés comme importants et évocateurs du début de la maladie sont des signes nerveux : agressivité marquée et inhabituelle, troubles de la démarche et de l'équilibre, prociidence de la 3^{ème} paupière (*cf. Annexe I*).

La **durée d'incubation** est définie comme la durée entre la date d'inoculation de l'animal et la date où cet animal présente son premier signe clinique. Dans le cas où l'animal ne présente aucun signe clinique avant de mourir, la durée d'incubation est assimilée par défaut à la durée entre l'inoculation de l'animal et sa mort, soit le délai de mortalité.

La **durée de la phase clinique** correspond à la durée entre le jour d'apparition des symptômes et le jour de la mort de l'animal. Dans le cadre du protocole de gestion de la souffrance animale, un point limite a été défini : les animaux paralysés ou présentant des signes nerveux pendant deux jours sont euthanasiés. Dans ces cas, la durée de la phase clinique correspond à la durée entre l'apparition des symptômes et l'euthanasie, le délai entre cette euthanasie et la mort naturelle étant considéré comme négligeable.

Prélèvements sur animaux vivants:

Tout au long de cette expérience, les animaux ont été manipulés vigiles.

Pour la salive, 2 prélèvements sont réalisés à chaque fois.

-L'animal est attrapé et mis sur une table. Son transpondeur est lu (*cf. Photo 7*). Une fois sa gueule liée, une salivette® synthétique¹ préalablement tarée est placée dans un cul-de-sac gingival et laissée jusqu'à la fin des autres prélèvements (*cf. Photo 8*). Lors de son retrait, le tampon est délicatement frotté dans les deux culs-de-sac gingivaux et contre les dents. Une

¹ Des tampons de cellulose peuvent piéger des immunoglobulines ou des particules virales et ne pas les relâcher, ce qui n'arrive pas avec des fibres synthétiques comme le dragon par exemple.

fois le coton récupéré, la salivette® est immédiatement pesée et un volume de DMEM correspondant à 4 fois le volume de salive prélevé est déposé sur le tampon, qui est ensuite placé au réfrigérateur à +4°C en attendant la fin des prélèvements de la journée.

-Pendant que le coton est en place, un petit écouvillon en fibres synthétiques est frotté contre les dents et dans les culs-de-sacs gingivaux. Une fois l'écouvillon bien imbibé de salive, il est immédiatement placé dans un tube contenant 1ml de solution de lyse pour les analyses par biologie moléculaire (cf. *Photo 9*). Le tube est ensuite également placé à +4°C en attendant la fin des prélèvements.

Les prises de sang pour le suivi sérologique sont réalisées, à la veine jugulaire, à l'aide d'une monovette® sérum de 7,5 ml (cf. *Photo 10*). En attendant leur centrifugation, les monovettes® sont laissées à température ambiante, sur la paillasse du laboratoire pour que la coagulation et la rétraction du caillot se fassent plus rapidement.

Photo 7 : Lecture du transpondeur d'un chien viverrin (*crédits photo E. MARTIN*)



Photo 8 : Mise en place d'une salivette® dans le cul-de-sac gingival gauche (*crédits photo E. MARTIN*)



Photo 9 : Ecouvillon en fibres synthétiques (à gauche) et tube contenant la solution de lyse (à droite) pour le recueil de la salive pour les analyses par biologie moléculaire (crédits photo E. MARTIN)

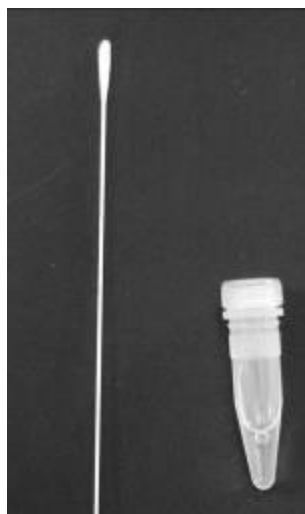
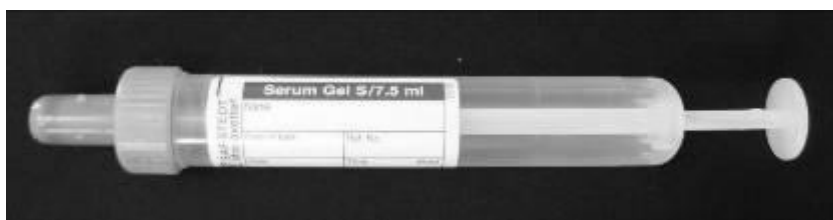


Photo 10 : Monovette® sérum de 7,5 ml pour les prélèvements de sang (crédits photo E. MARTIN)



Prélèvements sur cadavre :

L'autopsie est réalisée au plus tard le lendemain de la mort de l'animal, le lundi pour les animaux morts le week-end.

Lors de l'autopsie, un jeu d'instruments est utilisé pour accéder aux différents organes, puis un jeu est utilisé par organe afin d'éviter des contaminations croisées.

-Glandes salivaires : les glandes sous-maxillaires et parotides sont prélevées. Lors du prélèvement, des empreintes sont réalisées sur lames puis fixées dans l'acétone à -20°C pendant une demi-heure pour effectuer un test d'immunofluorescence. Les glandes sont ensuite broyées à 1/5 (poids/volume). Le broyat est centrifugé pendant 30 minutes à 2000g à +4°C. Deux cents µl de surnageant sont prélevés pour la culture cellulaire, le reste est congelé à -80°C.

-Système nerveux central, poumon et rein : ils sont prélevés et placés dans des pots identifiés avant transfert à Malzéville pour diagnostic (test d'immunofluorescence et culture cellulaire).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MEMOIRE

Un fragment de cerveau du premier chien viverrin mort de rage est transmis pour séquençage et identification de la souche.

4. Traitement des prélèvements – Analyses

-Salivettes® pour la culture cellulaire :

Après le traitement de la dernière salivette (pesée et ajout du DMEM pour obtenir une dilution de salive à 1/5), toutes les salivettes sont centrifugées 30 minutes à 2000g à 4°C. L'éluat est récupéré dans un cryotube de 2 ml placé sur une barrette en aluminium pour le transport au laboratoire de Malzéville et congelé à -80°C sur place. Ces salives sont transportées à Malzéville pour leur analyse dans un bidon de transport en vapeur d'azote à -160°C. A l'arrivée, les salives sont congelées à -80°C pendant au moins une semaine avant d'être analysées afin d'effectuer l'analyse pendant la période de stabilité du titre après congélation.

Lors de l'inoculation aux cellules de neuroblastome murin N2a, 50 µl de salive diluée sont inoculés dans une cupule de lab-tek. Ces lab-teks sont incubés 48 heures avec un changement de milieu à J1. Le tapis cellulaire est fixé par l'acétone à -20°C. Le reste de l'éluat est recongelé à -80°C.

-Écouvillons pour la biologie moléculaire :

Les tubes contenant les écouvillons dans la solution de lyse sont placés à -20°C et sont transportés à Malzéville dans des cartons en polystyrène contenant des plaques eutectiques congelées à -20°C.

-Sang pour la sérologie :

Les monovettes® sont laissées sur la paillasse pendant la centrifugation des salives. Ensuite, elles sont centrifugées pendant 30 minutes à 2000g. Les sérums obtenus après centrifugation sont prélevés, placés dans des tubes et conservés à -20°C.

III. Résultats

1. Paramètres de l'infection chez les chiens viverrins inoculés par voie intramusculaire par une souche de virus rabique isolée chez le chien viverrin

a. Mortalité en fonction de la dose de virus inoculé

Les résultats présentés ci-dessous regroupent tous les résultats obtenus lors des différents protocoles (CnV2008, CnV1, CnV2 et CnV3).

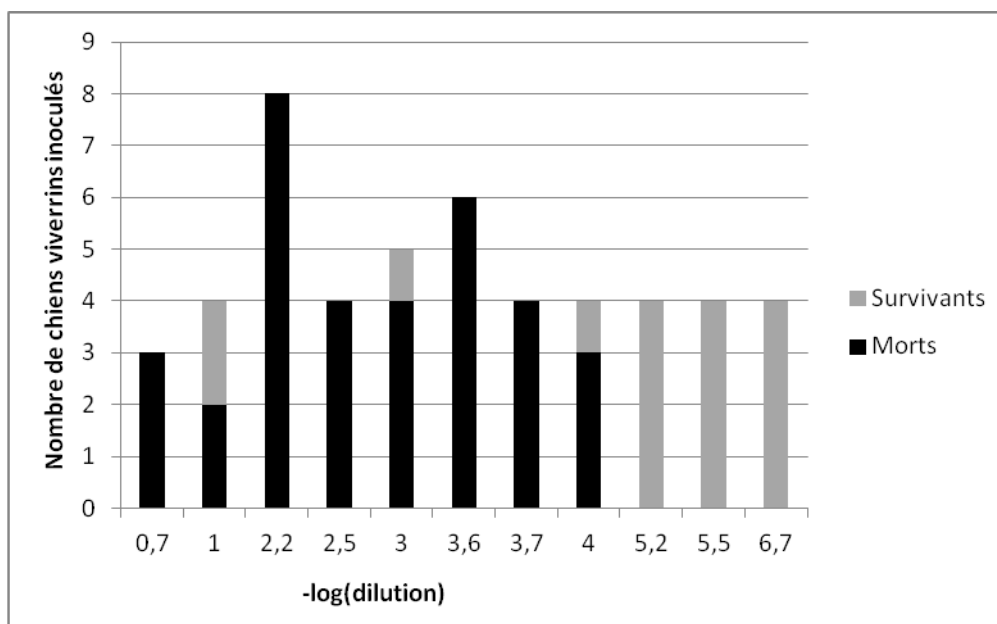
α. Létalité en fonction de la dilution du stock

Tableau 6 : Pourcentages de mortalité des animaux en fonction de la dilution de l'inoculum

-log (dilution)	Nombre d'animaux inoculés	Nombre d'animaux morts	Pourcentage de mortalité (%)
0,7	3	3	100
1	4	2	50
2,2*	8	8	100
2,5	4	4	100
3	5	4	80
3,6	6	6	100
3,7	4	4	100
4	4	3	75
5,2	4	0	0
5,5	3	0	0
6,7	4	0	0

*avant l'inoculation, un chien viverrin de ce groupe (5A) avait un titre protecteur en anticorps neutralisants et il n'est pas mort de rage. Nous avons donc décidé de ne pas le faire figurer dans les résultats.

Figure 8: Nombre d'animaux morts par rapport au nombre d'animaux inoculés en fonction de la dilution (données corrigées ne prenant pas en compte l'animal 5A)



Cent pourcents des animaux inoculés sont morts aux dilutions $10^{-0,7}$, $10^{-2,2}$, $10^{-2,5}$, $10^{-3,6}$ et $10^{-3,7}$ (cf. *Tableau 6 et Figure 8*). Un nombre de morts plus faible a été obtenu aux dilutions 10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-4} , avec des pourcentages d'animaux morts respectifs de 50%, 80% et 75%. Il semble qu'à partir de la dilution $10^{-5,2}$, la quantité de virus inoculé soit trop faible pour induire la maladie puisqu'à ces dilutions, aucun chien viverrin n'est mort ou n'a présenté des symptômes.

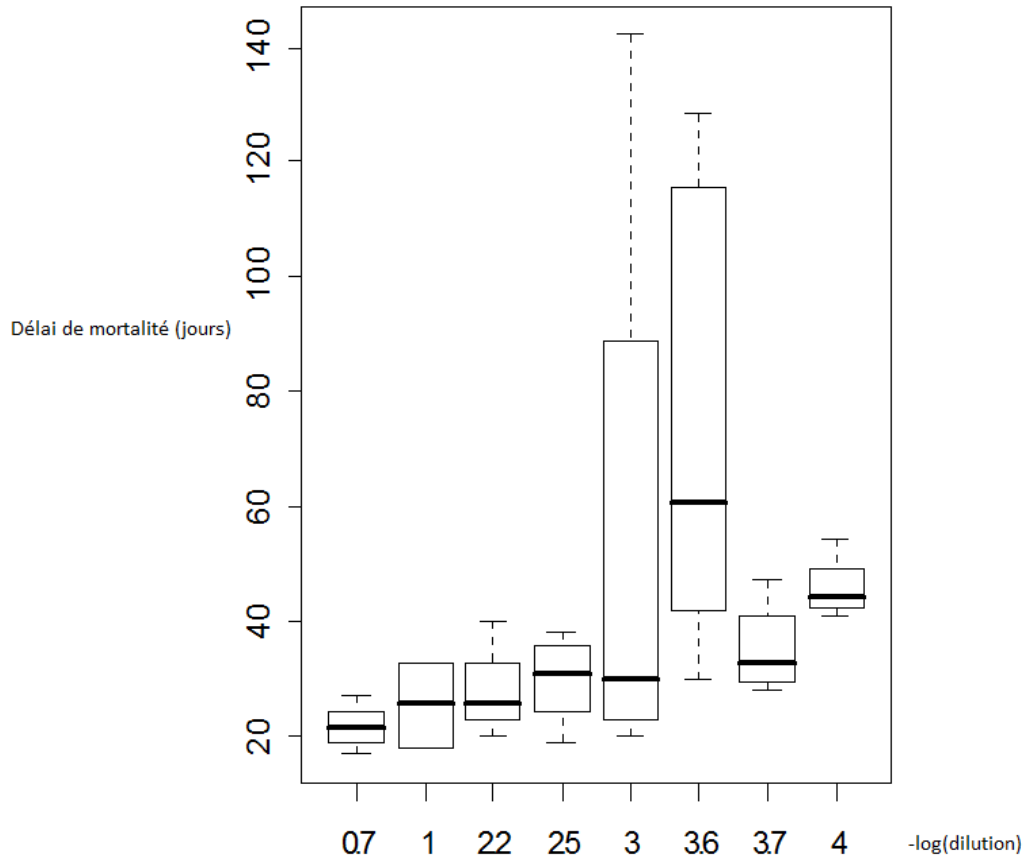
Cent pourcents des diagnostics de rage sur le système nerveux central des chiens viverrins morts se sont révélés positifs.

