



Transmission et pathogénie chez le renard roux de deux isolats à dix ans d'intervalle du virus de la rage vulpine

Mfa Aubert, J Blancou, J Barrat, Marc Artois, M-J Barrat

► To cite this version:

Mfa Aubert, J Blancou, J Barrat, Marc Artois, M-J Barrat. Transmission et pathogénie chez le renard roux de deux isolats à dix ans d'intervalle du virus de la rage vulpine. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1991, 22 (1), pp.77-93. hal-00902012

HAL Id: hal-00902012

<https://hal.science/hal-00902012>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Transmission et pathogénie chez le renard roux de deux isolats à dix ans d'intervalle du virus de la rage vulpine

MFA Aubert, J Blancou, J Barrat, M Artois, M-J Barrat

*Centre national d'études vétérinaires et alimentaires, laboratoire d'études sur la rage
et la pathologie des animaux sauvages, BP 9, 54220 Malzéville, France*

(Reçu le 26 juin 1990; accepté le 27 septembre 1990)

Résumé – Deux souches de virus de la rage isolées en France chez le renard roux en 1976 et 1986 ont été inoculées respectivement à 2 groupes de 10 renards, à raison d'environ 50 doses létales à 50 % intracérébrale souris par renard. Vingt autres renards sains ont été gardés chacun dans la cage d'un renard inoculé afin d'étudier la transmission de la rage des seconds aux premiers. Tous les renards expérimentalement infectés ont contracté la rage et l'ont transmise à leur compagnon. L'intervalle de temps entre la mort du renard expérimentalement infecté et celle de son compagnon s'est révélé significativement ($P < 0,001$) plus variable avec la souche la plus ancienne, de 1 à 33 j, par comparaison avec la souche la plus récente pour laquelle cet intervalle a été compris entre 10 et 14 j. Cependant l'intervalle moyen a été similaire pour les 2 souches. Cette perte de variabilité, apparue sur certaines souches récentes, pourrait entraîner une réduction des possibilités d'extension géographique de l'épizootie. On a mis en évidence une virémie chez 2 renards inoculés avec la souche la plus récente mais on ne peut affirmer qu'il s'agisse d'une caractéristique propre à cette souche. L'excrétion du virus dans la salive a été démontrée chez les renards quelle que soit la souche dans un intervalle de 29 j au maximum avant l'apparition des symptômes. Cette observation pose le problème du délai de sécurité avant l'apparition des premiers symptômes chez les animaux mordeurs.

rage / renard / épidémiologie / excrétion salivaire / virémie

Summary – **Transmissibility and pathogeny of two rabies isolates from the red fox at a 10 year interval.** Two rabies virus strains collected from naturally infected foxes in France in 1976 and 1986 were inoculated in 2 groups each consisting of 10 foxes (approximately 50 lethal doses₅₀ mouse intracerebral per fox). Another 20 healthy foxes were kept in the same cages as the inoculated animals in order to study the transmission of both strains. All the inoculated foxes became rabid and transmitted rabies to their cage companion. The intervals between death of the inoculated foxes and death of the cage companion were significantly more variable ($P < 0.001$) with the earlier strain, from 1 to 33 days compared to the range obtained with the later strain, 10-14 days. However, the mean intervals did not differ. Epidemiological consequences of such a decrease in variability, if confirmed in the field could decrease the epidemiological extent of rabies. Viremia was demonstrated in 2 foxes inoculated with the later strain

but we cannot assume this to be a characteristic of this strain compared with the earlier strain. Rabies virus (both strains) was isolated from the saliva of foxes 29 days or less before the onset of clinical symptoms. This last result raises the question of the time limit as regards security before onset of clinical symptoms in animals involved in human contamination.

rabies / fox / epidemiology / salivary excretion / viremia

INTRODUCTION

De 1948 à 1978 l'épizootie de rage du renard a progressé en Europe à partir de la Pologne à la vitesse moyenne de 30 km/an. À partir de 1978, l'épizootie s'est ralentie de manière spectaculaire et a même régressé dans certaines zones du front de rage, alors que l'arrière restait durablement contaminé (Blancou *et al*, 1988a). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce ralentissement :

— le front de rage aurait atteint des zones de moindre densité en renards et des zones où les échanges entre individus sont entravés par des obstacles naturels : à l'est de la zone d'enzootie (Bassin parisien), les rivières sont plus larges que dans les massifs qui les alimentent et au sud, la zone d'enzootie a atteint les barrières montagneuses alpines;

— une baisse de la densité des populations de renards (non documentée) qui aurait été provoquée par de faibles variations climatiques, ou l'aménagement des milieux (suppression des haies, drainages des terres);

— des modifications comportementales du renard : l'impact de la rage favoriserait les individus adoptant un mode de vie plus solitaire (et non pas en groupes sociaux élargis), et

ceux qui adopteraient des attitudes plus méfiantes vis-à-vis de congénères au comportement déviant. Au contraire, la sélection naturelle des renards les moins sensibles à la contamination paraît improbable compte tenu de l'extrême sensibilité des renards à la souche vulpine et de l'absence d'individus survivant à une inoculation virale;

— enfin la dernière hypothèse serait la modification du virus rabique lui-même.

Nous rapportons ici les expériences que nous avons conduites pour vérifier cette dernière hypothèse. Des expériences de ce type induisent une souffrance animale que nous avons cherché à limiter le plus possible. Elles étaient cependant les seules capables de nous apporter des éléments de réponse à la question de l'évolution possible du virus de la rage sur le terrain, question cruciale pour déterminer les meilleures stratégies de vaccination orale des renards sur le terrain.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Protocole général

Le but de ce protocole était de rechercher si des souches isolées chez des renards naturellement infectés à 10 ans d'inter-

valle se transmettent avec la même efficacité et à la même vitesse de renard à renard. On a essayé de recréer, au moins grossièrement, la chaîne de contamination du renard enragé au renard sain.

Nous avons utilisé 10 paires de renards. Un renard de chacune des 5 paires d'un premier groupe a été inoculé avec le premier isolat (GS3-1). Dans le même temps, le second isolat (GS7-1) a été inoculé à 1 renard de chacune des paires du second groupe. Le développement de la maladie a été suivi sur tous les individus qui ont été régulièrement soumis à des prises de sang et à des prélèvements de salive.

Cette expérience a été renouvelée une seconde fois sur 10 autres paires de renards.

