

## Actualité de la rage

La rage est encore, en 1986, une maladie d'une brûlante actualité dont la progression géographique se poursuit. Cela justifie largement la somme des travaux qui continuent de lui être consacrés.

**Anne Flamand**

*Directeur du laboratoire de génétique des virus du Cnrs*

**L**a rage, ce mal qui répand la terreur, est connue depuis l'Antiquité, mais c'est seulement à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle qu'une approche scientifique a permis de dégager les grandes caractéristiques de la maladie et de proposer un traitement protégeant réellement les sujets après contamination. C'est un jeune vétérinaire de Lyon, Victor Galtier, qui eut le premier l'idée d'utiliser le lapin comme modèle expérimental et démontra qu'on pouvait lui transmettre la maladie en lui inoculant de la salive de chien enragé. Il découvrit aussi qu'on pouvait protéger des moutons et des chèvres contre une surinfection en leur injectant du virus rabique dans la veine jugulaire. Dans sa première communication à l'Académie des Sciences datée du 25 Août 1879, Galtier emploie déjà le terme de virus rabique, montrant que la nature de l'agent infectieux était déjà correctement diagnostiquée. Pasteur reprit et compléta les travaux de son confrère : il démontra que le siège de l'infection virale était le système nerveux central. Il fut le premier, poussé par les circonstances, à vacciner un jeune enfant gravement mordu au bras et aux jambes, selon un protocole qu'il avait mis au point sur des chiens. Cet événement, qui a exactement cent ans, eut un immense retentissement et fut à l'origine de la construction de l'Institut Pasteur. Par la suite, des Instituts Pasteur d'outre-mer furent créés dans de nombreux pays. Ils assurèrent le diagnostic, la

vaccination et les études épidémiologiques. En dehors de ces Instituts, plusieurs laboratoires, un peu partout dans le monde, entreprirent des recherches fondamentales sur le virus et sur la maladie qu'il déclenche. Cet article se propose de faire le résumé de l'état actuel de nos connaissances. Le lecteur désirant en savoir plus pourra se reporter à l'excellente monographie publiée par les services vétérinaires [1].

### **Meurt-on encore de la rage en 1986?**

En dehors de l'Europe et de l'Amérique du Nord, où les cas de rage humaine sont rarissimes, la réponse est certainement oui, on meurt encore de la rage en 1986, bien qu'il soit difficile d'apprécier le nombre des victimes. La situation sanitaire d'un grand nombre de pays est telle que, en majorité, les personnes atteintes de rage ne sont pas hospitalisées soit parce qu'elles sont trop loin d'un centre hospitalier, soit qu'on les renvoie mourir chez elles, faute de place. Elles ne figurent donc dans aucune statistique. C'est pourquoi de façon paradoxale, les pays où la surveillance sanitaire est meilleure font état de plus de cas de rage que les autres. Dans ces conditions, les chiffres officiels n'ont qu'un intérêt très limité. Il semble raisonnable de multiplier au moins par dix l'ensemble des données; on peut donc mesurer l'ampleur de ce fléau qui fait probablement mourir chaque année dans d'horribles souffrances plusieurs centaines de

#### ADRESSE ET TIRÉS A PART

A. Flamand : Laboratoire de génétique des virus, Cnrs, 91190 Gif-sur-Yvette.

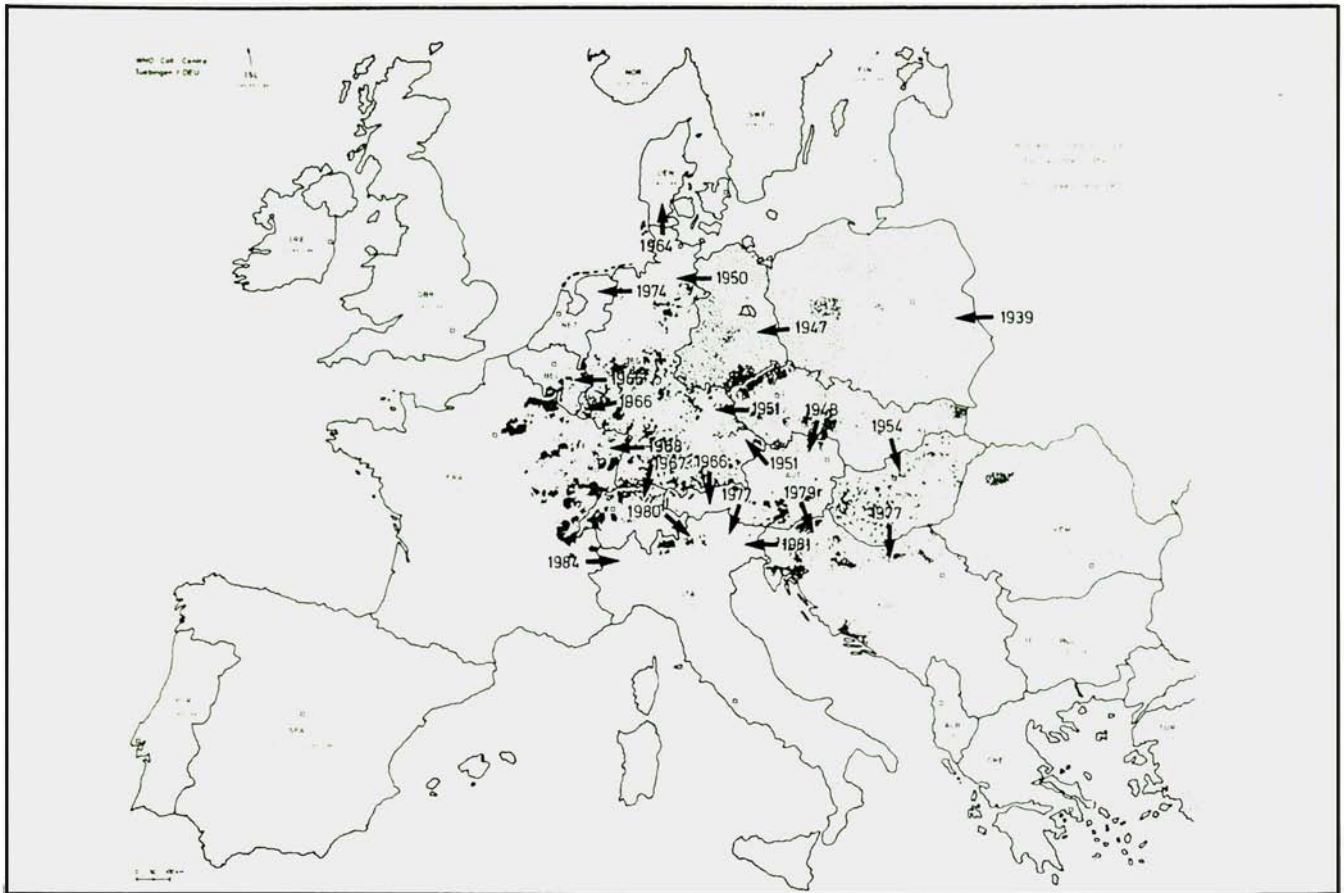


Figure 1. *Extension de la rage vulpine en Europe au cours du 1<sup>er</sup> trimestre 1984. Les flèches indiquent les années où l'épizootie a touché le pays pour la première fois. (D'après un document paru dans Rabies Bulletin, Europe. Who collaboration center for rabies, surveillance and research. Schneider LG, Ed. Tübingen, RFA).*

milliers de personnes.