β. Délai de survenue de la mort en fonction de la dose inoculée

Tableau 7 : Délais de mortalité moyens des chiens viverrins inoculés en fonction de la dilution de l'inoculum

-log (dilution)	Délai de mortalité (jours)						Nombre d'animaux inoculés morts
	Moyenne	Min	25%	Médiane	75%	Max	
0,7	21,67	17,00	17,00	21,00	27,00	27,00	3
1	25,50	18,00	18,00	25,50	33,00	33,00	2
2,2	27,88	20,00	23,00	26,00	32,50	40,00	8
2,5	29,75	19,00	24,00	31,00	35,50	38,00	4
3	55,50	20,00	22,50	30,00	88,50	142,00	4
3,6	72,67	30,00	42,00	60,50	115,00	128,00	6
3,7	35,25	28,00	29,50	33,00	41,00	47,00	4
4	46,33	41,00	41,00	44,00	54,00	54,00	3

Figure 9 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des délais de mortalité en fonction de la dilution de l'inoculum



Pour toutes les dilutions confondues, les délais de mortalité sont compris entre 17 jours et 142 jours (obtenus respectivement aux dilutions $10^{-0,7}$ et 10^{-3}). En moyenne, les chiens viverrins inoculés avec les différentes dilutions sont morts entre 21,67 jours et 72,67 jours après leur inoculation (cf. Tableau 7).

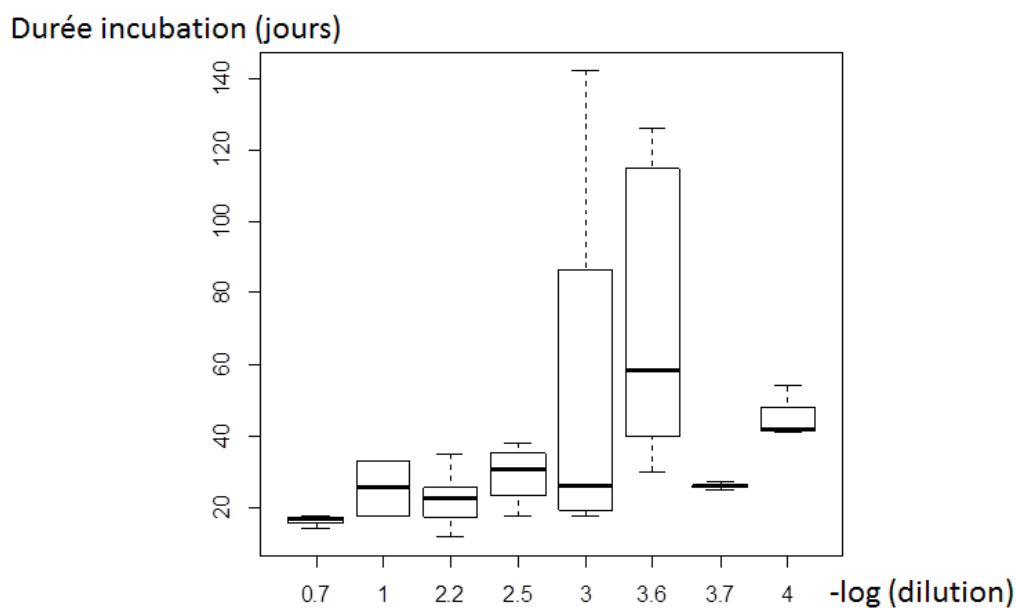
Graphiquement, on peut observer une tendance à l'augmentation du délai de mortalité quand la dilution de l'inoculum augmente (cf. Figure 9). On peut confirmer cette tendance statistiquement car il existe une corrélation positive entre le délai de mortalité et la dilution de l'inoculum (coefficient de Spearman = 0,6349855, $p = 5,484.10^{-5}$). Ainsi, plus on a dilué le virus inoculé, plus les chiens viverrins qui contractaient la rage ont mis du temps à mourir, dans la mesure où la quantité de virus inoculée est restée suffisante pour induire la maladie.

b. Incubation et symptomatologie

Tableau 8 : Durée moyenne de la phase d'incubation en fonction de la dilution de l'inoculum

-log (dilution)	Durée d'incubation (jours)						Nombre d'animaux inoculés morts
	Moyenne	Min	25%	Médiane	75%	Max	
0,7	16,33	14,00	14,00	17,00	18,00	18,00	3
1	25,50	18,00	18,00	25,50	33,00	33,00	2
2,2	22,25	12,00	17,50	22,50	25,50	35,00	8
2,5	29,50	18,00	23,50	31,00	35,50	38,00	4
3	53,00	18,00	19,50	26,00	86,50	142,00	4
3,6	71,33	30,00	40,00	58,50	115,00	126,00	6
3,7	26,00	25,00	25,50	26,00	26,50	27,00	4
4	45,67	41,00	41,00	42,00	54,00	54,00	3

Figure 10 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des durées d'incubation en fonction de la dilution de l'inoculum



Sur l'ensemble des chiens viverrins inoculés, l'incubation varie entre 12 et 142 jours (respectivement pour des dilutions de $10^{-2.2}$ et 10^{-3}). Mais en moyenne, les durées d'incubation varient entre 16,33 jours (dilution $10^{-0.7}$) et 71,33 jours (dilution $10^{-3.6}$) (cf. *Tableau 8*).

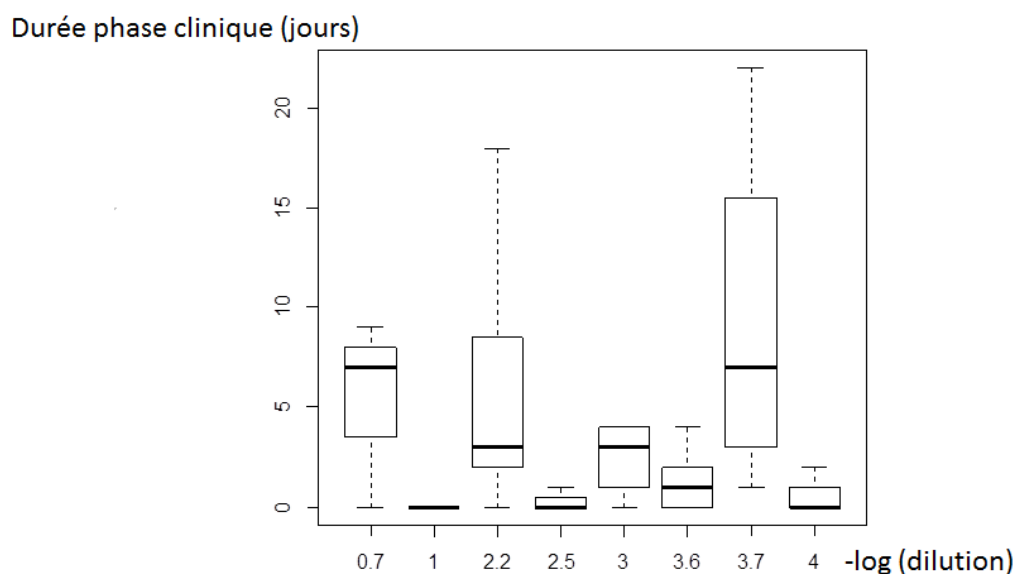
Il existe une corrélation positive entre la durée d'incubation et la dilution utilisée (coefficient de Spearman = 0,6175444, $p = 9,989.10^{-5}$). Ainsi, plus le virus inoculé a été dilué, plus la durée d'incubation s'est allongée dans notre étude.

Pour ce qui est de la symptomatologie, aucun symptôme vraiment caractéristique n'a été observé. La première manifestation notée était une baisse d'appétit ou un arrêt de consommation de l'aliment, cette constatation n'étant retenue comme le début de la phase clinique que si l'animal développait ensuite rapidement des signes nerveux (changement de comportement, boiterie,...). Un autre signe fréquemment observé était un état d'irritabilité marqué, avec des réactions aux stimuli exagérées.

Tableau 9 : Durée moyenne de la phase clinique en fonction de la dilution

-log (dilution)	Durée de la phase clinique des animaux morts (jours)						Nombre d'animaux inoculés morts
	Moyenne	Min	25%	Médiane	75%	Max	
0,7	5,33	0,00	0,00	7,00	9,00	9,00	3
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2
2,2	5,62	0,00	2,00	3,00	8,50	18,00	8
2,5	0,25	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00	4
3	2,50	0,00	1,00	3,00	4,00	4,00	4
3,6	1,33	0,00	0,00	1,00	2,00	4,00	6
3,7	9,25	1,00	3,00	7,00	15,50	22,00	4
4	0,67	0,00	0,00	0,00	2,00	2,00	3

Figure 11 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des durées de la phase clinique en fonction de la dilution



La durée des symptômes varie de 0 jours à 22 jours selon la dilution. Mais en moyenne, la durée de la phase clinique est plutôt comprise entre 0 et 9 jours selon la dilution utilisée (cf. *Tableau 9*). Chez 35% des chiens viverrins inoculés qui ont déclaré la rage, aucun symptôme n'a été mis en évidence avant qu'ils soient retrouvés morts (12 animaux sans symptômes vus sur les 34 animaux inoculés ayant déclaré la rage).

Graphiquement, il ne semble pas y avoir de corrélation entre ces durées et la dilution de l'inoculum (cf. Figure 11). Cette absence de corrélation est confirmée statistiquement (coefficient de Spearman = -0,07091222, p = 0,6902).

c. Excrétion salivaire du virus

Tableau 10 : Pourcentage de résultats positifs sur les glandes salivaires en fonction de la dilution de l'inoculum

-log (dilution)	Nombre de glandes salivaires testées pour le diagnostic de rage	Nombre de résultats positifs aux tests sur les glandes salivaires	Pourcentage de résultats positifs aux tests sur les glandes salivaires (%)
0,7	3	3	100
1	1	0	0
2,2	8	8	100
2,5	3	2	67
3	4	3	75
3,6	6	6	100
3,7	4	4	100
4	3	3	100

Cent pourcents des tests diagnostiques sur les glandes salivaires des chiens viverrins se sont révélés positifs aux dilutions $10^{-0,7}$, $10^{-2,2}$, $10^{-3,6}$, $10^{-3,7}$ et 10^{-4} . A la dilution 10^{-1} , un seul test sur glandes salivaires a pu être réalisé et s'est révélé négatif (cf. Tableau 10). Ce résultat est donc peu significatif. A la dilution $10^{-2,5}$, 67% des résultats de ces tests ont été positifs et 75% à la dilution 10^{-3} .

La majeure partie des chiens viverrins inoculés avec différentes dilutions du virus ont donc excrété du virus dans leur salive à un moment donné puisque le test sur leurs glandes salivaires s'est révélé positif.

Les prélèvements quotidiens de salive lors du suivi intensif du protocole CnV3 ont permis d'établir plus précisément une cinétique de l'excrétion salivaire chez le chien viverrin en fonction de la dose inoculée.

Tableau 11 : Animaux inoculés lors du protocole CnV3 ayant présenté au moins une culture cellulaire de salive positive avant de mourir

Animal inoculé	Groupe	Nombre de jours entre le premier résultat positif sur salive en culture cellulaire et le premier symptôme*(durée de l'excrétion pré-symptomatique)	Nombre de jours entre le premier résultat positif sur salive en culture cellulaire et la mort de l'animal (durée totale de l'excrétion)
4A	1	2	5
8A	2	2	2
9B	2	3	3

*Pour les chiens viverrins 8A et 9B qui sont morts sans qu'aucun symptôme n'ait été observé, le premier symptôme est assimilé au moment de la mort.

Deux techniques ont été utilisées pour analyser les échantillons de salive : recherche de l'ARN viral par PCR et isolement du virus par culture cellulaire. Sur les sept animaux inoculés dont la salive a pu être testée jusqu'au jour de leur mort, seuls trois animaux (4A, 8A et 9B, cf. *Tableau 11*) ont présenté des cultures cellulaires de salive positives alors que tous se sont révélés positifs à la PCR.

On peut donc affirmer pour ces trois animaux la présence du virus complet dans leur salive, capable de se répliquer, alors qu'ils étaient encore asymptomatiques, donc en fin de phase d'incubation. Ainsi, les chiens viverrins 4A et 8A ont présenté une excrétion salivaire pré-symptomatique de 2 jours et le 9B de 3 jours.