Isolats viraux

Souche GS3-1 et GS7-1 : il s'agit du broyat des 2 glandes salivaires sous-maxillaires d'un renard mort de rage à la suite de l'inoculation intramusculaire dans les muscles temporaux des souches GS3 et GS7 respectivement. Ces glandes ont été broyées à l'aide d'un homogénéiseur à couteau dans 4 fois leur poids de solution de Hanks à pH 7,2 additionné d'antibiotiques et d'antimycosique (réf Gibco, Cergy-Pontoise, 043-05240H). Après centrifugation à 1 500 g pendant 30 min à 4°C, le broyat a été distribué en ampoules de verre scellées et placées immédiatement en azote liquide. Les souches parentales GS3 et GS7 avaient été constituées selon le même protocole à partir de glandes salivaires de renards naturellement infectés morts en 1976 et en 1986 respectivement. Ces glandes avaient été sélectionnées comme les plus virulentes pour la souris après inoculation par voie intracérébrale.

Renards

Les renards roux (*Vulpes vulpes*) ont été obtenus par déterrage en France en 1987 (première expérience) et en 1988 (seconde expérience) dans des zones non encore contaminées par la rage (Ouest et

Centre). Ces renards étaient dépourvus d'anticorps rabiques neutralisants.

Ces renards ont été élevés par paire. Chaque paire était constituée par des renards souvent issus de mêmes portées, le plus souvent de sexe opposé et toujours élevés dans la même cage depuis au moins l'âge de 3-6 semaines. Les conditions générales d'élevage ont déjà été décrites par ailleurs (Blancou *et al*, 1979a).

Tous les renards ont été marqués individuellement par un numéro de 3 chiffres, tatoué dans le pavillon de l'oreille. Les renards portant un numéro compris entre 711 et 781 ont été utilisés pour la première expérience. Ils étaient âgés d'environ 10-12 mois le jour de l'inoculation. Les renards portant un numéro compris entre 800 et 872 ont été utilisés pour la seconde expérience. Ils étaient en moyenne plus jeunes de 4 mois. Ce numéro a systématiquement été vérifié chaque fois que les renards ont été manipulés (inoculation, prélèvements).

Les renards étaient observés au moins 2 fois/j en semaine et au moins 1 fois/j les samedis et dimanches. Afin de limiter le plus possible toute excitation susceptible de provoquer une attitude agressive chez les renards en phase clinique, toutes les manipulations ont été faites par un personnel qualifié, manipulant avec calme et dans un silence absolu. Malgré ces précautions, 2 renards ont été blessés gravement en notre présence par leur congénère enragé : ils ont été immédiatement euthanasiés par inoculation intraveineuse de 5 ml de DolétholND (Laboratoire Vétérinaire, Lure). Lors de la première expérience, dès que l'un des renards présentait des morsures graves, il était séparé de son congénère et placé dans une cage différente afin d'éviter que les combats se prolongent. Lors de la seconde expérience, même en l'absence de trace de morsure, les paires de renards ont été séparées dès le troisième j après l'apparition des symptômes de rage chez l'un des renards. Enfin, afin d'éviter des pathologies microbiennes dues aux morsures, les renards ont reçu à titre curatif (première expérience), et à titre préventif (seconde expérience), un traitement antibiotique (injection intramusculaire de Terramycine «longue action»ND Pfizer, Orsay, 0,5 ml/animal).

Souris

Des souris Swiss OF1 femelles âgées de 4-6 semaines, exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (IFFA CREDO-69210 l'Arbresle, France) ont été utilisées pour le titrage des virus. Des souriceaux de 4 j, issus de mères gestantes de même provenance ont été utilisés pour les essais d'isolement de virus à partir du sang et de la salive des renards.

Inoculations de virus

Les dilutions de virus ont été ajustées de manière à administrer à chaque renard le même nombre de doses létales 50 % intracérébrales souris (DL₅₀ICS) quelle que soit la souche. Le nombre de DL₅₀ICS visé était de 10^{1,5} ce qui, selon nos expériences antérieures (Blancou *et al*, 1979a) est équivalent à la DL₁₀₀ chez le renard, par inoculation intramusculaire dans les muscles temporaux. Les dilutions des inocula employées ont été 10^{-4,5} pour le virus GS3-1 et 10^{-5,4} pour le virus GS7-1. Le protocole suivi a été strictement le même lors des 2 expériences. Pendant le transport et entre chaque utilisation, les inocula étaient maintenus au froid. Ils ont été manipulés à l'abri de la lumière directe. Afin de multiplier les contrôles, des codes de couleur étaient apposés sur les flacons ainsi que sur les cages des renards des groupes correspondants. Les renards qui devaient subir l'inoculation virale ont été tirés au hasard dans chaque paire. Le renard témoin a été inoculé avec une solution de Hanks additionnée d'antibiotiques et antimycosique. À chaque renard subissant une inoculation virulente, on a sur le moment coupé les poils de l'extrémité de la queue afin de le distinguer de son congénère témoin sans avoir à les manipuler (pour lire le tatouage de l'oreille). Afin de s'assurer que chacun des 2 inocula fut administré au même moment, et que l'un ne subisse pas une décroissance de titre plus importante que l'autre avant d'être administré aux renards, on a alterné renard après renard l'inoculation de chacune des 2 souches pendant la manipulation. En fin de séance, les inocula ont été titrés par inoculation intracérébrale à la souris : les doses réellement employées ont été de

10^{1,94} DL₅₀ ICS pour la souche GS3-1 et de 10^{1,86} pour la souche GS7-1 lors de la première expérience, et 10^{1,81} et 10^{1,45} lors de la seconde expérience. Ces différences sont faibles et ne peuvent être jugées significatives.

Prélèvements et titrages

Prises de sang

Tous les renards ont été soumis à des prises de sang régulières par ponction à la veine jugulaire. Pour rechercher le virus rabique, du sang hépariné a été inoculé soit à des souriceaux nouveau-nés (0,02 ml par voie intracérébrale), soit à des cultures de neuroblastomes N2a (réf. ATCC = CCL 131) (Flow, Puteaux) sur les prélèvements faits à partir du jour 32 après inoculation, (Barrat *et al*, 1988). L'étiologie de la mort des souriceaux a systématiquement été vérifiée par immunofluorescence (Kaplan et Koprowski, 1973). Le sérum a été titré pour rechercher les anticorps neutralisants sur cellules BHK 21.