Dans les pays en voie de développement, presque toutes les victimes ont été mordues par des chiens : il suffirait donc, en théorie, d'éliminer les chiens errants et de vacciner les autres pour qu'on ne meurt plus de la rage. Ceci vient d'être fait en Tunisie et le nombre des cas de rage humaine a brusquement chuté. Mais ailleurs, faute de moyens, la situation reste stationnaire ou même éventuellement s'aggrave.

### **Les animaux vecteurs de rage**

A l'heure actuelle tous les continents, sauf l'Australie, sont infectés par la rage. Cinquante neuf pays, le plus souvent insulaires, s'en déclarent

indemnes, certains à juste titre comme la Grande-Bretagne, d'autres par ignorance ou volonté de camouflage.

On distingue deux types de rage : d'une part la **rage canine**, la plus grave, celle qui est responsable de la plupart des cas de contamination humaine. Tous les pays industrialisés et en particulier la France, s'en sont débarrassés grâce à des campagnes de vaccination. D'autre part, la **rage sylvatique** qu'il est beaucoup plus difficile, sinon pratiquement impossible d'éradiquer, bien que des essais de vaccination par voie orale aient été faits en Suisse et en Allemagne. Quels sont les principaux vecteurs de la rage sylvatique ? En Europe, il s'agit principalement du renard roux (80 % des animaux

enragés). L'épizootie s'est déclarée juste avant la deuxième guerre mondiale à la frontière russo-polonaise. Sur la *figure 1*, on peut voir la progression de cette épidémie ainsi que la situation actuelle en France. Les autres vecteurs dans les différentes régions du monde sont le chien sauvage, le loup, le blaireau, la fouine, la mouffette, le raton laveur, la mangouste, le chacal, la hyène, certains félins, divers mustélidés, des cervidés, des ongulés (chamois, mouflon, bouquetin), le sanglier et même, dans les régions polaires, le renne et le phoque. Cette liste n'est pas exhaustive et l'on peut dire de façon générale que tous les mammifères semblent sensibles à la maladie. Les chauves-souris méritent une mention particulière parce

qu'elles sont souvent infectées et font généralement une rage asymptomatique, avec sécrétion de virus sur de longues périodes. Les chauves-souris vampires peuvent transmettre la rage pendant leur repas de sang et sont responsables de véritables épidémies décimant le bétail en Amérique du Sud, ainsi que de cas de contamination humaine. En Europe, où n'existent que les espèces frugivores et insectivores, ce risque n'existe évidemment pas. Les oiseaux et les poïkilothermes (vertébrés à sang froid) ne sont pas sensibles à la maladie. Enfin, on n'a encore jamais trouvé d'insecte susceptible de transmettre la rage.

Lorsque les niches écologiques se recouvrent, les différentes espèces peuvent se contaminer mutuellement. On note cependant que le virus véhiculé par une espèce n'a pas le même pouvoir infectieux pour les autres espèces, ce qui constitue une barrière à l'extension horizontale de l'épidémie. Par exemple, avec une souche isolée à partir de renards (souche vulpine), il faut respectivement cent, dix mille et un million de fois plus de virus pour tuer un lièvre, un bovin ou un chat qu'un renard. Le chien semble également très résistant à la souche vulpine. Les animaux qui survivent à la contamination sont souvent protégés contre une surinfection, à condition qu'ils aient reçu assez de virus, ce qui renforce la barrière entre les espèces.

Les carnassiers sont évidemment plus dangereux pour l'homme que les autres espèces animales. Le renard enragé en général n'attaque pas l'homme mais il est probablement responsable de la plupart des cas de contamination de bovins. Les autres animaux cités plus haut, sauf peut-être la mangouste et la chauve-souris vampire, sont peu agressifs et ne représentent pas un danger majeur. Les herbivores qui font une rage de type paralytique (*voir plus loin*) contaminent rarement l'homme et se contaminent peu entre eux, bien que l'on ait signalé des épidémies de rage dans des élevages à l'abri de contamination externe. Les vétérinaires et les éleveurs peuvent toutefois courir un risque en manipulant les animaux

malades. Les rongeurs enragés sont également paralysés et n'infectent pas leurs congénères. Herbivores et rongeurs constituent en quelque sorte des « culs-de-sac » épidémiologiques ainsi que tous les animaux qui peuvent contracter la rage mais qui ne la transmettent qu'exceptionnellement.

### Comment se fait la contamination?

Elle se fait essentiellement par la salive de l'animal enragé. Le virus y est sécrété en quantité variable, quelquefois plusieurs jours avant l'apparition des symptômes. L'agent infectieux est fragile : il ne résiste ni à la chaleur, ni à la simple dessiccation, ni aux détergents et il est détruit par les rayons ultraviolets. Cette particularité explique que la contamination se produise presque exclusivement par contact direct entre l'animal enragé et l'organisme sain. On ne connaît pas de cas de contamination à distance, par exemple par l'intermédiaire d'un objet qui aurait été souillé par un animal enragé. La seule exception à cette règle est due à l'inhalation d'aérosol contenant du virus : deux accidents se sont ainsi produits aux États-Unis, le premier en laboratoire et le second dans une caverne habitée par une colonie de chauves-souris où la rage était à l'état endémique (l'atmosphère humide de la grotte ayant sans doute permis la survie du virus excrété par les animaux).

Il faut que le virus atteigne les terminaisons nerveuses du nouvel hôte. Il doit donc être introduit sous la peau ou déposé sur une muqueuse ou une peau excoriée. Le plus souvent la contamination a lieu par morsure mais quelquefois aussi par simple léchage. Dans le cas d'un animal non mordeur, il faut provoquer le contact avec la salive. La contamination par manipulation du cadavre d'un animal enragé peut survenir au cours d'une autopsie mais elle est rare. L'ingestion du cadavre par d'autres animaux ne conduit généralement pas à la transmission de la maladie et la consommation de viande cuite d'animaux incubant la rage, si elle se produisait, ne présenterait aucun

danger. On peut dire qu'en Europe, à condition de ne pas toucher ou déranger les animaux malades que l'on peut être amené à rencontrer, on ne court pratiquement aucun risque d'attraper la rage.

### Les différentes souches de rage

Il existe de très nombreux isolats du virus obtenus à partir d'animaux ou d'hommes morts de rage. Ces souches dites « sauvages » sont antigéniquement très proches. De nouvelles souches, dites apparentées à la rage, ont été récemment isolées en Afrique à partir de chauves-souris, de musaraignes, de divers animaux sauvages ou domestiques et de cas de rage humaine. Ce sont les virus *Lagos Bat*, *Mokola* et *Duvenhague*. Dans les tests immunologiques, ils montrent une faible réaction croisée avec le virus rabique et forment avec lui le sous-groupe des lyssavirus.

