



**HAL**  
open science

# Étude de la circulation des virus influenza D et EriCoV et de leurs manifestations cliniques chez les hérissons d'Europe (*Erinaceus europaeus*) accueillis au centre de soins de la faune sauvage de l'École nationale vétérinaire de Toulouse

Flore Birot-Zecchini

## ► To cite this version:

Flore Birot-Zecchini. Étude de la circulation des virus influenza D et EriCoV et de leurs manifestations cliniques chez les hérissons d'Europe (*Erinaceus europaeus*) accueillis au centre de soins de la faune sauvage de l'École nationale vétérinaire de Toulouse. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03780150

**HAL Id: dumas-03780150**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03780150v1>**

Submitted on 19 Sep 2022

**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.

# ETUDE DE LA CIRCULATION DES VIRUS INFLUENZA D ET ERICOV ET DE LEURS MANIFESTATIONS CLINIQUES CHEZ LES HERISSONS D'EUROPE (*ERINACEUS EUROPAEUS*) ACCUEILLIS AU CENTRE DE SOINS DE LA FAUNE SAUVAGE DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

---

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**BIROT-ZECCHINI Flore, Marie,  
Monique**

**Directeur de thèse : M. Guillaume LE LOC'H**

---

**JURY**

PRESIDENT :

**M. Christophe PASQUIER**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Guillaume LE LOC'H**

**M. Stéphane BERTAGNOLI**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- N. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup> CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*  
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

## MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*  
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*  
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*  
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*  
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*  
M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*  
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*  
Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*  
Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*  
Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*  
Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*  
Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*  
Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*  
M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*  
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*





## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier**

Professeur des Universités, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

*Virologie et Bactériologie*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse

Hommages respectueux

### **A Monsieur le Docteur Guillaume Le Loc'h**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Médecine zoologique et de la faune sauvage*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de ce travail de thèse, pour m'avoir accordé votre confiance et pour toute votre aide

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect

### **A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Virologie et infectiologie*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse

Veillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements

### **A L'ANSES et en particulier à Marine Wasniewski**

Responsable du Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour la sérologie rage et  
Responsable des activités Sérologie-Virologie au sein du Laboratoire de la rage et de la faune sauvage  
de Nancy

Pour avoir accepté de réaliser les PCR EriCov sur les échantillons de ma thèse et pour les explications  
que vous m'avez fournies

Veillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements

### **A Mariette Ducatez**

Directrice de recherche à l'INRAE, dans l'unité mixte de recherche ENVT-INRAE Interactions Hôtes-  
agents-pathogènes (IHAP).

Pour avoir accepté de m'aider sur ce travail et pour tout le temps que vous m'avez consacré

Veillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mes sincères remerciements

*Je remercie profondément ma famille et mes proches, pour m'avoir si bien entourée, conseillée et soutenue à chaque instant pendant toutes mes études et bien au-delà.*

*En particulier ma mère, dont la thèse faisait déjà un trait d'union avec la médecine vétérinaire (Zecchini 1992),  
ma sœur Marie-Anne et Sam.*

## Table des matières

Table des annexes .....	13
Table des illustrations.....	14
Tableaux .....	16
Liste des abréviations .....	17
Introduction.....	19
I. Le Hérisson d'Europe : présentation .....	22
A. Taxonomie .....	22
B. Répartition.....	23
C. Déclin des populations .....	25
1. Statut au sein de la Liste Rouge de l'IUCN .....	25
2. Déclin des populations .....	26
D. Statut juridique.....	28
1. Niveau européen .....	28
2. Niveau national .....	28
E. Habitat.....	29
F. Prédation .....	32
G. Comportement et régime alimentaires.....	32
H. Particularités anatomiques .....	34
1. Description générale .....	34
2. Squelette .....	34
3. Peau et piquants.....	35
4. Mise en boule .....	36
5. Dimorphisme sexuel.....	37
I. Fonction respiratoire chez le Hérisson d'Europe .....	38
1. Anatomie pulmonaire.....	38
2. Physiologie de la respiration .....	39
J. Fonction digestive du Hérisson d'Europe.....	40
K. Hibernation.....	40
1. Généralités .....	40
2. Dépression du système immunitaire.....	41
L. Étiologies des affections respiratoires .....	42

1.	Causes parasitaires .....	42
2.	Causes bactériennes.....	43
3.	Causes virales .....	44
4.	Divers.....	44
II.	Influenza D.....	45
A.	Introduction.....	45
B.	Classification.....	46
C.	Propriétés structurales.....	47
1.	Structure générale des virions influenza D.....	47
2.	Génome : structure et organisation .....	49
3.	Protéines .....	51
D.	Evolution des virus influenza.....	53
1.	Dérive antigénique .....	54
2.	Recombinaison génétique (ou cassure antigénique) .....	54
E.	Cycle viral.....	54
1.	Attachement à la cellule hôte .....	55
2.	Entrée dans la cellule et fusion endosome-membrane virale.....	55
3.	Import nucléaire des complexes ribonucléoprotéiques .....	56
4.	Synthèse de l'ARN viral.....	56
5.	Export nucléaire des ribonucléotides.....	57
6.	Assemblage des virus et empaquetage du génome.....	57
7.	Bourgeonnement .....	58
F.	Epidémiologie.....	58
1.	Circulation en Amérique.....	58
2.	Circulation en Europe .....	59
3.	Circulation en Afrique.....	60
4.	Circulation en Asie.....	60
5.	Espèces cibles et réservoirs.....	61
G.	Pathologie et modes de transmission .....	64
1.	Etude des différentes espèces cibles .....	64
2.	Bilan sur le tropisme du virus .....	66
III.	Coronavirus .....	67
A.	Introduction.....	67
B.	Classification.....	67

C.	Découverte d'EriCoV (HedCoV) .....	68
D.	Propriétés structurales et composition des virions.....	69
1.	Morphologie des virions.....	69
2.	Organisation du génome.....	70
3.	Protéines .....	71
E.	Cycle viral.....	75
1.	Attachement et fusion.....	75
2.	Formation du RTC.....	76
3.	Réplication.....	76
4.	Transcription .....	76
5.	Assemblage et libération des virions néo-formés.....	77
F.	Evolution des coronavirus .....	77
1.	Mutation.....	77
2.	Recombinaison intergénomique .....	78
G.	Epidémiologie.....	78
1.	Circulation en Europe .....	78
2.	Circulation en Chine .....	79
3.	Données épidémiologiques relatives à l'âge, l'année, le mois, la zone d'échantillonnage ..	79
H.	Pathologie.....	80
IV.	Matériels et méthodes .....	85
A.	Réflexion sur la récolte des données d'examen clinique sur des animaux de la faune sauvage ..	86
1.	Déroulement d'une admission en centre de soins.....	86
2.	Limiter les manipulations .....	87
3.	Réaliser des prélèvements (invasifs) .....	87
4.	Prendre en compte et limiter les risques de contamination au sein du centre.....	88
5.	Proposer un document facile et rapide à compléter .....	88
B.	Récolte des données cliniques et prélèvements.....	89
1.	Choix des individus à inclure dans l'étude .....	89
2.	Données d'examen clinique .....	89
3.	Evaluation de l'état corporel et indice de Bunnell .....	90
4.	Statut parasitaire.....	91
5.	Prélèvements.....	92
C.	Sérologies influenza D par IHA (World Health Organization 2002).....	94

1.	Description de la technique d'hémagglutination.....	94
2.	Etape de pré-traitement : traitement des sérums avec une enzyme destructrice des récepteurs à l'acide sialique.....	95
3.	Préparation des globules rouges.....	96
4.	Etape d'hémabsorption des sérums.....	96
5.	Etape de calibration des souches de virus .....	96
6.	Test des 4 UHA .....	98
7.	Test d'inhibition de l'hémagglutination .....	98
8.	Lecture.....	99
D.	Extraction d'ARN .....	99
E.	Détection des ARN viraux.....	100
1.	Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	100
2.	RT-PCR .....	101
3.	qPCR .....	102
4.	RT-qPCR influenza D.....	103
5.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	105
6.	RT-PCR EriCoV.....	105
F.	Analyses statistiques .....	106
G.	Cartes de répartition .....	108
V.	Résultats.....	109
A.	Période de récolte des données et nombre de hérissons.....	109
B.	Identification .....	109
C.	Commémoratifs.....	110
1.	Date d'admission dans le centre de soins .....	110
2.	Lieu de découverte des hérissons .....	110
D.	Etat de vigilance .....	111
E.	Aspect des fèces.....	112
F.	Poids et score corporel.....	113
G.	Examen de l'appareil respiratoire .....	114
H.	Statut parasitaire.....	115
I.	Prélèvements.....	115
J.	Résultats de PCR et sérologies .....	115
K.	Sérologie influenza D par inhibition de l'hémagglutination.....	116
1.	Description des résultats.....	116

2.	Séroprévalences .....	117
3.	Carte de répartition des résultats de sérologies .....	119
4.	Analyses statistiques .....	121
L.	Virologie influenza D par RT-qPCR .....	125
1.	Rinçages nasaux.....	125
2.	Prélèvements fécaux .....	125
M.	Virologie EriCoV par RT-PCR.....	127
1.	Rinçages nasaux.....	127
2.	Prélèvements fécaux .....	127
VI.	Discussion .....	133
1.	Séroprévalence influenza D.....	133
2.	Circulation de l'influenza D dans la population de hérissons d'Europe amenés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT .....	134
3.	Circulation d'EriCoV dans la population de hérissons d'Europe amenés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT et prévalence .....	136
4.	Manifestation clinique.....	138
5.	Co-infections.....	138
6.	Infections expérimentales.....	139
	Conclusion .....	140

## Table des annexes

Annexe 1 : Fiche d'examen clinique à remplir lors de l'admission d'un hérisson au centre de soins.	156
Annexe 2 : Fiche d'évaluation de l'état corporel d'un hérisson .....	157
Annexe 3 : Fiche explicative pour la réalisation des prélèvements dans le cadre de la thèse .....	159
Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ARN .....	160
Annexe 5 : Répartition des hérissons selon le critère "Marche" et les types de prélèvements effectués .....	163
Annexe 6 : Répartition des hérissons selon le critère "Mise en boule" et les types de prélèvements effectués.....	163
Annexe 7 : Répartition des hérissons selon le critère "Décubitus" et les types de prélèvements effectués.....	164
Annexe 8 : Répartition des hérissons selon le critère "Réaction à une stimulation" et les types de prélèvements effectués.....	164
Annexe 9 : Répartition des hérissons selon leur état de vigilance et les types de prélèvements effectués.....	165
Annexe 10 : Répartition des hérissons selon la consistance des fèces et les types de prélèvements effectués.....	165
Annexe 11 : Répartition des hérissons selon la couleur des fèces et les types de prélèvements effectués.....	166
Annexe 12 : Tableau récapitulatif des résultats de sérologie et de PCR.....	169

## Table des illustrations

Figure 1 : Taxonomie du Hérisson d'Europe .....	22
Figure 2: Carte de répartition du Hérisson d'Europe ( <i>Erinaceus europaeus</i> ) en Europe .....	24
Figure 3 : Catégories de la classification de la liste rouge de l'IUCN .....	25
Figure 4 : Pourcentages des estomacs non vides contenant les différentes catégories de proies.....	33
Figure 5 : Photographie des piquants d'un Hérisson d'Europe .....	35
Figure 6: A : Description des muscles du hérisson intervenant lors de la mise en boule, B et C : Représentation d'un hérisson en boule .....	36
Figure 7 : Photographie d'un hérisson roulé en boule .....	37
Figure 8 : Illustration du dimorphisme sexuel chez le Hérisson d'Europe .....	38
Figure 9: Photographie d'une dissection réalisée à l'ENVT présentant les viscères thoraciques du Hérisson d'Europe ( <i>E. europaeus</i> ). .....	39
Figure 10 : Illustration des spectres d'hôtes des quatre genres connus à ce jour de virus influenza...	45
Figure 11 : Schéma de la structure des virions d'influenza D.....	48
Figure 12 : Organisation du génome du virus influenza D .....	49
Figure 13 : Cycle de vie des virus influenza .....	55
Figure 14 : Séroprévalence de l'IDV dans les populations de bovins et de petits ruminants dans différentes régions françaises, entre 2014 et 2018 .....	60
Figure 15: Schéma de la structure des virions de <i>Betacoronavirus</i> , avec l'exemple du SARS-CoV.....	70
Figure 16 : Organisation du génome d'EriCoV et de trois autres betacoronavirus du clade C.....	71
Figure 17 : Organisation des polyprotéines issues de la traduction des ORF1a et ORF1b et fonctions des différentes nsp, dans le cas d'un virus SARS-CoV .....	74
Figure 18 : Cycle de vie des coronavirus .....	75
Figure 19 : Répartition mensuelle des accueils de hérissons d'Europe au centre de soins de l'ENVT, entre 2016 et 2021 .....	85
Figure 20 : Cheminement d'un hérisson au sein du centre de soins .....	86
Figure 21 Mesures réalisées sur un hérisson roulé en boule permettant la détermination de l'indice de Bunnell.....	90
Figure 22 : Hérissons d'Europe roulés en boule présentant des états corporels différents.....	91
Figure 23 : Schéma de l'organisation des plaques pour l'étape de calibration des souches .....	97
Figure 24 : Schéma de l'organisation des plaques pour le test d'inhibition de l'hémagglutination .....	99
Figure 25 : Répartition par mois d'arrivée au centre de soins des hérissons inclus dans l'étude.....	110
Figure 26 : Répartition des hérissons selon leur état corporel .....	114
Figure 27 : Carte de répartition des hérissons testés par sérologie IHA pour les souches D/Neb et D/5920 et résultats associés .....	119
Figure 28 : Cartes de répartition des hérissons testés par sérologie IHA pour la souche D/Neb et résultats associés.....	120
Figure 29 : Cartes de répartition des hérissons testés par sérologie IHA pour la souche D/5920 et résultats associés.....	120
Figure 30 : Détail de l'analyse multivariée réalisée sous R.....	122
Figure 31 : Détail de régression logistique réalisée sous R .....	124
Figure 32 : Résultats de la vérification par électrophorèse des PCR influenza D.....	126

Figure 33 : Résultats des RT-PCR EriCoV .....	128
Figure 34 : Carte de répartition des hérissons testés par PCR sur prélèvement fécal pour EriCov et résultats associés.....	131

## Tableaux

Tableau 1 : Amorces et sonde utilisées dans l'amplification par RT-qPCR pour le virus de l'influenza D .....	103
Tableau 2 : Composition de chaque mélange utilisé pour la réaction de RT-qPCR influenza D .....	104
Tableau 3 : Conditions de la réaction de RT-qPCR réalisées par le thermocycleur LightCycler 96 ....	104
Tableau 4 : Amorces et sondes utilisées dans l'amplification par RT-qPCR pour EriCoV.....	105
Tableau 5 : Tableau des catégories d'âge et de sexe des hérissons étudiés.....	110
Tableau 6 : Détail des notes attribuées aux individus des différentes classes de l'état de vigilance .	112
Tableau 7 : Répartition des variables Couleur et Consistance transformées et proportions associées .....	113
Tableau 8 : Détail des données d'examen clinique de l'appareil respiratoire .....	114
Tableau 9 : Répartition des individus par nombre et type de prélèvements réalisés .....	115
Tableau 10 : Synthèse des résultats de tests IHA et PCR réalisés .....	116
Tableau 11 : Résultats des tests d'inhibition de l'hémagglutination pour les souches D/Neb et D/5920 .....	116
Tableau 12 : Sensibilités et spécificités des tests d'IHA déterminées pour les souches D/Neb et D/5920 (Saegerman et al. 2021) .....	117
Tableau 13 : Séroprévalences apparentes et réelles (en pourcentages) et intervalles de confiance associés des résultats des tests d'IHA pour la souche D/Neb ( <i>IC = Intervalle de Confiance</i> ) .....	118
Tableau 14 : Séroprévalences apparentes et réelles (en pourcentages) et intervalles de confiance associés des résultats des tests d'IHA pour la souche D/5920 ( <i>IC = Intervalle de Confiance</i> ) .....	118
Tableau 15 : Viroprévalences apparente et réelle et intervalles de confiance associés des résultats de PCR Influenza D sur prélèvements fécaux (IC = Intervalle de Confiance) .....	126
Tableau 16 : Tableau résumé des associations avec l'infection par EriCoV et prévalence et p-value associées.....	129
Tableau 17 : Viroprévalences apparente et réelle et intervalles de confiance associés des résultats de PCR EriCov sur prélèvements fécaux (IC = Intervalle de Confiance) .....	130

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

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

ARN : Acide RiboNucléique

CRM1 : Chromosome Region Maintenance protein 1

DMV : Double Membrane Vesicles

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

ERGIC : Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment

HA : Hémagglutinine

HEF : Hemagglutinin-Esterase Fusion

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IAV : Influenza A Virus

IBV : Influenza B Virus

IC : Intervalle de Confiance

ICV : Influenza C Virus

IDV : Influenza D Virus

IHA : Indirect Haemagglutination (Inhibition de l'hémagglutination)

INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel

IUCN : International Union for Conservation of Nature

MERS-CoV : Middle East Respiratory syndrom coronaviruses

M1 / M2 : Matrix protein 1 / Matrix protein 2

NA : Neuraminidase

NEP-NS2 : Nuclear Export Protein – Non Structural protein 2

NES : Nuclear Export Signal

NLS : Nuclear Localization Signal

NP : Nucleoprotein

NSP : protéines non structurales

OR : Odds-Ratio

ORF : Open Reading Frame

PA : Polymerase acid

PBS : Phosphate Buffer Saline

PB1 / PB2 : polymerase basic 1 / polymerase basic 2

PCR : Polymerase Chain Reaction

PRR : Pattern Recognition Receptor

P3 : Polymerase protein

RACE-PCR : rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction

RDE : Receptor Destroying Enzyme

RNP : Ribonucléoprotéine

RTC : complexe réplicase-transcriptase

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SARS : Severe acute respiratory syndrome

TBE : Tris Borate EDTA

TRS : Transcriptions Regulatory sequences

UHA : Unité Hémagglutinante

## Introduction

Le Hérisson d'Europe (*Erinaceus europaeus*) est le mammifère le plus présenté en centre de soins de la faune sauvage en France. L'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) en accueille ainsi chaque année plusieurs centaines, répartis sur toute l'année. L'espèce peut être porteuse de nombreuses maladies infectieuses et notamment virales, dont l'incidence clinique peut être très variable, voire asymptomatique.