Prises de salive

Tous les renards ont simultanément été soumis à des prises de salive à l'aide de SalivettesND (Sarstedt, Molsheim réf. 51.1534). Le tampon de coton était placé dans le cul-de-sac gingival et la gueule maintenue fermée pendant la durée de la prise de sang. Ensuite, ce tampon était passé sur la muqueuse buccale et les dents alors que les mâchoires étaient maintenues fermées de manière à empêcher le mordillement du tampon. En cas d'échec, une nouvelle salivette était utilisée de manière à rendre possible la pesée (par différence) de la salive prélevée. Le tampon était ensuite immédiatement mouillé avec du diluant (Hanks, antibiotiques, antimycosique) de volume (ml) égal à 9 fois le poids (g) de la salive prélevée. Transportés sous froid au laboratoire, les prélèvements salivaires ont été centrifugés à 4 °C (1 500 g pendant 30 min). La salive diluée a été inoculée immédiatement soit à des souriceaux nouveau-nés (3-11 souriceaux selon le volume de salive dilué dis-

ponible), soit à des cultures de neuroblastomes N2a sur les prélèvements faits à partir du j 41 après inoculation du virus. Le plus rapidement possible après la mort des renards, les centres nerveux et les glandes salivaires ont été prélevés pour confirmer l'étiologie rabique par immunofluorescence et isolement du virus dans ces organes selon les protocoles recommandés par l'Organisation mondiale de la santé (Kaplan et Koprowski, 1973). Afin de multiplier les contrôles sur l'origine de chaque prélèvement, ceux-ci étaient suivis non seulement par inscription du numéro de tatouage de l'animal, la date du prélèvement et de sa nature, mais aussi à l'aide du code coloré déjà signalé plus haut. De même, l'inoculation des prélèvements aux souriceaux le jour même présentait l'avantage d'éviter une baisse du titre du virus éventuellement présent, mais évitait aussi les confusions d'étiquetage toujours possibles avec du matériel stocké.

Analyse statistique

La distribution des délais de mortalité ne suivant pas la loi de Laplace-Gauss, on

a utilisé le test de rangs de Mann-Whitney (Dagnélie, 1975).

Les titres de virus et d'anticorps neutralisants ont été calculés sur les probits de Bliss (Bliss, 1935a et b) selon la méthode des moindres carrés pondérés à l'aide d'un logiciel original.

La comparaison des titres en anticorps neutralisants a été faite sur le logarithme décimal du nombre d'unités internationales neutralisantes, selon la méthode d'analyse de la variance, adaptée à un plan non orthogonal (Dagnélie, 1975). La comparaison des séries de titres de virus mesurés sur les glandes salivaires a été faite selon le test de comparaison des moyennes de Student (Dagnélie, 1975).

RÉSULTATS

Mortalité et morbidité

À l'exception de 2 renards euthanasiés en raison de morsures graves, tous les renards inoculés et «contact» sont morts de rage (tableau I).

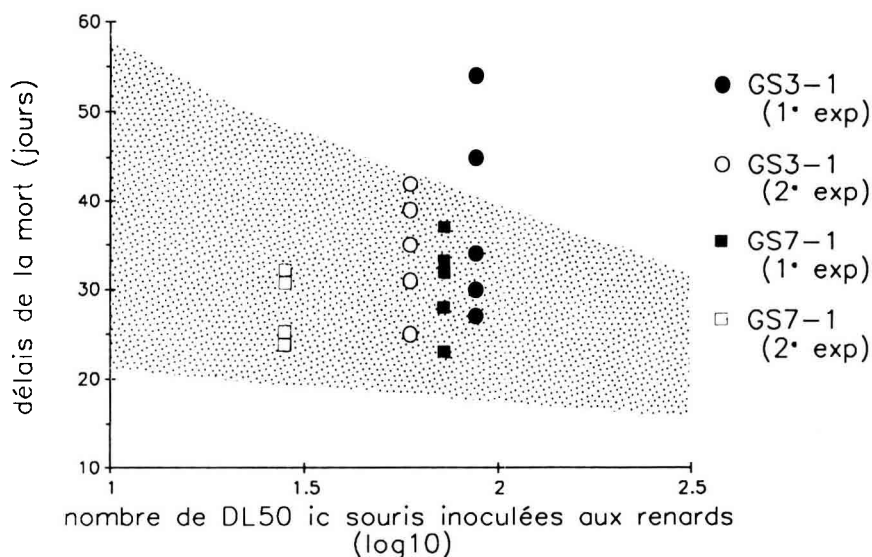


Fig 1. Relation entre délai de la mort et dose de virus rabique (DL₅₀ ic souris) inoculée aux renards. La zone ombrée représente la zone d'incertitude des résultats obtenus dans des expériences antérieures avec les souches parentales (Blancou *et al*, 1979a).

Chez les renards inoculés

La mortalité est survenue à partir du 27^ej et jusqu'au 54^e (36,2 j en moyenne) avec la souche GS3-1, et à partir du 23^ej et jusqu'au 37^ej (29j en moyenne) avec la souche GS7-1 (tableau I). Ces moyennes ne diffèrent pas significativement, mais la dispersion des délais est significativement plus grande avec la souche GS3-1 ($F = 3,66$ pour 9 et 9 ddl, $P < 0,05$). Paradoxalement, c'est avec la souche GS7-1 utilisée à dose plus faible, que les délais de mortalité sont les plus courts (fig 1).

La durée de la maladie est très variable : de 1-8 j (tableau I). La durée moyenne a été de 3,5 j avec la souche GS3-1 et de 3,9 j avec la souche GS7-1 (pas de différence significative). Les manifestations cliniques ont été similaires dans les 2 groupes de renards inoculés. Les symptômes classiquement observés ont été notés : perte d'appétit, agitation, glapissement, mordillement ou morsures convulsives du grillage ou de tout autre objet. L'agressivité se manifestait contre le congénère non inoculé qui évitait alors systématiquement la présence de son congénère malade. Les traces de

Tableau I. Durée de la maladie et délais de la mort des 20 renards inoculés avec du virus GS3-1 ou GS7-1 et de 20 autres renards témoins élevés dans les mêmes cages que ceux-ci (renards «contact»). Chaque ligne du tableau correspond à une cage.

Renards inoculés			Renards «contact»			
n° renard inoculé	durée maladie (j)	délais mort (j)	n° renard	durée maladie (j)	délais mort (j)	intervalle (j) ^a
GS3-1 ($10^{1,9}$ DL ₅₀ ICS)						
711	4	30	712	5	34	4
721	5	45	722	4	44	-1
731	2	27	732	4	60	33
744	2	34	745	3	46	12
781	8	54	749	8	54	0
810	5	39	814	1	54	15
838	2	42	848	2	55	13
841	4	25	851	3	38	13
853	1	35	844	3	47	12
872	2	31	855	3	32	1
GS7-1 ($10^{1,5}$ à $10^{1,8}$ DL ₅₀ ICS)						
737	1	23	736	2	36	13
746	1	37	747	5	51	14
755	2	28	754	4	42	14
764	2	33	763	5	43	10
767	6	32	779	2	45	13
800	4	25	850	b	-	-
846	6	31	863	2	41	10
859	3	24	862	b	-	-
864	6	25	867	5	39	14
866	8	32	865	2	45	13

^a : intervalle de temps entre la mort du renard «contact» et celle de son compagnon inoculé avec du virus; ^b : renard euthanasié.

morsures étaient souvent localisées à la face chez les 2 individus.

