

ACQUISITIONS NOUVELLES SUR LE DIAGNOSTIC, L'ÉPIDÉMIOLOGIE ET LA PROPHYLAXIE DE LA RAGE

par

Professeur Pierre SUREAU *

INTRODUCTION

L'application, aux recherches sur le virus rabique et la rage, des découvertes faites au cours des trente dernières années dans les domaines de la virologie, de l'immunologie et des biotechnologies a permis l'acquisition de connaissances nouvelles importantes et riches d'applications pratiques pour le diagnostic, l'étude épidémiologique et la prophylaxie de cette maladie.

Les progrès récents dans les domaines de la microscopie électronique, de la virologie moléculaire et du génie génétique et leur application à l'étude du virus rabique; l'acquisition de nouvelles connaissances en immunologie et leur application à la détermination de la structure antigénique des virus de la rage ainsi qu'à l'étude de la réponse immune humorale et cellulaire aux vaccins antirabiques; les progrès réalisés dans le domaine des cultures cellulaires et des biotechnologies et leur utilisation pour la production de nouveaux vaccins contre la rage ont véritablement révolutionné notre connaissance de la rage et de nos moyens de la combattre avec, en particulier:

la mise au point de nouvelles techniques simples, sensibles et spécifiques de diagnostic de laboratoire;

l'identification précise des divers types de virus rabique et des lyssavirus « apparentés à la rage » ;

le développement de nouveaux vaccins à usage humain et animal, y compris pour les animaux sauvages permettant enfin d'entrevoir l'éradication de la rage.

1. PROGRES RECENTS DANS LE DIAGNOSTIC DE LA RAGE

Aucune action valable ne peut être entreprise en matière de prophylaxie de la rage sans un diagnostic de laboratoire rapide et fiable, base de toute mesure sanitaire vétérinaire aussi bien que de toute décision en matière de traitement antirabique humain.

1.1. DETECTION DIRECTE DE L'ANTIGÈNE

Plusieurs méthodes permettent la détection directe de l'antigène rabique dans les prélèvements.

* Chef de l'Unité de la Rage — INSTITUT PASTEUR, PARIS

1.1.1. Le test des Anticorps Fluorescents

Le plus grand progrès en matière de diagnostic de la rage a été l'introduction, il y a environ trente ans, du test des anticorps fluorescents pour détection de l'antigène rabique dans des prélèvements de cerveau et de glandes salivaires (25) (25). L'immunofluorescence directe peut aussi s'appliquer au diagnostic *intra-vitam* de la rage par détection de l'antigène dans des cellules de frottis cornéens, des cellules du culot de centrifugation de la salive ou du liquide céphalo-rachidien et sur des biopsies cutanées; toutefois ce diagnostic *intra-vitam* est plus difficile que celui effectué *post-mortem* et requiert une expérience confirmée.

La technique des anticorps fluorescents est recommandée par l'O.M.S. et considérée comme «l'épreuve microscopique la plus précise qui existe actuellement pour le diagnostic de la rage» (13) quand elle est appliquée à l'examen de prélèvements frais, envoyés au laboratoire sous réfrigération.

Ceci n'est pas toujours faisable, spécialement dans les climats tropicaux où seuls des prélèvements fixés au formol peuvent être expédiés au laboratoire. De tels échantillons ne pouvaient, jusqu'à maintenant, être examinés que par la technique histologique, visant à la mise en évidence des classiques corps de Negri. Mais récemment une nouvelle technique a été proposée qui rend possible l'application du test des anticorps fluorescents aux échantillons fixés au formol: le pré-traitement par la trypsine (77); cette technique a fait la preuve de son efficacité, sur le terrain (79).

Le conjugué pour le test des anticorps fluorescents est préparé avec une immunoglobuline extraite du sérum d'un animal de laboratoire hyperimmunisé (généralement le lapin). Le virus utilisé pour l'immunisation doit être un virus fixe (souche CVS ou PM /PV). L'antigène inactivé est une suspension de cerveau (13) ou de préférence du virus produit en cultures de cellules BHK-21 (29). Cependant, étant donné que les inclusions à détecter dans les prélèvements sont essentiellement constituées de nucléocapsides, l'antigène idéal est une préparation purifiée de nucléocapsides (68) qui induit la formation d'anticorps spécifiques antinucléocapsides. C'est un conjugué fluorescent antinucléocapside de ce type, absorbé sur cerveau normal et lyophilisé, qui est actuellement préparé par l'Unité de la Rage de l'Institut Pasteur (commercialisé par DIAGNOSTICS PASTEUR: Code 72112).

1.1.2. La technique d'Immuno-peroxydase

Certains laboratoires cependant ne disposent pas de microscopes à fluorescence. Ils peuvent avoir recours à la technique de l'immunoperoxydase. Cette technique a été proposée pour la coloration directe d'impressions de tissu cérébral examinées avec un microscope optique ordinaire (2); elle n'a cependant pas été adoptée pour le diagnostic de routine.

Pour permettre néanmoins aux laboratoires ne disposant pas d'équipement de microscopie en fluorescence d'utiliser une méthode simple, sensible et spécifique, un nouveau test immuno-enzymatique a été récemment mis au point dans l'Unité de la Rage pour la détection rapide de l'antigène rabique dans des suspensions de cerveau ou de glandes salivaires. Ce test baptisé RREID pour «Rapid Rabies Enzyme Immuno Diagnosis» combine l'immuncapture de l'antigène par une immunoglobuline antinucléocapside fixée au support solide, avec la détection de l'antigène capturé au moyen de la même immunoglobuline conjuguée à la

peroxydase (46). Le chromogène (orthophénylène diamine et eau oxygénée) est ensuite ajouté ; la présence de l'antigène se traduit par une coloration jaune plus ou moins intense alors qu'en l'absence d'antigène il n'apparaît aucune coloration. La réaction positive peut être appréciée à l'œil nu ou mieux avec un photomètre à 492 nm par comparaison avec les résultats des témoins positifs et négatifs obligatoirement inclus dans le test.