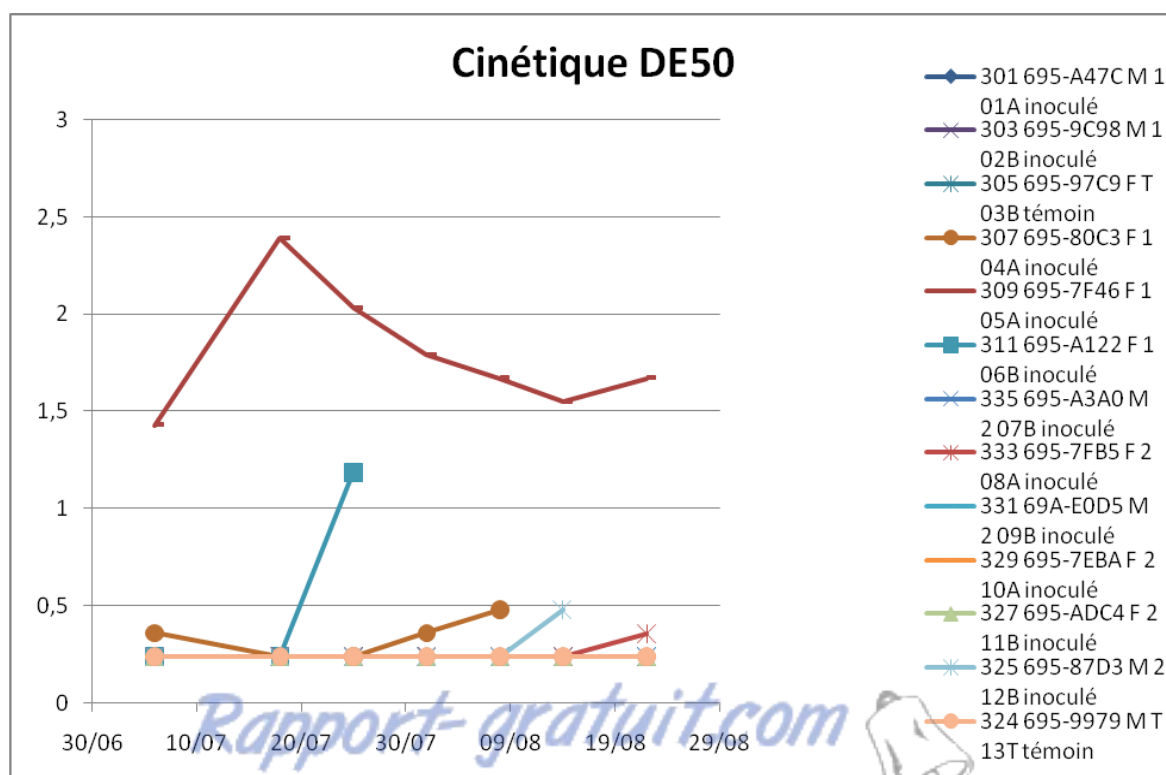
Tableau 12 : Moyennes des durées entre la première détection du génome viral dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme (biologie moléculaire, protocole CnV3)

-log (dilution)	Nombre de jours entre la première détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme						Nombre d'animaux inoculés morts
	Moyenne	Min	25%	Médiane	75%	Max	
2,2	3,33	0,00	0,00	4,00	6,00	6,00	4
3,6	1,25	0,00	0,00	1,00	2,50	3,00	3

Une durée maximale de 6 jours entre le premier résultat PCR positif sur la salive et l'apparition des symptômes a été observée sur un chien viverrin inoculé à la dilution $10^{-2,2}$. La biologie moléculaire n'a pas mis en évidence de génome viral dans la salive de certains animaux avant qu'ils ne présentent des symptômes (trois animaux). En moyenne, l'ARN viral était détecté par PCR dans la salive 3,33 jours avant l'apparition des premiers symptômes pour les animaux inoculés à la dilution $10^{-2,2}$ et 1,25 jour à la dilution $10^{-3,6}$ (cf. *Tableau 12*). Statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs obtenues dans les deux groupes (Test de Mann-Whitney/Wilcoxon $p > 0,05$).

d. Sérologie

Figure 12 : Cinétique du titre neutralisant des animaux inoculés lors du protocole CnV3



Sur la *Figure 12*, ci-dessus, on peut observer qu'un chien viverrin (5A) se démarque avec un taux d'anticorps élevé dès la première prise de sang, soit le jour même de l'inoculation (prise de sang réalisée avant l'injection du virus). Ainsi, avant même l'inoculation, cet animal a présenté un titre en anticorps antirabiques neutralisants de 0,66 UI/ml. Ce titre élevé est à mettre en relation avec le fait que cet animal est le seul animal inoculé lors du protocole CnV3 qui n'a pas déclaré de rage et qui n'est pas mort.

Une variation de +/-0,36 logarithmes dans la valeur de la dilution efficace 50% (DE50) n'est pas significative dans le test de séro-neutralisation sur cellules utilisé ici.

Quatre autres chiens viverrins inoculés ont présenté une variation de leur titre en anticorps au cours des différentes sérologies réalisées (4A, 6B, 8A et 12B). Néanmoins, pour les animaux 4A, 8A et 12B, ce titre est resté bas (0,06 à 0,07 UI/ml, variation de moins de 0,36 logarithmes sur la DE50). Ces variations ne sont donc pas significatives et correspondent en fait aux variations liées à la méthode. Le chien viverrin 6B présente une réelle séroconversion puisque son titre s'est élevé à 0,38 UI/ml un jour avant de mourir.

Les deux chiens viverrins témoins n'ont pas présenté de séroconversion puisque leur titre est toujours resté bas et stable (0,04 UI/ml).

e. Diffusion centrifuge du virus

Nous avons vu ci-dessus les résultats de la mise en évidence du virus rabique et/ou du génome viral dans les glandes salivaires des chiens viverrins morts de rage, ce qui constitue une première démonstration de la diffusion centrifuge du virus.

La recherche du virus par culture cellulaire et par immunofluorescence sur des portions de reins et de poumons a également été réalisée.

Tableau 13 : Recherche de virus rabique dans les reins et les poumons des animaux inoculés morts de rage (IF : immunofluorescence ; CELL : culture cellulaire)

Groupe	log(dose inoculée) DL ₅₀ ICS	Nombre de résultats positifs				Nombre d'animaux testés
		Rein IF	Rein CELL	Poumon IF	Poumon CELL	
1	3,1	0	0	1	0	3
2	1,7	0	1	0	0	6
1 et 2		0	1	1	0	9

Seule une culture cellulaire sur rein s'est révélée positive (animal 7B, groupe 2). De même, un seul diagnostic de rage par immunofluorescence sur poumon a été positif (animal 1A, groupe 1) (*cf. Tableau 13*).

f. Bilan des inoculations

Au cours de ce projet, 45 chiens viverrins ont été inoculés avec le même stock de virus d'épreuve préparé sur le chien viverrin numéro 634-AABD. Différentes dilutions ont été utilisées et le pourcentage de mortalité a été noté, ce qui permet de calculer le titre infectieux de ce stock par voie intramusculaire chez le chien viverrin.

En utilisant la méthode graphique des néoprobits (*cf. Annexe 2*), on arrive à un titre de $10^{4.5}$ DL₅₀ par voie intramusculaire pour le chien viverrin par millilitre de cerveau (ce stock d'épreuve étant un broyat à 1/5 du cerveau d'un chien viverrin). En tenant compte de ce titre, le groupe de chiens viverrins numéro un de la manip CnV3 qui a reçu 1 ml de la dilution $10^{-2.2}$ du stock a donc reçu environ 200 DL₅₀ et le groupe qui a reçu 1 ml de la dilution $10^{-3.6}$ a reçu environ 8 DL₅₀ (*cf. détails des calculs Annexe 3*). L'examen de la courbe sur papier néoprobit permet d'estimer la valeur de la DL₁₀₀ à environ $10^{0.8}$ soit 6 DL₅₀. Le premier groupe de chiens viverrins inoculés a donc reçu environ 33 DL₁₀₀ et le deuxième groupe en a reçu 1,3.

2. Transmission du virus aux animaux contacts

a. Mortalité des animaux contacts

Tableau 14: Bilan de survie des animaux contacts du protocole CnV3. *N.B.* : les animaux notés comme « morts » dans le tableau sont tous morts de rage (diagnostic positif sur SNC).

Groupe	Chiens viverrins contacts	Bilan de survie	Date de la mort
1	1B	Vivant	
	2A	Mort	19 août 2012
	4B	Mort	23 août 2012
	6A	Mort	7 août 2012
2	7A	Mort	1 ^{er} octobre 2012
	8B	Mort	3 septembre 2012
	9A	Mort	17 août 2012
	10B	Mort	9 novembre 2012
	11A	Mort	10 février 2013
	12A	Vivant	

Tableau 15 : Pourcentages de mortalité et de survie des animaux contacts en fonction des groupes.

Groupe	log(dose inoculée) DL ₅₀ ICS	Nombre de morts parmi les contacts* (% de mortalité)	Nb. de survivants parmi les contacts* (% de survie)	Nombre d'animaux contacts*
1	3,1	3 (75%)	1 (25%)	4
2	1,7	5 (83%)	1 (17%)	6
1 et 2		8 (80%)	2 (20%)	10

*Dans ce tableau, on ne retient que les animaux contacts pour lesquels le chien viverrin inoculé est mort de rage et peut donc être considéré comme excréteur ou potentiellement excréteur du virus rabique (l'animal 5B est donc retiré).

Sur les cinq chiens viverrins contacts du groupe 1, trois sont morts de rage. Pour le groupe 2, cinq des six chiens contacts sont morts de rage (*cf. Tableau 14*). Toutefois, il faut apporter une correction aux valeurs obtenues dans le groupe 1. Comme il est dit plus haut, le chien viverrin 5A qui présentait un titre protecteur en anticorps avant inoculation a été retiré de l'interprétation. Il en est donc de même de l'animal contact 5B qui ne pouvait logiquement pas être contaminé. Le chien viverrin 5B est donc retiré de l'effectif des animaux contacts exposés au virus rabique.

On obtient donc un nombre d'animaux contacts morts de rage dans le groupe 1 de 3/4, soit un taux de mortalité corrigé de 75%, et de 80% sur l'ensemble des animaux contacts (8 animaux sur 10) (*cf. Tableau 15*).

b. Durée maximale d'incubation et symptomatologie des animaux contacts

Tableau 16 : Nombre de jours entre la mort de l'animal inoculé et la mort de l'animal contact d'une même cage

Animal		Nombre de jours entre mort animal inoculé et animal contact
Groupe 1	2A	16
	4B	11
	6A	12
	7A	14
Groupe 2	8B	11
	9A	12
	10B	11
	11A	91
Moyenne :		22,25

En moyenne, les chiens viverrins contacts sont morts 22,25 jours après que l'animal inoculé de leur cage soit mort. Mais cette moyenne est augmentée par le cas exceptionnel de l'animal 11A, qui est mort 91 jours après l'animal inoculé de sa cage. Les autres animaux contacts ont davantage suivi un schéma commun et sont morts 11 à 16 jours après leur voisin de cage inoculé (*cf. Tableau 16 ci-dessus*), quelle que soit la dose que cet animal a reçue.

Si l'on considère le nombre de jours entre la mort des animaux inoculés et celle des contacts, statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre les moyennes obtenues dans les deux groupes (test de Mann-Whitney/Wilcoxon : $p=1,00 > 0,05$).

Tableau 17 : Durée maximale d'incubation des chiens viverrins contacts

Animal contact	Durée maximale d'incubation (jours)
2A	20
4B	16
6A	13
8B	17
9A	13

Il n'est pas possible de déterminer de façon certaine la durée d'incubation des chiens viverrins contacts car pour cela il faudrait connaître la date de la morsure ou du léchage

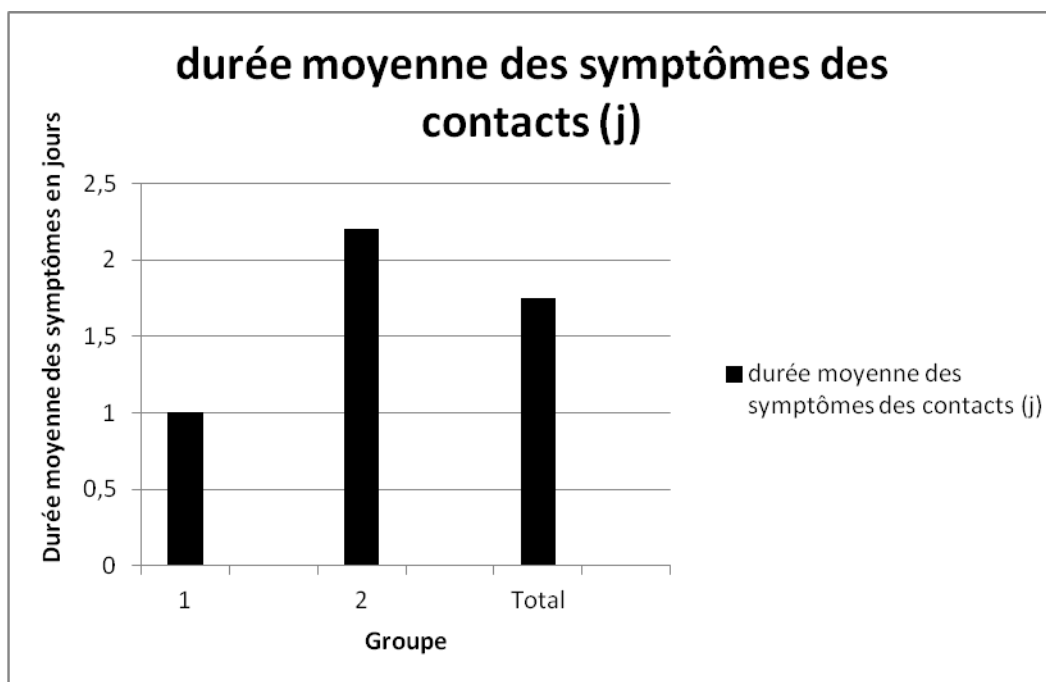
contaminant. Néanmoins, si on considère qu'une réaction positive en PCR signe la présence de virus dans les glandes salivaires et dans la salive, il devient possible de calculer une durée maximale d'incubation correspondant au délai entre le premier jour d'excrétion salivaire supposée de l'animal inoculé et le jour d'apparition des symptômes chez le contact. Cette durée maximale d'incubation des chiens viverrins contacts varie entre 13 et 20 jours, avec une moyenne de 15,8 jours (*cf. Tableau 17*).

Tout comme pour les animaux inoculés, chez les chiens viverrins contacts aucun symptôme vraiment caractéristique n'a été observé. La première manifestation notée était également une baisse d'appétit ou un arrêt de consommation de l'aliment, cette constatation n'étant retenue comme le début de la phase clinique que si l'animal développait ensuite rapidement des signes nerveux (changement de comportement, boiterie,...). Un autre signe fréquemment observé était un état d'irritabilité marqué, avec des réactions aux stimuli exagérées, comme précédemment pour les animaux inoculés.