Les souches utilisées en laboratoire, appelées souches « fixes », dérivent essentiellement de trois isolats de virus rabique : celui de Pasteur obtenu à partir d'un chien en 1882 (souches PM, PV et CVS), un autre réalisé aux États-Unis en 1953 également à partir d'un chien (souches SAD et ERA), et le dernier provenant d'une jeune fille décédée en 1939 aux États-Unis (Flury LEP et HEP). Dans chaque cas, le virus a été passé plusieurs milliers de fois sur des lapins, des souris ou des œufs embryonnés. Il est commun de dire que les souches fixes sont moins dangereuses que les souches sauvages. Cependant, en dehors de la souche Flury HEP qui a effectivement perdu toute virulence pour les animaux adultes, les autres souches sont toujours capables de tuer le lapin, la souris, le chien, le renard... Il convient donc d'être prudent en les manipulant.

### Aspects cliniques

Dans les conditions naturelles d'infection, la souche de virus, la dose reçue et la voie d'inoculation sont très variables. Les aspects cliniques diffèrent donc beaucoup d'un cas à l'autre. La première observation est qu'un sujet mordu n'attrape pas for-

cément la rage : le risque varie probablement entre 15 et 35 % selon la gravité et la localisation des morsures. Dans le cas où il va développer la rage, le temps d'incubation peut durer de quelques jours à plusieurs mois, voire plusieurs années, avec une moyenne de 3 à 4 semaines. Les symptômes, variables suivant les individus et les espèces, apparaissent lorsque le cerveau est totalement envahi par le virus. Ils sont d'ordre *psychique* : changement de comportement, anxiété, agressivité, refus de s'alimenter et *physiques* : perte de poids, troubles neuromusculaires avec perturbation de la motricité générale allant progressivement jusqu'à la paralysie complète et la mort, selon un enchaînement quasi inéluctable. Ces dernières années cependant, avec les techniques de réanimation et d'assistance respiratoire, on a pu maintenir en vie quelques personnes atteintes de rage. Mais ces dernières ont alors montré des lésions cérébrales irréversibles et gravement handicapantes. On signale également quelques cas d'animaux qui ont récupéré d'une rage déclarée, mais cela reste l'exception. On distingue traditionnellement la forme paralytique et la forme furieuse de la rage selon que les

phases précédant la paralysie générale et le coma sont plutôt agressives ou plutôt amorphes. L'hydrophobie ne se manifeste que chez l'homme alors que le chien et le chat essayent de boire, quelquefois sans arriver à déglutir. L'individu enragé peut être en hypo- ou hyperthermie selon les cas. Au laboratoire, dans des conditions d'inoculation standard et avec une dose de virus déterminée, les aspects cliniques sont beaucoup plus reproductibles d'un individu à l'autre. Ils dépendent presque uniquement de l'espèce et de la souche virale utilisée. Par exemple, des souris adultes inoculées par voie intramassénaire avec  $10^3$  doses létales 50 (DL 50) (\*) de la souche CVS meurent toutes de rage paralytique en six ou sept jours. On a pu étudier l'influence de la voie d'inoculation sur la probabilité d'infection. Il faut respectivement mille et cent mille fois plus de virus pour induire la maladie par voie intramusculaire et orale que par voie intracérébrale.

Quel est le rôle du système immunitaire dans les différentes phases de la maladie? Dans les premiers jours qui suivent l'infection, l'immunité

(\*) Une DL 50 est la quantité de virus qui fait mourir 50 % des animaux inoculés.

humorale et cellulaire joue certainement un rôle protecteur. Par exemple, des souris inoculées par voie plantaire avec la souche ERA survivent à l'infection, bien que le virus puisse être isolé de leur cerveau en quantité importante, mais de façon transitoire, entre les jours 6 et 8. Chez les souris immuno-déficientes ou immuno-déprimées, le virus ne disparaît pas du cerveau et les animaux finissent par mourir (*figure 2 A*) [2, 3]. Mais l'intervention du système immunitaire est en même temps néfaste puisque les animaux normaux meurent plus vite que les animaux immuno-déficients (*figure 2 B*) [4, 5, 6]. De plus, l'injection de sérum immun à des animaux immuno-déprimés incubant la rage peut déclencher brutalement la paralysie totale et la mort [7]; cela suppose qu'il y ait donc une composante d'immunopathologie dans l'évolution de la maladie [8].

### La vaccination

La vaccination devrait être systématiquement pratiquée chez les personnes contaminées par un animal suspect de rage, chez les professionnels susceptibles d'entrer en contact avec le virus et chez les

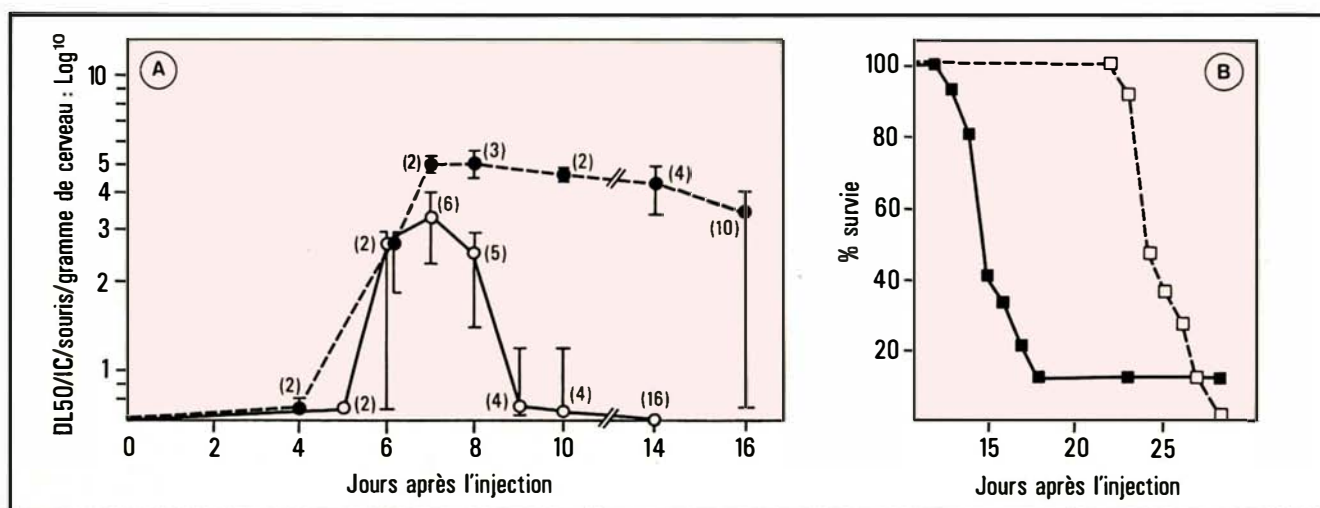


Figure 2. Influence du système immunitaire sur le développement de la rage. A. Présence du virus rabique dans le cerveau de souris immuno-compétentes ○—○ ou immuno-déprimées ●—● après injection intraplantaire de  $10^7$  DL50/IC/souris de la souche ERA (cette dose n'est pas létale par cette voie pour des souris normales mais le devient pour des souris immuno-déprimées). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de sujets étudiés pour chaque point et les traits verticaux représentent les fluctuations du titre viral. B. Temps de survie de souris immuno-compétentes ■—■ ou immuno-déprimées □—□ infectées par un virus de rage des rues. (Résultats d'après [2]).