Une étude collaborative effectuée par six centres collaborateurs O.M.S. pour la rage sur près de 1000 échantillons de diverses espèces animales a montré une concordance de 97,8 p. 100 entre ce test et l'immunofluorescence (47). D'autres études réalisées dans divers laboratoires aux Etats-Unis, au Canada, au Mexique, en République Dominicaine, au Venezuela, en Argentine, en Thaïlande, en Inde, au Maroc, en Algérie, au Soudan, en Namibie, au Ghana et au Nigéria ont permis de conclure que :

- le RREID est sensible et spécifique : utilisant une immunoglobuline polyclonale il peut détecter non seulement le virus rabique, mais aussi les lyssavirus apparentés à la rage (virus Mokola, Lagos-bat et Duvenhage).
- il peut s'appliquer à l'examen non seulement des prélèvements de cerveau et de glandes salivaires prélevés à l'autopsie mais aussi à des liquides biologiques comme la salive et le liquide céphalo-rachidien prélevés pendant la maladie, chez l'homme par exemple.
- il est d'exécution simple et ne nécessite pas d'équipement sophistiqué (l'utilisation d'un photomètre est recommandée mais non obligatoire).
- il peut donner des résultats positifs sur des échantillons dans lesquels la virulence a été inactivée par la chaleur pendant le transport et pour lesquels l'inoculation à l'animal de laboratoire resterait négative.
- il convient bien à l'examen de nombreux échantillons, pour des enquêtes épidémiologiques par exemple, en particulier pour les échantillons recueillis au moyen de la technique simplifiée récemment proposée par J. Barrat et J. Blancou du Centre National d'Etudes sur la Rage (WHO/Rab. Res/87.25).
- enfin son prix de revient est modéré, équivalent par échantillon examiné au prix d'une souris (environ 5 Francs français).

La seule restriction est que le RREID ne peut pas s'appliquer aux prélèvements fixés au formol dans lesquels l'antigène est insolubilisé par la fixation.

Le nouveau test RREID est actuellement commercialisé par DIAGNOSTICS PASTEUR.

1.1.3. La détection directe des acides nucléiques viraux (RNA)

Le génome du virus rabique ayant été complètement séquencé dans l'Unité de la Rage (75) (76), des sondes de cDNA ont été préparées qui s'hybrident spécifiquement avec les RNA extraits des cerveaux infectés de rage. Les sondes radioactives actuellement utilisées devront faire place à des sondes froides de sensibilité suffisante avant que cette nouvelle technique puisse être utilisée pour le diagnostic courant.

1.2. ISOLEMENT DU VIRUS

L'isolement du virus peut être utilisé pour confirmer la détection directe de l'antigène viral. Il peut aussi être nécessaire pour la caractérisation du virus isolé. Il nécessite des prélèvements frais maintenus sous réfrigération durant le transport jusqu'au laboratoire.

1.2.1. Inoculation aux animaux: souriceaux nouveau-nés

L'inoculation intra-cérébrale à la souris jeune adulte, technique recommandée par l'OMS (32) demande plusieurs semaines pour l'obtention d'une réponse définitive. Aussi, pour un diagnostic rapide est-il préférable d'inoculer des souriceaux nouveau-nés dont l'examen de cerveau en immuno-fluorescence donnera une réponse en quelques jours seulement (6) (43) (48).

1.2.2. Inoculation aux cultures cellulaires: neuroblastomes

C'est actuellement la meilleure technique pour l'isolement rapide du virus. Les cultures primaires de cellules de rein de hamster (28) et les cellules de lignée continue de rein de hamster BHK-21 (34) (51) ont été utilisées. Cependant, les lignées de neuroblastomes de souris qui sont plus sensibles sont actuellement recommandées pour l'isolement rapide du virus (52) (53) (65) (78). Au laboratoire de diagnostic de l'Unité de la Rage (4000 prélèvements par an) nous avons remplacé l'inoculation aux souriceaux par l'inoculation des cultures de neuroblastomes depuis 1982 (49). Les neuroblastomes inoculés avec le surnageant des broyats de cerveau sont fixés et colorés avec le conjugué fluorescent après 24 heures d'incubation, permettant ainsi une confirmation rapide du diagnostic fait en immunofluorescence directe sur les impressions de cerveau.

1.3. Identification du virus: les anticorps monoclonaux

Les conjugués polyclonaux utilisés pour le test d'immunofluorescence et le test immuno-enzymatique RREID donnent des résultats positifs avec tous les lyssavirus (virus rabique et virus apparentés à la rage).

L'identification des virus isolés peut, depuis une dizaine d'années, être faite de manière précise au moyen des anticorps monoclonaux (85). Les anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement les déterminants antigéniques soit de la nucléocapside soit de la glycoprotéine des lyssavirus rendent maintenant possible:

- l'identification précise des souches de virus de rage fixe utilisées pour la production des vaccins: souches Pasteur, PV, PM, CVS, Flury LEP et HEP, ERA/SAD, etc (90).
- la détection de variants antigéniques parmi les isolats de virus rabique selon les espèces animales et/ou selon l'origine géographique (66) (67) (73).
- l'identification des lyssavirus apparentés à la rage: Mokola, Lagos-bat et Duvenhage (86).

2. PROGRES RECENTS DANS L'EPIDEMIOLOGIE DE LA RAGE

La plupart des progrès réalisés ces dernières années dans la connaissance de l'épidémiologie de la rage ont été obtenus grâce à l'emploi des anticorps monoclonaux.