Tableau 18 : Durée des symptômes des chiens viverrins contacts en fonction des groupes

Groupe	Animal	Durée des symptômes (j)	Durée moyenne des symptômes des contacts (j)
1	2A	1	1
	4B	0	
	6A	2	
2	7A	4	2,2
	8B	0	
	9A	2	
	10B	5	
	11A	0	
1 et 2			1,75

Figure 13 : Durée moyenne des symptômes chez les chiens viverrins contacts en fonction des groupes (*N.B.* : « Total » correspond à l'ensemble des contacts des groupes 1 et 2)



La durée de la phase clinique chez les chiens viverrins contacts varie entre 0 et 5 jours (*cf. Tableau 18*). Chez trois des huit chiens viverrins contacts qui sont morts de rage, il n'a pas été possible d'observer de symptôme, soit 37,5% des animaux contacts morts. En moyenne, les animaux contacts du groupe 1 ont présenté une phase clinique d'un jour et ceux du groupe 2 de 2,2 jours (*cf. Figure 13*). Mais statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre la durée des symptômes des deux groupes (test de Mann-Whitney/Wilcoxon : $p > 0,05$). Ainsi, sur l'ensemble des animaux contacts, la durée moyenne de la phase clinique est de 1,75 jour.

c. Délai de mortalité des animaux contacts

Si l'on considère le premier jour de détection du virus ou de son acide nucléique dans la salive de l'animal inoculé comme étant le jour d'inoculation de l'animal contact, on obtient les données suivantes (cf. *Tableau 19*) :

Tableau 19 : Délais de mortalités supposés des chiens viverrins contacts

Animal inoculé	log(dose inoculée) DL ₅₀ ICS	Date du premier résultat positif dans la salive*	Animal contact	Date de mort du contact	Délai de mortalité supposé du contact après sa contamination
2B	3,1	29 juillet	2A	20 août	22
4A	3,1	7 août	4B	24 août	17
6B	3,1	23 juillet	6A	7 août	15
8A	1,7	17 août	8B	3 septembre	17
9B	1,7	2 août	9A	17 août	15

* virus et/ou génome viral

La moyenne des délais de mortalité des animaux contacts est de 16 jours lorsque les animaux inoculés ont reçu une faible dose de virus (groupe 2) et de 18 jours lorsque les animaux inoculés ont reçu une dose plus forte de virus (groupe 1).

d. Excrétion salivaire

100% des chiens viverrins contacts qui sont morts ont présenté un résultat positif au test PCR lors de la recherche du génome viral dans leurs glandes salivaires (100% de résultats positifs dans les glandes sous-maxillaires vs 50% dans les glandes parotides).

Tableau 20 : Chiens viverrins contacts ayant présenté un résultat positif de leur salive en culture cellulaire

Animal	Date prélèvement salive ayant culture cellulaire positive	Date mort de l'animal	Date premier symptôme rabique
2A	18 août 2012	19 août 2012	18 août 2012
11A	10 août 2012	10 février 2013	Pas de symptôme observé

La salive de seulement deux animaux contacts a fourni un résultat positif en culture cellulaire (animal 2A et 11A, cf. *Tableau 20*). Le chien viverrin 2A a ainsi excrété du virus dans sa salive un jour avant de mourir, ce qui correspond à la durée de sa phase clinique. Le cas de l'animal 11A est à noter. En effet, un seul de ses prélèvements de salive a été positif en culture cellulaire, le 10 août. Cet animal est mort 6 mois après ce prélèvement positif, tous ses autres prélèvements (effectués jusqu'au 24 août) se sont révélés négatifs. La PCR sur son prélèvement de salive du 10 août était négative. Cet unique résultat de culture cellulaire positif du chien viverrin 11A est donc très probablement dû à une erreur de manipulation ayant conduit à la contamination du prélèvement.

Tableau 21 : Délai entre la première détection du génome viral dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme ou de la mort de l'animal (biologie moléculaire)

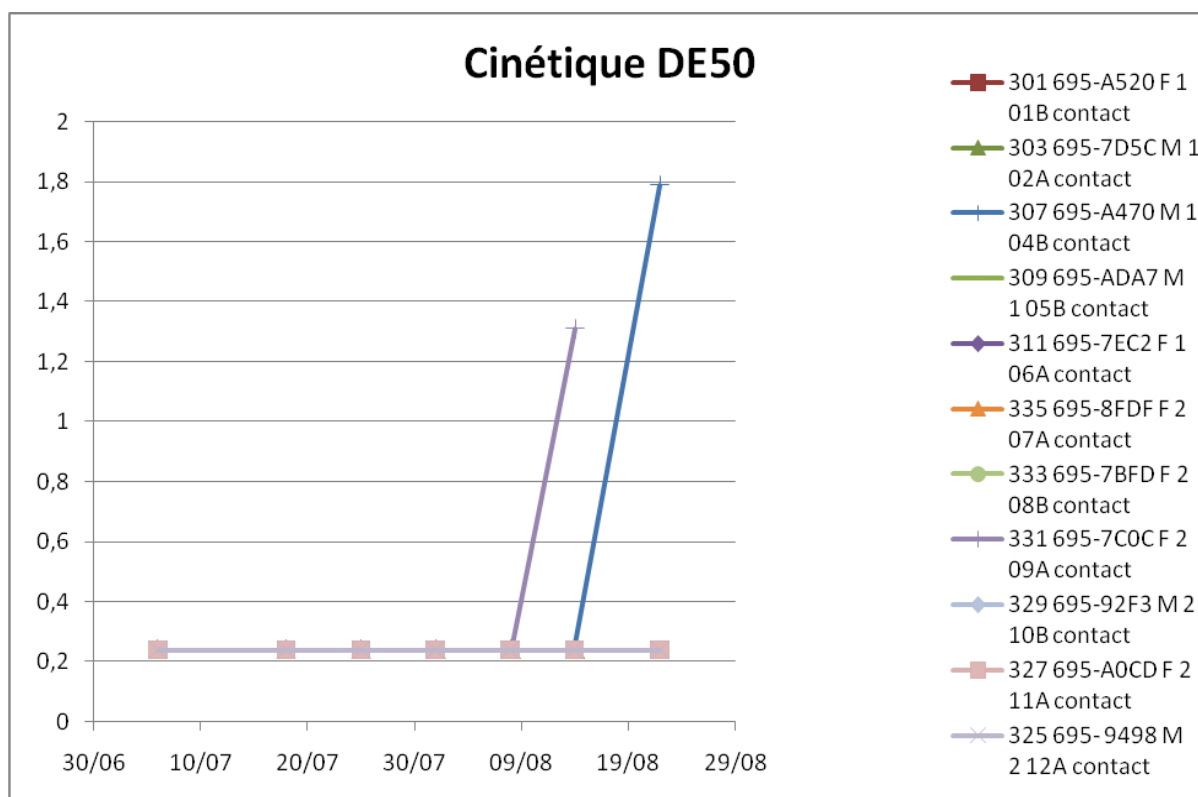
Animal	Nombre de jours entre la première détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme	Nombre de jours entre la première détection du virus dans la salive par PCR et la mort de l'animal
2A	1	3
4B	4	4
6A	0	3
9A	0	2
Moyenne :	1,25	3

La durée la plus longue de détection du virus dans la salive par PCR avant l'apparition des symptômes a été observée chez le chien viverrin contact 4B. Le génome du virus a ainsi été détecté dans la salive de cet animal 4 jours avant que celui-ci ne présente des signes cliniques. A l'opposé, chez deux chiens viverrins contacts, la biologie moléculaire n'a pas mis en évidence d'ARN viral dans leur salive avant que ceux-ci ne présentent des symptômes (cf. *Tableau 21*). Statistiquement, les délais moyens de détection du virus dans la salive par PCR avant l'apparition des signes cliniques dans les deux groupes d'animaux ne sont pas significativement différents (test de Mann-Whitney/Wilcoxon : $p=0,3458 > 0,05$).

Tous les animaux contacts qui ont pu être prélevés avant de mourir ont présenté des résultats positifs en PCR. En moyenne, le génome viral était détecté par PCR, dans la salive des chiens viverrins contacts, 3 jours avant leur mort et 1,25 jour avant qu'ils ne présentent leurs premiers symptômes rabiques.

e. Sérologie

Figure 14 : Cinétique de séroconversion des chiens viverrins contacts



Seuls deux chiens viverrins contacts ont présenté une augmentation détectable de leur titre sanguin en anticorps avant de mourir (animaux 4B et 9A). Pour ces deux animaux, on peut parler d'une réelle séroconversion puisque leur titre est devenu supérieur à la norme minimale requise par les autorités vétérinaires de 0,50 UI/ml (et leur DE50 a varié de plus de 0,36 logarithmes) (cf. Figure 14). En effet, l'animal 4B a présenté un titre de 1,51 UI/ml le jour de son euthanasie du fait de sa paralysie (point limite atteint). Un titre en anticorps de 0,5 UI/ml a été obtenu sur l'animal 9A 3 jours avant sa mort. Les autres contacts ont toujours eu un titre stable de 0,04 UI/ml (0,24 log DE50).

f. Diffusion centrifuge du virus

Outre, la salive (*cf.* ci-dessus), la recherche de virus rabique a également été réalisée sur des portions de reins et de poumons de ces animaux par immunofluorescence et culture cellulaire.

Tableau 22 : Nombre de résultats positifs lors de la recherche de virus rabique dans les reins et les poumons des animaux contacts morts (IF : immunofluorescence ; CELL : culture cellulaire)

Groupe	Nombre de résultats positifs				Nombre d'animaux
	Rein IF	Rein CELL	Poumon IF	Poumon CELL	
1	0	0	0	0	3
2	0	0	1	1	5
1 et 2	0	0	1	1	8

Aucune recherche de virus rabique dans les reins n'a donné de résultat positif. Seul un test d'immunofluorescence sur poumon s'est révélé positif (animal 7A, groupe 2), chez un des 5 animaux contacts morts de rage. De même, un seul test de culture cellulaire sur poumon a été positif (animal 10B, groupe 2), chez un des 5 animaux contacts morts de rage (*cf.* *Tableau 22*).

3. Comparaison des paramètres de l'infection des chiens viverrins inoculés lors du protocole CnV3 et des animaux contacts

a. Mortalité des chiens viverrins

Sur l'ensemble des 18 chiens viverrins (contacts et inoculés) qui sont morts, 100% des tests réalisés en vue de confirmer le diagnostic de rage sur le système nerveux central sont positifs.

Tableau 23: Comparaison du pourcentage de mortalité chez les animaux contacts et chez les animaux inoculés (avec retrait des animaux 5A et 5B)

Groupe	log(dose inoculée) DL ₅₀ ICS	Chiens viverrins contacts (n=10)		Chiens viverrins inoculés (n=10)	
		Pourcentage corrigé de contacts morts	nbr morts/nbr animaux en contact avec virus	Pourcentage d'inoculés morts	nbr morts/nbr animaux inoculés
1	3,1	75%	3/4	100%	4/4
2	1,7	83,33%	5/6	100%	6/6
1 et 2		80%	8/10	100%	10/10

Les dix chiens viverrins inoculés lors du protocole CnV3 sont tous morts de rage ce qui correspond à 100% de mortalité (cf. *Tableau 23*).

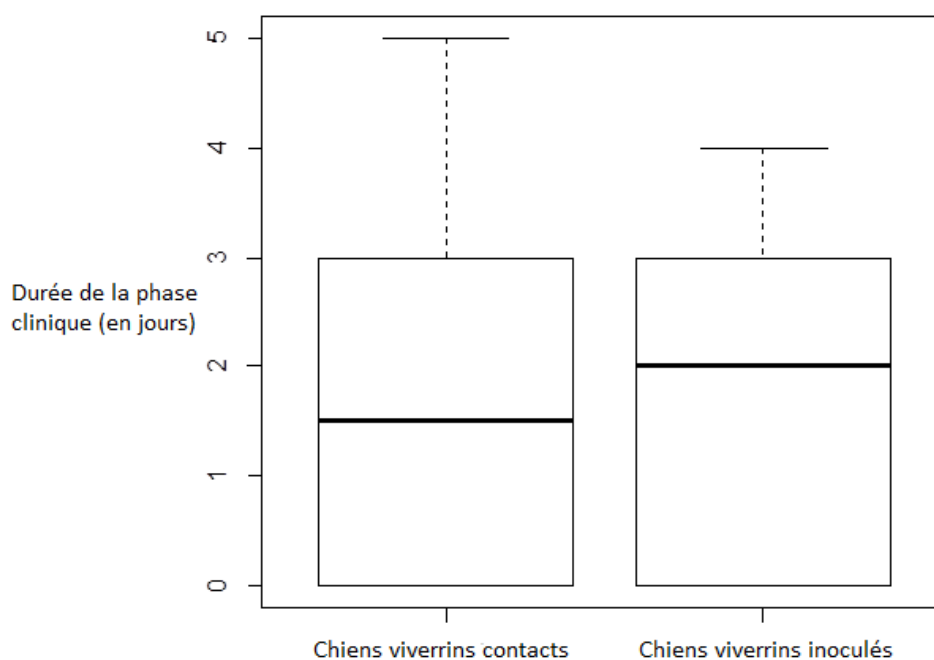
Chez les animaux contacts, ce pourcentage est moins élevé puisque seulement 80% des animaux sont morts (valeurs corrigées en retirant les animaux 5A et 5B).

b. Durée de la phase clinique

Tableau 24 : Comparaison de la durée de la phase clinique chez les animaux contacts et chez les animaux inoculés

Groupe	Chiens viverrins contacts				Chiens viverrins inoculés			
	Durée phase clinique (en jours)			Nombre animaux	Durée phase clinique (en jours)			Nombre animaux
	Moyenne	Minimum	Maximum		Moyenne	Minimum	Maximum	
1	1 j	0 j	2 j	3	2,5 j	2 j	3 j	4
2	2,2 j	0 j	5 j	5	1,33 j	0 j	4 j	6
1 et 2	1,75 j	0 j	5 j	8	1,8 j	0 j	4 j	10

Figure 15 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution de la durée de la phase clinique en fonction des animaux contacts et inoculés



La durée de la phase clinique des chiens viverrins contacts est comprise entre 0 et 5 jours, avec une moyenne de 1,75 jour. Chez les animaux inoculés, cette phase clinique dure entre 0 et 4 jours, avec une moyenne de 1,8 jour (cf. *Tableau 24*).