Chez les renards «contact»

Le délai de mortalité, compté à partir du jour de l'injection de solution témoin (et non pas à partir du jour où le renard a été contaminé, ce jour restant inconnu) a été de 32-60 j chez les renards de la série GS3-1 (46,4 j en moyenne) et de 36 à 51 j chez les renards de la série GS7-1 (42,8 j en moyenne) (tableau I). La différence entre ces 2 délais moyens n'est pas statistiquement significative. L'intervalle de temps écoulé entre la mort du renard «contact» et celle de son compagnon s'est échelonné de - 1 à 33 j (+ 10,2 j en moyenne) dans la série GS3-1; cet intervalle a été compris entre + 10 et + 14 j (+ 12,6 j en moyenne) dans la série GS7-1 (tableau I). Ces moyennes ne sont pas significativement différentes, en revanche on constate une grande variabilité des intervalles des dates de la mort des renards appariés de la série GS3-1 étant donné la régularité des mêmes délais enregistrés dans la série GS7-1. On remarque même que l'un des renards «contact» GS3-1 est mort avant son compagnon ayant reçu l'inoculation virulente. Cette différence de variance est hautement significative ($F = 35,9$ pour 9 et 7 ddl, $P < 0,001$). Cet intervalle est indépendant du délai de mortalité du renard à l'origine de la contamination du renard «contact».

Virulence salivaire

La mise en évidence du virus dans la salive est inconstante chez un même renard, mais elle a pu être faite à un moment ou à un autre de

la phase d'incubation ou de la phase clinique chez de nombreux individus : 9/10 renards et 7/10 renards dans les groupes de renards inoculés avec GS3-1 et GS7-1 respectivement et 7/10 renards et 8/10 renards dans les groupes «contact» correspondants (non significatif) (tableau II). Cette excrétion a été démontrée au plus tôt 14 j après l'inoculation virulente : les essais du j 7 et du j 11 ont tous été négatifs.

Lorsque les 2 individus occupant la même cage ont présenté une excrétion salivaire de virus, il est possible d'étudier le décalage des dates entre les examens positifs les plus précoces :

— dans la série GS3-1, le premier renard trouvé excréteur a été soit le renard inoculé (3 cas), soit le renard contact (2 cas); dans 1 cas le diagnostic positif a été porté le même jour sur les 2 individus;

— dans la série GS7-1, les mêmes situations se sont répétées respectivement : 1 fois, 2 fois et 3 fois.

Les premiers individus chez lesquels le virus a pu être isolé dans la salive appartiennent au groupe de renards inoculés avec GS7-1 et au groupe «contact» correspondant mais l'examen de l'ensemble des résultats montre qu'aucun groupe n'excrète plus précocement que l'autre. Aucune différence, même non significative, n'apparaît plus lorsque l'on compte à rebours les dates d'excrétion par rapport à la date de la mort de chaque renard (tableau III). L'analyse de ce tableau confirme bien que le virus a été isolé plus fréquemment dans les 5 j précédant la mort. Cette fréquence est moindre dans les périodes précédentes, mais même dans la décade de 21 à 30 j avant la mort,

Tableau II. Recherche du virus dans la salive de 20 renards inoculés avec les souches GS3-1 et GS7-1 et de 20 autres renards élevés dans les mêmes cages que ceux-ci (renards «contact»).

<i>Renards inoculés</i>		<i>Renards «contacts»</i>	
<i>n° renard</i>	<i>délais^a</i>	<i>n° renard</i>	<i>délais^a</i>
GS3-1			
711	26	712	21 et 26
721	36	722	...
731	21 et 26	732	56 et 57
744	21, 26 et 29	745	36
781	21, 33 et 42	749	...
810	...	814	24, 49 et 53
838	35, 39 et 41	848	49 et 53
841	20	851	20 et 27
853	32	844	24
872	24 et 27	855	...
GS7-1			
737	14 et 21	736	14 et 21
746	36	747	36
755	26	754	21, 26 et 36
764	14 et 29	763	...
767	26 et 29	779	21, 29 et 36
800	20	850	...
846	20 et 27	863	39
859	...	862	20
864	...	867	35
866	...	865	32

^a Délais de mise en évidence du virus dans la salive (j après inoculation).

Tableau III. Recherche du virus dans la salive des 20 renards inoculés avec les souches GS3-1 et GS7-1 et de 20 autres renards élevés dans les mêmes cages que ceux-ci (renards «contact»). Les délais sont comptés à rebours à partir du jour de la mort du renard. Ce décompte à rebours à partir du jour de la mort permet de cumuler tous les résultats, même lorsque la date de la contamination est inconnue.

<i>groupes</i>	<i>délais avant la mort (j)</i>							
	<i>0-5</i>	<i>6-10</i>	<i>11-15</i>	<i>16-20</i>	<i>21-25</i>	<i>26-30</i>	<i>31-35</i>	<i>36-40</i>
inoculés GS3-1	7/8 ^a	5/10	2/9	0/10	1/7	0/3	1/4	0/2
inoculés GS7-1	7/8	2/10	1/8	1/9	0/5	0/2	—	—
<i>total inoculés</i>	14/16	7/20	3/17	1/19	1/42	0/5	1/4	0/2
«contact» GS3-1	3/8	3/8	2/9	1/10	1/9	1/6	0/6	0/4
«contact» GS7-1	2/4	2/8	3/7	2/6	3/8	0/6	0/4	0/2
<i>total «contact»</i>	5/12	5/16	5/16	3/15	4/17	1/2	0/10	0/6
<i>total général</i>	19/28	12/36	8/33	4/34	5/29	1/17	1/14	0/8

^a Nombre de renards chez lesquels le virus a été isolé dans la salive au moins une fois pendant la période/nombre de renards examinés une fois au moins pendant la même période.

Tableau IV. Titre de virus (en $\log_{10}$ du nombre de DL_{50} ICS par gramme de glande) dans les glandes salivaires récoltées après la mort des renards.

Renards inoculés		Renards «contact»	
N° renards	Titre	n° renards	Titre
GS3-1			
711	6,59	712	0 ^a
721	5,35	722	0
731	5,44	732	6,50
744	4,52	745	7,38
781	7,1	749	3
810	8,38	814	8,02
838	7,72	848	2,82
841	8,05	851	5,61
853	8,06	844	6,26
872	6,89	855	0
Moyenne (écart type)	6,81 (1,33)		3,66 (3,43)
GS7-1			
737	7,58	736	5,36
746	7,54	747	4,91
755	7,45	754	8,37
764	6,18	763	0
767	4,65	779	5,50
800	7,46	850	0
846	5,41	863	8,21
859	8,15	862	0
864	8,88	867	7,12
866	7,81	865	7,28
Moyenne (écart type)	7,11 (1,30)		4,68 (3,43)

a : compte tenu du protocole de broyage et de dilution, un titre nul est en fait défini dans l'intervalle : $\infty < \tau < 2,2$.

il n'a pas été exceptionnel de mettre en évidence une virulence salivaire spécifique (chez 19 à 5 % de renards selon les séries).