## RÉFÉRENCES

1. « Pasteur et la rage ». Informations techniques des services vétérinaires. 175, rue du Chevaleret, 75646 Paris Cedex 13, 1985.
2. Smith JS. Mouse model for abortive rabies infection of the central nervous system. *Infect Immun* 1981; 31 : 297-307.
3. Miller A, Morse HC, Winkelstein J, Nathanson N. The role of antibody in recovery from experimental rabies. I. Effect of depletion of B and T cells. *J Immunol* 1978; 121 : 321-6.
4. Tignor GH, Shope RE, Gershon RK, Waksman BH. Immunopathologic aspects of infection with Lagos bat virus of the rabies serogroup. *J Immunol* 1974; 112 : 260-5.
5. Kaplan MM, Wiktor TJ, Koprowski H. Pathogenesis of rabies in immunodeficient mice. *J Immunol* 1975; 114 : 1761-5.
6. Smith JC, McClelland CL, Reid FL, Baer GM. Dual role of the immune response in street rabies virus infection of mice. *Infect Immun* 1982; 35 : 213-21.
7. Prabhakar BS, Nathanson N. Acute rabies death mediated by antibody. *Nature* 1981; 290 : 590-1.
8. Blancou J, Andral B, Andral L. A model in mice for study of the early death phenomenon after vaccination and challenge with rabies virus. *J Gen Virol* 1980; 50 : 433-5.
9. Cartwright B, Smale CJ, Brown F, Hull R. Model for vesicular stomatitis virus. *J Virol* 1972; 10 : 256-60.
10. Dietzschold B, Cox JH, Schneider LG. Rabies virus strains: A comparison study by polypeptide analysis of vaccine strains with different pathogenic patterns. *Virology* 1979; 98 : 63-75.
11. Madore HP, England JM. Rabies virus protein synthesis in infected BHK-21 cells. *J Virol* 1977; 22 : 102-12.
12. Yelverton E, Norton S, Obijeski JF, Goeddel DV. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science* 1983; 219 : 614-20.
13. Anilionis A, Wunner WH, Curtis PJ. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature* 1981; 294 : 275-8.
14. Sureau P, Rollin PE, Wiktor TJ. Epidemiological analysis of antigenic variations of street rabies virus : detection by monoclonal antibodies. *Am J Epidemiol* 1983; 117 : 605-9.
15. Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 1980; 48 : 97-104.
16. Wiktor TJ, Flamand A, Koprowski H. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. *J Virological Methods* 1980; 1 : 33-46.

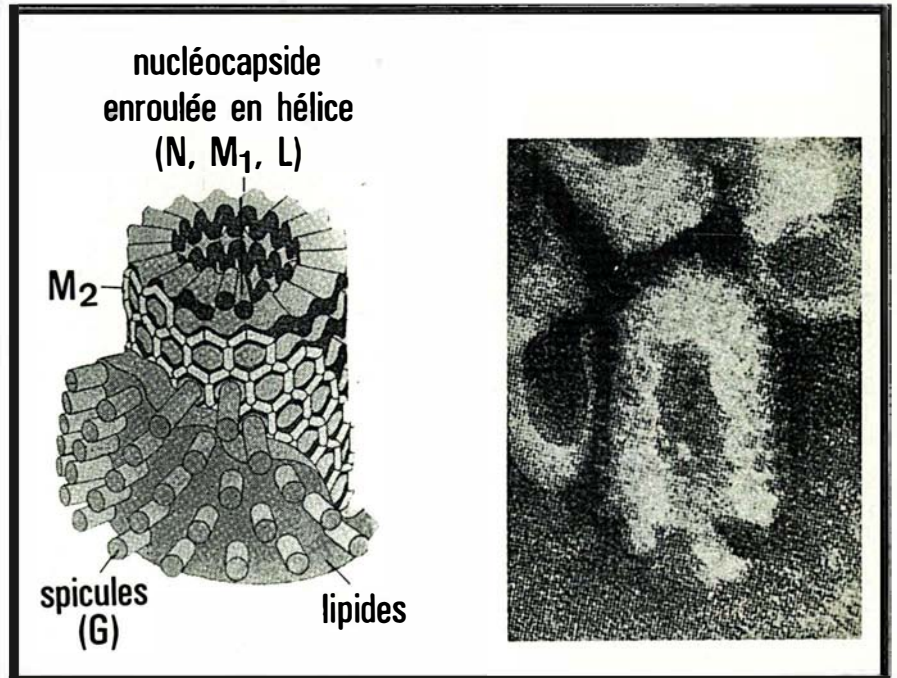


Figure 3. **Structure du virion rabique.** A gauche, schéma d'après [9]. A droite, photo au microscope électronique d'un virion après coloration négative.

chiens et chats vivant dans des régions où la rage est endémique. La vaccination est en outre obligatoire ou recommandée dans une série d'autres situations variables selon les pays. On en trouvera la liste dans « Pasteur et la rage » [1] ainsi que toutes les indications concernant le protocole de vaccination avant ou après exposition. La vaccination avant exposition protège très efficacement contre une surinfection pendant des périodes variables pouvant aller jusqu'à plusieurs années. La vaccination après exposition, pratiquée uniquement chez l'homme, le protège certainement, bien que l'on n'ait pas de bon modèle animal pour analyser cette situation.

Trois types de vaccins sont actuellement employés : les vaccins à virus complètement inactivés, partiellement inactivés, ou à virus vivant. Ils sont produits sur des cerveaux d'animaux adultes ou nouveau-nés, ou sur des œufs embryonnés (poule ou canard) ou sur cultures de tissus, infectés par une des souches fixes

mentionnées ci-dessus [1]. Dans les pays industrialisés les vaccins à virus inactivés produits sur cultures de cellules vont progressivement remplacer tous les autres parce qu'ils donnent moins de réactions secondaires. En ce qui concerne les pays en voie de développement qui manquent de devises pour acheter à l'étranger, il faudrait qu'ils aient accès à de bonnes souches vaccinales (or celles-ci sont en général vendues avec exclusivité aux industries pharmaceutiques) et de plus qu'ils apprennent à produire eux-mêmes leur vaccin.

### L'agent infectieux

L'apparition des techniques de cultures de cellules a permis d'aborder l'étude biochimique du virus, principalement à partir des souches fixes PV, ERA et CVS. En effet, la rage se multiplie relativement bien dans de nombreux types de cellules, en particulier les BHK 21 (*baby hamster kidney*) et peut être titrée sur des cellules CER (*chick embryo related*)

sous agar. Selon les souches, on observe au bout de quatre, cinq ou six jours d'incubation à 37°C des plages de lyse bien visibles après coloration au rouge neutre. Il est possible d'isoler le virus contenu dans une plage, ce qui constitue une méthode de clonage relativement simple. On peut également doser le virus par immunofluorescence ou par injection à des souris. Le virus rabique a peu d'effet cytopathogène : il n'inhibe que lentement les synthèses de la cellule hôte qui survit généralement au moins deux ou trois jours à l'infection en continuant à produire du virus.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses informations ont été obtenues sur la nature de l'agent infectieux et sur les caractéristiques du cycle viral. L'étude du déterminisme de sa virulence commence également à être abordée.