Graphiquement, il ne semble pas il y avoir de différence entre la durée de la phase clinique chez les chiens viverrins contacts et ceux qui ont été inoculés (cf. *Figure 15*). Cette absence de différence significative est confirmée statistiquement (test de Mann-Whitney/Wilcoxon : $p=0,7817 >0,05$).

c. Excrétion salivaire du virus

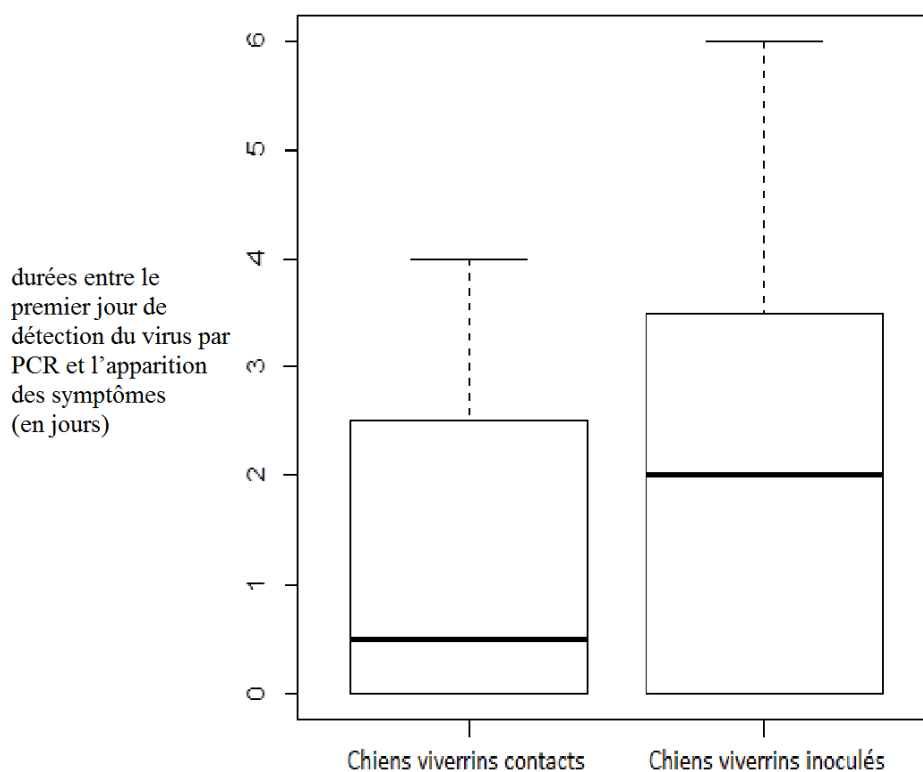
100% des chiens viverrins inoculés qui sont morts ont excrété du virus dans leur salive à un moment ou à un autre car 100% des tests de mise en évidence du virus rabique dans leurs glandes sous-maxillaires et/ou parotides se sont révélés positifs. Il en est de même avec les chiens viverrins contacts qui sont morts (100% de tests positifs sur les glandes salivaires).

De même, la biologie moléculaire a permis de révéler la présence de virus (au moins d'une partie de son génome) dans la salive de tous les chiens viverrins inoculés qui sont morts ainsi que dans celle de leurs contacts qui sont morts, avant et/ou pendant la phase clinique de la maladie.

Tableau 25 : Comparaison des durées entre le premier jour de détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition de symptômes, chez les animaux contacts et les inoculés

Groupe	Chiens viverrins contacts			Nombre animaux	Chiens viverrins inoculés			Nombre animaux
	Nombre de jours entre la première détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme				Nombre de jours entre la première détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition du premier symptôme			
	Moyenne	Min	Max		Moyenne	Min	Max	
1	1,66 j	0 j	4 j	3	3,33 j	0 j	6 j	4
2	0 j	0 j	0 j	1	1,25 j	0 j	3 j	3
1 et 2	1,25 j	0 j	4 j	4	2,14 j	0 j	6 j	7

Figure 16 : Diagramme en boîte à moustaches de la distribution des durées entre le premier jour de détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition des symptômes en fonction du statut de l'animal (contact ou inoculé)



La durée entre le premier jour de détection du virus dans la salive par PCR et l'apparition des symptômes, chez les chiens viverrins contacts, est comprise entre 0 et 4 jours, avec une moyenne de 1,25 jour. Chez les animaux inoculés, cette durée varie entre 0 et 6 jours, avec une moyenne de 2,14 jours (cf. *Tableau 25*).

Même si graphiquement la durée de détection du virus dans la salive par PCR avant l'apparition des symptômes semble plus longue chez les animaux inoculés que chez les contacts (cf. *Figure 16*), statistiquement il n'y a pas de différence significative entre la durée observée chez les contacts et celle des animaux inoculés (test de Mann-Whitney/Wilcoxon : $p=0,6194 > 0,05$).

d. Sérologie

Figure 17 : Cinétique du titre en anticorps antirabiques neutralisants des chiens viverrins contacts et inoculés ayant présenté une séroconversion

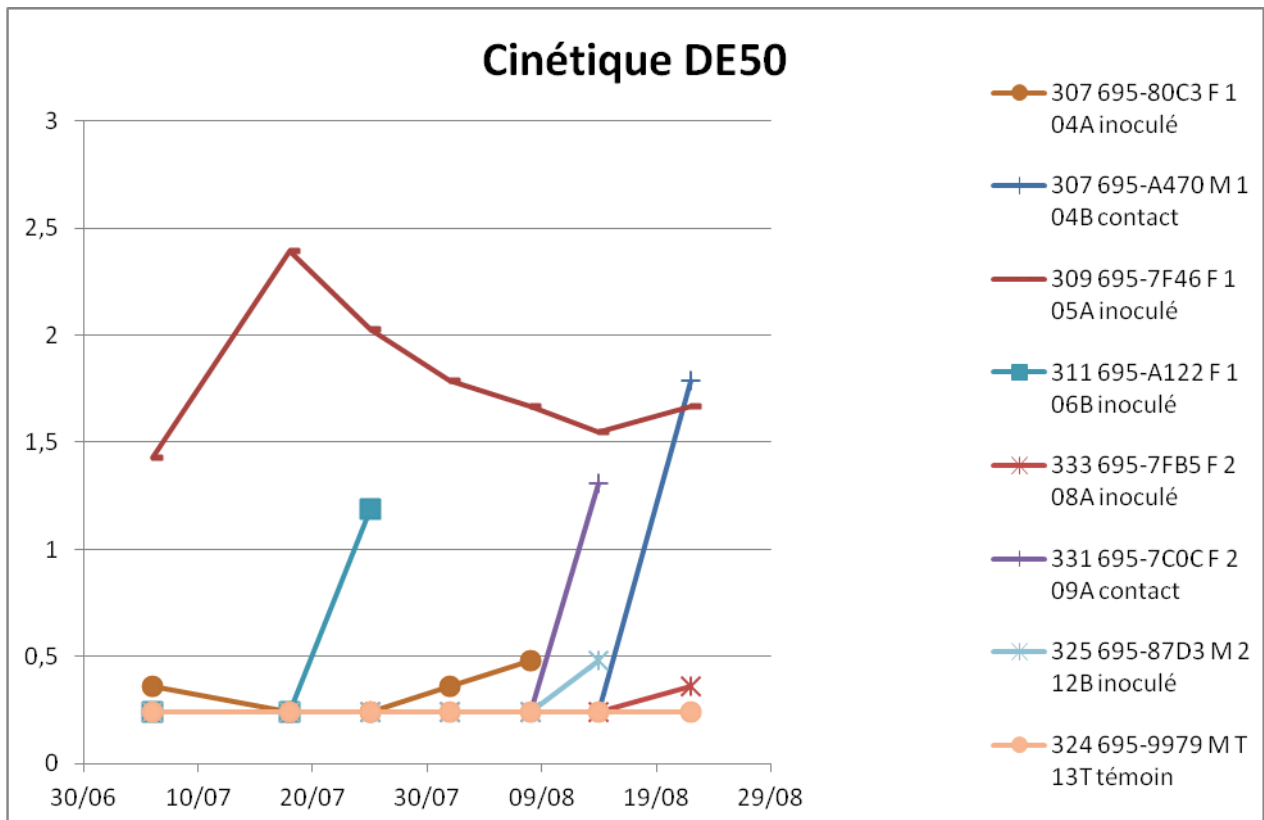


Tableau 26: Titre maximal en anticorps antirabiques des animaux ayant présenté une séroconversion réelle au cours de l'étude

Animal	Contact ou inoculé	Titre en anticorps maximal	Date de l'obtention du titre maximal par rapport à la mort
4B	Contact	1,51 UI/ml	Jour de la mort
9A	Contact	0,5 UI/ml	3 jours avant la mort
6B	Inoculé	0,38 UI/ml	1 jour avant la mort

Dans le *Tableau 26* ci-dessus, ne figure pas l'animal 5A qui a présenté un taux d'anticorps élevé avant même l'inoculation (0,66 UI/ml) et tout au long de l'expérience (entre 0,87 et 6,01 UI/ml).

Deux chiens viverrins contacts sur les quatre testés ont présenté une séroconversion avant de mourir (soit 50%) alors que dans le groupe des inoculés, un seul chien viverrin sur les sept testés a présenté une vraie séroconversion (soit 14,3%) (l'animal 5A n'étant pas pris en compte). Les animaux contacts ont présenté une séroconversion plus importante avec des taux d'anticorps élevés (1,51 UI/ml et 0,5 UI/ml) alors que le titre des animaux inoculés n'a jamais dépassé les 0,5 UI/ml (maximum de 0,38 UI/ml pour l'animal 6B).

e. Diffusion centrifuge du virus

Tableau 27 : Comparaison du nombre de résultats positifs sur rein et poumon des animaux contacts et inoculés (IF : Immunofluorescence, CELL : culture cellulaire)

	Nombre de résultats positifs				Nombre d'animaux
	Rein IF	Rein CELL	Poumon IF	Poumon CELL	
Chiens viverrins contacts	0	0	1	1	8
Chiens viverrins inoculés	0	1	1	0	9

Sur le rein, aucun test d'immunofluorescence ne s'est révélé positif, que ce soit chez des animaux inoculés ou contacts. En revanche, la culture cellulaire à partir du rein d'un animal inoculé s'est révélée positive (animal 7B).

Sur le poumon, le test d'immunofluorescence a fourni, deux résultats positifs, un chez un animal contact (animal 7A) et un autre chez un animal inoculé (1A) (*cf. Tableau 27*). Le test sur culture cellulaire du poumon de l'animal contact 10B a donné un résultat positif.

IV. Discussion

1. Sensibilité du chien viverrin au virus rabique isolé du chien viverrin

a. Infection expérimentale

La survie du chien viverrin 5A peut s'expliquer par un taux d'anticorps antirabiques neutralisants anormalement élevé au moment de son inoculation. De plus, la cinétique en anticorps neutralisants observée après l'inoculation confirme l'hypothèse que cet animal n'était probablement pas naïf vis-à-vis de la rage. On peut s'interroger sur les circonstances d'acquisition par cet animal d'une telle immuno-protection vis-à-vis de la rage. En effet, les chiens viverrins provenant de l'élevage de Mme Maarit Mohaibes en Finlande ne sont normalement pas vaccinés contre la rage. De plus, tous les animaux du protocole sont nés en captivité dans leur élevage d'origine et les conditions d'élevage des animaux ne leur permettent aucun contact avec la faune sauvage. Le chien viverrin 5A n'ayant normalement jamais été au contact du virus rabique, il ne nous est pas possible d'expliquer pourquoi cet animal possédait une telle protection immunitaire. Enfin, les bonnes conditions de manipulation ainsi que l'expérience du manipulateur lors de l'inoculation des animaux permettent d'écartier une éventuelle erreur de manipulation lors de l'inoculation de cet animal.

Si l'on ne considère que les chiens viverrins « naïfs », qui ne possédaient pas d'anticorps antirabique au moment de leur inoculation, on obtient alors une mortalité de 100%. Cette mortalité très élevée est à mettre en relation avec le choix de la souche de virus et la dose inoculée. En effet, lors du protocole CnV 2007, la souche de virus qui a été sélectionnée pour la suite des études correspondait à celle qui a tué le plus rapidement. On peut donc supposer que cette souche correspondait à la souche la plus virulente. Le stock préparé à partir du cerveau de cet animal a été réparti en ampoules qui ont été conservées dans des conditions identiques en azote liquide. De plus, les protocoles CnV 2008 et CnV2 ont permis de déterminer avec précision la DL₅₀ de cette souche de virus rabique isolé du chien viverrin. Ceci a déterminé le choix d'utiliser les dilutions $10^{-2,2}$ et $10^{-3,6}$ de ce stock pour les inoculations avec une dose voisine de quelques doses létales pour 100% des animaux (200 DL₅₀ ou 33 DL₁₀₀ pour la dilution $10^{-2,2}$ et 8 DL₅₀ ou 1,3 DL₁₀₀ pour la dilution $10^{-3,6}$, cf. *Annexe 3*) afin de s'assurer que les animaux mourraient, mais pas trop rapidement pour leur laisser le temps d'excréter du virus et permettre ainsi l'éventuelle contamination de l'animal contact.