Le titre viral dans les glandes salivaires récoltées après la mort de l'animal (tableau IV) est en moyenne de $10^{6,8}$ et $10^{7,1}$ DL_{50} ICS/g de glande respectivement chez les renards ayant subi une inoculation de virus GS3-1 et GS7-1. Le titre moyen est plus faible chez les renards «contact» : $10^{3,7}$ et $10^{4,7}$ DL_{50} ICS/g de glande dans les séries GS3-1 et GS7-1. Mais entre renards inoculés

d'une part et entre renards «contact» d'autre part, les titres ne sont pas statistiquement différents, ils ne sont en relation ni avec la fréquence ni avec la précocité de l'isolement du virus dans la salive.

Virulence du sang

Le virus a pu être isolé du sang de 2 renards sur 5 inoculés avec GS7-1, respectivement 20 et 24 j après l'infection (soit 4 et 7 j avant la mort) mais chez aucun renard «contact».

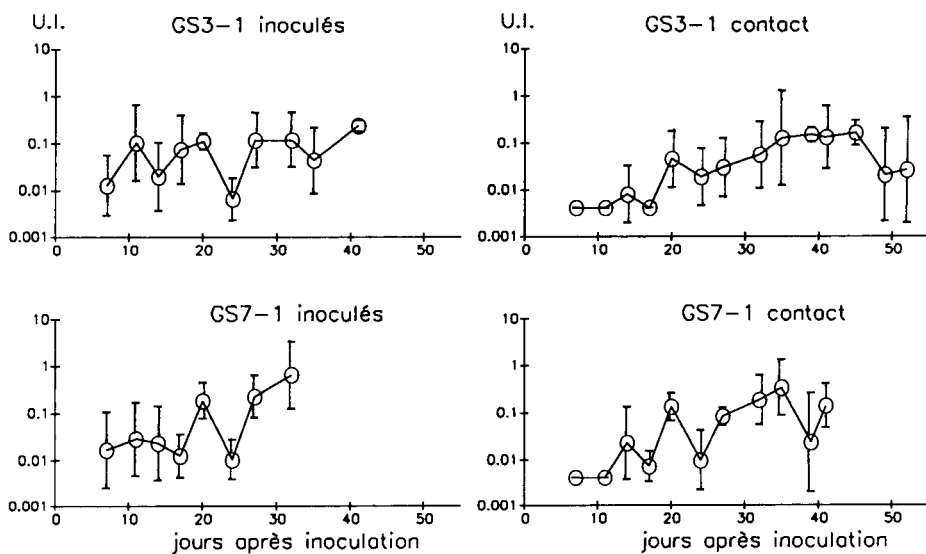


Fig 2. Titre moyen des anticorps séro-neutralisants chez 20 renards inoculés avec du virus GS3-1 et GS7-1 et chez 20 autres renards élevés dans les mêmes cages (contact). Les titrages sont regroupés en fonction des délais après inoculation.

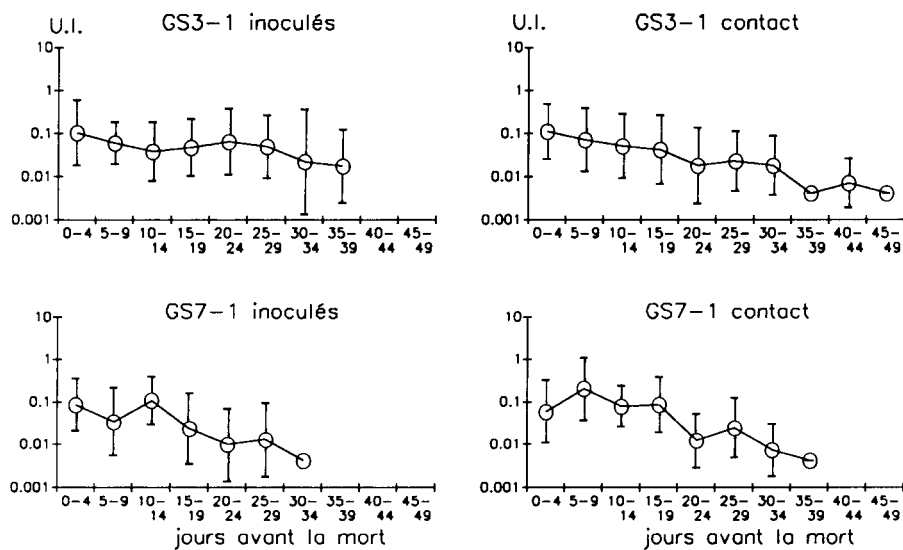


Fig 3. Titre moyen des anticorps séro-neutralisants chez 20 renards inoculés avec du virus GS3-1 et GS7-1 et chez 20 autres renards élevés dans les mêmes cages. Les titrages sont regroupés en fonction du délai avant la mort.

Tableau V. Analyse de la variance des titres en anticorps neutralisants chez 20 renards inoculés avec du virus GS3-1 et GS7-1 et 18 autres renards élevés dans les mêmes cages que ceux-ci (les sérologies de 2 renards euthanasiés n'ont pu être prises en compte puisque les périodes sont calculées avant la mort des renards). Aucun *F* calculé n'est significatif.

<i>Source de variation</i>	<i>ddl</i>	<i>F</i>
<i>De 0 à 9 jours avant la mort</i>	1 et 31	0,02
effet GS3-1/GS7-1	1 et 31	5,02
effet inoculés/contact	1 et 31	0,15
interaction		
<i>De 10 à 19 jours avant la mort</i>	1 et 33	0,26
effet GS3-1/GS7-1	1 et 33	2,49
effet inoculés/contact	1 et 33	0,08
interaction		
<i>De 19 à 47 jours avant la mort</i>	1 et 29	1,88
effet GS3-1/GS7-1	1 et 29	0,88
effet inoculés/contact	1 et 29	1,24
interaction		

Le virus n'a pu être retrouvé dans le sang d'aucun renard inoculé avec GS3-1 ou renard «contact». Par ailleurs les souriceaux ont très souvent mal supporté l'inoculation intracérébrale de sang total : sur 133 examens pratiqués selon cette méthode, 66 sont restés sans réponse (mort des souriceaux et test par immunofluorescence négatif). Dans ces conditions, ces résultats ne peuvent servir de base de comparaison entre les groupes expérimentaux.