Virus ARN de la famille des rhabdovirus, il partage les caractéristiques morphologiques des autres membres de la famille, à savoir une forme en obus, hérissée de spicules (figure 3). La dimension totale des particules est variable selon les souches et les conditions de culture mais se situe entre 80 et 100 nanomètres (nm) de large et 160 à 200 nm de long. Les virions sont constitués de 1 à 2 % d'ARN, 3 à 4 % de sucres, 15 à 20 % de lipides et 63 à 80 % de protéines. Le génome est constitué d'une molécule d'ARN simple chaîne qui

code pour les cinq protéines constituant le virion. Cet ARN sert de matrice pour la synthèse des messagers viraux, il est donc de polarité négative selon la définition habituellement admise. Il est enveloppé dans une structure protéique enroulée en hélice, la nucléocapside. Cette nucléocapside est entourée d'une membrane constituée de lipides et de deux protéines codées par le virus (figure 3). Tous les caractères qui viennent d'être passés en revue sont communs à l'ensemble des rhabdovirus. Voyons maintenant ce qui est particulier à la rage.

### Les protéines virales

On les divise logiquement en protéines de nucléocapside (L, N et M<sub>1</sub>) et en protéines de membrane (G et M<sub>2</sub>). Le poids moléculaire, estimé en gel de polyacrylamide, varie suivant les auteurs et suivant les souches. Pour les protéines de la souche ERA, il se situe aux alentours de 180, 80, 60, 40 et 25 kilodaltons pour les protéines L, G, N, M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> respectivement. Plusieurs auteurs ont estimé le nombre de molécules de chaque protéine présentes dans un virion. On peut voir dans le tableau I que les chiffres sont voisins d'une souche à l'autre. En particulier, le nombre de protéine N est remarquablement constant. Ceci reflète probablement le fait que cette protéine, dont la taille varie

peu d'une souche à l'autre, est vraisemblablement assemblée en « manchon » autour de l'ARN pour former la nucléocapside. Le nombre de protéines nécessaire pour habiller complètement le génome est évidemment fixé par la longueur de l'ARN, la taille de la protéine et sa structure tridimensionnelle. Ceci illustre une des règles probables de la constitution d'un rhabdovirus, basées sur des interactions protéines-ARN et protéines-protéines. On peut se représenter cela à la manière d'un jeu de construction, à partir d'éléments différents de forme complexe, de sorte que le nombre respectif des cinq protéines nécessaires pour construire un virion serait finalement relativement fixe.

Outre la protéine N majoritaire, la nucléocapside contient les protéines L et M<sub>1</sub>. N et M<sub>1</sub> sont phosphorylées. La protéine L est probablement la transcriptase, c'est-à-dire l'enzyme capable de fabriquer de l'ARN à partir d'une matrice ARN (activité qui n'existe pas dans les cellules non infectées). Associée à la protéine M<sub>1</sub>, elle assure la synthèse des différentes catégories d'ARN viral. Il n'y a pas d'intermédiaire ADN dans le cycle de réplication de la rage et donc pas de transcriptase réverse.

La nucléocapside est entourée d'une membrane qui est constituée de lipides d'origine cellulaire et de deux protéines codées par le virus, G et M<sub>2</sub>. Une petite quantité de protéines cellulaires est également présente de façon relativement constante dans le virion. On y trouve par exemple de l'actine et une activité kinase capable de surphosphoryler N et M<sub>1</sub>, in vitro. La protéine G, une glycoprotéine, porte une ou deux chaînes latérales de sucre. Associée en trimère, elle constitue les spicules qui émergent de l'enveloppe virale. Cette protéine a une importance particulière dans le déroulement de l'infection rabique puisqu'elle déclenche la synthèse d'anticorps capables de neutraliser le pouvoir infectieux du virus et qu'elle est reconnue à la surface des cellules infectées par les cellules T cytotoxiques. Elle est probablement aussi responsable du tropisme du virus pour certains

Tableau I  
NOMBRE DE MOLÉCULES  
DES PROTÉINES L, G, N, M<sub>1</sub> ET M<sub>2</sub> PAR VIRION

protéine	souche de rage				
	HEP	CVS	PM	ERA <sub>1</sub>	ERA <sub>2</sub>
L	37	150	104	17	33
G	1928	1638	1743	1825	1815
N	1751	1751	1738	1776	1806
M <sub>1</sub>	919	919	961	965	951
M <sub>2</sub>	1647	1715	1688	1688	1547

Les estimations pour HEP, CVS, PM et ERA<sub>1</sub> sont d'après [10] et celles d'ERA<sub>2</sub> d'après [11].

types de cellules. Elle a donc été plus étudiée que les autres protéines virales. Sa séquence en acides aminés, établie pour les souches ERA et CVS, montre qu'elle est constituée de 505 acides aminés et d'une séquence dite signal qui sert à insérer la protéine en début de synthèse dans les membranes plasmiques [12, 13]. La séquence en acides aminés montre 89 % d'homologie entre les glycoprotéines d'ERA et de CVS, ce qui est très remarquable si l'on songe que ces souches dérivent de deux isolats réalisés à 50 ans de distance et sur des continents différents.

Les anticorps monoclonaux ont permis de préciser les relations entre les différentes souches de rage et les virus apparentés. A l'heure actuelle, plusieurs laboratoires ont isolé des anticorps monoclonaux qui sont presque tous dirigés contre la protéine de nucléocapside (N) ou contre la protéine externe (G). Les études immunologiques ont donc porté essentiellement sur ces deux protéines et les résultats peuvent se résumer ainsi : (a) Il y a peu de variation au niveau de la protéine de nucléocapside des différentes souches de rage. Quelques anticorps monoclonaux reconnaissent tous les lyssavirus [14, 15] et même des rhabdovirus appartenant à d'autres groupes. En utilisant une combinaison de quatre anticorps antinucléocapsides judicieusement choisis, par immunofluorescence indirecte sur des coupes ou des empreintes de cerveau, on peut immédiatement savoir si l'on a affaire à un lyssavirus et lequel [16]. Ce sont en effet les amas de nucléocapsides qui constituent les corps de Négri dont la présence a permis de faire le diagnostic histologique de la rage depuis des dizaines d'années (*figure 4*). (b) Les variations au niveau de la glycoprotéine sont beaucoup plus importantes [17, 18]. Aucun anticorps monoclonal anti-G ne reconnaît toutes les souches de rage. Cependant ces anticorps, s'ils ne peuvent être utilisés pour le diagnostic, se sont révélés particulièrement utiles : ils ont servi à l'étude de la structure antigénique de la glycoprotéine et certains d'entre eux ont permis d'isoler des mutants de virulence sur lesquels nous reviendrons