Le virus de l'influenza D (IDV) a été découvert en 2011 aux Etats-Unis, à partir d'échantillons de porcs. Depuis, l'IDV a été détecté chez de nombreuses autres espèces, notamment parmi des espèces de la faune sauvage, et ce dans le monde entier. En 2019, une étude portant sur des hérissons accueillis au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT a mis en évidence une infection de l'espèce par ce virus. Cependant, peu de données existent encore actuellement concernant la circulation au sein des populations sauvages de hérissons. Par ailleurs, la manifestation clinique de ce virus, en particulier au niveau de la sphère respiratoire, n'a à notre connaissance encore jamais été étudiée chez cette espèce.

EriCoV fait partie de la famille des bêtacoronavirus et a été décrit pour la première fois en Allemagne en 2014 puis a également été détecté chez cette même espèce dans plusieurs pays européens, et en Chine. En France, il a été mis en évidence chez des Hérissons d'Europe dans le Nord mais sa présence n'est pas encore connue dans le Sud. Ses manifestations cliniques ont commencé à être étudiées dans plusieurs études mais aucune association significative n'a pour l'instant pu être mise en évidence entre des signes cliniques (respiratoires ou digestifs par exemple, étant donné le tropisme de nombreux coronavirus) et une infection par le virus. Le Hérisson d'Europe pourrait à ce titre constituer une espèce réservoir pour EriCoV.

Dans cette étude, nous cherchons donc à préciser la circulation de ces deux virus au sein de la population de Hérissons d'Europe accueillis sur une année entière dans le

centre de soins de la faune sauvage de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et à déterminer leur potentielle manifestation clinique. Des analyses sérologiques seront ainsi réalisées ainsi que des recherches de génome viral, à partir de prélèvements sanguins, fécaux et des rinçages nasaux sur des hérissons admis au centre de soins, pour lesquels des examens cliniques minutieux auront également été réalisés.

La première partie de ce travail est un travail bibliographique sur le Hérisson d'Europe, l'influenza D et EriCoV et la deuxième partie est consacrée à la partie expérimentation, résultats et discussion.

# Partie bibliographique

## I. Le Hérisson d'Europe : présentation

### A. Taxonomie

Le Hérisson d'Europe (espèce *Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758 (Linné, Salvius 1758)) appartient au règne animal, embranchement des chordés, classe des mammifères, ordre des *Eulipotyphla*, famille des *Erinaceidae* et au genre des *Erinaceus* (MNHN & OFB [Ed] 2003-2022). La monophylie de l'ancien ordre des « Insectivores », auquel le Hérisson appartenait auparavant a été remise en question par des analyses de phylogénie moléculaire (Symonds 2005) et est aujourd'hui considérée comme invalide d'un point de vue taxonomique. De nombreuses polémiques existent quant à la classification des espèces de la sous-famille erinacéinés (les hérissons), certains considérant qu'elle se décompose en trois genres, d'autres jusqu'en six. Il est plus généralement admis qu'elle est en fait composée de seize espèces, réparties en cinq genres : *Atelix*, *Hemiechinus*, *Erinaceus*, *Mesechinus* et *Paraechinus*. Le genre *Erinaceus* comprend quatre espèces : *Erinaceus amurensi* (Hérisson de l'Amour), *Erinaceus concolor* (Hérisson sud-oriental), *Erinaceus roumanicus* (Hérisson oriental) et *Erinaceus europaeus* (Hérisson d'Europe) (*Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database* 2022). Cette taxonomie est illustrée dans la Figure 1.

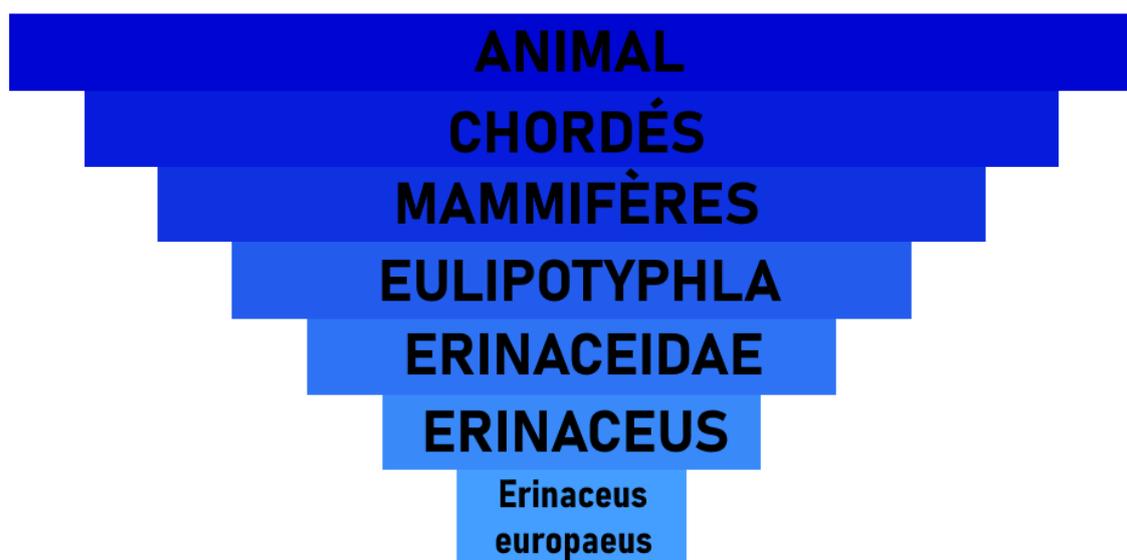


Figure 1 : Taxonomie du Hérisson d'Europe

## B. Répartition

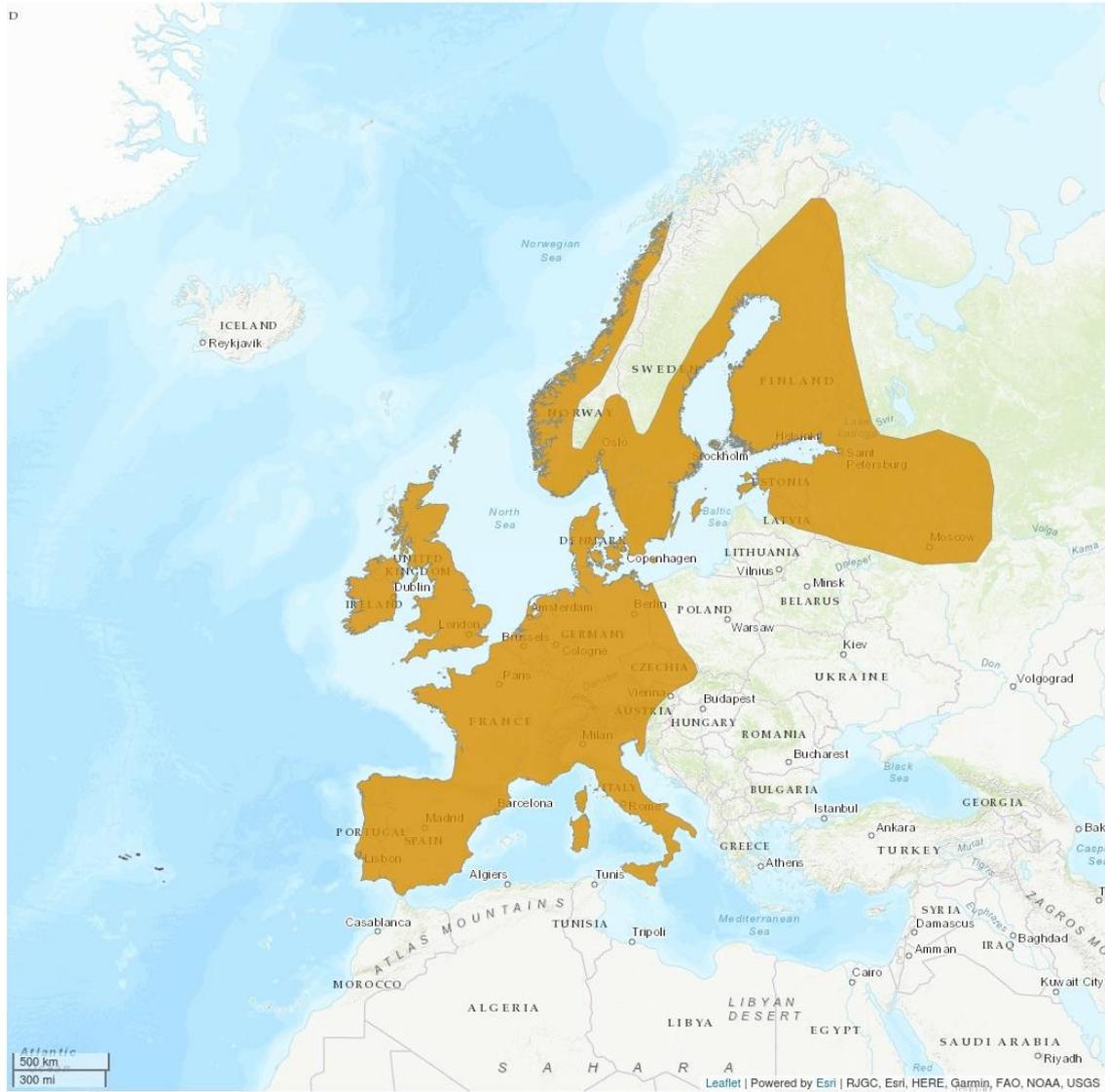
Le Hérisson d'Europe (*Erinaceus europaeus*) est présent dans la totalité de l'Europe occidentale et une partie de l'Europe centrale, du Sud de l'Espagne au Nord des îles Britanniques et du Sud de l'Italie au Nord du Danemark. A l'Est, le Hérisson est présent à la frontière Allemagne/Pologne, en République Tchèque et en Autriche. Au Nord, il est observé sur la quasi-totalité de la côte norvégienne, le Sud de la Suède ainsi que le long de la côte suédoise, dans la moitié sud de la Finlande, en Estonie et jusque dans la région de Saint-Pétersbourg en Russie. *Erinaceus europaeus* est présent dans les grandes îles méditerranéennes (Sardaigne, Sicile, Corse) mais est absent des Baléares. Il est présent dans la majorité des îles de la côte atlantique française. *Erinaceus europaeus* n'est pas présent en Islande (Jourde, Lenartowski 2020; MNHN & OFB [Ed] 2003-2022). Une carte de sa répartition en Europe est présentée en Figure 2.

Le Hérisson d'Europe est donc présent dans la totalité de la France métropolitaine, pour des altitudes inférieures à 1500-2000 mètres (mais avec des observations plus fréquentes en dessous de 600 mètres), et est absent des zones de haute montagne.

Concernant les autres espèces de hérissons présentes en Europe, le Hérisson oriental (*Erinaceus roumanicus*) occupe tout le reste de l'Europe centrale (son aire de répartition superpose celle du Hérisson d'Europe en Autriche et en République Tchèque) et s'étend vers la Russie, et le Hérisson d'Algérie (*Atelerix algirus*) n'est présent que sur la côte Est de l'Espagne, pour ce qui concerne sa présence européenne (il est par ailleurs présent en Afrique du Nord également) (Jourde, Lenartowski 2020; MNHN & OFB [Ed] 2003).

## Distribution Map

*Erinaceus europaeus*

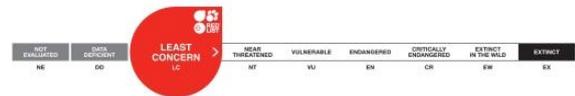


### Legend

- EXTANT (RESIDENT)
- EXTANT & INTRODUCED (RESIDENT)

Compiled by:

IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2008



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply any official endorsement, acceptance or opinion by IUCN.

Figure 2: Carte de répartition du Hérisson d'Europe (*Erinaceus europaeus*) en Europe (IUCN 2016)

## C. Déclin des populations

### 1. Statut au sein de la Liste Rouge de l'IUCN

Le Hérisson d'Europe est classé au sein de la liste rouge des espèces menacées de l'IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) depuis 1996 dans la catégorie « LR/LC » (*Least Concern*). Ce statut est valable tant au niveau national que régional, dans l'intégralité de la France métropolitaine (UICN France et al. 2017). La liste rouge de l'IUCN (*Red List*) est une base de données en ligne, inventaire réalisé à l'échelle mondiale et nationale, permettant de donner un état des lieux de la conservation des espèces animales et végétales, en répartissant celles-ci en neuf catégories, présentées en Figure 3 (UICN 2012) :

- Eteint (EX)
- Eteint à l'état sauvage (EW)
- En danger critique (CR)
- En danger (EN)
- Vulnérable (VU)
- Quasi Menacé (NT)
- Préoccupation mineure (LC)
- Données insuffisantes (DD)
- Non évalué (NE)

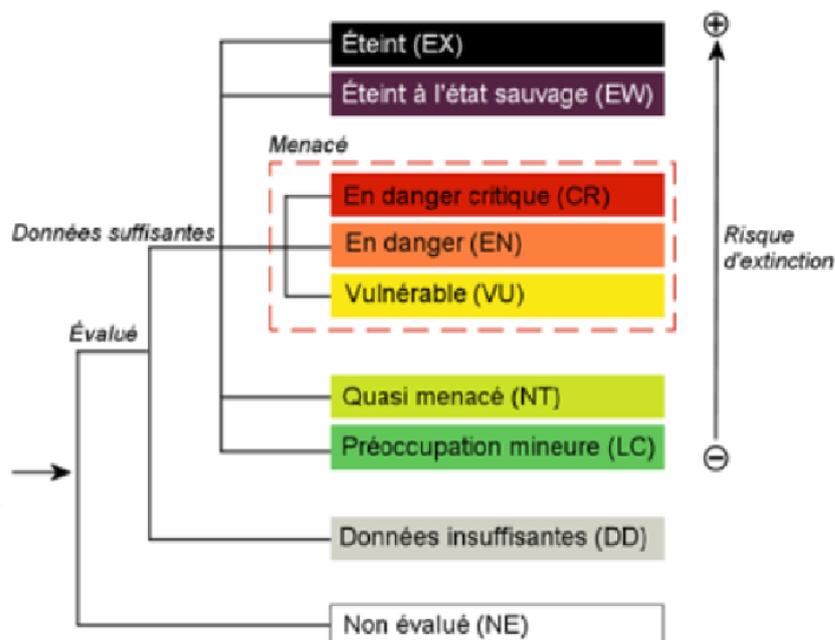


Figure 3 : Catégories de la classification de la liste rouge de l'IUCN (UICN 2012)

Les espèces considérées comme « menacées » sont celles des catégories CR, EN et VU. Les critères utilisés permettant de classer un taxon dans l'une ou l'autre des catégories comprennent : le déclin évalué de la population, la répartition géographique du taxon, la taille de la population associée au nombre d'individus matures en son sein et plus ou moins un déclin ou une réduction de l'aire d'occupation, et enfin une évaluation de la probabilité d'extinction du taxon dans la nature.