Sérologie

Lorsque les moyennes des titres sont calculées en regroupant les résultats comptés après la date d'inoculation, ces résultats apparaissent très irréguliers (fig 2). Lorsque l'on regroupe les résultats en fonction du nombre de *j* avant la mort (fig 3), les résultats sont beaucoup plus réguliers et il devient impossible d'établir une quelconque différence entre groupes. C'est aussi ce que laisse apparaître l'analyse de la variance

effectuée sur les résultats regroupés sur 3 périodes (tableau V).

DISCUSSION

Le premier problème posé par cette approche expérimentale est celui de la représentativité des souches utilisées comparées aux souches qui circulent naturellement sur le terrain. Les souches GS3 et GS7 ont été sélectionnées à l'origine parmi les renards contaminés naturellement mais ayant les glandes salivaires les plus productives en virus ou au moins à partir de glandes salivaires qui sont parvenues au laboratoire dans le meilleur état de conservation. Elles ont ensuite été passées 1 fois chacune sur 1 seul individu par inoculation périphérique. Un dispositif expérimental parfaitement représentatif de ce point de vue serait irréalisable. Nous nous sommes au moins assurés que les 2 souches avaient été sélectionnées de la même façon, et préparées et conservées de la

même façon. Un second problème tient au fait que nous avons été obligés de supposer que la relation du nombre de DL₅₀ souris ic au nombre de DL₅₀ renard im restait la même pour les souches GS3-1 et GS7-1 afin d'inoculer aux renards la même quantité de doses létales renard. Si cette relation devait avoir changé, la conclusion finale de cette expérience s'en trouverait cependant confortée : les souches GS3-1 et GS7-1 auraient *a fortiori* des caractères pathogéniques différents. Enfin, la variabilité et l'inconstance des paramètres mesurés rendent particulièrement difficile l'interprétation des résultats et nous incitent à des conclusions prudentes. Il n'est pas possible pour des raisons pratiques (ni souhaitable pour des raisons éthiques) de compenser cette variabilité en augmentant la taille des groupes expérimentaux. Cette variabilité rend particulièrement décevants les résultats de la sérologie : certaines différences significatives obtenues lors d'expériences antérieures avec les souches parentales GS3 et GS7 (la souche GS7 se révélait plus immunogène, Blancou *et al*, 1988b) n'ont pas été obtenues avec les souches qui en sont directement dérivées : GS3-1 et GS7-1.

Il n'en reste pas moins vrai que ces expériences ont apporté des résultats dont la portée pratique peut être considérable :

L'excrétion précoce du virus dans la salive des renards

Des expériences antérieures avec la souche GS3 sur le renard avaient révélé un délai maximum de 6 j avant la mort et de 5 j avant les premiers

symptômes (Blancou *et al*, 1979b). C'est probablement l'utilisation d'un protocole permettant de récolter le maximum de salive, même en faible quantité, de la diluer le moins possible, de préserver au froid les échantillons prélevés, et de les traiter immédiatement, qui a permis de dépasser les chiffres antérieurs : le record de 29 j avant l'apparition des premiers symptômes ne doit pas être considéré comme exceptionnel dans notre expérience, puisque nous avons obtenu aussi des délais intermédiaires : 25 j, 22 j, 20 j (sur 2 individus), 17 j (sur 2 individus), etc. Ces records dépassent ceux rapportés chez les autres espèces : 13 j chez le chien (Fekadu *et al*, 1982), 17 chez le chat (Vaughn *et al*, 1965).

Le fait de n'obtenir qu'irrégulièrement, à partir de la salive du même individu, des isollements positifs n'est pas un résultat surprenant : ce fait avait déjà été observé par d'autres auteurs (Vasconcellos *et al*, 1978). Nous n'avons pas réussi à isoler le virus dans la salive de 4 individus inoculés, alors que ceux-ci ont été capables de transmettre la rage à leurs compagnons. Ceci indique bien que la technique de mise en évidence du virus dans la salive est peu sensible. Chez 3 renards, le virus n'a pu être isolé ni dans les glandes salivaires, ni dans la salive. L'un d'eux est un renard qui avait été euthanasié, probablement avant que ne s'installe la multiplication du virus dans les glandes salivaires. Aux 2 autres cas peut être opposée la situation inverse : isolement du virus dans la salive, mais pas dans les glandes salivaires (n^{os} 712 et 862). La même situation fut obtenue par Vaughn *et al*, 1965 sur 2 chiens. Une neutralisation du virus dans les

glandes n'est pas à exclure comme cela a déjà été supposé par d'autres auteurs (Carski *et al*, 1962).

L'excrétion salivaire que nous avons observée ne peut cependant être assimilée à un phénomène de «clearance» tel que celui qui avait été invoqué pour expliquer les résultats obtenus par Bindrich et Schmidt (1958) qui avaient obtenu une excrétion virale dès 24 h chez le chien après inoculation d'une quantité énorme de matière virulente. Dans notre expérience, la phase d'éclipse du virus dure au minimum 11 j chez tous les individus inoculés.

Tout en gardant à l'esprit les importantes observations de rage latente du chien en bonne santé apparente, mais excréteur de virus, signalées exceptionnellement dans certaines zones d'enzootie (Andral et Sérié, 1957), ne faut-il pas remettre en cause la notion de délai de sécurité, limité à 15 j avant l'apparition des symptômes chez les animaux mordeurs, sachant que 29 j avant l'apparition des premiers symptômes, un carnivore peut avoir suffisamment de virus dans sa salive pour tuer 1 souriceau sur 7 inoculés ?

L'observation d'une virémie rabique chez le renard est nouvelle

Plusieurs auteurs ont rapporté des virémies rabiques, chez d'autres espèces animales. Mais il convient de bien distinguer, parmi ces rapports, ceux qui décrivent une «virémie d'inoculation» (le virus passe immédiatement dans le sang à la faveur de l'effraction vasculaire d'inoculation) de la «virémie vraie», beaucoup plus tardive, au cours de

laquelle le virus ne passe dans le sang qu'après s'être abondamment répliqué dans les centres nerveux (Aubert et Andral, 1975; Gribencha et Barinsky, 1982). De nombreuses «virémies d'inoculation» ont été rapportées chez la souris (Aubert et Andral, 1975), la chauve-souris (Reagan *et al*, 1955a, 1955b; Fouad, 1964), le lapin (Marie et Urbain, 1905; Wong et Freund, 1951), l'embryon de poulet (Koprowski et Cox, 1948) etc. Les «virémies vraies» sont beaucoup plus rares. Elles ont été rapportées, soit après recherche directe du virus dans le sang des bovins (Pacheco et Proenca, 1936), des chiens (Pasteur *et al*, 1884), de l'homme (Herrmann, sans date), des souris (Atanasiu *et al*, 1970; Baratawidjaja *et al*, 1965), soit en réalisant une parabiose entre un animal enragé et un animal sain (Zunker, 1963), soit en démontrant la possibilité d'une infection transplacentaire (nombreuses observations, Aubert et Andral, 1975; Picard et Blancou, 1983). Et les échecs de telles démonstrations sont, également, nombreux, bien que rarement rapportés (Schweinburg et Windholz, 1930; Becker, 1961) soulignant le caractère aléatoire et transitoire de la «virémie vraie».