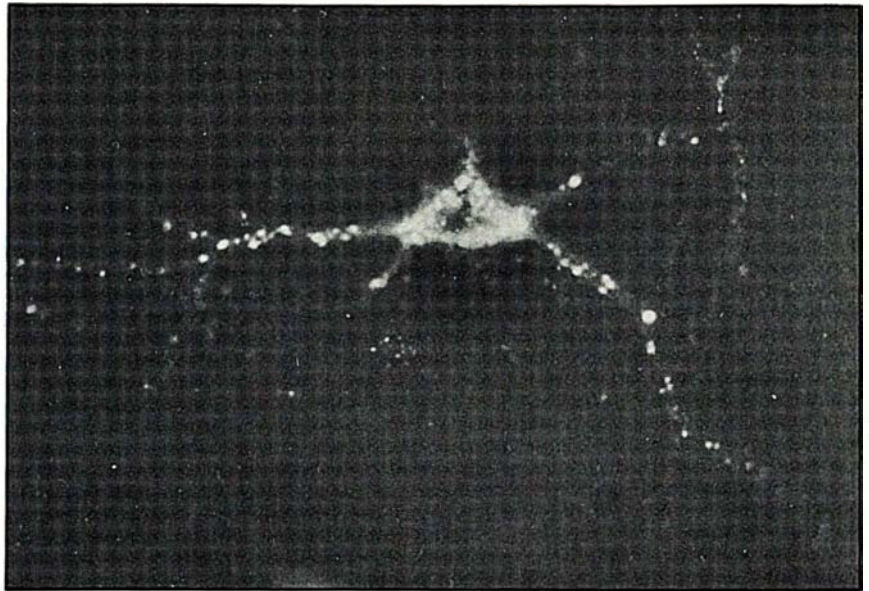


Figure 4. *Présence de nucléocapsides rabiques dans un neurone infecté par la rage (immunofluorescence indirecte). Une coupe de moelle épinière de souris réalisée 48 heures après injection dans le mollet de  $10^3$  DL 50 de virus CVS a été traitée par un anticorps monoclonal antinucléocapside, puis par un anti-anticorps de souris conjugué à la fluorescéine. Observation au microscope à fluorescence : dans le champ, un seul neurone est fluorescent, les autres ne sont pas infectés.*

plus loin. On a pu mettre en évidence sur la protéine G plusieurs sites antigéniques liés à la neutralisation du pouvoir infectieux [19]. Par ailleurs, il existe des anticorps qui se lient à la glycoprotéine sans neutraliser le virus. On ne sait pas encore pourquoi certains anticorps antiglycoprotéines neutralisent et d'autres ne neutralisent pas le virus.

### Les ARN viraux

Comme il a été dit plus haut, le virion rabique contient une seule molécule d'ARN, simple brin, de  $4,6 \times 10^6$  daltons. L'ordre des gènes est le suivant : 3'N, M1, M2, G, L, 5'. Dans les cellules infectées, on a pu mettre en évidence 4 catégories de molécules : les messagers des cinq protéines, qui sont des molécules d'ARN de polarité complémentaire à celle du génome, monocistroniques, un messenger par protéine, et terminées par une chaîne de « poly A » de longueur variable; un ARN leader, qui est une petite molécule de 58 nucléotides, complémentaire de l'extrémité 3' du gé-

nome, et dont le rôle n'est pas encore éclairci; les antigénomes, qui ont la longueur du génome mais sont de polarité complémentaire; sous forme de nucléocapsides, ils servent de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes; et enfin les génomes nouvellement synthétisés, sous forme de nucléocapsides, pouvant servir soit à fabriquer des virions, soit à synthétiser les différentes catégories d'ARN viral.

### Le cycle viral

Il est entièrement cytoplasmique et a pu être relativement bien étudié en culture de cellules. Quelques informations sur ce qui se passe dans l'animal entier sont également disponibles.

En culture de cellule, on distingue une phase d'adsorption pendant laquelle le virus entre en contact avec la membrane de la cellule-hôte. Ces contacts impliquent certainement la glycoprotéine et certains constituants de la membrane cellulaire. La question de savoir s'il

existe des récepteurs spécifiques a souvent été posée. Des travaux effectués sur des cultures de muscle différencié et dans l'animal au niveau des jonctions neuromusculaires suggèrent que le virus pourrait se fixer sur les récepteurs d'acétylcholine [20]. D'autres résultats obtenus sur des BHK 21 et des neuroblastomes de souris indiquent que le virus reconnaît un phospho- ou un glycolipide de la membrane cellulaire [21]. Cette observation est également vraie pour un autre rhabdovirus, n'appartenant pas au sous-groupe des lyssavirus et qui n'est pas neurotrope, le VSV. Tout ce que l'on peut dire c'est que, dans l'animal, le virus semble avoir un tropisme pour certains types de cellules parmi lesquelles figurent les neurones cholinergiques. Au contraire, in vitro, le spectre d'hôte du virus est très large, ce qui suggère que les résultats obtenus en culture de cellules ne sont pas forcément généralisables à la situation dans l'animal entier. Après l'adsorption a lieu l'internalisation par fusion avec la membrane ou par pinocytose. La nucléocapside se retrouve dans le cytoplasme, débarrassée de la membrane virale qui fusionne avec la membrane cellulaire. Elle commence alors la transcription (ou synthèse des messages) puis la réplication lorsque suffisamment de protéines N ont été fabriquées pour venir envelopper l'ARN naissant. La molécule en cours de synthèse étant immédiatement séparée de sa matrice par des protéines, il n'y a jamais d'intermédiaire double chaîne dans ce processus. Les protéines G et M2 s'insèrent dans les membranes de la cellule-hôte et la maturation a lieu lorsque les nucléocapsides arrivent au contact des membranes transformées. Dans le cas de la rage, la maturation peut se produire au contact des membranes internes et externes. Environ 24 heures séparent la pénétration des premiers virions et la phase de production virale maximale.

D'après ce qui vient d'être dit, il est clair que l'ARN nu ne saurait être infectieux, d'abord parce qu'il lui manque sa transcriptase et ensuite parce que c'est la structure nucléocapside qui est fonctionnelle et que

cette structure se forme exclusivement autour de l'ARN naissant. Dans le cas de la rage et plus généralement des autres virus ARN à chaîne négative on n'arrivera sans doute pas à manipuler l'ARN (ou l'ADN correspondant) in vitro et à réobtenir un virus infectieux. La mutagenèse dirigée est donc impossible jusqu'à preuve du contraire. Enfin, on peut remarquer que les cinq protéines virales ont à la fois un rôle structural (elles sont toutes présentes dans le virion mature) et fonctionnel puisqu'elles participent aux différentes étapes du cycle.