Ce taux de mortalité élevé dans cette expérience confirme la grande sensibilité du chien viverrin au virus rabique isolé dans cette espèce, comme l'avaient démontré BOTVINKIN *et al.* (1984) dans leur étude. Mais cette sensibilité semble être inconstante et dépendre de l'isolat utilisé. En effet, d'autres travaux au laboratoire de la Rage et de la Faune sauvage de Nancy ont démontré qu'une autre souche de virus chien viverrin, isolée en Pologne dans les années 80, ne tue plus le chien viverrin alors qu'elle a toujours un très bon titre sur souris (souche n'ayant pas subi de passage sur souris et aucune chute du titre notée).

b. Infection naturelle

Comme il a été dit précédemment, l'animal 5B, contact du 5A, n'est pas pris en considération car l'animal 5A, n'ayant pas déclaré la rage, n'a pas pu le contaminer.

Huit des dix chiens viverrins n'ayant reçu que le solvant en injection intramusculaire dans les muscles temporaux (animaux contacts) sont morts de rage. La mortalité chez ces animaux contacts est donc de 80%, ce qui est inférieur à la mortalité de 100% observée chez les animaux inoculés expérimentalement. Cette mortalité plus faible peut s'expliquer par le fait que la contamination des animaux contacts nécessite une ou plusieurs morsures contaminantes. Néanmoins, l'excrétion salivaire du virus par tous les chiens viverrins inoculés ainsi que leur irritabilité et leur agressivité lors de la phase clinique aurait dû permettre une excellente transmission du virus aux animaux contacts. De plus, à la différence de ce qui se passe dans le milieu naturel et bien que les animaux d'une même cage se soient habitués l'un à l'autre avant l'inoculation, les animaux se trouvaient dans des cages exiguës où le nombre et la fréquence des contacts étaient donc bien plus élevés que dans la nature, ce qui aurait dû favoriser la contamination. Le fait que tous les animaux contacts n'aient pas été contaminés, malgré les conditions de proximité, le comportement des animaux enrégés et leur excrétion salivaire pourrait suggérer une moins bonne efficacité du chien viverrin à diffuser le virus de son espèce que le chien et le renard à diffuser le leur. En effet, dans des expériences similaires de contamination de renard contact par un renard inoculé en captivité, 100% des renards contacts déclaraient la maladie (AUBERT *et al.*, 1991). Une autre explication à cette différence serait que le chien viverrin est moins sensible au virus chien viverrin (ou tout du moins à la souche utilisée) que le renard n'est sensible au virus renard.

Mis à part pour l'animal 11A, le délai entre la mort de l'animal inoculé et celle de son contact est approximativement la même pour tous les binômes, quelle que soit la dose que l'animal inoculé avait reçue (absence de différence significative entre les deux groupes). On sait que chez le renard inoculé avec un virus renard, si la dose inoculée est élevée, l'excrétion

salivaire est faible ou absente. En supposant que le virus du chien viverrin se comporte de la même façon chez le chien viverrin que le virus du renard chez le renard, les animaux du groupe 1 qui ont été inoculés avec une plus forte dose devraient excréter moins de virus et les animaux contacts devraient alors mourir plus tard. Comme il n'y a pas de différence significative entre les délais entre la mort de l'animal inoculé et celle de l'animal contact d'une même cage en fonction de la dose inoculée, on peut donc supposer que les animaux contacts des deux groupes ont été infectés par une dose voisine de virus rabique à l'occasion du contact ou de la morsure.

Le cas de l'animal contact 11A qui est mort 3 mois après son voisin de cage inoculé montre que chez le chien viverrin, comme cela a déjà été observé dans d'autres espèces mieux connues, il peut y avoir des variations importantes de la durée d'incubation entre individus.

Ces durées d'incubation importantes peuvent expliquer le maintien à bas bruit du virus rabique pendant le creux entre deux vagues d'épidémie.

2. Délai de mortalité et phase clinique

Nos résultats montrent une corrélation positive entre le délai de mortalité et la dose de virus inoculé. Le même phénomène est observé chez le renard inoculé avec une souche renard (AUBERT, 1983). De plus, le délai moyen de survenue de la mort des chiens viverrins inoculés est semblable à celui obtenu expérimentalement sur des renards inoculés avec une souche renard, à des doses comparables (AUBERT *et al.*, 1991).

La moyenne des délais de mortalité supposés des animaux contacts est légèrement plus faible lorsque l'animal inoculé a reçu une faible dose de virus que lorsque l'animal inoculé a reçu une dose plus forte de virus. Si on se base sur ce qui est connu en matière de rage du renard et de rage du chien, cette différence, bien que non significative, est relativement "logique": un animal inoculé avec une forte dose excrètera peu, il contaminera donc avec une plus faible dose de virus, ce qui entraînera un délai de mortalité plus important chez l'animal contaminé et inversement, si la dose inoculée est faible, l'excrétion sera plus importante et la quantité de virus transmis à l'occasion de la morsure sera plus élevée, d'où un délai de mortalité court chez l'animal contaminé.

La durée de la phase clinique observée est semblable chez les chiens viverrins inoculés et chez leurs contacts. Toutefois, il se peut que cette durée soit un peu sous-estimée, pour différentes raisons. D'une part, les animaux n'étaient surveillés qu'en journée (au moins deux

fois par jour à partir du moment où un signe considéré comme anormal était observé) et non la nuit. Il est donc possible voire probable que des animaux retrouvés mort un matin et donc notés par défaut comme n'ayant pas présenté de symptôme, aient en réalité présenté des symptômes au cours de la nuit. Néanmoins dans ces cas, cela dénote de l'existence d'une courte phase clinique, d'un maximum de douze heures. D'autre part, le fait qu'un point limite ait été défini (euthanasie d'un animal qui est paralysé ou d'un animal qui présente des signes nerveux depuis deux jours) amène à raccourcir l'évolution de la phase clinique.

La phase clinique observée sur les chiens viverrins dans ce protocole semble être relativement plus courte que les moyennes établies chez le chien ou le renard (moyenne de 4 à 5 jours chez le chien d'après la saisine n°2009-SA-0007 de l'AFSSA ; moyenne de 3 à 4 jours chez le renard dans l'expérience de BLANCOU *et al.*, 1979). Mais on sait également qu'il existe des variations intra-espèce considérables de la durée d'incubation et de la phase clinique (TOMA *et al.*, 2012). On ne peut donc pas comparer de façon certaine ces durées obtenues sur des chiens viverrins à celles des renards ou des chiens, du fait des variations individuelles et des faibles effectifs dans notre protocole. De plus, à l'époque de l'expérience de BLANCOU *et al.*, en 1979, la notion de point limite n'existait pas et en général, les animaux mourraient de rage, ils pouvaient éventuellement être euthanasiés lorsqu'ils étaient totalement paralysés. Le respect du point limite dans notre protocole, donnant une moyenne de la durée de la phase clinique légèrement sous-estimée, est donc à prendre en compte pour comparer nos valeurs à celles obtenues par BLANCOU *et al.* ainsi que les doses inoculées car on sait que la durée de la phase clinique est liée à la dose inoculée.

Si aucun symptôme caractéristique de rage furieuse n'a été observé, certains chiens viverrins enragés ont présenté une irritabilité marquée et une agressivité vis-à-vis de leur compagnon de cage peut de temps avant de mourir. Mais à la différence de ce qui a pu être observé chez le renard, les attaques entre chien viverrin d'une même cage, lorsque l'un des deux était enragé, étaient très brèves mais très violentes (deux chiens viverrins contacts ont eu d'importantes blessures qui ont dû être suturées suite à une violente attaque de leur compagnon de cage). Ce changement de comportement est différent de celui qui a pu être observé lors d'une expérience au laboratoire de la Rage et de la Faune sauvage de Nancy, en mettant en contact dans un petit parc un renard enragé et un renard sain. En effet, dans le cas des renards, le renard enragé essayait constamment d'attaquer le renard sain qui fuyait, alors que pour le chien viverrin, l'attaque ne durait que quelques secondes puis tout rentrait dans l'ordre. Toutefois, il est difficile de savoir si cette observation reflète ce qui se passe dans la

nature car la taille des enclos d'observation était très différente (cage d'un peu plus de 2 m² pour les chiens viverrins contre parc de 25 m² pour les renards).

3. Excrétion salivaire du virus

Dans la thèse universitaire de DUCHENE (1987), lors de l'inoculation de chiens viverrins avec une souche de virus rabique d'origine vulpine, aucun test ne s'était révélé positif sur les glandes salivaires des chiens viverrins. Cette absence de virus détectable dans les glandes salivaires des chiens viverrins morts rendait peu probable la transmission de la rage par un chien viverrin enragé par une souche vulpine (DUCHENE 1987). Mais cette affirmation doit être nuancée par les doses inoculées aux animaux dans cette expérience. En effet, on estime qu'une morsure de renard transmet environ 1000 à 2000 DL₅₀IC pour la souris. Or, dans la thèse de DUCHENE (1987), les chiens viverrins qui sont morts ont été inoculés avec des doses de 10^{6,5} et 10⁴ DL₅₀ICS (soit respectivement environ 3000000 et 10000 DL₅₀ICS), ce qui correspond à des doses très élevées par rapport à celle d'une inoculation naturelle par morsure. Il se peut donc qu'il y ait eu trop de virus inoculé et que les animaux soient morts avant que les glandes salivaires ne soient colonisées par le virus. Néanmoins, ces doses inoculées prennent en considération les observations faites par le Laboratoire de la Rage et de la Faune sauvage de Nancy. Bien que lorsque la rage du renard sévissait en France, il y ait eu des chiens naturellement enragés avec un virus renard, il a été noté qu'expérimentalement, une contamination hétérologue (virus renard sur chien) nécessite une dose de virus 10⁵ à 10⁶ fois plus grande que dans le système homologue (virus renard sur renard).

La positivité de la totalité des tests sur glandes salivaires dans notre étude ainsi que le succès de la contamination des animaux contacts prouvent que le chien viverrin transmet très bien à ces congénères certaines souches de virus rabique isolé du chien viverrin.

Si l'excrétion salivaire du virus lors de la phase clinique semble être constante, il n'en est pas de même pour l'excrétion pré-symptomatique qui n'a pu être notée que dans un peu plus de la moitié des cas, même en supposant que la présence du génome du virus dans la salive détecté par PCR traduit une excrétion salivaire. Il est à noter à ce propos que la recherche de l'ARN viral par PCR (biologie moléculaire) est très sensible mais correspond en fait à la simple détection d'un fragment d'ARN, ce qui ne veut pas nécessairement dire que cet isolement positif correspond à un virus complet et infectieux. Même si la technique est moins

sensible, l'isolement sur culture cellulaire apporte la preuve que la salive contenait un virus infectieux capable de se répliquer. Le diagnostic par PCR est environ 300 000 fois plus sensible que le diagnostic classique associant immunofluorescence et culture cellulaire. Du fait de cette importante différence de sensibilité, la distorsion obtenue entre les résultats des deux tests n'est donc pas surprenante.

Parmi les animaux ayant présenté une excrétion salivaire pré-symptomatique et/ou chez qui le génome viral a été détecté, cette excrétion et/ou la présence d'ARN viral durait entre 1 à 6 jours avant l'apparition du premier symptôme de rage. En moyenne, sur l'ensemble des chiens viverrins de l'étude, la présence salivaire pré-symptomatique du virus et/ou du génome viral était de 1,81 jour.

Selon la saisine n°2009-SA-0007 de l'AFSSA, l'excrétion salivaire pré-symptomatique chez le chien est de quelques heures à 3 jours dans 80% des cas, entre 4 et 5 jours dans 15% des cas et entre 5 et 8 jours pour les 5% restant. Expérimentalement, AUBERT *et al.* 1991 ont noté une excrétion salivaire pré-symptomatique pouvant aller jusqu'à 29 jours chez le renard inoculé avec une souche renard. La durée d'excrétion salivaire pré-symptomatique chez le chien viverrin dans notre expérience, dans la mesure où on lui assimile aussi la présence de génome viral, semble donc être comparable à celle du chien mais un peu moins longue que celle du renard, même s'il est difficile de généraliser sur cette durée du fait qu'elle peut beaucoup varier entre individus.

Tous ces éléments pourraient contribuer à expliquer pourquoi il n'y a pas eu de contamination de 100% des animaux contacts, en dépit d'une grande proximité avec l'animal enragé qu'ils côtoyaient.

4. Recherche du virus dans les organes

Toutes les recherches de virus rabique, par immunofluorescence ou par culture cellulaire, se sont révélées positives dans le système nerveux central. Les chiens viverrins morts ou euthanasiés en phase agonique ont donc bien tous été infectés par le virus rabique. De même, comme vu précédemment, tous les animaux ont présenté un résultat positif aux tests réalisés sur glandes salivaires (sous-maxillaires et/ou parotides).

Dans leur étude, BOTVINKIN *et al.* (1984) ont inoculé des chiens viverrins et des renards par voie intramusculaire (muscles temporaux) avec une souche de virus provenant du cerveau d'un chien viverrin naturellement infecté par le virus rabique (Est de l'Europe). Le virus a été

retrouvé à une exception près dans le cerveau et les glandes salivaires des chiens viverrins morts de rage. Dans la moitié des cas (n=8), le virus a également été isolé des reins et/ou des poumons de chiens viverrins mais pas des viscères des renards morts.

Dans notre étude, la fréquence de détection du virus dans les reins et/ou les poumons est moins élevée puisque seule 1/17 (5,88%) des cultures cellulaires de reins s'est révélée positive. On obtient le même résultat pour les cultures cellulaires de poumons. Tous les tests d'immunofluorescence sur reins étaient négatifs et 2/17 (11,76%) des tests d'immunofluorescence sur poumons étaient positifs. Les différences entre les résultats de BOTVINKIN *et al.* et nos résultats pourraient s'expliquer par le fait que lors de l'autopsie, seule une partie des organes était testée et non l'ensemble des reins et des poumons, même si dans l'étude de BOTVINKIN *et al.* il n'est pas précisé si tout l'organe ou juste une portion a été prélevé.