2.1. VARIANTS ANTIGENIQUES DU VIRUS RABIQUE

La détermination du profil antigénique de la nucléocapside de plus de 200 souches de virus rabique isolées dans divers pays d'Europe, d'Afrique et d'Asie nous ont permis de montrer (73) soit l'homogénéité des souches dans une région donnée (France, Afrique du Nord, Afrique Centrale), soit dans d'autres régions (Madagascar, Moyen-Orient, Thaïlande) la coexistence de souches ayant des types

antigéniques différents, certaines de ces variations antigéniques pouvant peut-être être responsables d'échecs de vaccination.

Des études récentes aux Etats-Unis (66) (67) ont montré que dans quatre zones géographiques différentes le profil antigénique des souches isolées de mammifères terrestres était défini par l'espèce animale constituant le réservoir animal principal dans cette zone : renards au nord-est, rats-laveurs sur la côte est, mouffettes dans le centre et mouffettes en Californie ; les souches isolées d'autres espèces ayant le même profil antigénique que dans l'espèce dominante. Ces études ont aussi montré que le profil antigénique des souches isolées de chauves-souris était différent de celui des souches isolées des mammifères terrestres.

2.2. LES LYSSAVIRUS « APPARENTES A LA RAGE »

Ces virus ont été isolés et décrits, pour la première fois, en Afrique. Ils y ont été, récemment, retrouvés de plus en plus fréquemment alors que leur pouvoir pathogène pour l'homme et les animaux y devenait plus évident. De plus, l'un d'eux a été récemment identifié en Europe.

2.2.1. Le virus Lagos-bat

Il a été isolé pour la première fois en 1956 à Lagos, Nigéria, du cerveau d'une chauve-souris frugivore *Eidolon helvum* (12). Dix-huit ans plus tard, en 1974, le virus Lagos-bat a été retrouvé en République Centrafricaine chez une autre espèce de chauve-souris frugivore *Micropteropus pusillus* (72). Six ans après, en 1980, le virus Lagos-bat a été isolé à six reprises en Afrique du Sud (Natal) du cerveau de chauve-souris frugivores de l'espèce *Epomophorus walbergi* (40). En 1985 le virus Lagos-bat a été isolé d'une chauve-souris *Nycteris gambiensis* capturée à Kindia en Guinée et d'une chauve-souris *Eidolon helvum* capturée à Dakar Sénégal (J.P. Digoutte, comm. pers.).

Enfin, en 1986, le virus Lagos-bat a été isolé au Zimbabwe chez un chat, préalablement immunisé contre la rage (C. Foggin, comm. pers.). Ceci est le premier isolement de virus Lagos-bat chez un carnivore domestique : cet isolement prouve que ce virus est pathogène non seulement pour les chiroptères mais aussi pour les animaux domestiques et que les vaccins antirabiques couramment utilisés pour ces animaux n'induisent pas d'immunité contre ce virus, ce que nous avons expérimentalement confirmé au laboratoire sur la souris, avec H. Bourhy, dans l'Unité de la Rage.

Tous les isolements rapportés ci-dessus démontrent la vaste distribution géographique du virus Lagos-bat en Afrique au sud du Sahara.

Les déterminations faites dans l'Unité de la Rage par M. Lafon avec des anticorps monoclonaux ont permis d'identifier quatre sous-types de virus Lagos-bat : sous-type 1 Nigéria ; sous-type 2 République Centrafricaine et Zimbabwe ; sous-type 3 Natal et Dakar ; sous-type 4 Kindia.

2.2.2. Le virus Mokola

Le virus Mokola a aussi été isolé pour la première fois au Nigéria en 1968, de musaraignes *Crocidura sp.* capturées près d'Ibadan dans le district de Mokola (27). Il a été retrouvé en 1969 dans le liquide céphalo-rachidien d'un enfant souffrant de méningite aseptique (15) et en 1971 dans le cerveau d'un cas fatal de paralysie chez une jeune femme (16). En 1974, le virus Mokola a été isolé d'une musaraigne au

Cameroun (36) et en 1981 en République Centrafricaine chez un rongeur *Lophuromys sikapusi* (55).

Le pouvoir pathogène du virus Mokola pour les animaux domestiques a été démontré en 1981 quand ce virus a été isolé au Zimbabwe d'un chat atteint de paralysie ascendante avec agressivité. L'année suivante le virus Mokola a été isolé au Zimbabwe de cinq autres chats et d'un chien préventivement vacciné contre la rage six mois auparavant (19) (20) (21) (87).

Comme pour Lagos-bat, ces divers isollements montrent que la distribution géographique est étendue en Afrique au sud du Sahara et qu'il est pathogène pour les chiens et chats qui ne sont pas protégés par une vaccination préalable contre la rage, ce que nous avons expérimentalement confirmé chez la souris au laboratoire avec P. Rollin, H. Bourhy et M. Lafon dans l'Unité de la Rage.

2.3.3. Le virus Duvenhage

Le premier isolement de virus Duvenhage a été obtenu en Afrique du Sud en 1970 du cerveau d'un homme décédé avec des signes cliniques de rage à la suite d'une morsure par une chauve-souris d'espèce non déterminée (39). Dix ans plus tard, en 1981, en Afrique du Sud (Transvaal), le virus Duvenhage a été isolé du cerveau d'une chauve-souris insectivore *Miniopterus schreibersii* (41) (81).