Cette liste est un outil permettant d'alerter sur l'état des populations de certaines espèces et dont l'un des objectifs est également d'argumenter en faveur de la mise en place de mesures de protection. Elle étudie et réévalue régulièrement les risques spécifiques que courent les espèces menacées et diffuse publiquement ces informations par la suite.

Les populations de Hérissons d'Europe sont considérées comme stables, et bien qu'inscrite dans la catégorie des espèces menacées, la préoccupation pour cette espèce est faible, selon la Liste Rouge de l'IUCN, tant au niveau mondial qu'à l'échelle de la France. L'espèce ne présente donc pas un risque d'extinction particulier pour le moment, ce qui ne signifie pas que le risque d'extinction est inexistant, mais que la probabilité de sa survenue prochaine est faible. Au Royaume-Uni, l'espèce est classée dans la catégorie vulnérable (Mathews et al. 2018).

## **2. Déclin des populations**

Les populations de Hérissons semblent néanmoins en diminution plus ou moins marquée dans plusieurs pays européens, surtout dans les zones rurales. Le Hérisson d'Europe a été classé en 2007 parmi les UK BAP Priority Species and Habitats (UK BAP = *United Kingdom Biodiversity Action Plan*), c'est-à-dire parmi les espèces identifiées comme menacées et nécessitant des actions de conservation, dans le cadre du plan UK BAP, créé suite à la signature de la Convention sur la Diversité Biologique, signée par le Royaume-Uni lors de conférence de Rio de Janeiro de 1992. Un déclin modéré a en effet été mis en évidence au Royaume-Uni, entre les périodes 1960-1975 et 2000-2015 (Hof, Bright 2016), avec une diminution de 5 à 7,4% des mailles occupées sur le territoire, ou à travers les travaux menés par

le BTO (*British Trust for Ornithology*) composés de six programmes de récolte de données, mettant en évidence pour la plupart cette même tendance de diminution des populations de hérissons (Roos, Johnston, Noble 2012). Cette diminution s'observe dans plusieurs autres pays européens, tels que la Belgique, la Suisse ou les Pays-Bas.

Cependant, les zones urbaines, qui semblaient jusque-là apparaître comme des « refuges » pour les populations de hérissons ne sont pas épargnées par ce déclin. Une étude réalisée au niveau de la ville de Zurich en comparant les données de deux études (la première en 1992, la deuxième entre 2016 et 2018), a permis de mettre en évidence une diminution d'abondance et de densité des populations de Hérissons d'Europe dans la quasi-totalité de l'aire urbaine de Zurich. Une combinaison de plusieurs facteurs est avancée pour expliquer un tel déclin, incluant une diminution et une détérioration de l'habitat (diminution des espaces verts en ville, jardins entretenus ne laissant pas la possibilité d'un environnement adapté pour le Hérisson, incluant la possibilité de faire un abri par exemple, intensification du trafic routier, modification des températures), une diminution de la biomasse des insectes (constitutifs du régime alimentaire du Hérisson) par l'usage de pesticides ou la diminution de leur propre habitat, la prédation par les animaux domestiques, le rapprochement du Blaireau (prédateur du Hérisson) des villes, l'augmentation de la pression parasitaire, etc. (Taucher et al. 2020). Tous ces facteurs peuvent s'appliquer dans d'autres villes et une diminution globale des populations de Hérissons d'Europe peut donc être suspectée, à la fois dans les zones rurales et urbaines. Par ailleurs, le Hérisson, est une espèce commune, largement répandue, mobile, généraliste, se nourrissant de macro-invertébrés, à l'instar de beaucoup d'autres taxons présents sur les mêmes zones de répartition. A ce titre, le Hérisson d'Europe peut donc presque être considéré comme une espèce « (bio-)indicatrice » (Hof, Bright 2016). Une « espèce-indicatrice » est une espèce qui témoigne de la bonne santé d'un écosystème. Ces espèces, très sensibles aux modifications de leur écosystème, sont les premières à répondre à une dégradation de celui-ci (par exemple par un déclin de leurs populations) (Saltz 2001), ce qui n'est pas forcément prouvé néanmoins pour le Hérisson d'Europe car des espèces, notamment moins mobiles et ubiquistes peuvent être affectées de façon plus sévère et précoce. Le déclin des populations de Hérisson d'Europe est cependant un indicateur de la

dégradation générale de l'environnement et peut avoir des implications dans la gestion de celui-ci.

## **D. Statut juridique**

### **1. Niveau européen**

Le Hérisson d'Europe est inscrit sur l'Annexe III de la convention de Bern (1979) (Conseil de l'Europe 1979). L'objectif de cette convention est d'assurer la protection et la conservation de la flore et la faune sauvage ainsi que de leurs habitats naturels et d'encourager la coopération entre les Etats signataires dans cet objectif, avec une attention particulière pour les espèces menacées d'extinction et vulnérables. En vertu de son appartenance à l'Annexe III, le Hérisson d'Europe bénéficie d'une attention particulière, portée au maintien hors de danger de ses populations, ce qui comprend une réglementation stricte de son exploitation, ou encore l'interdiction d'usage de « moyens non sélectifs de capture et de mise à mort et des moyens susceptibles d'entraîner localement la disparition, ou de troubler gravement la tranquillité des populations [de l'] espèce » (Conseil de l'Europe 1979).

### **2. Niveau national**

En France, le Hérisson d'Europe est protégé au titre de l'article L411-1 du code de l'environnement (*Article L411-1 - Code de l'environnement - Légifrance 2016*) et apparaît dans l'arrêté du 23 Avril 2007 fixant la « liste des mammifères terrestres protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection » et abrogeant l'arrêté du 17 avril 1981 fixant la liste des mammifères protégés sur l'ensemble du territoire français. Ainsi, selon l'article 2 de l'arrêté du 23 Avril 2007 (modifié le 17 Mars 2019), cela entraîne « sur tout le territoire français et en tout temps [l'interdiction de] la destruction, la mutilation, la capture ou l'enlèvement, la perturbation intentionnelle des animaux dans le milieu naturel », mais aussi « sur les parties du territoire métropolitain où l'espèce est présente, ainsi que dans l'aire de déplacement naturel des noyaux de populations existants, [l'interdiction de] la destruction, l'altération ou la dégradation des sites de reproduction et des aires de

repos des animaux », ce dernier point s'appliquant à « tout élément physique ou biologique réputé nécessaire à la reproduction ou au repos de l'espèce considérée », si leur destruction, altération ou dégradation remet en cause le bon accomplissement des cycles biologiques de l'espèce. Cet arrêté interdit également « sur tout le territoire national et en tout temps la détention, le transport, la naturalisation, le colportage, la mise en vente, la vente ou l'achat, l'utilisation commerciale ou non, des spécimens de mammifères prélevés ».(*Arrêté du 23 avril 2007 fixant la liste des mammifères terrestres protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection - Légifrance 2019*). L'article L411-1 précise que les interdictions s'appliquent aux individus vivants mais également morts.

La violation de l'article L411-1 est un délit, dont les sanctions peuvent aller jusqu'à trois ans d'emprisonnement et 150 000€ d'amende (*Article L415-3 - Code de l'environnement - Légifrance 2019*).

## **E. Habitat**

Le Hérisson est une espèce ubiquiste, c'est-à-dire qu'elle est retrouvée dans des milieux très variés, et donc qu'elle dispose d'une grande plasticité de ses exigences écologiques, tant que certains critères sont vérifiés, ce qui lui permet de coloniser ces différents milieux. La présence de proies (et donc de conditions d'humidité/de température favorables au développement de celles-ci), de matériaux pour construire un nid, l'absence de prédateurs sont quelques-uns de ces critères. Certains milieux cependant sont favorisés et des études sur l'habitat du Hérisson ont été réalisées, majoritairement dans les pays du Nord de l'Europe, ce qui a permis de mettre en évidence certains points communs. Le Hérisson semble présenter une attirance pour les milieux ouverts, notamment car ils facilitent la chasse et que les proies y sont abondantes (Jourde, Lenartowski 2020), avec par exemple les prairies mais également les jardins, les terrains de sports, de golfs, etc. La présence de structures paysagères verticales comme par exemple les haies est en revanche essentielle dans ces milieux ouverts.

Des travaux utilisant la radiodétection en vue de suivre les mouvements des hérissons sur au moins dix nuits pour étudier leur sélection d'habitat et leur activité

au sein des différents types d'habitat ont été réalisés par Hof et Bright (Hof, Bright 2010) sur la côte Nord du Norfolk, au Royaume-Uni et ont permis de mettre en évidence que les haies et les bordures de champs cultivés étaient largement sélectionnées par les hérissons.

Le domaine vital (défini en 1943 par W. Burt comme étant la zone spatiale restreinte régulièrement utilisée par un individu dans la réalisation de ses activités habituelles, telles que la chasse, le nourrissage, le repos, la reproduction, les soins aux jeunes, etc. (Burt 1943)) évolue dans le temps pour un hérisson et peut se superposer à celui d'un congénère. Par ailleurs, le Hérisson ne défend pas de territoire en particulier et ne présente pas de comportement de marquage (Jourde, Lenartowski 2020).

Dans l'étude de Hof et Bright de 2010, il est également mis en évidence que le comportement des hérissons est différent en fonction de l'habitat où ils se trouvent. Le repos constituait la principale activité dans les haies et les bois, alors que dans tous les autres types d'habitat (champs et bordures, prairies, pâturages, terres en jachère, villages), la recherche de nourriture constituait l'activité principale. Les haies constituent en effet un lieu de refuge vis-à-vis de la prédation, tout en étant également adaptées à la chasse ou à l'élevage des jeunes, d'où sa large sélection, et l'absence de celles-ci constitue un obstacle majeur aux mouvements des hérissons.

La prédation influe sur la répartition du Hérisson d'Europe, et celui-ci a donc tendance à choisir des habitats refuges, comme les haies. Au Royaume-Uni, où la densité de Blaireaux européens (*Meles meles*) est nettement plus élevée qu'en France, la densité de hérissons varie en relation directe avec la densité de blaireaux (Young et al. 2006). Hof et al. ont montré que lors de la présence de blaireaux, les hérissons s'éloignaient en moyenne moins des haies, des bordures de champs et des lisières de forêts (Hof, Snellenberg, Bright 2012), alors qu'en parallèle la disponibilité alimentaire ne variait pas par rapport à des zones où les hérissons s'éloignaient plus de ces refuges. Mais cette relation entre les deux espèces semble plus complexe et inclut, en plus des phénomènes de prédation, des phénomènes de compétition (le Blaireau européen se nourrissant également par exemple de macro-invertébrés, à l'instar du Hérisson d'Europe), ou des stratégies d'évitement (Williams et al. 2018). En Europe continentale cependant, et notamment en France, la densité

de blaireaux est bien moindre qu'au Royaume Uni, et les effets de la prédation du Blaireau sur le Hérisson n'y ont pas encore été pleinement étudiés.

Une étude menée dans le Nord-Est de la France au niveau de la ville de Sedan et ses alentours, a montré que la densité de hérissons était bien plus élevée en zone urbaine qu'en zone rurale (Hubert et al. 2011). Ce fait avait déjà été constaté auparavant, et l'étude visait à essayer de comprendre les effets de la présence de nourriture naturelle et anthropogénique et de l'impact de la prédation par le Blaireau sur les densités de hérissons en zone urbaine et rurale. Les fortes densités observées en ville n'étaient pas associées dans cette étude à une faible présence de prédateurs naturels et les ressources alimentaires importantes ne semblent pas non plus pouvoir les expliquer seules. Une combinaison de plusieurs facteurs expliquerait que les zones urbaines soient plus densément peuplées. La présence de nourriture d'origine anthropogénique, mais également un nombre moins élevé de morts suite à un choc avec une voiture et des conditions de températures plus favorables (températures en ville en moyenne plus élevées que dans les campagnes alentours) ont été avancées comme variables explicatives. Une température plus douce induit en effet un coût énergétique plus faible pour les hérissons et des durées d'hibernation (moment critique) plus courtes, et donc de meilleures chances de survie, notamment durant l'hiver.

Le Hérisson est un animal crépusculaire et nocturne. Les individus observés le jour sont en général soit des individus en détresse (malades, en manque de nourriture), soit des individus dérangés pendant leur repos diurne. Ainsi, pendant sa période d'activité (période hors hibernation), le Hérisson se dissimule le jour dans des abris que l'on qualifie de nids car généralement constitués de végétaux mais pouvant également être des anfractuosités rocheuses, des trous sous des branches, des souches ou des bûches, des terriers, ou autres abris naturels. Les femelles y protègent également leurs petits. Lorsque le nid est constitué de végétaux, le Hérisson ramène des matériaux, les dispose en tas et tourne sur lui-même afin de former une « chambre ». Ce nid est difficilement détectable et peut être réutilisé, éventuellement par des individus différents (Jourde, Lenartowski 2020).

## F. Prédation

Si le Hérisson peut constituer une proie pour des espèces comme le Renard roux (*Vulpes vulpes*), la Chouette hulotte (*Strix aluco*), la Fouine (*Martes foina*), le Sanglier d'Europe (*Sus scrofa*), ou encore des espèces domestiques comme le Chien et le Chat, la plupart sont efficacement repoussés par les épines de l'animal, mode de défense principal du Hérisson. Seules deux espèces parviennent à retourner l'animal sur le dos et à lui ouvrir le ventre grâce à leurs serres ou griffes, et sont donc en mesure de chasser et consommer régulièrement le Hérisson d'Europe : le Blaireau européen (*Meles meles*) et le Grand-duc d'Europe (*Bubo bubo*). Dans le Nord de l'Europe, le Grand-duc d'Europe étant assez rare, le Blaireau européen peut être considéré comme le principal prédateur du Hérisson (Hubert et al. 2011).

## G. Comportement et régime alimentaires

Pour chasser, le Hérisson se déplace lentement et explore son environnement de sa truffe. Les proies sont à priori repérées essentiellement à l'odeur, bien que le bruit puisse intervenir également. Le Hérisson hume donc énormément son environnement et renifle bruyamment (Jourde, Lenartowski 2020). Le Hérisson attrape majoritairement des proies vivantes proches du sol et peu rapides (Yalden 1976).

Le Hérisson d'Europe présente des habitudes majoritairement insectivores, mais est également opportuniste sur d'autres types de nourritures.

Par étude des contenus stomacaux de 177 hérissons provenant d'Angleterre, Yalden a déterminé en 1976 que les proies principales des hérissons étaient des invertébrés (Yalden 1976). La Figure 4 a été réalisée à partir des résultats de cette étude. Les coléoptères arrivent en général en premier dans la liste des proies consommées et l'étude de Yalden a montré que deux grandes familles représentaient cet ordre dans les contenus des estomacs non vides : les *Carabidae* et les *Scarabeoidea*. Viennent ensuite dans l'ordre les *Dermaptera*, les larves d'insectes du genre *Lepidoptera* (papillons), les *Diplopoda*, les *Lumbricidae* et les mollusques, dont les limaces. Les autres catégories de proies sont représentées dans moins de 20% des cas et on

compte parmi celles-ci les *Opiliones* (ordre d'arachnides), les *Araneida* (ordre comprenant toutes les araignées modernes), les *Hymenoptera*, les *Diptera* sous forme de larves et d'imagos, etc. (Yalden 1976).

Dans deux études, les restes de vertébrés ne sont pas couramment rencontrés, bien que relevés malgré tout, avec des restes de mammifères, d'oiseaux et d'œufs (ceci pouvant malgré tout être dû à la technique de capture des individus, appâtés avec ces catégories de restes). Le comportement de prédation vis-à-vis de ce type de proies n'est pas formellement identifié, et il pourrait également s'agir d'un comportement charognard de la part du Hérisson. Enfin, des restes végétaux sont également retrouvés dans le contenu intestinal des individus, bien que ceux-ci ne constituent pas une part de leur régime alimentaire et qu'ils soient plutôt avalés de façon accidentelle, lors de l'ingestion de proies (Yalden 1976; Jones, Moss, Sanders 2005).

Le Hérisson peut tirer profit de la nourriture d'origine anthropogénique, que ce soit les déchets laissés dans la nature ou l'alimentation des animaux domestiques, parfois laissée à dessein pour les hérissons eux-mêmes. Cependant, il a été montré qu'il utilisait cet apport en complément de sa chasse, et non comme source principale de nourriture, lors de conditions optimales pour la recherche naturelle.