Dans l'animal entier le virus se multiplie sans doute localement dans les cellules musculaires au point d'inoculation mais il se peut aussi qu'il entre directement dans le système nerveux central. Une étude précise des voies de pénétration du virus a été faite en injectant le virus dans la chambre antérieure de l'œil de rats adultes [22]. A des intervalles de 24 heures après l'injection, l'animal a été sacrifié et la progression de l'infection a été suivie par immunofluorescence sur des coupes sériées de l'œil, de ses annexes et du cer-

veau. On a pu conclure de ce travail que le virus pénétrait dans le système nerveux central par les neurones du parasympathique et du trijumeau et par une voie d'innervation de la rétine appelée voie rétino-pétale (mais pas par les neurones rétinien) (figure 5). Certaines de ces terminaisons nerveuses sont cholinergiques mais de nature muscarinique et la nature des autres est inconnue. Conformément aux observations d'autres auteurs [23], le virus ne pénètre pas dans les neurones du sympathique. A l'intérieur des neurones le virus commence sans doute immédiatement sa transcription et sa réplication, le matériel viral étant transporté passivement vers les corps cellulaires par le flux axonal rétrograde à une vitesse de 0,5 mm par heure chez le rat [22, 24]. La maturation virale libérerait des virions infectieux au niveau des synapses, ce qui permettrait la réinfection des neurones voisins. De proche en proche, le virus gagne le système nerveux central (phase centripète de l'infection), puis il redescend vers la périphérie par la voie axonale (phase centri-

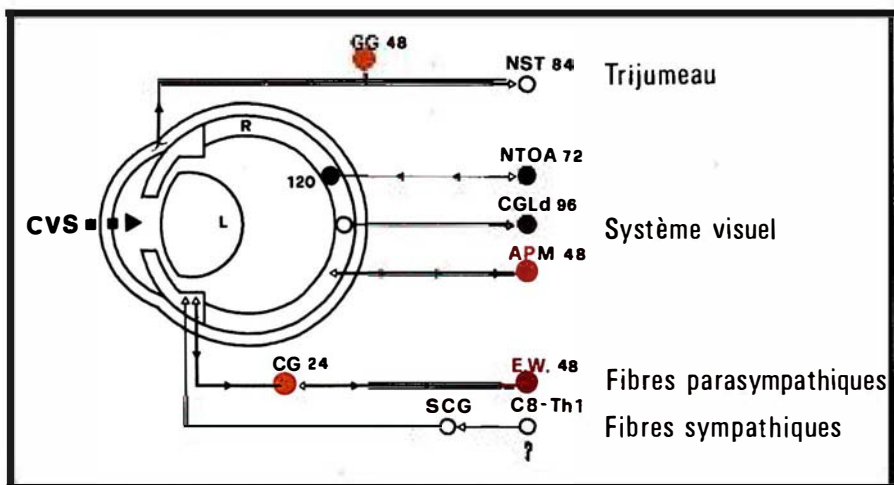


Figure 5. *Pénétration de la rage dans le système nerveux à la suite d'une injection intraoculaire.* ▽ direction de la transmission synaptique; ► cheminement du virus; ● neurones infectés en premier; ● neurones infectés secondairement; ○ neurones non infectés.

Abréviations : APM : aire pretectalis medialis; CG : ganglion ciliaire; CGLd : corps genouillé latéral droit; C8-Th : neurones sympathiques pré-ganglionnaires; CVS : challenge virus strain; EW : noyau d'Edinger-Westphal; GG : ganglion de Gasser; L : cristallin; NTOA : noyau terminal du système optique accessoire; NST : noyau sensoriel terminal; R : rétine; SCG : ganglion cervical supérieur.

Les chiffres indiqués à côté des abréviations représentent le nombre d'heures au terme duquel les structures sont atteintes par le virus (étude par immunofluorescence).



## RÉFÉRENCES

17. Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. II. The glycoprotein. *J Gen Virol* 1980, 48 : 105-9.
18. Wiktor TJ. In : Vodpiha J, ed. *Proceedings International Conference on Improvement of Rabies Postexposure Treatment*, Zagreb, 1984.
19. Lafon M, Wiktor TJ, Macfarlan RI. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1983; 64 : 843-51.
20. Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 1982; 215 : 182-4.
21. Wunner WH, Reagan KJ, Koprowski H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *J Virol* 1984; 50 : 691-7.
22. Kucera P, Dolivo M, Coulon P, Flamand A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. *J Virol* 1985; 55 : 158-62.
23. Tsiang H, Derer M, Taxi J. An in vivo and in vitro study of rabies virus infection of the rat superior cervical ganglia. *Arch Virol* 1983; 76 : 231-43.
24. Tsiang H. Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. *J Neuro-pathol Exp Neurol* 1979; 38 : 286-96.
25. Murphy FA. Rabies pathogenesis. Brief review. *Arch Virol* 1977; 54 : 279-97.
26. Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Molecular basis of rabies virus virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence. *J Gen Virol* 1983; 64 : 693-6.
27. Dietzhold B, Wunner WH, Wiktor TJ, et al. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 70-4.
28. Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol* 1985; 53 : 926-34.
29. Perrin P, Thibodeau L, Dauguet C, Fritsch A, Sureau P. Amplification des propriétés immunogènes de la glycoprotéine rabique par ancrage sur des liposomes préformés. *Ann Virol* 1984; 135 E : 183-99.
30. Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81 : 7194-8.

fuge) et c'est alors seulement que les symptômes commencent à apparaître, et que le virus est excrété dans la salive [25].

Il n'y a jamais de virémie. Comme dans les cultures de cellules in vitro, l'effet de l'infection rabique est relativement discret. L'étude histopathologique des cerveaux d'animaux ou d'individus décédés de rage ne montre pas de grandes altérations. Il n'y a pas de démyélinisation, peu ou pas de réactions inflammatoires. On peut donc penser que l'infection virale entraîne une dérégulation du fonctionnement des neurones à un niveau moléculaire qui reste encore complètement inconnu.

### Étude génétique

Afin d'avoir de bons outils pour étudier les différentes phases du cycle viral ainsi que les relations du parasite avec son hôte, des mutants thermosensibles et des mutants antigéniques ont été isolés. Les premiers correspondent pour la plupart à une seule substitution d'acide aminé dans une des cinq protéines virales. Les mutants antigéniques résultent d'une substitution d'acide aminé dans la glycoprotéine.

### Mutants thermosensibles

Le virus se multiplie normalement en culture de cellules à des températures comprises entre 33 et 39,5°C. Au-dessous, son cycle est considérablement ralenti, au-dessus il est inhibé. Il est relativement facile d'isoler des mutants qui sont incapables de pousser à partir de 38,5°C mais qui se multiplient normalement à 33°C : ce sont des mutants thermosensibles. Plusieurs dizaines de mutants thermosensibles ont été isolés à partir de différents stocks de virus, avec ou sans mutagenèse. La fréquence des mutants thermosensibles spontanés se situe aux alentours de 0,3%. Elle peut être multipliée par 10 après mutagenèse. Le classement de ces mutants a été compliqué par le fait que la rage ne présente ni complément, ni recombinaison. La caractérisation biochimique des mutants a montré que la plupart d'en-

tre eux sont bloqués à des étapes précoces du cycle viral. Les autres effectuent normalement leur synthèses d'ARN et de protéines à température élevée mais il n'y a pas de maturation de virions infectieux. Trois mutants ont été caractérisés : deux sont mutés dans le gène de la protéine M<sub>1</sub> et un dans celui de la protéine G.