Cependant, contrairement à Lagos-bat et Mokola, le virus Duvenhage existe aussi en dehors de l'Afrique; trois isollements de virus obtenus en Allemagne Fédérale de chauves-souris d'espèces non identifiées: en 1968 à Hambourg, en 1970 à Stade et en 1982 à Bremerhaven ont été récemment identifiés comme virus Duvenhage. La première hypothèse fût celle de l'importation par des navires de chauves-souris africaines.

Mais pendant l'année 1985 plusieurs autres isollements de virus Duvenhage furent obtenus de chauves-souris insectivores *Eptesicus serotinus* dans le nord de l'Europe: un en Pologne (4) (64), dix au Danemark (42), trois en Allemagne Fédérale (58); ainsi que d'un cas humain de rage consécutif à une morsure de chauve-souris en Union Soviétique (61). D'autre part, un virus voisin mais cependant différent des souches précédentes était isolé en Finlande d'un cas humain de rage chez un naturaliste spécialiste des chiroptères (8) (38).

L'épizootie à virus Duvenhage chez les chauves-souris en Europe s'est confirmée en 1986 avec de nombreux isollements de virus à partir de diverses espèces de chiroptères: un en Allemagne Démocratique, douze en Allemagne Fédérale (59), quatre-vingt-dix-sept au Danemark (26) (71); outre *Eptesicus serotinus* les espèces en cause étaient *Myotis daubentonii*, *M. dasycneme*, et *Pipistrellus nathusii*. Au printemps et durant l'été de 1987, plusieurs autres isollements ont été obtenus aux Pays-Bas des espèces *Serotinus* et *Myotis*. Enfin, deux isollements ont été obtenus du cerveau de chauve-souris ayant agressé des enfants en Espagne: l'un en Août 1987 à Séville (*Pipistrellus pipistrellus*), l'autre en Septembre à Grenade, indiquant que l'aire géographique du virus Duvenhage en Europe ne se limitait pas aux rivages de la mer Baltique mais s'étendait à la région méditerranéenne.

Considérant le risque d'exposition humaine à des chauves-souris infectées de virus Duvenhage nous avons étudié la protection conférée à l'homme, par les divers vaccins rabiques de cultures cellulaires actuellement disponibles, contre le virus

Duvenhage. Tous les sérums de sujets vaccinés avec les vaccins préparés sur cellules diploïdes humaines, sur cellules de rein de fœtus bovin, sur fibroblastes d'embryon de poulet ou sur œufs de cane embryonnés contenaient des anticorps neutralisant le virus Duvenhage, de même que les immunoglobulines humaines antirabiques commercialement disponibles en Europe (33).

Néanmoins, des études expérimentales sur souris que nous avons faites dans l'Unité de la Rage avec M. Lafon et H. Bourhy ont montré que, si les vaccins préparés avec la souche PV de virus rabique fixe conféraient une protection complète contre une épreuve avec le virus Duvenhage, il n'en était pas de même avec les vaccins préparés avec la souche PM ou avec la souche Flury HEP.

3. PROGRES RECENTS DANS LA PROPHYLAXIE DE LA RAGE

La véritable révolution, en ce domaine, a été apportée il y a une vingtaine d'années avec l'apparition des vaccins produits sur cultures cellulaires.

3.1. LES VACCINS DE CULTURES CELLULAIRES

3.1.1. Les vaccins à usage médical

Le vaccin produit sur cellules diploïdes humaines, mis au point en 1964 par Wiktor, Fernandes et Koprowski (84) peut être considéré comme la plus grande découverte en matière de vaccination antirabique depuis Pasteur. Ce vaccin est actuellement largement utilisé, de par le monde, pour la vaccination humaine qu'il s'agisse de vaccination préventive ou de traitement antirabique après exposition.

Les autres vaccins de culture à usage médical actuellement disponibles sont produits sur cultures primaires de cellules de rein de hamster (17) (37) (60), de cellules de rein de fœtus bovin (3), de cellules de rein de chien (80), de fibroblastes d'embryon de poulet (7) (30). Tous ces vaccins, concentrés et purifiés, totalement inactivés, sont hautement antigéniques et bien tolérés; ils sont cependant onéreux à produire et ceci constitue un obstacle à leur utilisation à grande échelle dans les pays en développement qui cependant en ont le plus besoin.

Des efforts ont donc été faits pour la mise au point de méthodes industrielles de production de vaccins peu coûteux. La possibilité, récemment reconnue par les autorités internationales en matière de standardisation biologique, d'utiliser les cellules de lignée continue cultivées sur des micro-soutiens en suspension dans des bioréacteurs de grande capacité a constitué un progrès décisif. Après avoir été appliquée au vaccin polio cette technologie a été appliquée au vaccin rabique. Le nouveau vaccin purifié produit sur cellules Vero, maintenant autorisé en France et plusieurs autres pays, s'est montré très immunogène et d'une excellente tolérance (22). De très récents progrès dans le domaine des bioréacteurs, dont la capacité peut être réduite en proportion de l'augmentation de leur rendement en cellules cultivées et de la production de virus par ces cellules, en même temps que le mode opératoire de ces bioréacteurs peut être simplifié vont certainement faciliter le transfert de ces nouvelles biotechnologies dans les pays en développement qui souhaitent produire le vaccin dont ils ont besoin.

° 3.1.2. Les vaccins à usage vétérinaire

Les vaccins à usage vétérinaire sont soumis à moins de contraintes que les vaccins à usage médical. C'est ainsi qu'ils peuvent être produits sur des lignées cellulaires continues dites «transformées» qui ont l'avantage de croître en

suspension dans des bioréacteurs de taille industrielle en même temps qu'elles ont un haut rendement en virus, les cellules BHK-21 de rein de hamster par exemple. Ces vaccins peuvent être adjuvés ce qui renforce leur immunogénicité. Ils peuvent être associés à d'autres vaccins, selon les espèces animales à immuniser (association rage-fièvre aphteuse pour les bovins, par exemple).