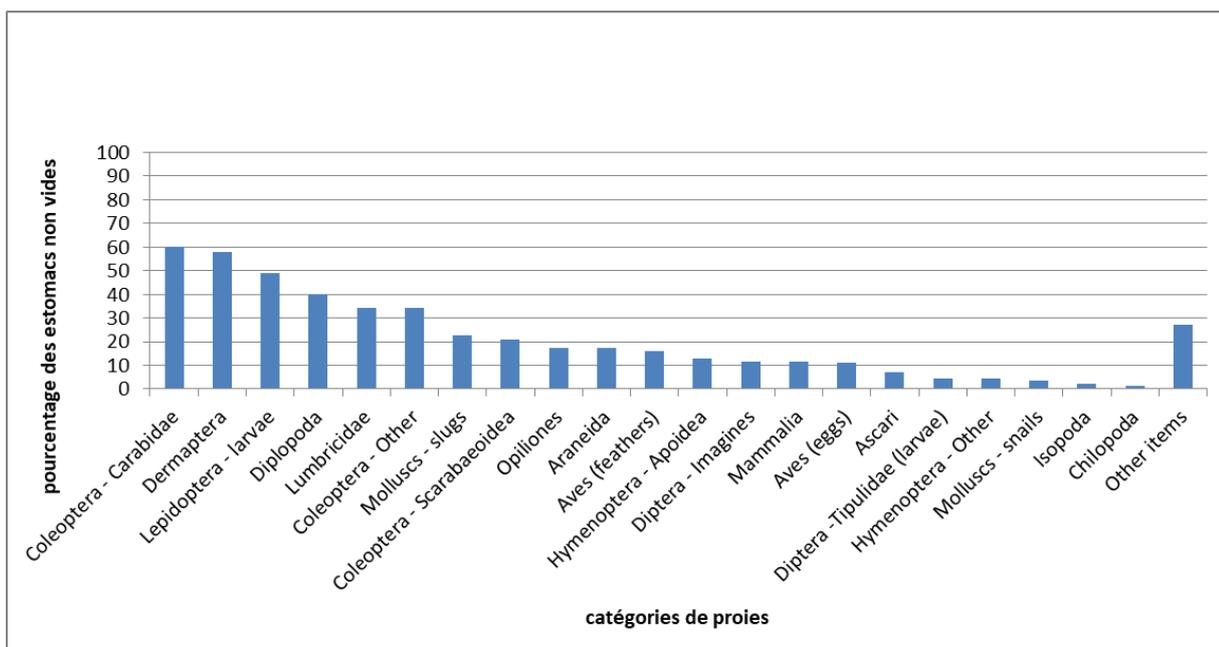


Figure 4 : Pourcentages des estomacs non vides contenant les différentes catégories de proies (d'après Yalden, 1976)

Le régime alimentaire du Hérisson varie au cours de sa vie. En vieillissant, les individus mangent des proies en moyenne plus grosses et plus massives, telles que des mollusques, larves, carabes et moins de petites proies telles que des arachnides et dermoptères. Les individus plus âgés ont également tendance à réduire leur spectre de proies. Certaines proies non ou peu consommées par les individus âgés sont acceptées par les jeunes, probablement faute de mieux et par méconnaissance. Contrairement à d'autres espèces présentant des variations de spectre alimentaire au cours de leur vie, les changements chez le Hérisson d'Europe ne sont à priori pas corrélés à sa taille et son poids, mais seraient plutôt imputables à l'amélioration des techniques de chasse de ce dernier au cours de sa vie (Dickman 1988).

## **H. Particularités anatomiques**

Nous ne détaillerons pas l'intégralité de l'anatomie du Hérisson d'Europe dans cette étude. Nous évoquerons quelques particularités et nous attarderons davantage sur les appareils respiratoire et digestif, cibles principales des virus étudiés dans la suite.

### **1. Description générale**

Le Hérisson est un mammifère présentant un corps massif court et arrondi avec un cou peu marqué. Il s'agit d'un plantigrade, mesurant de 18 à 31 cm de long (plus une queue de 18 à 44 mm) et pesant de 260 à 1375 g. Il a la particularité principale de présenter un manteau de piquants recouvrant tout le dos, les flancs et le front. Les pattes sont courtes, le museau pointu et terminé en groin, des oreilles ne dépassant pas des piquants (Aulagnier et al. 2020).

### **2. Squelette**

Le squelette des hérissons ne présente pas de caractéristique notable parmi les mammifères, si ce n'est que la colonne vertébrale est plutôt voûtée et que le cou est relativement court, le tout facilitant par ailleurs certainement la mise en boule.

### 3. Peau et piquants

Les piquants sont en fait des poils modifiés, donc constitués de kératine et creux. Ils recouvrent le dos, les flancs et le haut du crâne, zones où le hérisson ne présente pas de fourrure isolante. Les piquants mesurent 22 mm de long en moyenne, 1.5 mm de diamètre, sont de couleur brun clair avec une bande sombre plutôt du côté de l'extrémité. Un hérisson adulte en possède entre 5000 et 7000 (Figure 5).

Les piquants sont solidement fixés dans la chair de l'animal par une sorte de bulbe à la base du piquant et la pointe externe est acérée. Au repos, les piquants sont tous dans le même sens, aplatis contre le corps mais en cas de danger et grâce à l'action de muscles striés, ils peuvent s'ériger en tous sens et leur pointe acérée s'enfonce facilement dans la peau d'un prédateur insistant, offrant une certaine dissuasion. Si le danger persiste le hérisson peut se mettre en boule (processus détaillé dans le paragraphe suivant (I.H.4)).

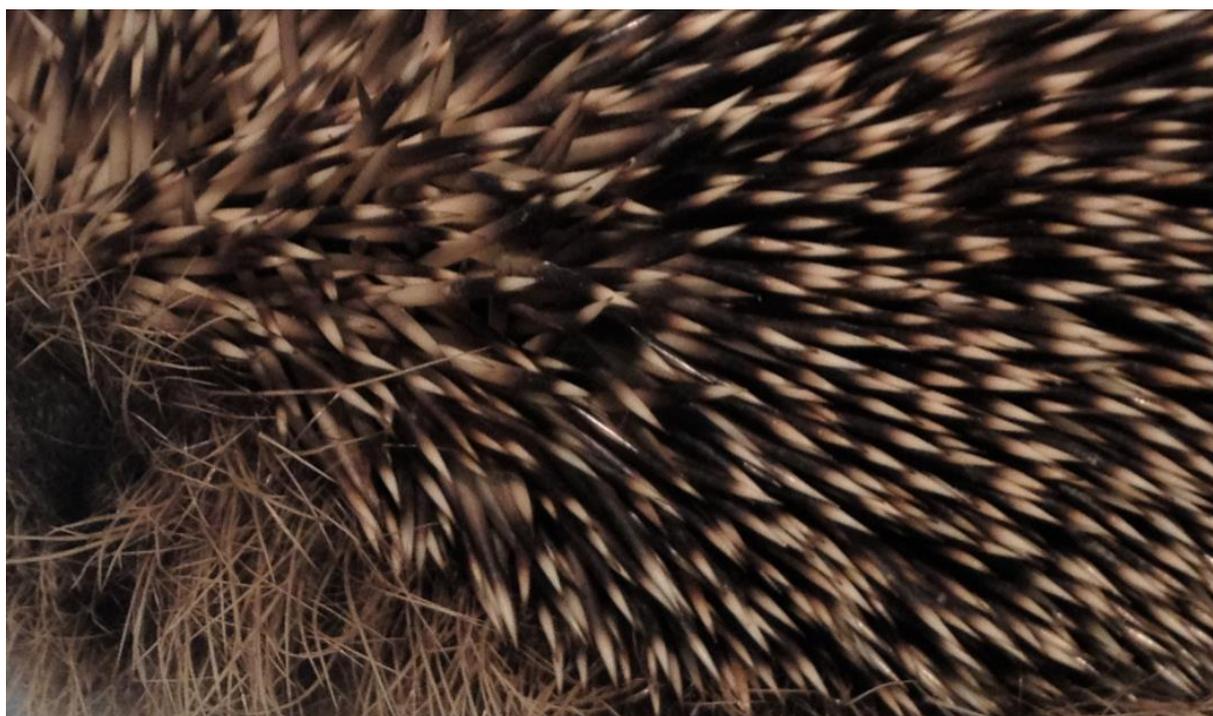


Figure 5 : Photographie des piquants d'un Hérisson d'Europe (photographie personnelle)

Les piquants jouent donc un rôle important dans la défense de l'animal mais peuvent également servir à absorber efficacement les chocs, par exemple lors d'une chute.

La face et les parties inférieures du corps sont recouvertes d'un pelage brun plus ou moins foncé (avec quelques zones brun jaune plus ou moins étendues mais le centre de la poitrine est toujours brun-foncé), lâche, raide et rêche, avec des poils plus longs au niveau des flancs, à la jonction avec les piquants (Jourde, Lenartowski 2020).

#### 4. Mise en boule

La mise en boule constitue le principal moyen de défense du Hérisson. Celle-ci est extrêmement rapide et rendue possible par l'action combinée de plusieurs muscles, présentés en Figure 6 : les muscles *panniculus carnosus*, *orbicularis*, *frontodorsalis* et *caudodorsalis*. La partie dorsale est alors rabattue vers l'avant, l'arrière et les flancs, la tête, les pattes et la queue sont dissimulés sous le manteau épineux et le muscle orbiculaire (*orbicularis*), en se contractant, permet de maintenir la position pendant un temps assez long sans que le hérisson ne ressente beaucoup de fatigue. Seul le nez dépasse du manteau épineux, afin que le hérisson puisse respirer. Si le hérisson est touché au niveau d'une zone précise, les muscles peauciers peuvent localement augmenter la densité de piquants en se contractant (Jourde, Lenartowski 2020; Morris et al. 1998). Une photographie d'un hérisson en position est présentée en Figure 7.

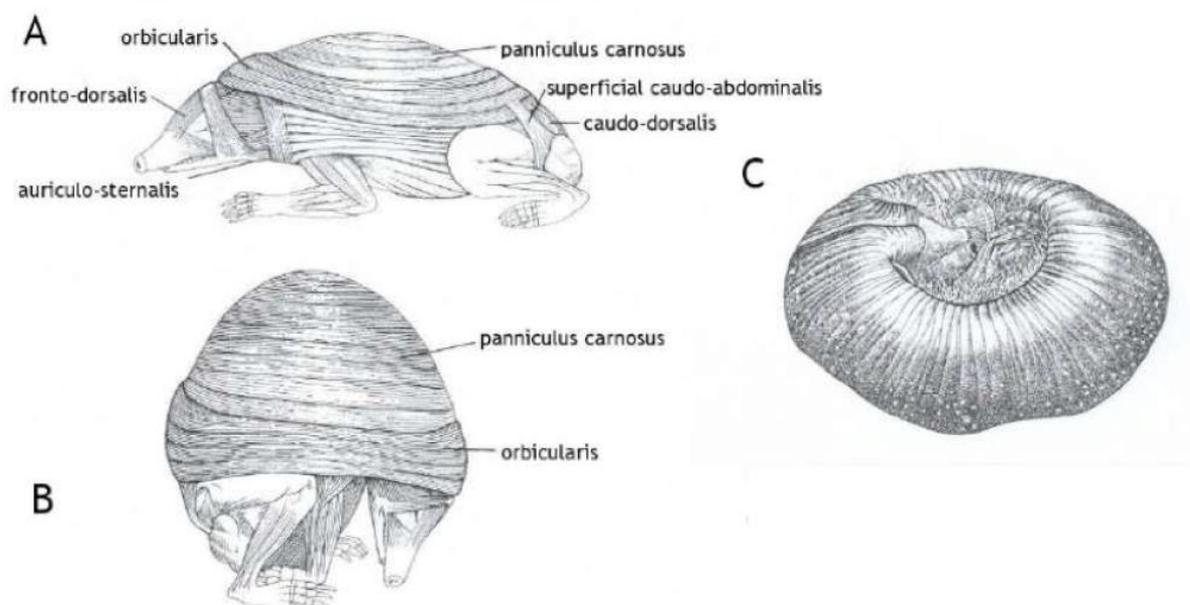


Figure 6: A : Description des muscles du hérisson intervenant lors de la mise en boule, B et C : Représentation d'un hérisson en boule (d'après Reeve, Lindsay 1994)



Figure 7 : Photographie d'un hérisson roulé en boule (photographie personnelle)

## 5. Dimorphisme sexuel

Le sexage peut se réaliser à tout âge et nécessite simplement d'observer l'abdomen de l'animal. Le mâle possède un pénis externe très en avant, à peu près au milieu de l'abdomen. La femelle présente en revanche une vulve très proche de l'anus. La Figure 8 illustre ce dimorphisme sexuel chez le Hérisson d'Europe.

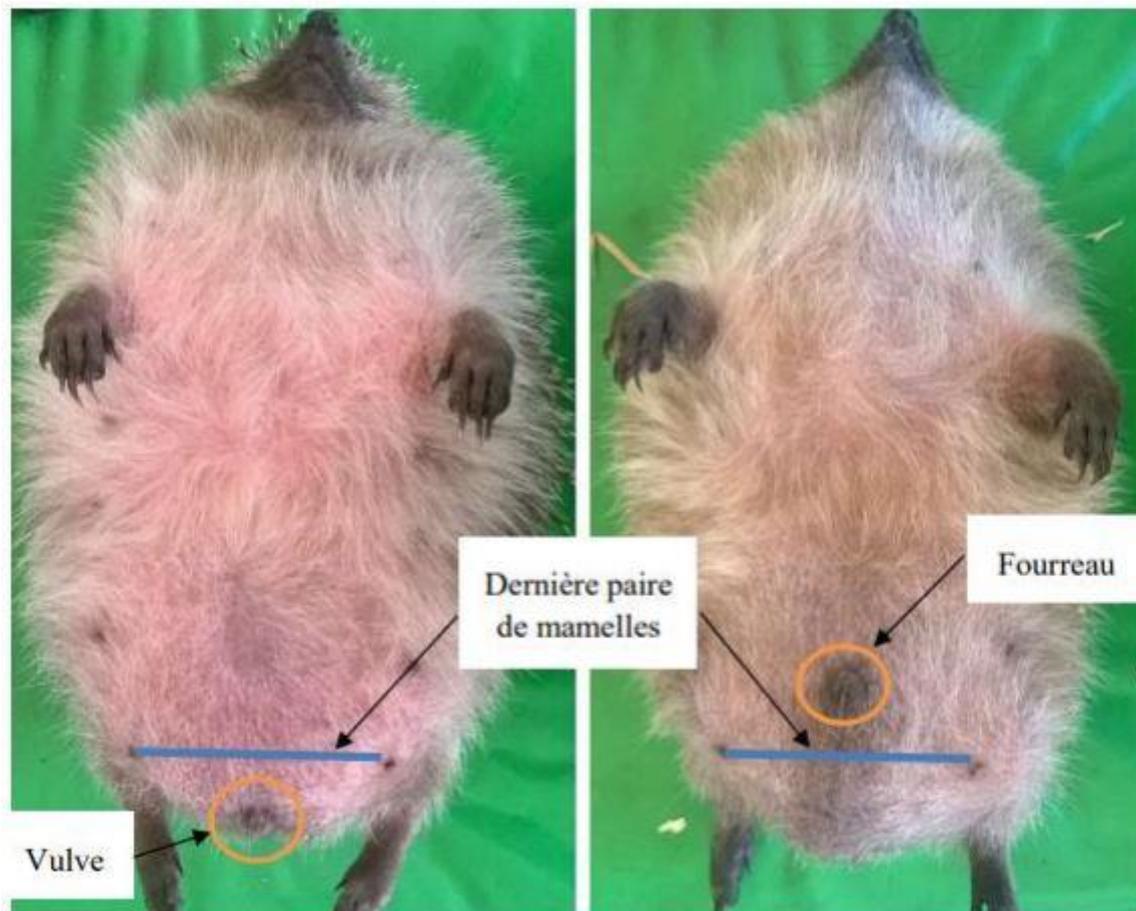


Figure 8 : Illustration du dimorphisme sexuel chez le Hérisson d'Europe (*la femelle est à gauche et le mâle à droite*) (Denaes 2019)

## I. Fonction respiratoire chez le Hérisson d'Europe

### 1. Anatomie pulmonaire

Les poumons du Hérisson d'Europe sont semblables à ceux du Hérisson oriental (*Erinaceus concolor*). Ils se situent dans la cage thoracique et sont divisés en quatre lobes à droite (crânial, moyen, caudal et accessoire) et un unique lobe à gauche. Le reste de l'anatomie respiratoire du Hérisson ne présente pas de particularité notable et est donc constitué des voies aériennes supérieures (nez/groin, cavités nasales), des voies aérophores (larynx, trachée, bronches), des poumons, de la cavité

thoracique et des plèvres. Une photographie des viscères thoraciques d'un Hérisson d'Europe est présentée en Figure 9.