Chez le renard aucun auteur n'a rapporté ce type de virémie, bien que les observations de Debbie et Trimarchi (1970) sur le pantropisme du virus rabique chez *Vulpes vulpes* indiquent qu'elle était possible bien que passée inaperçue jusqu'à ce jour.

Dans ces conditions, le fait de n'avoir pu isoler le virus GS7-1 (et non le GS3-1) du sang de renards, peut avoir une signification importante, même si le hasard ne peut être

totale­ment écarté, il étaye l'hypothèse déjà avancée d'une modification du caractère du virus de 1976 à 1986 (Blancou, 1988; Blancou *et al*, 1988b).

Cette virémie observée chez les renards ne peut être jugée comme négligeable, car elle a été mise en évidence malgré les échecs par défaut inhérents à la méthode employée. Les conséquences peuvent en être importantes car la contagiosité du sang n'est généralement pas prise en compte en matière de rage, pas plus que celle de ses dérivés (plasma, sérum), ni de celle des viscères qu'il irrigue. Ce matériel biologique est parfois manipulé sans précaution. La recherche d'une virémie serait à étendre à d'autres espèces (domestiques). L'émergence possible de souches de rage dont la pathogénie serait en évolution doit donc être surveillée dans l'intérêt de la santé publique.

En matière d'épidémiologie de la rage, motivation première de cette étude, nous concluons :

a) avec les souches GS3-1 ou GS7-1, la mortalité de 100 % obtenue chez les renards inoculés correspond bien à la relation dose-mortalité déterminée dans des études antérieures pour les souches virales parentales GS3 et GS7 (Blancou *et al*, 1979a);

b) les symptômes cliniques observés sont ceux classiquement observés (George *et al*, 1980) et ne peuvent être différenciés pour les 2 souches;

c) les délais de mortalité ne diffèrent pas de ceux que nous avons déjà obtenus lors d'expériences précédentes avec les souches parentales GS3 et GS7 et s'inscrivent aussi dans l'intervalle d'incertitude de la

relation délais de la mort/dose inoculée démontrée antérieurement (fig 1) (Blancou *et al*, 1979a) :

d) qu'il s'agisse de la souche GS3-1 ou GS7-1, la transmission de renard à renard est aussi efficace, et les conséquences de cette transmission sont identiques : *rien n'indique donc que des renards puissent survivre à la contamination par des souches plus récentes*;

e) cependant les délais de mortalité apparaissent *significativement plus homogènes avec la souche la plus récemment isolée*. La souche GS7-1 paraît avoir acquis un caractère de souche «fixe» pour le renard au sens Pastorien du terme. Or les modélisations mathématiques de la rage démontrent à quel point un changement, si faible soit-il, de l'un des paramètres de la transmission peut théoriquement éteindre ou faire flamber l'épizootie (Aubert et Artois, 1988). Une souche provoquant la mort quasi-simultanée de tous les renards contaminés par un même individu peut entraîner une élimination rapide des porteurs de virus avant que ceux-ci ne contaminent un congénère sain. Au contraire, une plus grande variabilité des délais de mortalité offrant une plus grande dispersion calendaire des intervalles de contamination possible pourrait être un avantage épidémiologique. Ainsi une plus grande variabilité de ces délais (même à moyenne égale) suppose par exemple une plus grande fréquence de délais longs, permettant alors le repeuplement en renards d'une région avant la mort de tous les renards contaminés sur place. Certaines souches récentes (GS7) auraient perdu une part de cette variabilité et seraient géographiquement et temporellement

moins expansives bien que restant tout aussi pathogènes pour le renard. Une modélisation mathématique serait souhaitable pour valider cette hypothèse;

f) l'observation d'une virémie obtenue avec la souche GS7-1, en supposant qu'elle n'existe pas pour la souche GS3-1, (ce que nous ne pouvons pas conclure), pourrait-elle avoir des conséquences épidémiologiques importantes ? Pour le renard lui-même, le passage du virus dans le sang, pourrait stimuler la production d'anticorps neutralisants et modifier la réponse immunitaire entraînant des conséquences dont la portée est difficile à prévoir. D'autre part, cette virémie pourrait-elle induire l'émergence d'un rôle vecteur chez les parasites hématophages spécifiques au renard ? Des recherches antérieures sur les tiques du renard (Aubert, 1982a) et d'autres carnivores (Aubert, 1982b) ont montré que la virémie n'était pas suffisante pour qu'un tel circuit de transmission s'installe. La multiplication du virus de la rage n'a jamais pu être provoquée par inoculation directe (chez les tiques à tous les stades) ou par nourrissage (de tiques, de mouches). D'autre part, la transmission mécanique simple est bloquée par la barrière gastrique ou salivaire des tiques lorsque le virus est inoculé dans la cavité générale. Enfin, la fragilité du virus de la rage rend très improbable la transmission d'un virus déposé sur les pièces buccales d'un insecte hématophage.

L'observation des renards en cage nous a révélé qu'au bout de quelques jours les renards «contact» se tenaient le plus possible à l'écart de leur compagnon inoculé avec du virus. Libres, auraient-ils tous été

contaminés ? La transmission de la rage et son devenir sur le terrain ne peuvent se limiter à une simple approche mécaniste de la pathogénie. Le suivi du comportement des renards et de son évolution sur le terrain restent primordial (Aubert et Artois, 1988).

Enfin ces expériences illustrent une fois de plus la variabilité du virus de la rage. Dans ce contexte on comprendra mieux que ce virus s'accommode de densités de renards très variables et que les stratégies prophylactiques qui visaient à réduire ces densités aient été décevantes. À l'inverse, ces résultats nous suggèrent que les campagnes de vaccination entreprises aujourd'hui devront couvrir rapidement de grandes surfaces et être suffisamment intenses pour ne pas offrir au virus le temps de s'adapter aux conditions nouvelles de populations vulpines rendues transitoirement moins réceptives par la vaccination.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à la collaboration technique de J Bailly.