Cependant, les progrès récemment obtenus en matière de purification des récoltes de virus obtenues sur cultures cellulaires, par les techniques de centrifugation zonale entre autres, qui permettent de réduire à des niveaux acceptables le contenu résiduel en DNA cellulaire dans le produit final, laissent entrevoir la possibilité d'utiliser de tels types de cellules pour la production de vaccins à usage médical, avec une technologie simple et de faible prix de revient.

3.2. LES VACCINS OBTENUS PAR RECOMBINAISON GENETIQUE

Les progrès les plus récents en matière de vaccin rage découlent de l'utilisation des techniques du génie génétique. Depuis que le génome du virus rabique a été cloné et séquencé, il est devenu possible d'introduire, dans le génome du virus de la vaccine, le gène du virus rabique qui code pour la glycoprotéine, l'antigène d'enveloppe du virus rabique responsable de l'induction de l'immunité (11). Ce virus recombinant «vaccine-glycoprotéine rage» a donné, expérimentalement sur des animaux de laboratoire, des résultats très encourageants (88).

3.3. LES NOUVELLES MODALITES DE LA VACCINATION

3.3.1. Schémas réduits de vaccination de l'homme

La posologie actuellement recommandée par l'O.M.S. (91) pour le traitement antirabique après exposition avec les vaccins de cultures cellulaires consiste en une injection intra-musculaire à chacun des jours 0, 3, 7, 14 et 28 (une injection de rappel au jour 90 étant facultative). De nombreux schémas ont été proposés tendant d'une part à réduire la quantité de vaccin utilisée, au moyen notamment de l'utilisation de doses réduites inoculées par voie intra-dermique, et d'autre part à accélérer la réponse en anticorps au moyen d'injections multiples simultanées. Une synthèse de ces diverses modifications a été finalement mise au point sous la forme d'un protocole de vaccination comportant deux injections intra-musculaires de 1 ml au jour 0 (une injection dans chaque deltoïde) suivies d'une seule injection à chacun des jours 7 et 21. Ce protocole a donné d'excellents résultats avec les quatre vaccins de cultures cellulaires actuellement commercialisés en Europe (82).

3.3.2. La vaccination des animaux domestiques.

L'utilisation d'adjuvants dans les vaccins de cultures cellulaires inactivés à usage vétérinaire permet d'obtenir, avec une seule injection de vaccin, une immunité d'une durée de trois ans chez les chiens et les chats, comme précédemment avec les vaccins vétérinaires à virus vivant modifié (Flury, ERA) mais sans les risques inhérents à l'utilisation de virus vivant (cas de «rage vaccinale» dans certaines espèces animales) qui font proscrire l'utilisation des vaccins injectables à usage vétérinaire à virus vivant dans nombre de pays. Toutefois l'utilisation du vaccin à virus vivant modifié souche SAD, utilisé pour la vaccination orale des renards (voir plus loin), est envisagée pour la vaccination par voie orale des chiens errants.

3.3.3. La vaccination de la faune sauvage

Si l'éradication de la rage canine peut être obtenue au moyen de campagnes de masse de vaccination des populations de chiens, et a en fait été obtenue dans de nombreux pays, le contrôle de la rage des animaux sauvages reste plus difficile. Les tentatives d'immunisation par voie orale des animaux sauvages, réservoirs naturels de la maladie, ont commencé il y a une quinzaine d'années aux Etats-Unis (5) (89). En Europe des essais sur le terrain de vaccination par voie orale des renards au moyen de la distribution d'appâts (têtes de poulets) contenant une ampoule de vaccin vivant modifié ERA/SAD ont été réalisés avec plein succès en Suisse depuis 1976 (69) (70). Depuis 1982 des campagnes similaires ont été réalisées en Allemagne Fédérale avec le clone SAD B/19 de la souche ERA contenu dans des capsules incorporées dans des appâts fabriqués industriellement (57) (83). Cette vaccination a été expérimentalement étudiée en France (9) (10) (14) où son application sur le terrain est maintenant commencée. Cette même technique d'immunisation par voie orale peut se révéler fort utile pour la vaccination des chiens errants dans certains pays d'Afrique: des essais ont déjà été faits en Tunisie.

Il est possible que le vaccin obtenu par recombinaison génétique avec le virus de la vaccine contenant le gène de la glycoprotéine rabique offre d'intéressantes possibilités pour la vaccination de la faune sauvage: des essais concluants ont été faits sur les renards en France et en Belgique (11) (45), sur les ratons laveurs aux Etats-Unis (54) et sur les mouffettes au Canada (74).

Ainsi, après la protection contre la rage de l'homme et des animaux domestiques, on peut maintenant espérer contrôler la rage dans les populations d'animaux sauvages qui constituent son réservoir naturel et aboutir finalement à son éradication.