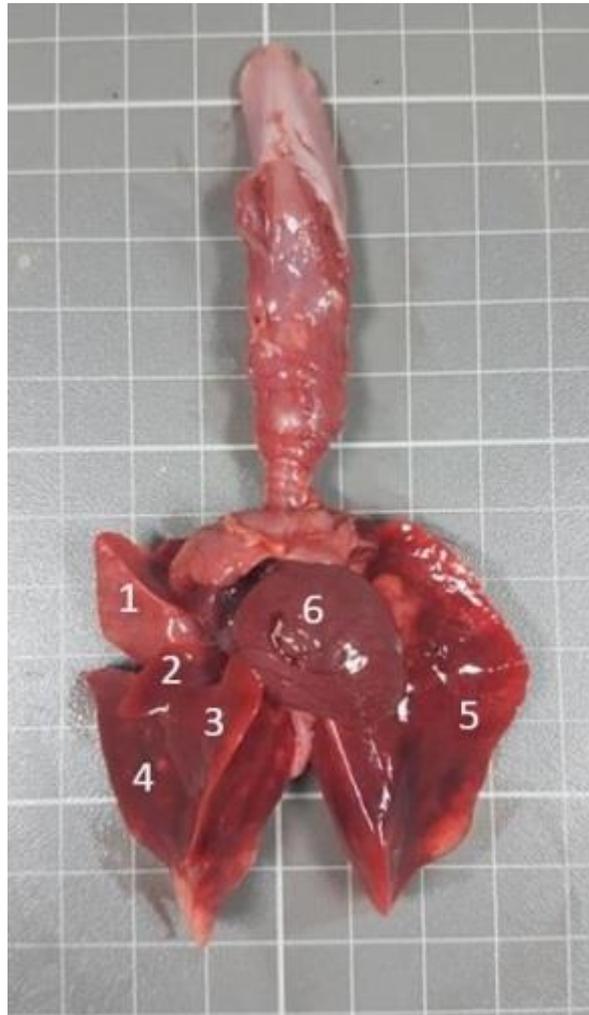


Figure 9: Photographie d'une dissection réalisée à l'ENVT présentant les viscères thoraciques du Hérisson d'Europe (*E. europaeus*). 1 : lobe crânial droit, 2 : lobe moyen droit, 3 : lobe accessoire droit, 4 : lobe caudal droit, 5 lobe gauche, 6 : cœur (tiré de (Muret 2020))

## 2. Physiologie de la respiration

La physiologie de la respiration du Hérisson d'Europe ne comporte pas de caractéristique particulière par rapport à d'autres mammifères.

La fréquence respiratoire normale d'un hérisson en bonne santé, au repos et hors hibernation est usuellement autour de 25 mouvements par minute mais peut augmenter jusqu'à 50 mouvements par minute en cas d'effort ou de stress et diminue à 13 respirations par minute ou moins lors de l'hibernation. La respiration est

silencieuse, sauf en cas d'expulsion forcée de l'air lors d'une manifestation de peur ou d'agressivité (Reeve, Lindsay 1994; Johnson 2011).

## **J. Fonction digestive du Hérisson d'Europe**

L'anatomie de l'appareil digestif du Hérisson est similaire à celle des autres mammifères et est donc constituée de la cavité buccale, puis l'œsophage, l'estomac (avec un cardia, une muqueuse cardiaque, une muqueuse fundique, une muqueuse pylorique et enfin un pylore), l'intestin grêle, le colon et se finit au niveau de l'anus. Le Hérisson ne possède pas de caecum.

Ce tube digestif est long d'environ 1.5 m chez l'individu adulte. La digestion est assez rapide chez le Hérisson et une durée inférieure à 24 h suffit pour que la totalité du bol alimentaire ait transitée dans tout le tube digestif et soit évacuée dans les fèces.

## **K. Hibernation**

### **1. Généralités**

L'hibernation est une stratégie évolutive permettant de résister à un climat défavorable et à la raréfaction de proies concomitantes. Après avoir réalisé suffisamment de réserves énergétiques durant la phase active, l'animal entre dans une phase de torpeur, durant laquelle les fonctions vitales fonctionnent au ralenti, ce qui permet une baisse drastique de la consommation énergétique par l'organisme. Cette baisse de la consommation a notamment été mise en évidence en Nouvelle-Zélande par Webb et Ellison, qui, en se basant sur les estimations de la consommation en oxygène en fonction de la masse entre un animal en état de torpeur et un éveillé, ont modélisé le temps nécessaire pour épuiser les dépôts de graisse dans les deux situations. Alors que les hérissons actifs épuisent leur réserve énergétique en 15 à 16 h, les individus en hibernation peuvent eux survivre et ne se réveiller qu'après 100 jours (Webb, Ellison 1998). L'hibernation ne constitue pas un

impératif vital. En effet, des hérissons maintenus à des températures supérieures à 10°C, avec de la nourriture à disposition n'entrent pas en léthargie.

L'entrée en hibernation est conditionnée par plusieurs paramètres, comme la baisse des températures (notamment une température inférieure à 8°C et maintenue), la diminution de la disponibilité alimentaire et de la durée de la photopériode. Mais des facteurs liés à l'individu tels que l'état de santé, son sexe ou encore l'accumulation des réserves entrent également en compte (Reeve, Lindsay 1994; Mullineaux, Keeble 2016)

La période et la durée d'hibernation ne sont donc pas définies. En effet, étant conditionnée par des facteurs tels que la température ou la photopériode, l'entrée et la sortie d'hibernation varient selon les conditions environnementales, la latitude, la température moyenne.

L'hibernation est précédée d'une période de constitution des réserves nécessaire. Le hérisson construit un abri (hibernaculum) dans lequel il va réaliser cette phase de léthargie, souvent constitué d'une accumulation de feuilles mortes au centre de duquel il va venir tourner sur lui-même afin de constituer une sorte de « chambre ». Enfin, l'hibernation n'est pas une longue période de sommeil ininterrompue mais est plutôt entrecoupée de phases plus ou moins régulières de réveil, phases pendant lesquelles le Hérisson est plus ou moins actif et peut changer d'abri.

## **2. Dépression du système immunitaire**

L'hibernation est une période à risque concernant la fonction immunitaire. Un déclin important des compétences immunitaires est en effet observé durant la phase de torpeur. Des expériences ont été menées sur le Hamster doré et ont montré une diminution du nombre de leucocytes circulants lors d'une baisse de température corporelle spontanée ou forcée. Ces taux ré-augmentent rapidement lors du réveil et du retour à une température normale. Cette leucopénie observée est la conséquence d'une diminution du nombre de lymphocytes circulants, de neutrophiles et de monocytes (Bouma, Carey, Kroese 2010; Bouma et al. 2013).

Certaines réactions immunitaires pourraient se trouver décalées par la torpeur. Par exemple, des expériences d'injection de LPS (lipopolysaccharide) dans la cavité péritonéale de spermophiles à manteau doré n'ont pas induit de réponse fébrile, tant que les animaux restaient en phase de torpeur. Cependant, pendant la phase d'éveil la réponse fébrile est présente et l'éveil est prolongé (Prendergast et al. 2002).

## L. Étiologies des affections respiratoires

### 1. Causes parasitaires

Les infestations respiratoires parasitaires sont très communes chez le Hérisson d'Europe. Les parasites les plus souvent détectés sont des nématodes, en particulier *Crenosoma striatum* et *Capillaria aerophila* (Johnson 2011).

Les capillaires se logent dans les muqueuses trachéales et bronchiques ; plus rarement au niveau des cavités nasales et des sinus. Le cycle est direct, c'est-à-dire que l'infection se fait par ingestion d'œufs ou d'un hôte paraténique abritant des œufs (comme le ver de terre). Une fois l'œuf ingéré, la larve éclot puis pénètre dans l'intestin et migre jusqu'aux poumons via la circulation sanguine, et atteint le stade adulte 40 jours après l'infection. Les œufs sont toussés par l'hôte vers le pharynx, puis ingérés et se retrouvent excrétés dans les fèces (Johnson 2011).

*Crenosoma striatum* se trouve dans la trachée et les bronches. Il présente un cycle indirect, c'est-à-dire que les hérissons vont s'infester par ingestion d'un hôte intermédiaire (contenant la larve de stade 3), comme les limaces et les escargots. Des larves sont produites trois semaines après l'infestation, toussées puis avalées au niveau du pharynx et vont se retrouver dans les fèces. Une suspicion d'infestation directe, éventuellement par voie transplacentaire existe, étant donné l'existence d'individus non sevrés infestés (Johnson 2011).

Les signes cliniques peuvent être légers à absents pour une infection légère mais dans le cas d'une infestation plus sévère, des signes plus graves peuvent être observés tels que des rhinites, trachéites, bronchites, bronchopneumonies, dyspnées, anorexies, pertes de poids. Par ailleurs ces infestations peuvent favoriser le développement d'une infection bactérienne secondaire (Johnson 2011).

Les taux d'infestation par ces parasites peuvent se révéler assez élevés, supérieurs à 50-60 % voire plus (Gaglio et al. 2010; Robinson, Routh 1999). Une large part de la population de Hérissons d'Europe sauvages est probablement porteuse de parasites respiratoires.

Au final, les infestations parasitaires peuvent entraîner une clinique préoccupante chez les individus infestés (voire une issue fatale) et favoriser des infections bactériennes secondaires, aggravant encore le tableau clinique. (Robinson, Routh 1999; Manzocchi, Venco, Di Cesare 2016; Mullineaux, Keeble 2016; Johnson 2011)

## 2. Causes bactériennes

Les causes bactériennes d'affections respiratoires incluent trois agents principaux : *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* et des *Corynebacterium*. Des écoulements nasaux, de la toux, une respiration non-eupnéique, des sifflements, des bruits respiratoires ou encore de l'épistaxis peuvent être relevés, ainsi que parfois des anomalies fécales, de l'anorexie et des pertes de poids. Parfois, ces infections conduisent à la mort de l'individu (Johnson 2011).

Les infections à *Bordetella bronchiseptica* sont souvent secondaires à d'autres infections respiratoires (notamment parasitaires). *Pasteurella multocida* serait une bactérie commensale, pouvant se multiplier de façon démesurée dans le cas d'un stress quelconque de l'animal (Robinson, Routh 1999; Manzocchi, Venco, Di Cesare 2016; Mullineaux, Keeble 2016; Johnson 2011).

Des cas d'infections à *Mycobacterium* (notamment *M. bovis*) ont également été rapportés chez des Hérissons d'Europe (Lugton, Johnstone, Morris 1995).

Les lésions engendrées par ces affections respiratoires (parasitaires ou bactériennes) peuvent être sévères (Majeed, Cooper 1984; Hoseini et al. 2014; Mariacher et al. 2021; Naem et al. 2014) et persister, même après traitement, entraînant des phénomènes de consolidation pulmonaire. Ainsi, même après guérison de l'affection parasitaire ou bactérienne, une certaine fragilité des voies respiratoires peut persister.

### 3. Causes virales

Les causes virales sont assez rares chez les hérissons, d'autant plus dans le cas des affections respiratoires. Citons malgré tout le virus de la fièvre aphteuse, pouvant affecter les hérissons et pouvant, en plus des lésions vésiculaires typiques de la maladie, provoquer des éternuements, ainsi qu'un paramyxovirus apparenté au virus de la maladie de Carré, entraînant des signes neurologiques, des ulcérations et hyperkératose des membres, des plaies sur le visage et des écoulements nasaux (Johnson 2011).

### 4. Divers

Les causes traumatiques ne doivent pas être oubliées dans l'étiologie des signes respiratoires, que celles-ci soient de la prédation, un choc avec un véhicule, une chute, etc.

Les affections cardiaques peuvent également engendrer des signes respiratoires, fait plus souvent observé chez les hérissons de compagnie, notamment *Atelerix albiventris*, de même pour les affections néoplasiques.

## II. Influenza D

### A. Introduction

Les virus influenza infectent chaque année énormément d'humains et d'animaux à travers le monde et sont régulièrement responsables de pandémies humaines (par exemple la grippe espagnole de 1918 à 1919, dont le virus responsable A(H1N1) a été responsable d'environ 50 millions de morts à travers le monde) et animales, avec dans certains cas des potentiels zoonotiques avérés. A titre d'exemple il peut être cité les épidémies régulières d'influenza aviaire, avec notamment la dernière en date sur le territoire français (2021-2022).

La Figure 10 illustre les spectres d'hôtes des quatre genres actuellement connus de virus influenza (Asha, Kumar 2019).

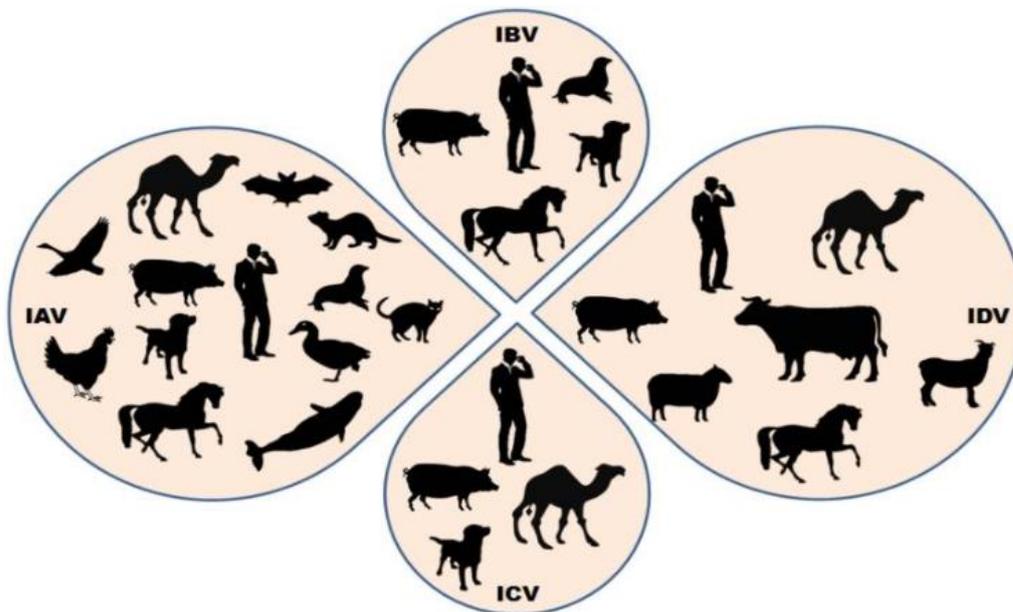


Figure 10 : Illustration des spectres d'hôtes des quatre genres connus à ce jour de virus influenza (Asha, Kumar 2019)

Le virus de l'influenza D (dont le nom officiel est *Deltainfluenzavirus influenzae*) a été isolé pour la première fois en 2011, dans l'état de l'Oklahoma, à partir d'écouillons nasaux de porcs de 15 semaines présentant des signes cliniques compatibles avec une infection par un virus influenza (Hause et al. 2013). Il a été nommé pour la première fois en 2016 (Yu, Li, Wang 2020).

## B. Classification

D'après l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), les virus influenza font partie de l'ordre des *Articulavirales*, famille des *Orthomyxoviridae*, laquelle comprend neuf genres : *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Mykissvirus*, *Quaranjavirus*, *Sardinovirus* et *Thogotovirus* (Committee on Taxonomy of Viruses ICTV 2021). En tout, vingt et une espèces constituent cette famille, dont quatre influenza (connus à ce jour).

Les virus influenza sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative. L'ARN n'est donc pas codant dès son entrée dans la cellule, il doit d'abord être transcrit en ARN brin complémentaire avant de pouvoir être traduit. Ce génome est également segmenté.

Les virus influenza sont nommés en fonction de leur genre (A, B, C ou D), les espèces à partir desquelles ils ont été isolés (à l'exception de l'homme), le lieu où le virus a été isolé, le numéro de l'isolat, l'année où le virus a été isolé et dans le cas du genre A des sous-types des protéines d'hémagglutinine (HA) et de neuraminidase (NA). Par exemple : D/bovine/France/5920/2014, virus d'influenza D, isolé à partir d'un bovin en France en 2014 et dont le numéro de l'isolat est 5920.