5. Réaction immunitaire humorale

La proportion des animaux ayant présenté une réelle séroconversion est plus importante chez les chiens viverrins contacts que chez les inoculés. Parmi les chiens viverrins ayant présenté une augmentation significative de leur titre en anticorps antirabiques, les animaux contacts ont présenté une séroconversion plus importante avec des taux d'anticorps plus élevés que ceux des animaux inoculés. Cela pourrait être dû au mode de contamination : la morsure étant plus délabrante que l'injection, elle permet peut-être un meilleur contact entre le virus et le système immunitaire.

Le chien viverrin 5A avait, le jour de l'inoculation, un taux d'anticorps sériques neutralisants élevé, ce qui peut expliquer le fait qu'il n'a pas déclaré la rage. On remarque au niveau de sa cinétique de séroconversion un léger pic après l'inoculation puisque son taux d'anticorps monte le 18 juillet puis le 25 et le 1^{er} août 2012 avant de redescendre à peu près au même niveau qu'au jour de l'inoculation. Un an après, dans le cadre d'un autre protocole d'étude, cet animal a été vacciné le 26 juin 2013 par injection par voie intramusculaire d'une dose de SAG2 (vaccin à virus vivant utilisé pour la vaccination orale du renard et du chien viverrin), et la cinétique de sa réponse immunitaire humorale a été suivie. Le taux d'anticorps est monté dès le 1^{er} juillet et lors de la dernière prise de sang analysée, le 25 juillet, l'animal avait encore un titre en anticorps plus élevé que sa ligne de base. En revanche, l'allure globale

de la courbe (*cf. Annexe 4*) présente un aspect atypique par rapport à ce qui est attendu chez un animal préalablement immunisé. Habituellement, une réponse anamnesticque se caractérise par un titre en anticorps qui s'élève très rapidement et qui se maintient en plateau. Or, chez l'animal 5A, on a juste observé un pic rapidement mais avec un titre descendant ensuite tout aussi rapidement, tout en restant à un niveau supérieur à avant l'immunisation. L'allure générale de la courbe (*cf. Annexe 4*) est assez voisine de ce qui a été observé chez l'animal contact 5B, qui a été inclus dans le même protocole et qui a donc été vacciné lui aussi le 26 juin 2013.

Cette réponse à la vaccination, qui n'est pas classique, est un argument de plus pour écarter le groupe 5A/5B de l'interprétation des résultats.

CONCLUSION

Suite à son introduction dans la partie européenne de l'ex-URSS, dans les années 1930 à 1950, le nombre de chiens viverrins dans les pays d'Europe de l'Est n'a cessé d'augmenter et la proportion de chiens viverrins parmi les animaux sauvages reconnus enrégés a aussi beaucoup augmenté. Or, si de nombreuses expériences ont déjà été menées sur la rage du chien ou du renard, celle du chien viverrin est peu connue.

L'objectif de cette étude expérimentale était de permettre une estimation des paramètres de l'infection du chien viverrin par une souche de virus rabique isolée du chien viverrin et d'étudier la transmission de cette souche par contact entre individus. A la suite de ces travaux, il apparaît donc que le chien viverrin est sensible à ce virus rabique isolé du chien viverrin, ou du moins à certains isolats de cette souche et qu'il est capable de transmettre ce virus à un autre chien viverrin.

La durée d'incubation relativement longue et la phase symptomatique courte sont comparables à celles des carnivores plus classiquement étudiés, comme le renard ou le chien. Toutefois, ces paramètres sont très variables entre individus, notamment si l'on considère le délai de mortalité.

Pour ce qui est des symptômes, seule la forme paralytique de la maladie a été observée. Néanmoins, une irritabilité et des réactions exagérées aux stimuli étaient fréquemment notées, résultant en des attaques très frustrées mais très violentes entre congénères. Ce changement de caractère, aboutissant souvent en de nombreuses morsures entre chiens viverrins d'une même cage, a favorisé la transmission du virus entre individus.

Outre le succès de la contamination des animaux contacts, l'excrétion salivaire du virus par les chiens viverrins inoculés a pu être mise en évidence dans certains cas par culture cellulaire. La phase d'excrétion salivaire était toujours très proche de la mort et aucune variation significative de la durée de cette excrétion n'a été notée en fonction de la dose de virus inoculée. De plus, chez tous les chiens viverrins morts de rage, l'antigène viral a été mis en évidence dans leur glande salivaire.

La connaissance de ces paramètres de l'infection du chien viverrin par un virus rabique isolé du chien viverrin et le succès de la transmission du virus entre individus permettent de placer cette espèce comme un réel vecteur du virus rabique.

Du fait du fréquent partage des terriers par les blaireaux et les chiens viverrins, il serait intéressant par la suite d'étudier les paramètres de l'infection du blaireau par une souche de virus isolé du chien viverrin et son éventuelle transmission à un autre animal, pour mieux comprendre l'épidémiologie de la rage dans les pays d'Europe de l'Est.

BIBLIOGRAPHIE

- AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2009). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur la définition des périodes d'excrétion virale salivaire potentielle dans la rage animale. Saisine n°2009-SA-0007 ; 1-11
- ALBERTINI AAV, RUIGROK RWH et BLONDEL D (2011). Rabies Virus Transcription and Replication. *In* : Advances in Virus Research. Elsevier Inc. **79**, Chapter 1 ; 1-18
- ANDRAL L, ARTOIS M, AUBERT MFA et BLANCOU J (1982). Radio-pistage de renards enrégés. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **5**(1-3) ; 285-291
- ANDRAL L et SERIE C (1957). Etudes expérimentales sur la rage en Ethiopie. *Ann. l'Inst. Pasteur.* **93** ; 475-488
- ANONYME. Arrêté du 9 août 2011 complétant les dispositions de l'article R. 223-25 du code rural et de la pêche maritime relatif à la lutte contre la rage. NOR : AGRG1122472A. (JORF n°0186 du 12 août 2011, texte n°59)
- AUBERT MFA (1983). Contributions à l'étude des ectoparasites du renard et d'autres carnivores sauvages de l'Est de la France et à l'étude du rôle des arthropodes dans l'épizootie de rage vulpine. Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles, Université Nancy 1. 346 p.
- AUBERT MFA, BLANCOU J, BARRAT J, ARTOIS M et BARRAT MJ (1991). Transmission et pathogénie chez le renard roux de deux isolats à dix ans d'intervalle du virus de la rage vulpine. *Ann. Rech. Vet.* **22** ; 77-93
- BABAUT N, CORDIER F, LAFAGE M, COCKBURN J, HAOUZ A, PREHAUD C, REY FA, DELEPIERRE M, BUC H, LAFON M et WOLFF N (2011). Peptides targeting the PDZ domain of PTPN4 are efficient inducers of glioblastoma cell death. *Structure.* **19**(10) ; 1518-24.
- BARRAT J, RICHOMME C et MOINET M (2010). The accidental release of exotic species from breeding colonies and zoological collections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **29**(1) ; 113-122

- BARRAT J et ROLLIN PE (1985). Les symptômes de la rage et son diagnostic. *In* : Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 303-310
- BLANCOU J, AUBERT MFA, ANDRAL L et ARTOIS M (1979). Rage expérimentale du renard roux (*Vulpes vulpes*). *Revue Méd. Vét.* **130**(7) ; 1001-1015
- BLANCOU J, AUBERT MFA et PERRIN G (1985). Rage expérimentale du chien. Sensibilité-Symptômes-Excrétion du virus, réactions immunitaires et résistance trois ans après vaccination. *Revue Méd. Vét.* **136**(2) ; 147-152
- BOTVINKIN AD, NIKIFOROVA TA et SIDOROV GN (1985). Experimental rabies in hibernator rodents. *Acta. virol.* **29** ; 44-50
- BOURHY H, KISSI B, AUDRY L, SMRECZAK M, SADKOWSKA-TODYS M, KULONEN K, TORDO N, ZMUDZINSKI JF et HOLMES EC (1999). Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J. Gen. Virol.* **80** ; 2545-2557
- CERKASSKIJ V.L (1980). The Role of the Raccoon Dog in the Epizootiology of Rabies. *WHO-Rabies Research.* **80**(9) ; 11-13
- CHANTAL J et BLANCOU J (1985). Le virus rabique. *In* : Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 281-292
- CHERKASSKIY B.L (1988). Roles of the Wolf and the Raccoon Dog in the Ecology and Epidemiology of Rabies in the USSR. *Rev. Infect. Dis.* **10** (Supplement 4) ; S634-S636
- CLIQUET F, GUIOT AL, MUNIER M, BAILLY J, RUPPRECHT CE et BARRAT J (2006). Safety and efficacy of the oral rabies vaccine SAG2 in raccoon dogs. *Vaccine.* **24** ; 4386-4392
- DECOSTER A, LEMAHIEU JC et PEIGUE-LAFEUILLE H. *Rhabdoviridae. In* : Espace étudiant : Cours de virologie systématique. [en ligne] Campus de microbiologie médicale. Université Paris Descartes 5 [<http://www.microbes-edu.org/>]. Consulté le 17 avril 2013
- DRYGALA F, MIX HM, STIER N et ROTH M (2000). Preliminary findings from ecological studies of the racoon dog (*Nyctereutes procyonides*) in Eastern Germany. *Z. Ökologie u. Naturschutz.* **9** ; 147-152
- DUCHENE MJ (1987). Contribution à l'étude de 2 Carnivores introduits en France : Le Chien viverrin (*Nyctereutes procyonides*, Gray 1834), le Raton laveur (*Procyon lotor*,

Linnaeus 1758) et de leur rôle dans l'épidémiologie de la rage. Diplôme d'études supérieures de sciences naturelles, Université Nancy 1, soutenu le 28 octobre 1987.

-DUCHENE MJ et ARTOIS M (1988). Les carnivores introduits : Chien viverrin (*Nyctereutes procyonides* Gray, 1834) et Raton laveur (*Procyon lotor* Linneus, 1758). *Encyclopédie des Carnivores de France. Espèces sauvages ou errantes, indigènes ou introduites, en métropole ou dans les DOM-TOM n°4 et 6*. Société française pour l'étude et la protection des mammifères. 1-20

-FEKADU M, CHANDLER FW et HARRISON AK (1982). Pathogenesis of Rabies in Dogs Inoculated with an Ethiopian Rabies Virus Strain. Immunofluorescence, Histologic and Ultrastructural Studies of the Central Nervous System. *Arch.Virol.* **71** ; 109-126

-FEKADU M et SHADDOCK J.H (1984). Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Amer. J. Vet. Res.* **45** (4) ; 724-729

-HOLMALA K et KAUHALA K (2006). Ecology of wildlife rabies in Europe. *Mammal Rev.* **36**(1) ; 17-36

-International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)(2013). ICVT Master Species List 2012 v2. Document en ligne [http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4090.aspx] (consulté le 10 Août 21013)

-Institut Pasteur. Site de l'Institut Pasteur. [en ligne]
[<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Dylah/fr-rage.html>]

-IWASAKI Y (1985). Le virus rabique : morphologie. *In* : Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 123 S-129 S

-KAPLAN C, TURNER GS et WARRELL DA (1986). Rabies in animals. *In*: Rabies the facts. Second Edition. Oxford University Press. 68-74

-KAUHALA K (1994). The Raccoon Dog : a Successful Canid. *Canid News.* n°2 ; 37-40

-KAUHALA K et HOLMALA K (2006). Contact rate and risk of rabies spread between medium-sized carnivores in southeast Finland. *Ann. Zool. Fennici* n°43 ; 348-357

-KAUHALA K, HOLMALA K et SCHREGEL J (2007). Seasonal activity patterns and movements of the raccoon dog, a vector of diseases and parasites, in southern Finland. *Mammalian Biology* **72** (6) ; 342-353

- LEGER F et RUETTE S (2005). Le chien viverrin en France. *Faune sauvage*. n° 269 ; 4-13
- MAIER T, SCHWARTING A, MAUER D, ROSS RS, MARTENS A, KLIEM V *et al.* (2010). Management and Outcomes after Multiple Corneal and Solid Organ Transplantations from a Donor Infected with Rabies Virus. *Clin. Infect. Dis.* **50** ; 1112-1119
- MOREAU R (1985). La rage de l'Antiquité au siècle des lumières. *In : Pasteur et la Rage*. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 19-28
- OKUMURA A et HARTY R.N (2011). Rabies Virus Assembly and Budding. *In : Advances in Virus Research*. Elsevier Inc. **79**, Chapter 2 ; 23-32
- Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2013). Site internet de l'OIE [en ligne] [http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php]. Consulté le 08 janvier 2013
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2005). Révision du Règlement sanitaire international. *Cinquante-huitième assemblée mondiale de la santé*. WHA 58.3, 23 mai 2005
- POTZSCH CJ (2002). Surveillance of non-fox mediated rabies in Europe- The hidden rabies risk-Raccoon dog rabies. *In : Proceedings of WHO meeting of rabies control in middle and east European countries, in Kosice Slovakia, 25-27 septembre 2002*. 91 p.
- RUPPRECHT CE, HANLON CA et HEMACHUDHA T (2002). Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* **2** ; 327-343
- SINGER A, KAUFHALA K, HOLMALA K et SMITH GC (2008). Rabies risk in Raccoon Dogs and Foxes. *In : Towards the Elimination of Rabies in Eurasia*. Dev Biol. Basel, Karger, 2008, **131** ; 213-222
- SINGER A, KAUFHALA K, HOLMALA K et SMITH GC (2009). Rabies in Northeastern Europe-The threat from invasive Raccoon dogs. *J. Wildl. Dis.* **45**(4) ; 1121-1137
- SRINIVASAN A, BURTON EC, KUEHNERT MJ, RUPPRECHT C, SUTKER WL, KSIAZEK TG *et al.* (2005). Transmission of Rabies Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **352**(11) ; 1103-1111
- THOULOUBE MI et LAFON M (2000). Les récepteurs du virus de la rage. *Virol.* **4**(1) ; 39-48