REFERENCES

1. ANDERSON R.M. — Rabies Control. Vaccination of wildlife reservoirs. *Nature*, 1986, **322**, 304.
2. ATANASIU P., DRAGONAS P., TSIANG H., HARBI A. — Immuno-peroxydase. Nouvelle technique spécifique de mise en évidence de l'antigène rabique intra et extra-cellulaire en microscopie optique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1981, **121**, 247-250.
3. ATANASIU P., TSIANG H., GAMET A. — Nouveau vaccin antirabique humain de culture cellulaire primaire. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1974, **125B**, 419-432.
4. BADYOCZEK A. — Rabies in Poland. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1985, **9/3**, 5-6.
5. BAER G.M., ABELSETH M.K., DEBBIE J.G. — Oral vaccination of foxes against rabies. *Amer. J. Epidemiol.*, 1971, **93**, 487-490.
6. BAGNAROLI R.A., LARGHI O.P., MARCHEWSKI N. — Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rabico demostrado por inmunofluorescencia. *Bol. Ofic. Sanit. Panamericana*, 1970, **68**, 388-392.
7. BARTH R., GRUSCHKAU H., BIJOK U., HILFENHAUS J., HINZ J., MILCKE L., MOSER H., JAEGER O., RONNEBERGER H., WEINMANN E. — A new inactivated tissue culture rabies vaccine for use in man. Evaluation of PCEC-vaccine by laboratory tests. *J. Biol. Stand.*, 1984, **12**, 29-46.
8. BERGER R. — A human rabies case in Finland possibly of bat origin. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1985, **9/4**, 12.
9. BLANCOU J., ANDRAL L., AUBERT M.F.A., ARTOIS M. — Vaccination du renard contre la rage par voie orale. Bilan des essais réalisés en France. *Bull. Acad. Vét., (France)*, 1982, **55**, 351-359.
10. BLANCOU J., SCHNEIDER G., WANDELER A., PASTORET P. — Vaccination du renard roux (*Vulpes vulpes L.*) contre la rage par voie orale. Bilan d'essais en station expérimentale. *Rev. Ecol. (Terre et Vie)*, 1985, **40**, 249-255.
11. BLANCOU J., KIENY M.P., LATHE R., LECOCQ J.P., PASTORET P.P., SOULEBOT J.P., DESMETTRE P. — Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, 1986, **322**, 373-375.
12. BOULGER L.R., PORTERFIELD J.S. — Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1958, **52**, 421-424.
13. DEAN D.J., ABELSETH M.K. — The fluorescent antibody test. in Kaplan M.M., Koprowski H. eds. *Laboratory techniques in Rabies*. Geneva: World Health Organization, 1973, 73-84.
14. DUBREUIL M., ANDRAL L., AUBERT M.F.A., BLANCOU J. — The oral vaccination of foxes against rabies. An experimental study. *Ann. Rech. Vet.*, 1979, **10**, 9-21.
15. FAMILUSI J.B., MOORE D.L. — Isolation of a rabies related virus from the cerebrospinal fluid of a child with aseptic meningitis. *Afr. J. Med. Sci.*, 1972, **3**, 93-96.

16. FAMILUSI J.B., OSUNKOYA B.O., MOORE D.L., KEMP G.E., FABIYI A. — A fatal human infection with Mokola virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1972, **21**, 959-963.
17. FENJE P. — A rabies vaccine from hamster kidney tissue cultures: preparation and evaluation in animals. *Canad. J. Microbiol.*, 1960, **6**, 605-609.
18. FERMI C. — Über die Immunisierung gegen Wutkrankheit. *Z. Hyg. Infekt-Krankh.*, 1908, **58**, 233-276.
19. FOGGIN C.M. — Atypical rabies in cats and a dog in Zimbabwe. *The Veterinary Record.*, 1982, **110**, 338.
20. FOGGIN C.M. — Mokola virus infection in cats and dogs in Zimbabwe. *The Veterinary Record.*, 1983, **113**, 115.
21. FOGGIN C.M. — Mokola virus infection in domestic cats in Zimbabwe. in *Rabies in the Tropics*. E. Kuwert, C. Mérieux, H. Koprowski, K. Bögel eds. Springer-Verlag. 1985, 65-70.
22. FOURNIER P., MONTAGNON B., VINCENT-FALQUET J.C., AJJAN N., DRUCKER J., ROUMIANTZEFF M. — A new vaccine produced from rabies virus cultivated on Vero cells. in *Improvements in Rabies Post-Exposure Treatment*. Vodopija I., Nicholson K.G., Smerdel S., Bijok U. eds. Zagreb Institute of Public Health. 1985, 115-121.
23. FUENZALIDA E., PALACIOS R. — Rabies vaccine prepared from brains of infected suckling mice. *Bol. Inst. Bacteriol. Chile*, 1955, **8**, 3-10.
24. GOLDWASSER R.A., KISSLING R.E. — Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, **98**, 219-223.
25. GOLDWASSER R.A., KISSLING R.E., CARSKI T.R., HOSTY T.S. — Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 1959, **20**, 579-588.
26. GRAUBALLE P.C., BAAGOE H.J., FEKADU M., WESTERGAARD J.M., ZOFFMANN H. — Bat rabies in Denmark. *Lancet*, 1987, **1**, 379-380.
27. KEMP G.E., CAUSEY O.R., MOORE D.L., ODELOLA A., FABIYI A. — Mokola virus. Further studies on IbAn 27377, a new rabies related etiologic agent of zoonosis in Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1972, **21**, 356-359.
28. KISSLING R.E. — Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1958, **98**, 223-225.
29. KISSLING R.E. — The fluorescent antibody test in rabies. in Baer G.M. ed. *The Natural History of Rabies*. New York San Francisco London: Academic Press. 1975, vol. I, 401-416.
30. KONDO A., TAKASHIMA Y., SUZUKI M. — Inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. *Symp. Series immunobiol. Stand.*, 1974, **21**, 182-189.
31. KOPROWSKI H., COX H.R. — Studies on chick embryo-adapted rabies virus. I. Culture characteristics and pathogenicity. *J. Immunol.*, 1948, **60**, 533-544.