RÉFÉRENCES

- Andral L, Serie C (1957) Études expérimentales sur la rage en Ethiopie. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 93, 475-488
- Atanasiu P, Guillon JC, Vallée A (1970) Contribution à l'étude de la rage expérimentale du renard. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 119, 260-269
- Aubert MFA (1982a) Recherche sur le rôle éventuel des tiques en tant que réservoir du virus rabique. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 5, 343-349

- Aubert MFA (1982b) Essais de transmission de la rage au furet par un Ixodidé : *Pholeoixodes rugicollis* (Schulze et Schlottke, 1929). *Acarologia* (Paris) 23, 125-132
- Aubert MFA, Andral L (1975) Rôle éventuel des arthropodes dans l'épidémiologie de la rage. *Symbioses* 7, 57-74
- Aubert MFA, Artois M (1988) Études prospectives de l'influence de la vaccination sur l'épidémiologie de la rage et les populations vulpines. in : *Vaccination to control rabies in foxes* (Pastoret PP, Brochier B, Thomas I, Blancou J, eds). Office Publ Eur Offic Commun, Luxembourg, 39-54
- Baratawidjaja RX, Morrissey LP, Labzoffsky NA (1965) Demonstration of vaccinia, lymphocytic choriomeningitis and rabies viruses in the leucocytes of experimentally infected animals. *Arch Gesam Virusforsch* 17, 273-279
- Barrat J, Barrat MJ, Picard M, Aubert MFA (1988) Diagnostic de la rage sur culture cellulaire : comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation à la souris. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 11, 207-214
- Becker P (1961) Die Ausbreitung des Tollwutvirus verschiedener Stämme in der Organen von Albino-Mäusen. *Monatsh Tierheilkd* 13, 90-95
- Bindrich H, Schmidt J (1958) Beitrag zur Virusausscheidung bei gesunden und immunen Hunden nach experimenteller Infektion mit dem Tollwutvirus. *Arch Exp Veterinaermed* 12, 202-215
- Blancou J (1988) Ecology and epidemiology of fox rabies. *Rev Inf Dis* 10, S606-S609
- Blancou J, Aubert MFA, Andral L, Artois M (1979a) Rage expérimentale du renard roux (*Vulpes vulpes*). I. Sensibilité selon la voie d'infection et la dose infectante. *Rev Méd Vét* 130, 1001-1015
- Blancou J, Andral L, Samudio A, Silva Crispim L (1979b) Rage expérimentale du renard roux (*Vulpes vulpes*). Excrétion du virus rabique après infection. *Rev Méd Vét* 130, 1473-1482
- Blancou J, Aubert MFA, Artois M (1988a) La rage animale en Europe : son évolution de 1978 à 1988. *Méd Mal Infect*, 18, 590-597
- Blancou J, Aubert MFA, Artois M, Barrat J (1988b) Why has rabies stopped progressing in Europe for ten years ? *Rabies Infect Exch*, 17, 9-13
- Bliss CI (1935a) The calculation of the dosage-mortality curve. *Ann Appl Biol* 22, 134-167
- Bliss CI (1935b) The comparison of dosage-mortality data. *Ann Appl Biol* 22, 307-333
- Carski Tr, Wilsnack RE, Sikes RK (1962) Pathogenesis of rabies in wildlife. II. Fluorescent antibody studies. *Am J Vet Res* 23, 1048-1052
- Dagnélie P (1975) *Théorie et méthodes statistiques. Applications agronomiques. II. Les méthodes de l'interférence statistique*. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, 463 p
- Debbie JG, Trimarchi CV (1970) Pantropism of rabies virus in free-ranging red fox *Vulpes fulva*. *J Wildl Dis* 6, 500-506
- Fekadu M, Shaddock JH, Baer GM (1982) Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. *J Infect Dis* 145, 715-719
- Fouad MSA (1964) Response of *Tadarida ruppeli* to the street rabies virus by the intraperitoneal inoculation and the early demonstration of the virus in their blood. *Vet Med J* 9, 255
- George JP, George J, Blancou J, Aubert MFA (1980) Description clinique de la rage du renard. Étude expérimentale. *Rev Méd Vét* 131, 153-160
- Gribencha SV, Barinsky IF (1982) Viremia in rabies. *Acta Virol* 26, 301
- Herrmann O, Die Ansteckungsfähigkeit des Blutes bei *Lyssa humane*. *zentralbl Bakteriol Parasiterkd Infektionskr Hyg Abt I Orig*, 94, 201
- Kaplan MM, Koprowski H (1973) Laboratory techniques in rabies, 3rd ed. World Health Organization, Geneva, 367 p
- Koprowski H, Cox HR (1948) Occurrence of rabies virus in the blood of developing chick embryo. *Proc Soc Exp Biol Med* 68, 612-615
- Marie AC, Urbain (1905) Virus rabique fixe et virulence du sang. *CR Séances Soc Biol Fil* 106, 166-168
- Pacheco, Proenca (1936) O virus da raiva bovina no Brasil circula no sangue e se pode transmitir por via sanguínea. *Bras Med* 50, 661

- Pasteur L, Chamberland CE, Roux PME (1884) CR Séances Acad Sci 98, 457
- Picard M, Blancou J (1983) Transmission *in utero* de la rage chez la souris. *Rev Inst Pasteur Lyon* 16, 235-240
- Reagan R, Tromba F, Brueckner M (1955a) Study of haemocytes from ticks (*Ornithodoros*) infected by feeding on cave bats (*Myotis lucifugus*) infected with a street virus rabies strain. *Southwest Vet* 8, 139-142
- Reagan R, Tromba F, Guemlek M, Brueckner A (1955b) Transmission of a street virus strain (R 174) from the cave bat (*Myotis lucifugus*) to the tick (*Ornithodoros*) by blood feeding: a preliminary report. *Cornell Vet* 46, 3-6
- Schweinburg F, Windholz F (1930) Über den Ausbreitungsweg des Wuterregers von der Eintrittspforte aus. (Untersuchungen an parabiosierten Ratten). *Virch Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 278, 23-34
- Vasconcellos SA, Cortes JA, Nilsson MR, Ito FH, Enriquez Rozas CE (1978) Diagnostico *in vivo* da raiva em caes experimentalmente infectados. Emprego do teste de cornea e isolamento de virus por inoculação intracerebral de saliva em camundongos. *Rev Fac Med Vet Zootec Univ Sao Paulo* 15, 75-86
- Vaughn JB, Gerhardt P, Newell KW (1965) Excretion of street rabies virus in the saliva of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 193, 363-368
- Wong DH, Freund J (1951) Fixed rabies virus in blood following intracerebral inoculation in mice and rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 76, 717-720
- Zunker M (1963) Ergebnisse und Probleme der Tollwutforschung *Zentralbl Veterinaermed* 3, 271-277