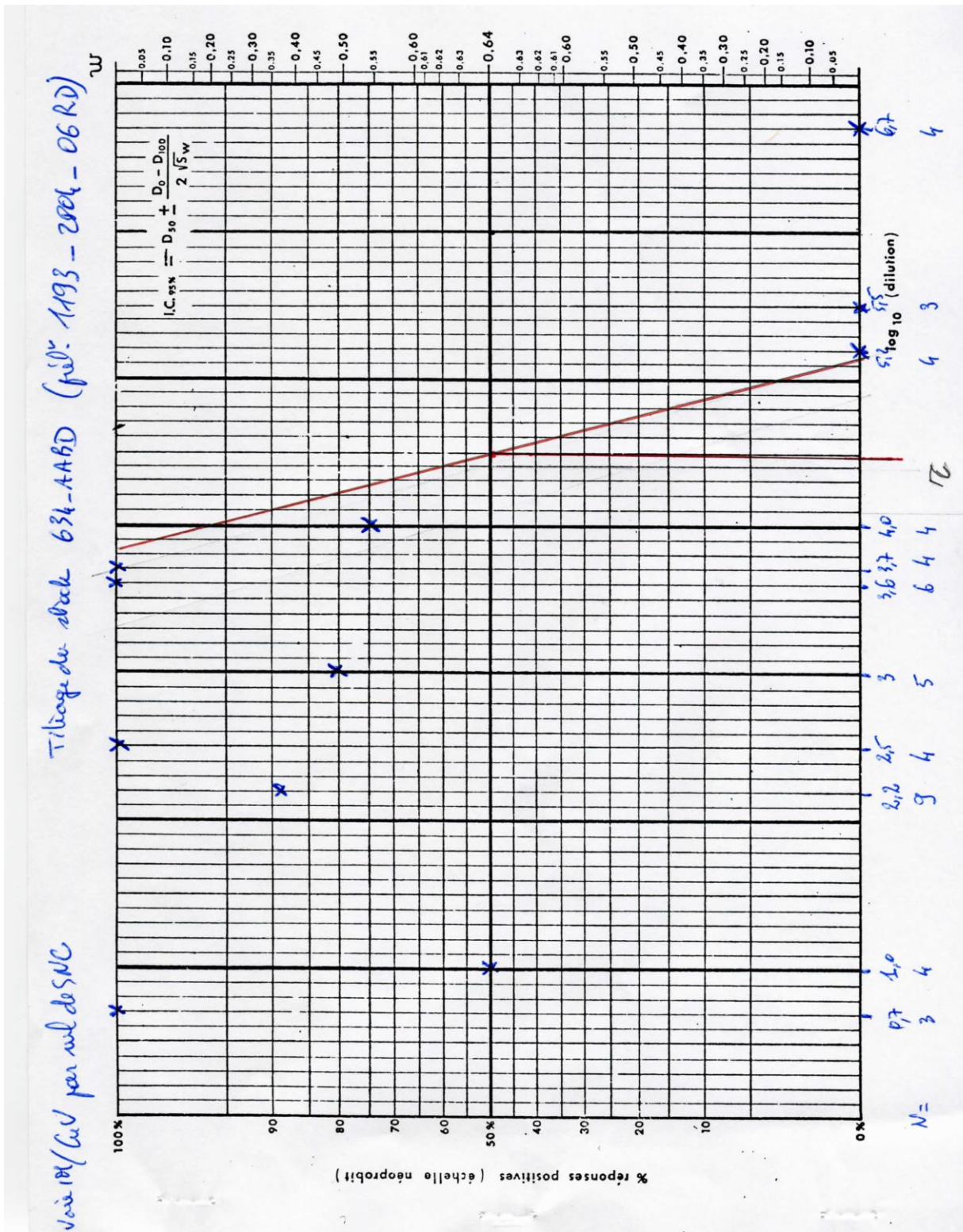
- TOMA B, DUFOUR B *et al.* (2012). *La rage*. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Merial (Lyon), 65 p.
- TORDO N et POCH O (1988). Structure of rabies virus. *In* : Rabies. Boston, Campbell JB and Charlton KM, Kluwer Academic Publishers ; 25-40
- TSIANG H (1985). Pathogénie de la rage. *In* : Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 145S-151S
- VERNON SK. Rabies virus. Products of sequential degradation. *In* : The Big Picture Book of Viruses : [http://www.virology.net/Big_virology/Special/Rabies1/Rabies.htm]. Consulté le 12 février 2013
- VORA NM, BASAVARAJU SV, FELDMAN KA, PADDOCK CD, ORCIARI L, GITTERMAN S *et al.* (2013). Raccoon rabies virus variant transmission through solid organ transplantation. *J. Am. Med. Assoc.* **310**(4) ; 398-407
- WANDELER A, WACHENDÖRFER G, FÖRSTER U, KREKEL H, MÜLLER J et STECK F (1974). Rabies in Wild Carnivores in Central Europe. II. Virological and Serological Examinations. *Zbl. Vet. Med.* **21** ; 757-764
- World Health Organisation (WHO). Site internet de “World Health Organisation” (WHO) [en ligne] [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/fr/>]. Consulté le 14 février 2013
- WHO Rabies Bulletin. Site internet de WHO Rabies Bulletin. [en ligne] [<http://www.who-rabies-bulletin.org/Queries/Maps.aspx>]. Consulté le 08 janvier 2013
- WHO Technical Report Series (2005). WHO Expert Consultation on Rabies. First report. *WHO Technical Report Series.* **931** ; 15-19

ANNEXES

Annexe 1 : Grille de suivi des signes cliniques

Signe clinique			
RAS			
Anorexie			
Modification du regard			
Absence de crainte, curiosité			
Familiarité			
Fait des réserves de nourriture			
Prostration			
Cris			
Agressivité			
Nervosité, excitabilité			
Fureur			
Auto-épilation			
Auto-mutilation			
Plaintes			
Parésie			
Paralysie			
Procidence 3 ^{ème} paupière			
Difficulté de déglutition			
Tremblements			
Diarrhée			
Vomissements			
Dyspnée			
Salivation			
Mort			
Nombre de croix			
Visa			

Annexe 2 : Détermination du titre du stock par la méthode graphique des néoprobits



Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Annexe 3 : Calcul de la dose réellement reçue par les animaux des deux groupes lors du protocole CnV3

- Graphiquement, pour le stock de virus utilisé, on obtient le titre suivant :

Titre = $10^{4,5}$ DL₅₀IM pour le chien viverrin/ml de SNC (sur le graphique

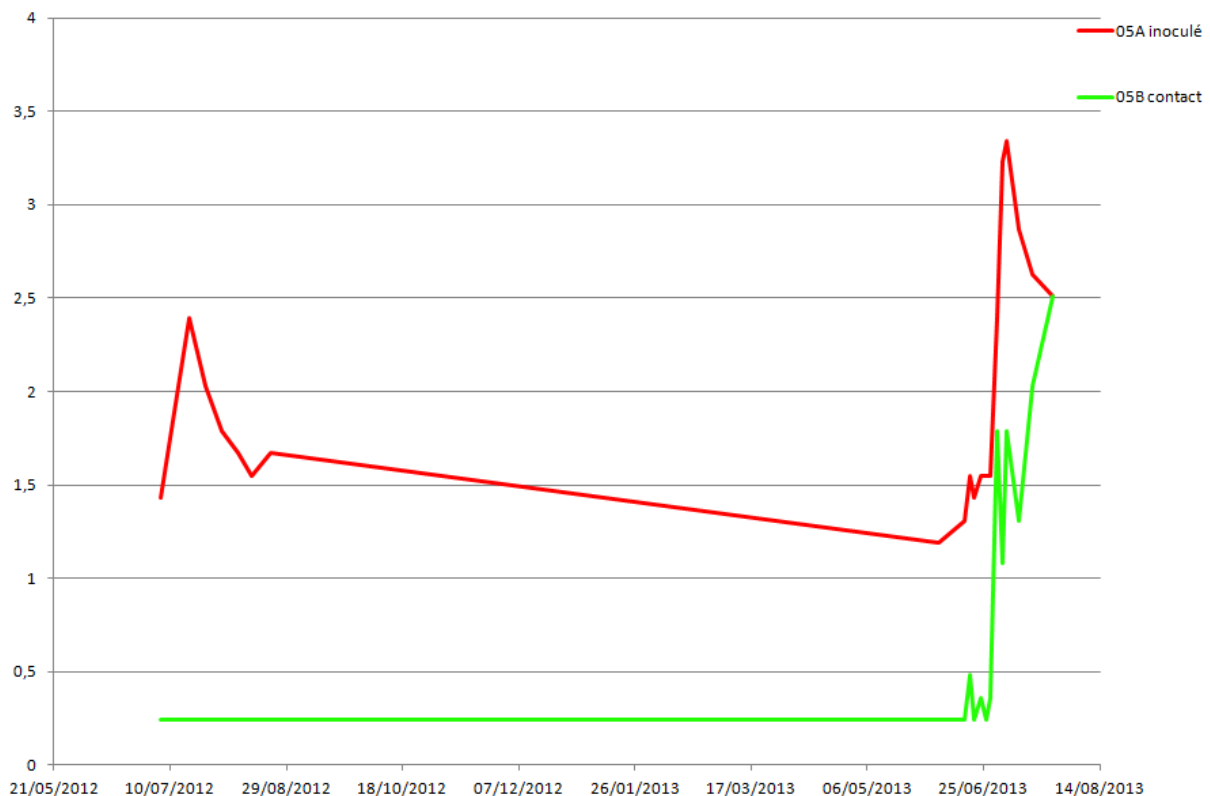
Annexe 2, correspond au log₁₀(dilution) de 50% de réponses positives de la droite rouge)

- Les animaux du **groupe 1** ont été inoculés avec 1ml du stock dilué à $10^{-2,2}$. Ces animaux ont donc reçu : $10^{4,5} \times 10^{-2,2} = 10^{2,3}$ DL₅₀IM pour le chien viverrin = **200 DL₅₀IM pour le chien viverrin**

- Les animaux du **groupe 2** ont été inoculés avec 1ml du stock dilué à $10^{-3,6}$. Ces animaux ont donc reçu : $10^{4,5} \times 10^{-3,6} = 10^{0,9}$ DL₅₀IM pour le chien viverrin = **8 DL₅₀IM pour le chien viverrin**

Annexe 4: Courbe de la cinétique de la DE50 du couple de chien viverrin 5A/5B, de l'inoculation (le 6 juillet 2012) à leur vaccination (le 26 juin 2013)

Cinétique DE50



PHYSIOPATHOLOGIE DE LA RAGE DU CHIEN VIVERRIN ET EXCRÉTION SALIVAIRE DU VIRUS RABIQUE CHEZ CETTE ESPÈCE

MARTIN Elise

Résumé :

Le chien viverrin a été introduit en Europe entre les années 1930 et 1950. Il est rapidement devenu le principal vecteur de la rage sylvatique dans certains pays de l'Est de l'Europe. Il est dès lors apparu nécessaire au laboratoire de la rage et de la faune sauvage (Anses, Nancy) d'étudier les caractéristiques de l'infection virale chez le chien viverrin, notamment par le virus adapté à cette espèce, pour limiter l'expansion de cette maladie mortelle. Cinq protocoles ont été mis en place et au total, 45 chiens viverrins ont été inoculés avec le même stock de virus, à des doses différentes. La dernière expérience, à laquelle j'ai participé, a consisté à évaluer l'excrétion salivaire et la transmission « naturelle » du virus entre chiens viverrins. Ces travaux ont montré que le chien viverrin est sensible au virus rabique isolé du chien viverrin, du moins à certains isolats, et qu'il est capable de transmettre ce virus à un autre chien viverrin. La durée moyenne de l'incubation et de la phase symptomatique sont comparables à celles observées chez les carnivores plus classiquement étudiés. La phase symptomatique se caractérisait souvent par des attaques très frustes et très violentes entre congénères. La phase d'excrétion salivaire était toujours très courte et proche de la mort et ne présentait pas de variation significative en fonction de la dose de virus inoculée.

Mots clés :

RAGE / VIRUS RABIQUE / INOCULATION / TRANSMISSION / EXCRÉTION
SALIVAIRE / COADAPTATION HÔTE-VIRUS / CHIEN VIVERRIN / CANIDÉ

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr HADDAD HOANG-XUAN Nadia

Assesseur : Dr LE PODER Sophie

Invités : Dr MONCHATRE-LEROY Elodie, Dr BARRAT Jacques

PHYSIOPATHOLOGY OF RABIES IN THE RACCOON DOG AND VIRAL EXCRETION IN THE SALIVA OF THIS SPECIES

SURNAME: MARTIN

Given name: Elise

Summary:

The raccoon dog was introduced in Europe between the 1930's and the 1950's. It rapidly became the main rabies vector amongst wildlife in certain countries of Eastern Europe. In such a context, it became necessary for the rabies and wildlife laboratory (Anses, Nancy) to study the characteristics of the viral infection in the raccoon dog, and particularly with the viral strain found in this species, in order to limit the spread of this lethal illness. Five protocols have been established and in total, 45 raccoon dogs were inoculated with the same viral stock but with different doses. The last experiment, to which I participated, consisted in studying the viral salivary excretion and the "natural" transmission of the virus between raccoon dogs. We conclude that the raccoon dog is vulnerable to the rabies virus which comes from the raccoon dog, or at least to some isolates. Furthermore, it is capable of transmitting this virus to another raccoon dog. The incubation period and the clinical phase are comparable to that of more frequently studied carnivores. Short violent attacks between individuals were frequent. The period of viral detection in the saliva was always very short and close to animal death. The length of this period was almost identical in all animals regardless of the dose of the virus that was administered.

Keywords:

**RABIES / RABIES VIRUS / INOCULATION / TRANSMISSION / VIRAL SALIVARY
EXCRETION / VIRUS-HOST COADAPTATION / RACCOON DOG / CANID**

Jury:

President: Pr.

Director: Pr HADDAD HOANG-XUAN Nadia

Assessor: Dr LE PODER Sophie

Guests : Dr MONCHATRE-LEROY Elodie, Dr BARRAT Jacques