32. KOPROWSKI H. — The mouse inoculation test. *in* Kaplan M.M., Koprowski H. eds. **Laboratory techniques in Rabies**. Geneva: World Health Organization. 1973, 85-93.
33. LAFON M., HERZOG M., SUREAU P. — Human rabies vaccines induce neutralizing antibodies against the european bat rabies virus (Dùvenhage). *Lancet*, 1986, II, 515.
34. LARGHI O.P., NEREL A.E., LAZARO L., SAVY V.L. — Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylaminoethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. *J. Clin. Microbiol.*, 1975, 1, 243-245.
35. LEBENTRAU K.H. — Rabies in Germany, Democratic Republic. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1986, 10/3, 3.
36. LE GONIDEC G., RICKENBACH A., ROBIN Y., HEME G. — Isolement d'une souche de virus Mokola au Cameroun. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1978, 129A, 245-249.
37. LIN FANGTAO, ZENG FANZHEN, LU LONGMU, LU XIAOZHEN, ZEN RONGFAN, YU YONGXIN, CHEN NAIMIN — The primary hamster kidney cell rabies vaccine: adaptation of viral strain, production of vaccine, and pre- and post-exposure treatment. *J. Infect. Dis.*, 1983, 147, 467-473.
38. LUMIO J., HILLBOM M., ROINE R., KETONEN L., HALTIA M., VALLE M., NEUVONEN E., LAHDEVIRTA J. — Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet*, 1986, I, 378.
39. MEREDITH C.D., ROSSOUW A.P., VAN PRAAG KOCH H. — An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. *S.A. Medical Journal*, 1971, 45, 767-769.
40. MEREDITH C.D., STANDING E. — Lagos-bat virus in South Africa. *Lancet*, 1981, I, 832-833.
41. MEREDITH C.D. — Isolation of Dùvenhage virus from a microchiropteran bat. *Rabies Info. Exch.*, 1983, 1, 53.
42. MOLLGAARD S. — Bat-rabies in Denmark. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1985, 9/3, 8 & 9/4, 11.
43. NILSSON M.R., SUGAY W. — O uso de camundungos lactentes no diagnostico da raiva. *Arg. Inst. Biol. Sao Paulo*. 1966, 33, 47-48.
44. PASTEUR L. — Méthode pour prévenir la Rage après Morsure. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1885, 101, 765-772.
45. PASTORÉT P.P., BROCHIER B., BLANCOU J., KIENY M.P., LECOCQ J.P., LANGUET B., MACKOWIAK M., DESMETTRE P. — Use of a recombinant vaccinia virus harbouring the rabies glycoprotein gene for vaccination of wildlife against rabies, VII International Congress of Virology. August 9-14, 1987. Edmonton, Canada.
46. PERRIN P., ROLLIN P.E., SUREAU P. — A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. *J. Biol. Standard.*, 1986, 14, 217-222.

47. PERRIN P., SUREAU P. — Results of a collaborative study of an experimental kit for the Rapid Rabies Enzyme Immuno-Diagnosis (RREID). *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 1987, **65**, N° 4, 489-493.
48. PILO MORON E., VINCENT J., SUREAU P., NEEL R. — Diagnostic rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous-maxillaire aux souris et par l'immunofluorescence. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1967, **45**, 5-10.
49. PORTNOI D., FAVRES., SUREAU P. — Use of neuroblastoma cells (MNB) for the isolation of street rabies virus from field specimens. *Rabies Info. Exch.*, 1982, **6**, 336.
50. POWELL H.M., CULBERTSON C.G. — Action of rabies vaccine derived from embryonated eggs against street virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1959, **101**, 801-803.
51. RUDD R.J., TRIMARCHI C.V., ABELSETH M.K. — Tissue culture technique for routine isolation of street strains rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, 1980, **12**, 590-593.
52. RUDD R.J., TRIMARCHI C.V. — BHK-21 vs neuroblastoma cell lines for the isolation of street rabies virus. *Rabies Info. Exch.*, 1983, **8**, 38-40.
53. RUDD R.J., TRIMARCHI C.V. — Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, **25**, 1456-1458.
54. RUPPRECHT C.E., WIKTOR T.J., JOHNSTON D.H., HAMIR A.N., DIETZSCHOLD B., WUNNER W.H., GLICKMAN L.T., KOPROWSKI H. — Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, **83**, 7947-7950.
55. SALUZZO J.F., ROLLIN P.E., DAUGUET C., DIGOUTTE J.P., GEORGES A.J., SUREAU P. — Premier isolement du virus Mokola à partir d'un rongeur (*Lophuromys sikapusi*). *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 1984, **135E**, 57-66.
56. SCHNEIDER L.G. — A new case of bat-rabies in Germany. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1982, **6/4**, 17-18.
57. SCHNEIDER L.G., COX J.H., MULLER H.W. — Field trials of oral immunization of wildlife animals against rabies in the Federal Republic of Germany. A mid course assessment. *Rev. Ecol. (Terre et Vie)*, 1985, **40**, 265-266.
58. SCHNEIDER L.G. — Occurrence of bat-rabies in Europe. *Rabies Bull. Europe.*, 1986, **10/1**, 9-10.
59. SCHNEIDER L.G. — Bat-rabies cases in the Federal Republic of Germany. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1986, **10/2**, 8-9.
60. SELIMOV M., AKSENOVA T., KLYUEVA E., GRIBENCHA L., LEBEDEVA I. — Evaluation of the inactivated tissue culture rabies vaccine from the Vnukovo-32 strain. *Develop. Biol. Stand.*, 1978, **40**, 57-62.
61. SELIMOV M.A., TATAROV A.G., ANTONOVA L.A., SCHERBACH Y.N., SHABLOSKAYA E.A., SMEKHOV A.M., MOGILEVSKY B.Y. — To the issue of chiropterian rabies infection. *Rabies Info. Exch.*, 1986, **14**, 9-12.