Les relations d'évolution entre les différents virus d'influenza sont fréquemment étudiées par analyse de la protéine PB1, laquelle serait la mieux conservée des protéines virales au cours des cycles dans le cas des virus influenza (Yamashita, Krystal, Palese 1989).

Les genres influenza présentent tous un ancêtre commun, et il est admis que les genres A et B auraient divergés entre eux plus récemment que le genre C.

Lors de sa découverte en 2011, le virus de l'influenza D a d'abord été considéré comme appartenant au genre C en tant que nouveau sous-type et a alors été désigné sous le nom C/swine/Oklahoma/1334/2011 (ou C/OK). Mais plusieurs analyses phylogénétiques et sérologiques ont permis de justifier sa classification dans un nouveau genre, celui de l'influenza D (Hause et al. 2013; 2014).

## C. Propriétés structurales

### 1. Structure générale des virions influenza D

Les virions d'influenza sont sphériques ou filamenteux, ils sont pléomorphes, c'est-à-dire qu'ils peuvent présenter des formes différentes selon les conditions physico-chimiques. Ils présentent un diamètre de 80 à 120 nm mais certains virus présentent également des formes filamenteuses allant jusqu'à plusieurs micromètres de longueur (influenza C et D notamment) (Fields, Knipe, Howley 2007; *Committee on Taxonomy of Viruses ICTV* 2021). Les virions d'influenza C présentent une structure hexagonale en surface et sont capables de former à la surface des cellules infectées des structures en corde très longues (500 µm) (Nishimura et al. 1990).

Les virus influenza présentent un noyau central dense d'ARN, et l'enveloppe lipidique des virions dérive de la membrane cellulaire acquise par bourgeonnement depuis la cellule hôte. A cette membrane sont incorporées un nombre variable de glycoprotéines virales (1 à 3) et des protéines non glycosylées (1 à 2). L'enveloppe lipidique et protéique recouvre une matrice protéique et le génome central.

La structure des virions d'influenza D est similaire à celle des virions d'influenza C. Ainsi, l'IDV (Influenza D Virus), comme l'ICV (Influenza C Virus), ne présente qu'une seule glycoprotéine de surface, la protéine HEF (Hemagglutinin-esterase fusion), qui, à l'image des protéines NA (Neuraminidase) et HA (Hémagglutinine) dans le cas de l'IAV (Influenza A Virus) et l'IBV (Influenza B Virus) forme des spicules à la surface de l'ICV. Elle est donc insérée dans la membrane lipidique.

Une autre protéine est insérée dans cette membrane, la protéine CM2, présentant une activité de canal ionique permettant l'influx des ions H<sup>+</sup> de l'endosome à la particule virale, ce qui a pour effet d'acidifier l'endosome, de briser les liaisons protéine-protéine et autoriser la libération du matériel génétique viral.

La protéine de matrice M1 est la protéine la plus abondante. Elle forme une structure en hélice tapissant l'intérieur de l'enveloppe présentée précédemment. Elle interagit également avec le complexe RNP et les glycoprotéines de surface, formant un pont entre les deux, et participe à l'export nucléaire de l'ADN et au bourgeonnement (Fields, Knipe, Howley 2007).

La Figure 11 présente la structure des virions d'influenza D. La protéine nommée PA sur le schéma correspond en réalité à la protéine P3 pour le virus de l'influenza D.

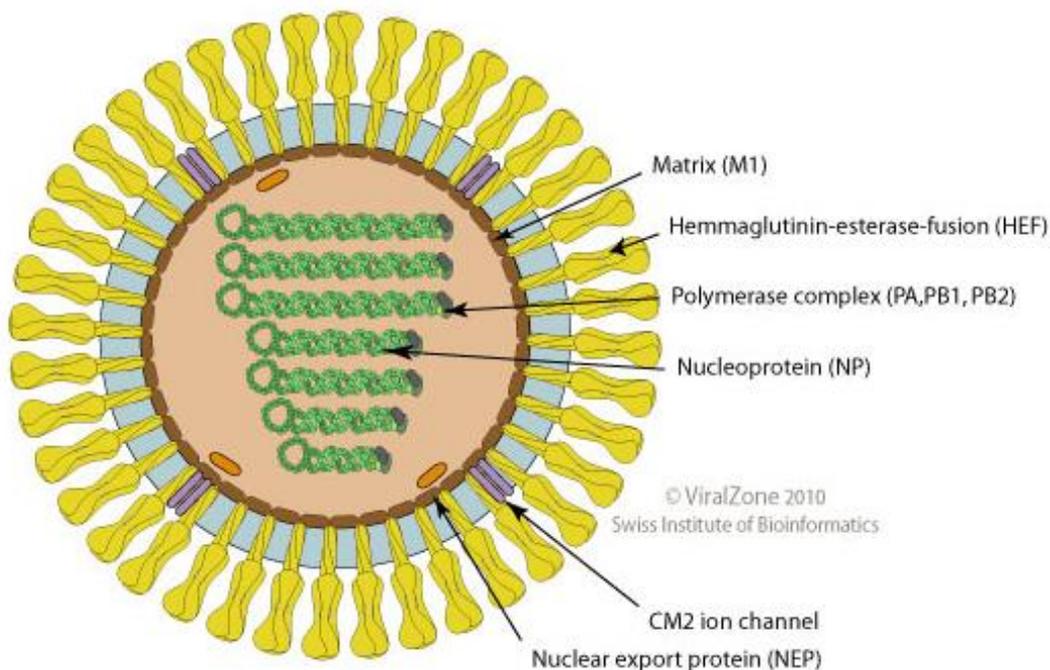


Figure 11 : Schéma de la structure des virions d'influenza D (source : <https://viralzone.expasy.org/>)

## 2. Génome : structure et organisation

Le génome des virus d'influenza est constitué d'ARN monocaténaire (simple brin) de polarité négative. De plus ce génome est segmenté : il présente des segments d'ARN de longueurs variables, sept dans le cas du virus de l'influenza D. Les segments d'ARN viral sont inclus dans un complexe ribonucléoprotéique constitués des segments d'ARN, des trois protéines polymérases (PB1, PB2, PA/P3) et encapsidés par des nucléoprotéines (NP). Cette structure a une forme de tige torsadée repliée et enroulée sur elle-même, formant une double hélice (Noda, Kawaoka 2010). Le noyau viral est également composé de la protéine NEP-NS2, protéine d'exportation nucléaire.

Le génome des virus influenza D est divisé en sept segments d'ARN et encode pour neuf protéines (Ferguson et al. 2016). Sa taille est d'environ 10 kb. Un schéma de l'organisation de ce génome est présenté en Figure 12.

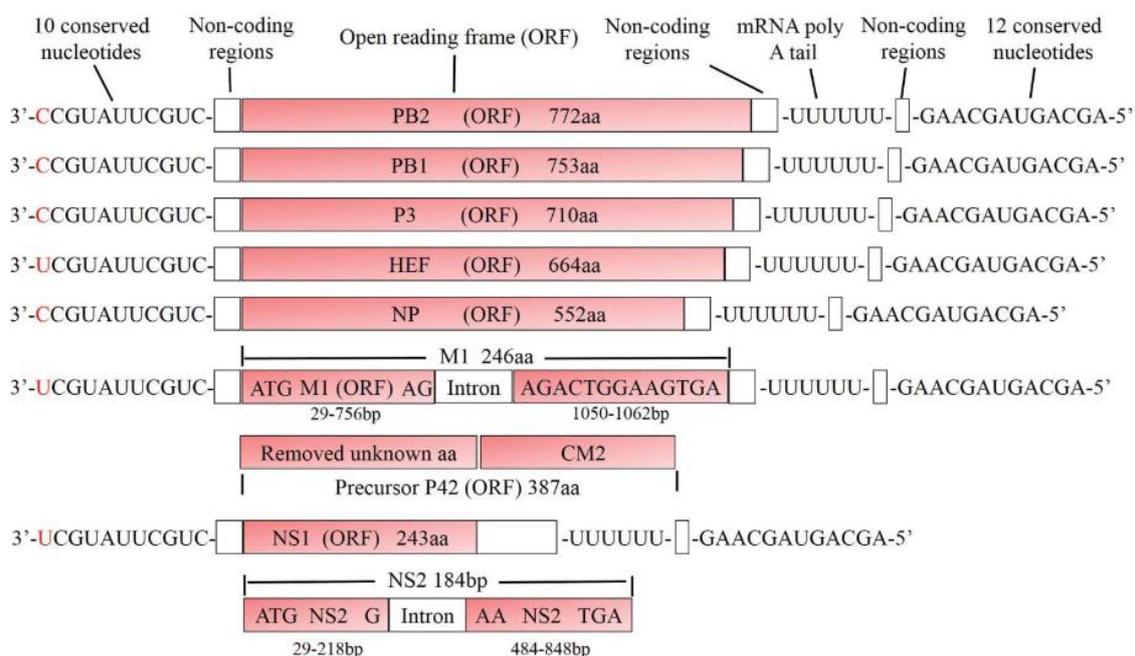


Figure 12 : Organisation du génome du virus influenza D (Su et al. 2017)

Des expériences de migration des segments d'ARN (par électrophorèse) combinées à des analyses des protéines (sérologiques ou par analyses sur gel) ont permis d'identifier les protéines encodées par les différents segments.

Les trois premiers segments encodent pour trois sous-unités de l'ARN polymérase hétérotrimérique : PB2, qui contient les domaines de liaison à la coiffe ; PB1, contenant le site actif de la polymérase et P3, contenant les domaines d'endonucléase nécessaires à l'initiation de la transcription (Asha, Kumar 2019; Su et al. 2017).

Le quatrième segment encode pour une hémagglutinine estérase fusion (HEF), formant l'unique spicule à la surface des virions IDV (Asha, Kumar 2019; Su et al. 2017).

Le cinquième segment encode pour une nucléoprotéine (NP), formant avec PB1, PB2, P3 et les segments d'ARN le complexe RNP (Asha, Kumar 2019; Su et al. 2017).

Le sixième segment encode pour deux protéines de matrice (M1 et CM2), par épissage alternatif, et enfin le dernier segment encode pour des protéines non structurales (NS1 et NS2/NEP), également par épissage alternatif (Asha, Kumar 2019; Su et al. 2017).

Les extrémités 5' et 3' contiennent des séquences non-codantes, impliquées dans la transcription et la réplication du génome, en tant que promoteurs viraux.

Ces séquences codantes du génome ont été utilisées pour réaliser des analyses génétiques et phylogénétiques. Les alignements de séquences (de nucléotides ou d'acides aminés) permettent d'identifier les régions homologues entre les séquences, ce qui peut permettre entre autres de faire ressortir l'histoire évolutive de ces séquences entre les différents genres du virus influenza (les séquences subissant des modifications au cours de l'évolution). La protéine PB1, commune à tous les genres connus d'influenza est considérée comme étant la mieux conservée aux cours des cycles et sert donc à déterminer les relations évolutives les plus précises entre les différents genres d'influenza (Yamashita, Krystal, Palese 1989).

Le génome du virus de l'influenza D partage moins de 50% d'identité de séquence protéique avec le virus de l'influenza C humain, lequel représente malgré tout le membre le plus proche génétiquement du virus de l'influenza D (Hause et al. 2013), ce qui a été confirmé par alignement des protéines PB1 des différents genres : le genre D est plus étroitement lié aux genres C qu'aux genres A et B.

### 3. Protéines

Les genres C et D d'influenza présentent des protéines similaires en structure et en fonction. Les rôles de ces protéines encodées par les différents segments de l'ARN sont décrits ci-dessous.

#### *a) PB2*

La protéine PB2 présente un rôle crucial dans l'initiation de la transcription des ARNm, car permet la reconnaissance de la coiffe en 5' et interviendrait également dans la réplication car des mutations de cette protéine modifient ce processus (Gastaminza et al. 2003).

#### *b) PB1*

La protéine PB1 est responsable de l'activité de polymérisation proprement dite, puisqu'elle catalyse l'ajout de nucléotide durant l'étape d'élongation de la chaîne d'ARN lors de la réplication du génome (Fields, Knipe, Howley 2007).

#### *c) Protéine PA*

La protéine PA présente une activité endonucléase nécessaire à l'initiation de la transcription, en clivant la coiffe des ARNm, dans le phénomène appelé « cap-snatching » (Fields, Knipe, Howley 2007).

#### *d) Nucléoprotéine*

La nucléoprotéine coiffe les molécules d'ARN, formant des hélices et structurant ainsi le génome. Par ailleurs, elle est impliquée dans l'import et l'export nucléaire du génome par des interactions avec des importines, ainsi que dans la réplication et la transcription du génome (Fields, Knipe, Howley 2007).

#### *e) Protéine M1*

Il s'agit de la protéine la plus abondante dans le virion. Elle tapisse l'enveloppe lipidique virale et est essentielle dans l'architecture virale, agissant comme une sorte d' « endosquelette », interagissant avec les glycoprotéines de surface, la protéine de matrice M2, le complexe RNP et la membrane (Peukes, Xiong, Briggs 2021). Elle intervient dans les étapes de recrutement, d'assemblage et de bourgeonnement des virions néo-formés (où, dans ce dernier cas, sa présence est nécessaire et suffisante à la formation de particules virales) (Gómez-Puertas et al. 2000). La protéine M1 interagit également avec la protéine NEP/NS2, pour permettre l'export nucléaire des RNP (Fields, Knipe, Howley 2007).

#### *f) Protéine M2*

La protéine M2 est une protéine de la membrane, tétramérique, possédant une activité de canal ionique (Fields, Knipe, Howley 2007). Ses rôles principaux sont détaillés dans la présentation du cycle viral.

#### *g) NS1*

NS1 est une protéine nucléaire dimérique, extrêmement exprimée dans les cellules infectées, s'accumulant d'abord dans le noyau puis dans le cytoplasme dans des stades plus tardifs de l'infection. Elle est responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire innée, en entrant notamment en compétition avec des PRR (Pattern Recognition Receptor), ce qui va limiter ou empêcher ensuite la production d'interférons, lesquels activent des gènes permettant de lutter contre cette infection

virale. Elle est également responsable de l'inhibition de l'activité de la protéine kinase R. NS1 est donc impliquée dans la lutte contre les défenses antivirales de la cellule hôte, et serait également impliquée dans la régulation de la réplication d'ARN virale, la synthèse de protéine virale et la réplication du virus (Kim, Jeong, Jang 2021).

#### *h) NEP/NS2*

La protéine NEP/NS2 interagit avec le récepteur d'export Crm1 (Chromosomal Maintenance 1) et M1, permet le recrutement de la machinerie d'export nucléaire, et dirige ainsi l'export du complexe (Fields, Knipe, Howley 2007).

#### *i) HEF*

L'Hémagglutinine Esterase Fusion est présente sur les virions d'influenza C et D et présente une similitude importante entre les deux virus, avec une identité d'acides aminés de 53% (Hause et al. 2013). C'est une glycoprotéine de surface constituée de deux sous-unités, HEF1 (comprenant les acides aminés N-terminaux) et HEF2 (comprenant un peptide de fusion hydrophobe, un domaine transmembranaire et un queue cytoplasmique courte) (Wang, Veit 2016; Herrler, Klenk 1991).

L'HEF combine plusieurs activités : liaison aux récepteurs cellulaires ; hydrolyse des récepteurs grâce à une activité estérase qui permet la libération des particules virales de la cellule hôte ; et enfin une activité de fusion membranaire entre l'enveloppe virale et l'endosome, ce qui permet la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule hôte (Wang, Veit 2016; Fields, Knipe, Howley 2007).

### **D. Evolution des virus influenza**

Les virus influenza présentent une évolution génétique et antigénique rapide, et ce en raison des propriétés de leur génome.

## **1. Dérive antigénique**

La dérive antigénique est une conséquence du fait que le génome des virus influenza se présente sous forme d'ARN. C'est donc une ARN-polymérase-ARN dépendante qui réalise la réplication du génome. Or cette polymérase ne présente pas de fonction de correction. Ainsi, des erreurs aléatoires ont lieu lors de la transcription et s'accumulent, faute de correction, ce qui peut alors entraîner des substitutions d'acides aminés aux sites antigéniques. Le phénomène concerne principalement les genres A et B (Krammer et al. 2018).

## **2. Recombinaison génétique (ou cassure antigénique)**

Le deuxième mécanisme d'évolution des virus influenza est dû au fait que le génome est segmenté. Ainsi, lorsque deux virus infectent une même cellule, des échanges de matériel génétique peuvent avoir lieu lors des processus d'assemblage et empaquetage des virus. Ainsi, il y a formation au final d'un nouveau virus, dont le génome provient de deux virus différents. C'est donc un phénomène brutal, ne résultant pas de changements progressifs, par accumulation comme c'est le cas lors de dérive génétique. Cependant, le phénomène reste relativement rare (Pérez-Losada et al. 2015).