Par ailleurs le pouvoir pathogène et protecteur des mutants a été étudié sur des souris Balb/C. Les expériences ont montré que certains mutants ont un pouvoir pathogène très atténué. Malheureusement ils ne protègent pas l'animal contre une surinfection par une souche virulente, à l'exception du mutant ts G<sub>1</sub> (ts = thermosensible, G = Gif) qui ne tue plus la souris adulte lorsqu'il est inoculé par voie intramusculaire mais la protège très efficacement. Ce dernier est donc intéressant d'un point de vue pratique. Le phénotype thermosensible et avirulent est dû à une mutation dans la glycoprotéine (leucine 132 → phénylalanine).

### Mutants antigéniques

Des mutants antigéniques peuvent être facilement isolés parmi les virus résistants à la neutralisation par un anticorps monoclonal. Le travail a été entrepris à grande échelle à partir des souches ERA et CVS, à l'aide d'une quinzaine d'anticorps monoclonaux neutralisant l'une et (ou) l'autre de ces souches. Pratiquement dans tous les cas il a été possible de sélectionner des mutants antigéniques. Leur fréquence varie entre 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-4</sup> selon les stocks et l'anticorps utilisé; avec un agent mutagène, le 5 FU à la dose de 50 µg/ml, elle est multipliée par un facteur 10. La fréquence des mutants antigéniques est en moyenne plus faible que celle des mutants thermosensibles, ce qui est tout à fait normal. En effet les premiers correspondent à une substitution d'acide aminé dans une région bien précise de la glycoprotéine (un site antigénique) tandis que le phénotype thermosensible peut sans doute être obtenu par une série de mutations localisées tout le long du génome. Le taux de mutation de la rage semble donc être aussi élevé

que celui des autres virus ARN. Ceci est probablement lié au pourcentage d'erreurs que fait la transcriptase en copiant l'ARN, erreurs qui ne sont pas corrigées comme dans le cas de l'ADN. Les mutants ont été injectés à des souris adultes afin de voir si leur virulence était modifiée. Il s'est alors avéré que tous les mutants résistants à la neutralisation par deux des anticorps monoclonaux avaient totalement perdu la virulence pour les animaux adultes [26]. Les souriceaux nouveau-nés restent sensibles à l'infection mais la résistance s'installe rapidement et devient totale vers cinq ou six semaines.

La séquence en acides aminés de la glycoprotéine des mutants est modifiée au niveau du site antigénique n° III. L'arginine en position 333 est remplacée par une glutamine, une glycine ou une isoleucine [27, 28]. Le site III s'étend au moins sur 10 acides aminés autour de l'arginine 333 mais les substitutions portant sur les autres acides aminés n'ont jusqu'à présent pas entraîné de modification de la virulence. Pourquoi l'arginine 333 est-elle essentielle pour la virulence? C'est une question passionnante à laquelle on peut déjà apporter un élément de réponse. En effet, il a été montré que cette mutation modifie le spectre d'hôte du virus. Par exemple, celui-ci n'est plus capable d'envahir les terminaisons nerveuses du parasymphatique et de la voie rétinopétale. Par contre il est devenu capable d'infecter les cellules de l'épithélium du cristallin [22]. Le travail est en ce moment activement poursuivi, car ce type de mutants devrait apporter des informations intéressantes sur les causes de la virulence, à un niveau moléculaire.

### Utilisation des souches mutantes

Il est clair que l'utilisation des souches mutantes est une possibilité intéressante pour la fabrication de vaccin vivant ou inactivé. En effet, même dans ce dernier cas, la production et la manipulation de grandes quantités de virus n'offriraient plus aucun danger pour le personnel et l'on n'aurait plus à redouter les

accidents dus à une mauvaise inactivation. Les mutants déclenchent une forte réponse immunitaire chez les animaux inoculés : le taux d'anticorps circulants, de cellules T cytotoxiques et d'interféron est élevé. Les animaux vaccinés sont bien protégés contre une surinfection par un virus d'épreuve. La pathogénicité résiduelle des mutants pour des espèces cible (renards) ou non cible (rongeurs) est presque nulle. Les essais de vaccination orale des renards réalisés en Allemagne ont été faits avec un mutant antigénique avirulent. Cette souche n'a malheureusement pas été séquencée. Par analogie avec les résultats émanant des autres laboratoires, on peut penser qu'elle porte une seule mutation dans la glycoprotéine. Or, il ne faut pas oublier que les jeunes animaux restent sensibles et peuvent constituer un réservoir de virus avec apparition éventuelle de révertants virulents.

Afin d'obtenir une souche ayant moins de chance de reverser vers la virulence, un double mutant a été sélectionné à partir de la souche thermosensible tsG<sub>1</sub>, à l'aide des deux anticorps monoclonaux mentionnés plus haut. Il porte effectivement les deux mutations entraînant la perte de la virulence (leucine 132 → phénylalanine et arginine 333 → glutamine). Son pouvoir protecteur et sa stabilité génétique sont en ce moment à l'étude.

En dehors des souches modifiées, d'autres possibilités sont essayées dans différents laboratoires. Citons parmi celles-ci : l'utilisation de peptides synthétiques correspondant à des fragments de la glycoprotéine; l'utilisation de glycoprotéine obtenue à partir de virions purifiés ou par génie génétique, incluse ou non dans des immunosomes; l'introduction du gène de la glycoprotéine dans le virus de la vaccine. Des résultats encourageants ont été obtenus dans les deux derniers cas [29, 30].

Souhaitons que, grâce à ces approches diversifiées, se profile bientôt une solution efficace et économique au problème de la vaccination massive des chiens, seul moyen de maintenir la rage humaine au niveau le plus bas ■

## Summary

Rabies disease is endemic all over the world but human cases are almost exclusively found in developing countries. Most of the victims have been bitten by dogs. Many wild life mammals are also infected and may constitute an everlasting reservoir. The infectious agent is a lyssavirus which belongs to the rhabdovirus family. It is a bullet shape, negative strand RNA virus. The genome which codes for 5 proteins has a molecular weight of  $4.6 \times 10^6$  daltons. It is tightly wrapped into a proteic structure, the nucleocapsid, composed of 3 viral proteins N, L and M<sub>1</sub>, surrounded by a lipid bilayer including viral proteins G and M<sub>2</sub> and some contaminants of cellular origin. G is a glycoprotein which protrudes as spikes visible at the surface of the virion. After introduction into the organism, the virus selectively penetrates some categories of nerve endings. The specificity is likely to involve the recognition by the viral glycoprotein of some putative receptors at the surface of the cells. It has been found that a single point mutation on the glycoprotein involving an arginin in position 333 deeply modifies the host range spectrum of the virus and abolishes its pathogenicity for adult animals. Viral RNA and proteins syntheses immediately follow the entry of the nucleocapsid into the cytoplasm. The viral material is passively transported by the retrograde axoplasmic flow. Reinfestation of neighbouring neurones probably occurs at the synapses through viral maturation and reabsorption of mature particles. In experimental models, total invasion of the brain occurs within 5 or 6 days followed by dissemination of the virus into the whole peripheric nervous system whereas the well known symptoms of the disease occur.