62. SEMPLE D. — The preparation of safe and efficient antirabic vaccine. *Sci. Mem. Med. Sanit. Dept. Govt. India. Bull. Inst. Pasteur*, 1911, 9, 701.
63. SEMPLE D. — On the Nature of Rabies and Antirabic Treatment. *The Brit. Med. J.*, 1919, Sept. 20, 371-373.
64. SEROKA D. — Epidemiological analysis of rabies post-exposure vaccination in humans in Poland with data for 1985. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1986, 10/3, 9-11.
65. SMITH A.L., TIGNOR G.H., EMMONS R.W., WOODIE J.D. — Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Inter-virology*, 1978, 9, 359-361.
66. SMITH J.S., SUMMER J.W., ROUMILLAT L.F., BAER G.M., WINKLER W.G. — Antigenic characteristics of isolates associated with a new epizootic of raccoon rabies in the United States. *J. Infect. Dis.*, 1984, 149, 769-774.
67. SMITH J.S., REID-SANDEN F.L., ROUMILLAT L.F., TRIMARCHI C., CLARK K., BAER G.M., WINKLER W.G. — Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. *J. Clin. Microbiol.*, 1986, 24, 573-580.
68. SOKOL F. — Purification of rabies virus and isolation of its components. *in* Kaplan M.M., Koprowski H. eds. *Laboratory techniques in Rabies*. Geneva: World Health Organization. 1973, 165-178.
69. STECK F., WANDELER A., BICHSEL P., CAPT S., SCHNEIDER L.G. — Oral Immunization of foxes against rabies. A field study. *Zool. Med. Vet.*, 1982, B29, 372-396.
70. STECK F., WANDELER A., BICHSEL P., CAPT S., HAFLIGER U., SCHNEIDER L.G. — Oral Immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 1982, 5, 165-171.
71. STOUGAARD E. — Rabies in Denmark. *Rabies Bull. Europe (WHO)*, 1986, 10/3, 3.
72. SUREAU P., GERMAIN M., HERVE J.P., GEOFFROY B., CORNET J.P., HEME G., ROBIN Y. — Isolement du virus Lagos-bat en Empire Centrafricain. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1977, 70, 467-470.
73. SUREAU P., ROLLIN P., WIKTOR T.J. — Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. *Am. J. Epidemiol.*, 1983, 117, 605-609.
74. TOLSON N.D., CHARLTON K.M., STEWART R.B., CAMPBELL J.B., WIKTOR T.J. — Immune response in Skunks to a Vaccinia Virus Recombinant expressing the Rabies Virus Glycoprotein. *Can. J. Vet. Res.*, 1987, 51, 363-366.
75. TORDO N., POCH O., ERMINE A., KEITH G. — Primary structure of leader RNA and nucleoprotein of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acid Research.*, 1986, 14, 2671-2683.
76. TORDO N., POCH O., ERMINE A., KEITH G., ROUGEON F. — Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1986, 83, 3914-3918.

77. UMOH J.U., BLENDE D.C. — Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin-fixed tissue after treatment with trypsin. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 1981, **59**, 737-744.
78. UMOH J.U., BLENDE D.C. — Comparison of primary skunk brain and kidney and raccoon kidney cells with established cell line for isolation and propagation of street rabies virus. *Infect. and Immun.*, 1983, **41**, 1370-1372.
79. UMOH J.U., EZEKOLII C.D., OKOH A.E.J. — Immunofluorescent staining of trypsinized formalin-fixed brain smears for rabies antigen: results compared with those obtained by standard methods for 221 suspect animal cases in Nigeria. *J. Hyg. Camb.*, 1985, **94**, 129-134.
80. VAN WEZEL A.L., VAN STEENIS G. — Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. *Develop. Biol. Stand.*, 1978, **40**, 69-75.
81. VAN DER MERWE M. — Bats as vectors of rabies. *South Af. J. of Science.*, 1982, **78**, 421-422.
82. VODOPIJA I., SUREAU P., LAFON M. & al. — An evaluation of second generation tissue culture rabies vaccines for use in man: a four-vaccine comparative immunogenicity study using a pre-exposure vaccination schedule and an abbreviated 2-1-1 post-exposure schedule. *Vaccine*, 1986, **4**, 245-248.
83. WACHENDORFER G., FROST J., GUTMAN B., ESKENS U., SCHNEIDER L.G., DINGELDEIN W., HOFMAN J. — Preliminary results of field trial in Hesse (FRG) to control rabies by oral immunization. *Rev. Ecol. (Terre et Vie)*, 1985, **40**, 257-263.
84. WIKTOR T.J., FERNANDES M.V., KOPROWSKI H. — Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain W138. *J. Immunol.*, 1964, **93**, 353-366.
85. WIKTOR T.J., KOPROWSKI H. — Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 3938-3942.
86. WIKTOR T.J., FLAMAND A., KOPROWSKI H. — Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies infection and differentiation of rabies and rabies related viruses. *J. Virol. methods.*, 1980, **1**, 33-46.
87. WIKTOR T.J., MACFARLAN R.I., FOGGIN C.M., KOPROWSKI H. — Antigenic analysis of rabies and Mokola virus from Zimbabwe using monoclonal antibodies. *Develop. Biol. Stand.*, 1984, **57**, 119-211.
88. WIKTOR T.J., MACFARLAN R.I., REAGAN K.J. & al. — Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1984, **81**, 7194-7198.
89. WINKLER W.G., BAER G.M. — Rabies immunization of red foxes (*Vulpes fulva*) with vaccine in sausage baits. *Am. J. Epidemiol.*, 1976, **103**, 408-415.
90. WHO — Report of German Green Cross/WHO Workshop on Monoclonal Antibody in Rabies Diagnosis and Research. WHO/RAB.RES./84.20.
91. WHO — Expert Committee on Rabies. Seventh Report. *Technical Report Series* 709. World Health Organization, Geneva, 1984.