## **E. Cycle viral**

La Figure 13 présente le cycle de vie des virus influenza (Krammer et al. 2018).

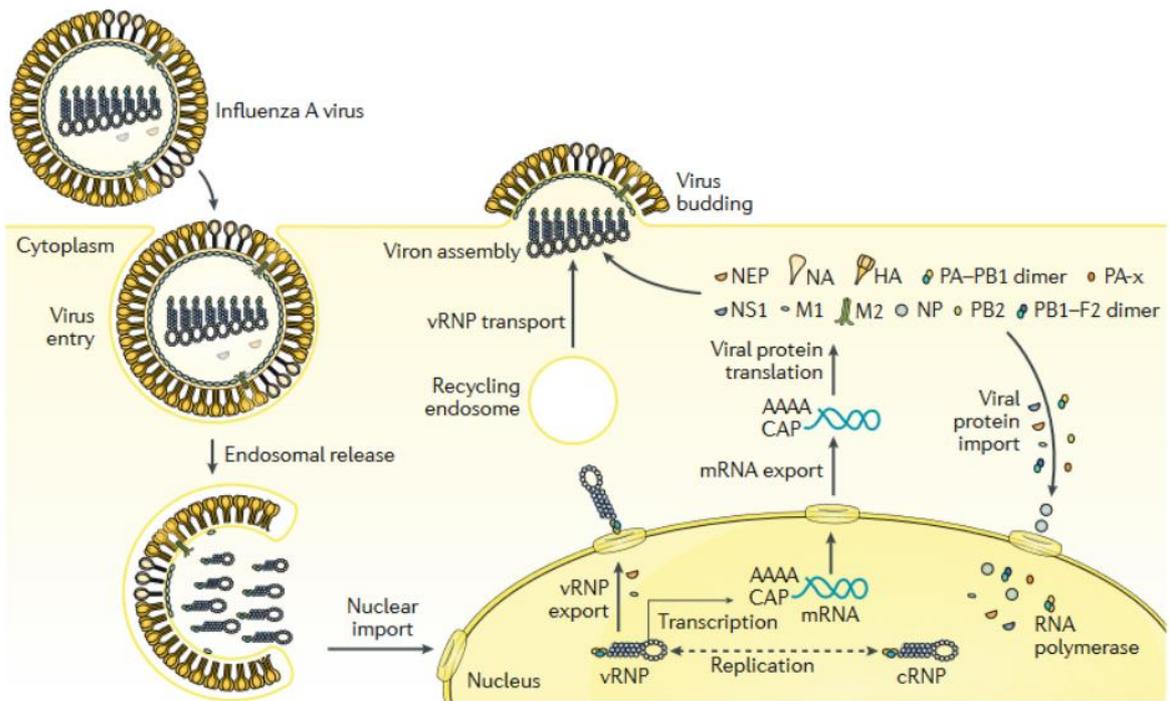


Figure 13 : Cycle de vie des virus influenza (Krammer et al. 2018)

## 1. Attachement à la cellule hôte

Les virus influenza se lient aux récepteurs acides sialiques des cellules, par l'intermédiaire de l'HE.

## 2. Entrée dans la cellule et fusion endosome-membrane virale

Les virus influenza n'entrent pas directement dans la cellule à travers la membrane plasmique. Une première internalisation a lieu dans un compartiment nommé **endosome**. Celui-ci présente un pH acide, lequel induit un changement de conformation de l'HEF, exposant le peptide de fusion. Ce peptide interagit alors avec la membrane de l'endosome et l'amène en juxtaposition à la membrane virale, ce qui aboutit à leur fusion (Stegmann 2000; Fields, Knipe, Howley 2007). Ces fusions entraînent la formation de pores. Parallèlement, la protéine M2, qui présente une activité de canal ionique, permet le passage de protons  $H^+$  de l'intérieur de l'endosome vers l'intérieur du virion, ce qui a pour effet de dissocier le complexe RNP des autres composants du virion, notamment M1 (Bui, Whittaker, Helenius 1996), déclenchant le relargage du complexe RNP à travers les pores créés.

### 3. Import nucléaire des complexes ribonucléoprotéiques

L'importation des RNP est un processus actif reposant sur des signaux de localisation nucléaire (NLS), notamment ceux des nucléoprotéines. Ces NLS sont reconnus par des protéines de la super famille des importines  $\beta$  (également nommées des caryophérines) et ce sont ces protéines qui permettent l'entrée dans le noyau du complexe RNP et des autres protéines virales nécessaires à la réplication (Boulo et al. 2007; Hutchinson, Fodor 2012).

### 4. Synthèse de l'ARN viral

#### a) *Transcription*

La transcription produit un ARN messager de polarité positive (mRNA), coiffé et polyadénylé qui représente une copie incomplète de l'ARN viral (vRNA). Cet ARN messager sert de matrice à la production de protéines ensuite dans le cytoplasme, grâce à la machinerie de traduction cellulaire.

L'ARN-polymérase cellulaire II permet le phénomène de « cap-snatching » (vol de coiffe), nécessaire pour la synthèse de l'ARNm. La transcription se fait ensuite, de l'extrémité 3' vers 5', catalysée par la fonction polymérase de PB1, jusqu'à la formation de la queue polyadénylée (en raison de la rencontre d'une zone riche en uridine vers l'extrémité 5' de l'ARN viral). Certains segments d'ARN vont subir des phénomènes d'épissage alternatif, à l'origine de plusieurs ARN codant pour des protéines différentes à partir d'un même segment d'ARN (Fields, Knipe, Howley 2007).

#### b) *Réplication*

Le processus de réplication se déroule en deux étapes, avec premièrement la synthèse d'un brin d'ARN de polarité positive, complémentaire du brin d'ARN viral, cRNA. Ce brin est ensuite utilisé afin de produire un brin d'ARN viral de polarité négative cette fois, identique au brin d'ARN viral initial (Fields, Knipe, Howley 2007).

## 5. Export nucléaire des ribonucléotides

Seuls les brins d'ARN de polarité négative (vRNA) sont exportés du noyau.

Un import préalable des protéines formant les complexes RNP (NP et les trois sous-unités de la polymérase) est nécessaire. Ce processus repose sur des signaux de localisation situés sur les protéines et reconnus par des importines. (Boulo et al. 2007).

La protéine de matrice M1 et la protéine d'export nucléaire (NEP) sont également essentielles à l'export des RNP et importées dans le noyau, possiblement par diffusion simple vers le noyau (Boulo et al. 2007).

Les exportines sont des protéines d'export capables de reconnaître des signaux particuliers, les NES (Nuclear Export Signal), portés en particulier par la protéine NEP-NS2 ce qui va permettre l'export des RNP (Boulo et al. 2007; Fields, Knipe, Howley 2007).

## 6. Assemblage des virus et empaquetage du génome

Les protéines de la membrane sont synthétisées sur des ribosomes liés à la membrane. Elles sont ensuite déplacées dans le réticulum endoplasmique où elles acquièrent leur forme, éventuellement glycosylées et associées en polymères. Les protéines sont alors acheminées vers l'appareil de Golgi et après les dernières modifications post-traductionnelles, dirigées par des signaux vers le site d'assemblage des virus, au pôle apical (Fields, Knipe, Howley 2007; Samji 2009).

Pour obtenir un virion fonctionnel (infectieux), il est nécessaire que tous les segments du génome soient présents et intégrés lors du processus d'empaquetage. Deux modèles sont avancés dans la description de ce processus : soit un modèle aléatoire, soit un modèle d'empaquetage spécifique des segments d'ARN, incluant la présence de signaux d'encapsulation sur les régions codantes et non-codantes des segments d'ARN. (Samji 2009).

## 7. Bourgeoisement

Les glycoprotéines de surface ainsi que la protéine M2 sont transportées du côté apical des cellules polarisées. L'accumulation de la protéine M1 entraîne une courbure de la membrane plasmique et finalement la fusion de la membrane à la base de la particule bourgeonnante. Les liaisons glycoprotéines-acides sialiques sont coupées par l'HEF, permettant le relargage du virus néoformé à l'extérieur de la cellule. L'enveloppe des virus est donc composée de la membrane plasmique de la cellule hôte (Samji 2009).

## F. Epidémiologie

Un virus proche de l'influenza C a été détecté pour la première fois en 2011 dans l'Oklahoma, sur des porcs présentant des signes compatibles avec une infection par un virus influenza. En parallèle, un virus très similaire a été mis en évidence sur des populations de bovins (espèce jusque-là non connue pour être sensible à un genre de virus influenza) aux Etats-Unis, en Asie ou encore en Europe (Ferguson et al. 2015; Luo et al. 2017; Jiang et al. 2014; Murakami et al. 2016; Flynn et al. 2018; Chiapponi et al. 2016; Ducatez, Pelletier, Meyer 2015). Depuis sa découverte, une dissémination mondiale a donc été mise en évidence. Cependant, des analyses réalisées sur des sérums conservés ont pu montrer rétrospectivement que le virus, depuis identifié comme l'IDV, circule depuis au moins 2003 dans des élevages des Etats-Unis, notamment dans les états du Nebraska et du Mississippi (Luo et al. 2017; Ferguson et al. 2015).

### 1. Circulation en Amérique

Le virus a été isolé pour la première fois aux Etats-Unis, dans l'état de l'Oklahoma, chez des porcs (Hause et al. 2013) mais depuis plusieurs études ont démontré sa circulation chez des bovins dans d'autres états, tels que le Mississippi, le Nebraska ou le Dakota du Sud, et chez les équins par exemple dans le Minnesota (Ferguson et al. 2015; Luo et al. 2017; Nedland et al. 2018; Silveira et al. 2019).

Le virus circule également parmi les bovins dans l'Ouest du Canada et à l'Est dans la province de Québec (Zhang et al. 2019; Saegerman et al. 2022).

En Amérique du Sud le virus a été détecté chez des bovins au Brésil et en Argentine (da Silva et al. 2022; Alvarez et al. 2020).

## **2. Circulation en Europe**

Une circulation virale a été mise en évidence en France et au Luxembourg chez des bovins, des porcs et des sangliers ; en Italie chez des bovins et des porcs ; et chez des bovins en Irlande et au Danemark (Ducatez, Pelletier, Meyer 2015; Gorin et al. 2019; Oliva et al. 2019; Snoeck et al. 2018; Chiapponi et al. 2016; Foni et al. 2017; Flynn et al. 2018; Dane et al. 2019; Goecke et al. 2022; Trombetta et al. 2022).

Une étude réalisée dans des élevages de bovins à la frontière européenne de la Turquie a montré que le virus circulait aussi dans cette région (Yilmaz et al. 2020).

Par ailleurs, il a été relevé que la prévalence globale de l'IDV dans les populations de bovins est en moyenne plus faible dans les pays plutôt exportateurs de ces animaux, comme la France, que dans les pays plutôt importateurs, comme l'Italie par exemple, suggérant une mise en contact avec le virus pendant ou après le transport et/ou une excrétion virale après le transport (Gaudino et al. 2021). Le transport des animaux est donc sans doute un facteur important à prendre en compte dans la diffusion de ce virus.

Une carte des séroprévalences observées dans les différentes régions françaises dans les populations de bovins et petits ruminants a pu être établie (Oliva 2019). Les différences observées entre régions peuvent potentiellement s'expliquer par des disparités de techniques d'élevages et d'échanges d'animaux.

Cette carte, présentée en Figure 14 donne ainsi un aperçu de la circulation de l'IDV en France.

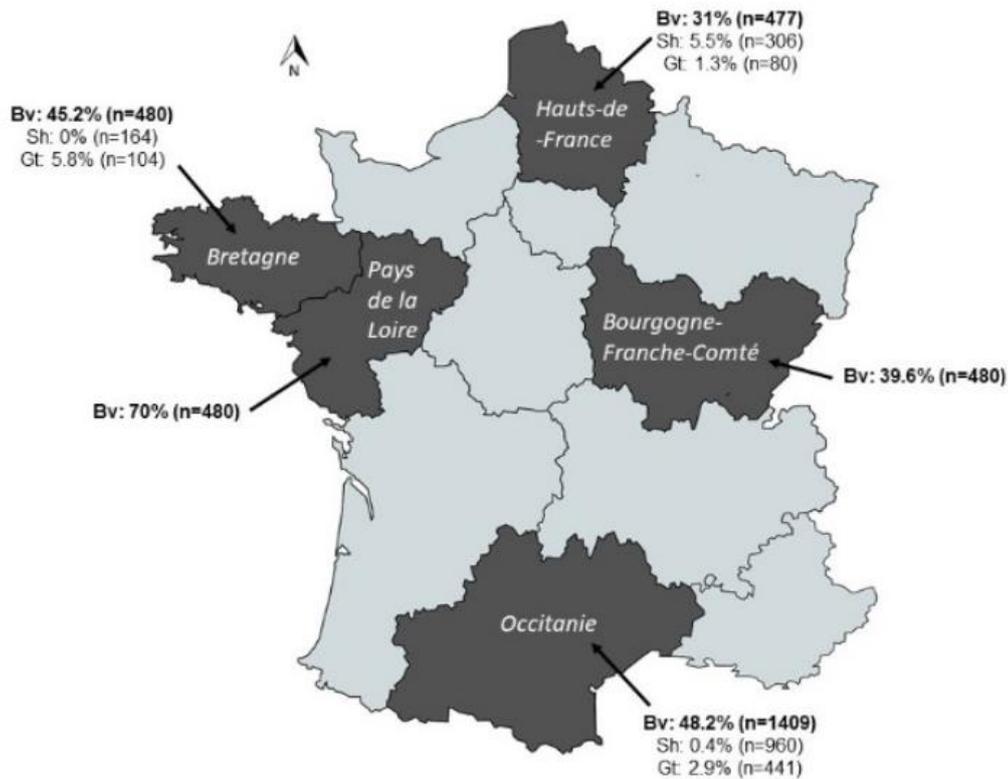


Figure 14 : Séroprévalence de l'IDV dans les populations de bovins et de petits ruminants dans différentes régions françaises, entre 2014 et 2018. Bv : bovine ; Sh : sheep ; Gt : goat (Oliva 2019)

### 3. Circulation en Afrique

Des études sérologiques ont attesté la circulation d'IDV en Afrique, plus précisément au Maroc, au Bénin, au Togo, au Kenya, en Ethiopie et en Côte d'Ivoire (Salem et al. 2017; Murakami et al. 2019; Sanogo et al. 2021). Le virus a également été isolé en Namibie (Molini et al. 2022).

### 4. Circulation en Asie

Le virus de l'influenza D a été détecté pour la première fois en Chine en 2014 chez des bovins (Jiang et al. 2014), puis sur un nombre élargi d'espèces en 2016 (petits ruminants, porcs) dans une province du Sud de la Chine (Zhai et al. 2017). Le virus a également été détecté au Japon, où des études sérologiques ont montré qu'il circule depuis au moins 2010 dans ce pays (Horimoto et al. 2016). En 2018 dans l'état de

Sarawak en Malaisie, le virus a été détecté à partir d'échantillons d'aérosols d'une ferme de volailles (Bailey et al. 2020).

Cette dissémination mondiale pose la question de la transmission intercontinentale via le trafic et l'échange d'animaux entre les pays.

## 5. Espèces cibles et réservoirs

### a) *Espèces domestiques*

Les réservoirs primaires et hôtes d'amplification du virus de l'influenza D sont les bovins, ce qui a été démontré par enquête sérologique (pourcentages de titres positifs et moyennes géométriques bien plus élevés que ceux qui ont été observés chez l'homme et le porc) et par la facilité à isoler ce virus chez les bovins (Hause et al. 2014).

L'IDV a été dans un premier temps identifié chez le porc, ce qui aurait pu laisser penser que cette espèce en constituait un réservoir. Mais lors de tests de routine sur rinçages nasaux, le pourcentage de positivité par RT-PCR a été déterminé à moins de 0,1 % (Hause et al. 2014). Des études épidémiologiques ont également montré que le pourcentage de séropositivité dans les sérums de 220 porcs aux Etats-Unis était relativement bas (9,5%) (Hause et al. 2013). En revanche, ce taux est beaucoup plus élevé chez les bovins, et notamment chez les veaux, avec des taux de séropositivité supérieurs à 80 % et une présence d'anticorps maternels chez les jeunes dans plus de 95 % des cas.

Les hôtes primaires sont donc les bovins comme nous l'avons déjà évoqué mais seraient en particulier les jeunes, au-delà de six mois, c'est-à-dire après que les anticorps maternels aient diminués, ce qui aboutit à des individus plus sensibles à l'infection par l'IDV et permet des transmissions actives entre individus (Su et al. 2017; Ferguson et al. 2015).

D'autres espèces que les bovins et les porcs sont également infectées par ce virus, notamment les petits ruminants (moutons, chèvres), ce qui a été montré aux Etats-Unis, avec des taux de séropositivité cependant beaucoup moins élevés que chez les bovins. Au cours de cette même étude, des sérums de volaille (dindes, poulets)

du Minnesota et de l'Iowa ont également été testés, ne révélant aucune séropositivité (Quast et al. 2015), mais une étude en Asie du Sud-Est a plus récemment détecté la présence de virus dans des échantillons d'aérosols d'élevage de volailles, sans pouvoir cependant relier cette présence à une infection réelle des volailles (Bailey et al. 2020).

Des anticorps anti-IDV ont également été détectés chez les chevaux (Nedland et al. 2018) et les dromadaires, ces derniers étant suspectés de jouer un rôle de réservoir du virus localement (Murakami et al. 2019; Salem et al. 2017).

Hause et al ont réalisé des études d'infection de furets par C/OK (C/swine/Oklahoma/1334/2011, une souche initialement nommée ainsi lors de l'étude car suspectée d'appartenir au genre C, avant de comprendre qu'il s'agissait d'un nouveau genre). Le modèle furet est utilisé afin d'étudier le potentiel pathogénique des virus influenza sur l'homme. Des inoculations intranasales ont été réalisées sur des furets et la présence de virus dans des rinçages nasaux ou encore dans tout l'appareil respiratoire, le tube digestif, la rate et le foie ainsi que les séroconversions ont été étudiées sur les furets inoculés et des furets mis en contact avec ceux-ci. Les résultats ont montré que le virus est à la fois capable de se répliquer au sein des individus infectés mais également d'être transmis aux individus en contact avec les individus inoculés. Le virus n'est cependant à priori pas transmis par les aérosols (Hause et al. 2014). Par ailleurs, le virus ne se transmet pas des bovins aux furets, ce qui a été démontré par exposition de furets à un jouet imbibé d'écoulements nasaux infectés de bovins (Ferguson et al. 2016). Cette dernière expérience servait à étudier le potentiel zoonotique du virus et les furets n'ont pas présenté d'excrétion virale ou de séroconversion.

## *b) Homme*

Concernant l'homme, des enquêtes étiologiques et sérologiques ont été réalisées. Une étude rétrospective a été menée en Ecosse sur des individus hospitalisés entre 2006 et 2008, dont l'objectif était d'essayer de détecter par RT-PCR la présence de virus dans des échantillons respiratoires. L'IDV n'a pu être mise en évidence chez aucun patient (Smith et al. 2016). Si dans la population générale la séoprévalence

n'est estimée qu'à un peu plus d' 1% (Hause et al. 2013), celle-ci est nettement plus élevée dans la population en contact régulier avec les bovins (éleveurs), atteignant 94% à 97% (White et al. 2016). La même étude a mis en évidence une séroprévalence de 18% pour l'IDV chez des personnes non exposées à des bovins. Ces résultats n'excluent cependant pas des réactions croisées avec ICV et le virus n'a pas encore été isolé. En Italie, la présence d'anticorps anti IDV a été détectée dans des sérums de vétérinaires travaillant avec des porcs datant de 2004 (Trombetta et al. 2022).

Bien que les manifestations cliniques de l'IDV chez l'humain ne soient pas encore bien connues, ce résultat pose tout de même la question d'une maladie émergente, notamment chez les populations exposées de façon régulière aux bovins ou aux porcs. De même, la question d'une transmission entre humains n'est pas encore bien connue.

#### *c) Espèces de la faune sauvage*

Des études de séroprévalence ont également été réalisées sur la faune sauvage et ont mis en évidence des séropositivités parmi plusieurs espèces sauvages : des cochons sauvages en Europe (Gorin et al. 2019), des camélidés en Ethiopie et au Kenya (Salem et al. 2017; Murakami et al. 2019) puis en Mongolie, Australie, Arabie-Saoudite et au Nigeria (Oliva 2019), des cervidés en Allemagne, en Belgique et dans des zoos français, des kangourous et des wallabies provenant eux aussi de zoos français (Oliva 2019). Ces données suggèrent que ces espèces pourraient être sensibles à l'IDV. L'IDV a également été détecté chez des girafes et un gnou (Molini et al. 2022).

#### *d) Hérissons d'Europe*

Une séroprévalence de 29,1 % a été observée dans un échantillon de sérums de 48 hérissons admis au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT (Oliva 2019). Afin de confirmer l'éventuelle circulation du virus dans la population de hérissons du

centre de soins, une recherche d'IDV par RT-qPCR a ensuite été réalisée à partir d'écouvillons nasaux, écouvillons et fragments d'organes de hérissons hospitalisés et décédés. Du virus a ainsi été détecté dans des écouvillons nasaux et des fragments de poumons, néanmoins en quantité relativement faible (sans déterminer si cela est dû à la quantité initiale réelle ou aux conditions analytiques qui auraient entraîné une dégradation de l'ARN). La question de la pathogénicité, soulevée également lors de cette étude, est cependant restée en suspens.

Il est à noter que les prélèvements dans le cadre de cette étude ont été réalisés sur des animaux ayant potentiellement passé plusieurs jours hospitalisés dans le centre de soins, et donc présentant des contacts plus ou moins directs avec d'autres individus. Ainsi, une contamination au sein même du centre est envisageable, d'où la nécessité d'études complémentaires pour comprendre la circulation d'IDV parmi la population sauvage de hérissons d'Europe (Oliva 2019).

Une étude récemment menée dans le Nord de l'Italie sur des hérissons d'Europe et recherchant la présence de différents virus, dont celui de l'influenza D à partir de prélèvements fécaux n'a pas mis en évidence de présence du virus (Delogu et al. 2020).

## **G. Pathologie et modes de transmission**

### **1. Etude des différentes espèces cibles**

La pathologie et le mode de transmission sont étudiés par des infections expérimentales, réalisées dans le cas de l'IDV sur des bovins, des porcs, des furets et des cochons d'Inde.

Chez les **bovins**, l'IDV peut être détecté dans les voies respiratoires supérieures et inférieures, avec un tropisme préférentiel pour les voies aériennes supérieures (Salem et al. 2019; Mitra et al. 2016).

Une transmission directe entre animaux a été démontrée, par mise en évidence d'animaux non inoculés présentant des écouvillons nasaux positifs lorsque mis en contact avec des veaux inoculés (Hause et al. 2014; Ferguson et al. 2016). Mais une transmission par aérosol a également été mise en évidence, par examen virologique

positif de veaux initialement naïfs logés (sentinelles) à 3 m de veaux inoculés. Des particules d'IDV ont été détectées dans l'air circulant de l'enclos infecté vers l'enclos des veaux sentinelles. La transmission par voie aérienne est donc possible sur de courtes distances (Salem et al. 2019).

D'un point de vue clinique, des rhinites et trachéites sont observées chez les bovins positifs mais ceux-ci ne présentent que des signes plutôt légers. Ce phénomène trouve plusieurs explications possibles, à la fois sur les modalités d'infection (voies, doses), les conditions d'élevage mais également une association à d'autres pathogènes (virus, bactéries, ...) (Mitra et al. 2016). Des lésions de bronchopneumonie et de pneumonie interstitielle restreinte ont été détectées sur des veaux infectés expérimentalement (Salem et al. 2019). Au final, beaucoup d'études ont démontré que l'IDV n'était responsable que de signes cliniques respiratoires assez modérés, avec éventuellement des lésions associées au niveau des voies aériennes supérieures. L'IDV fait très probablement partie du complexe BPI (Bronchopneumonie Infectieuse) incluant d'autres agents pathogènes (Ng et al. 2015).

Chez les **porcs**, le virus est détecté dans les voies respiratoires supérieures en priorité mais semble également présenter une réplication, éventuellement limitée, dans l'appareil respiratoire inférieur, selon une étude menée en 2019 (Lee et al. 2019). Cette détection dans l'appareil respiratoire inférieur peut cependant être liée à la voie d'infection (intranasale et intra-trachéale), pratiquée dans cette étude. Comme pour les bovins, une transmission entre animaux a été mise en évidence par séroconversion des animaux non inoculés (Hause et al. 2013).

Chez les **furets**, le virus est détecté dans les voies respiratoires supérieures seulement et se transmet par contact direct entre individus. Aucune lésion et aucun signe clinique ne sont observés chez les individus infectés (Hause et al. 2013). Pour les cochons d'Inde, le virus a été détecté dans les voies respiratoires supérieures et inférieures des individus infectés, donc dans les poumons également, à la différence du furet (Sreenivasan et al. 2015).

Chez le **Hérisson d'Europe**, aucun signe clinique associé à l'infection par le virus de l'IDV n'a été rapporté jusqu'ici.

## 2. Bilan sur le tropisme du virus

Les nombreuses études réalisées concernant la circulation du virus ont montré qu'IDV était majoritairement détecté à partir d'échantillons provenant des voies respiratoires (voies hautes et basses). Des analyses immunohistochimiques ont montré que les cellules de l'épithélium broncho-alvéolaire et trachéal étaient les principales cellules infectées (Salem et al. 2019; Ferguson et al. 2016)

De l'ARN viral a également été détecté dans des écouvillons rectaux de chèvres, suggérant soit une ingestion directe du virus, soit éventuellement une réplication intestinale, à l'image des virus de l'IAV et de l'IBV. Enfin, le virus a été détecté dans des sérums de bovins et de chèvres gravement malades, ce qui peut laisser supposer que le virus est capable d'induire une virémie lors de l'infection (Zhai et al. 2017).

### III. Coronavirus

#### A. Introduction

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN, responsables d'infections le plus souvent digestives et respiratoires, mais ne s'arrêtant pas à ces deux sphères, chez les mammifères et les oiseaux.

En médecine vétérinaire, plusieurs coronavirus présentent un intérêt tout particulier, en raison des impacts sanitaires et potentiellement économiques qu'ils peuvent engendrer. En témoignent les épidémies de bronchite infectieuse aviaire (due à l'*Avian coronavirus*), de gastroentérite transmissible porcine (due à un *Alphacoronavirus 1*), de péritonite infectieuse féline (due à un autre *Alphacoronavirus 1*).

Les coronavirus peuvent présenter une contagiosité très importante et induire une clinique très diverse et concernant de nombreux organes, sans se limiter à la sphère respiratoire. De plus, leur importante capacité évolutive en fait de très bons candidats au phénomène de franchissement de barrière d'espèce.

En médecine humaine, les coronavirus sont responsables de rhumes saisonniers mais également d'affections autrement plus sévères, à l'origine de pandémies majeures. En effet, outre les pandémies de SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome) en 2003 et MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome) en 2012, la dernière en date a éclaté en 2020, avec l'émergence d'un nouveau coronavirus pneumopathogène le SARS-CoV2 qui, jusqu'en juin 2022 a causé plus de 6 millions de morts à travers le monde. Les coronavirus présentent donc un intérêt clinique et épidémiologique majeur (Laude 2021; Fields, Knipe, Howley 2007).

#### B. Classification

Les coronavirus font partie de l'ordre des *Nidovirales*, dans le sous ordre des *Cornidovirinea*, famille des *Coronaviridae* et dans la sous-famille des *Orthocoronavirinae* (*Committee on Taxonomy of Viruses ICTV 2021*).

Quatre genres constituent cette sous-famille des *Orthocoronavirinae*, différenciés par les caractéristiques de leurs séquences protéiques : les *Alphacoronavirus*, divisés en 15 sous-genres, les *Betacoronavirus*, divisés en 5 sous-genres et comprenant notamment les espèces SARS (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*) ou MERS (*Middle East respiratory syndrome-related coronavirus*), les *Gammacoronavirus* et les *Deltacoronavirus*, divisés en trois sous-genres chacun (*Committee on Taxonomy of Viruses ICTV 2021*). Les genres *Alphacoronavirus* et *Betacoronavirus* infectent les mammifères, les *Deltacoronavirus* et les *Gammacoronavirus* infectent plutôt les oiseaux, cette frontière n'étant pas forcément bien nette (Laude 2021). Dans ces quatre genres, de nombreux sous-genres sont présents. Beaucoup d'espèces sont infectées par des coronavirus spécifiques (de l'espèce), mais quelques exceptions existent : les primates ne semblent pas présenter de coronavirus spécifique. A l'opposé, certaines espèces peuvent être infectées par plusieurs coronavirus, notamment le porc, capable d'être infecté par des coronavirus de trois des quatre genres différents (Laude 2021). Beaucoup de coronavirus infectent en général un nombre restreint d'espèces, avec quelques exceptions notables (SARS-CoV).

Les analyses phylogénétiques des nombreux coronavirus découverts laissent supposer que les genres alpha et beta auraient un ancêtre commun dont l'hôte serait une chauve-souris, tandis que les genres gamma et delta seraient issus d'un ancêtre commun aviaire. Les frontières ne sont cependant pas nettes, notamment entre les coronavirus infectant les oiseaux et ceux infectant les mammifères (Woo et al. 2012).

### C. Découverte d'EriCoV (HedCoV)

En 2012, un nouvel agent pathogène a émergé dans la population humaine, le *Middle East Respiratory syndrom-related coronaviruses* (MERS-CoV), nouveau coronavirus hautement pathogène, détecté pour la première fois en Arabie Saoudite. Le Dromadaire est suspecté être une espèce hôte pour le virus et la source animale de l'infection de l'homme (WHO 2019). Il appartient au sous-genre *Merbecovirus* et au genre des *Betacoronavirus*, qui n'était jusque-là connu pour ne compter que des chauves-souris (en particulier insectivores) dans son spectre d'hôtes, lesquelles

peuvent héberger une diversité de coronavirus assez conséquente. Des coronavirus ont alors été recherchés chez d'autres mammifères insectivores, notamment chez les *Eulipotyphla*, taxon frère le plus proche des chauves-souris, comptant notamment dans ses membres les hérissons. Une telle recherche a été réalisée en Allemagne sur 248 hérissons d'Europe provenant de centres de soins, à partir d'échantillons fécaux et en utilisant la technique de RT-PCR. Les résultats ont mis en évidence quatre séquences différentes de virus, également classés dans le sous-genre *Merbecovirus* des *Betacoronavirus*. Ce nouveau groupe, nommé EriCoV (et dont le nom d'espèce est désormais *Hedgehog coronavirus 1*, abrégé en HedCoV en anglais), a été détecté par RT-PCR dans 58,9% des échantillons fécaux, avec des quantités d'ARN viral assez élevées (7,9 log<sub>10</sub> copies/mL de suspension fécale), et avec une suspicion de réplication virale dans l'intestin inférieur, étant donné les concentrations plus élevées à ce niveau-là. Dans cette même étude, les concentrations virales moyennes dans les organes solides, l'urine et le sang de douze individus présentant du virus dans les intestins ont été comparées et ont mis en évidence que les concentrations virales étaient au moins dix fois plus élevées dans les intestins qu'ailleurs, ce qui est compatible (avec le taux élevé de détection dans les fèces) avec une voie de transmission fécale-orale. Cette étude n'a cependant pas permis de déterminer une manifestation clinique de la maladie chez les hérissons (Corman et al. 2014).

## **D. Propriétés structurales et composition des virions**

### **1. Morphologie des virions**

Les coronavirus ont une structure sphérique de 100 à 160 nm de diamètre, ce qui constitue une taille importante. Ces structures sphériques sont entourées d'une couronne de laquelle la famille tire son nom (« corona » signifiant couronne en latin). Cette « couronne » est constituée en réalité de spicules, constitutives de l'enveloppe, et parmi lesquelles deux types peuvent être distingués : les glycoprotéines S (spike), les plus longues (20 nm) et présentes sur tous les coronavirus, et les glycoprotéines HE (hemagglutinine-esterase), plus courtes et présentes seulement sur certains coronavirus. Le génome, sous forme d'ARN positif simple brin s'associe avec une nucléoprotéine (phosphoprotéine N) pour former une nucléocapside de structure

hélicoïdale, longue et flexible. L'enveloppe provient de la cellule hôte. (Fields, Knipe, Howley 2007). Un schéma de la structure de virion appartenant au genre *Betacoronavirus* est présenté en Figure 15, avec comme exemple celui du SARS-CoV.

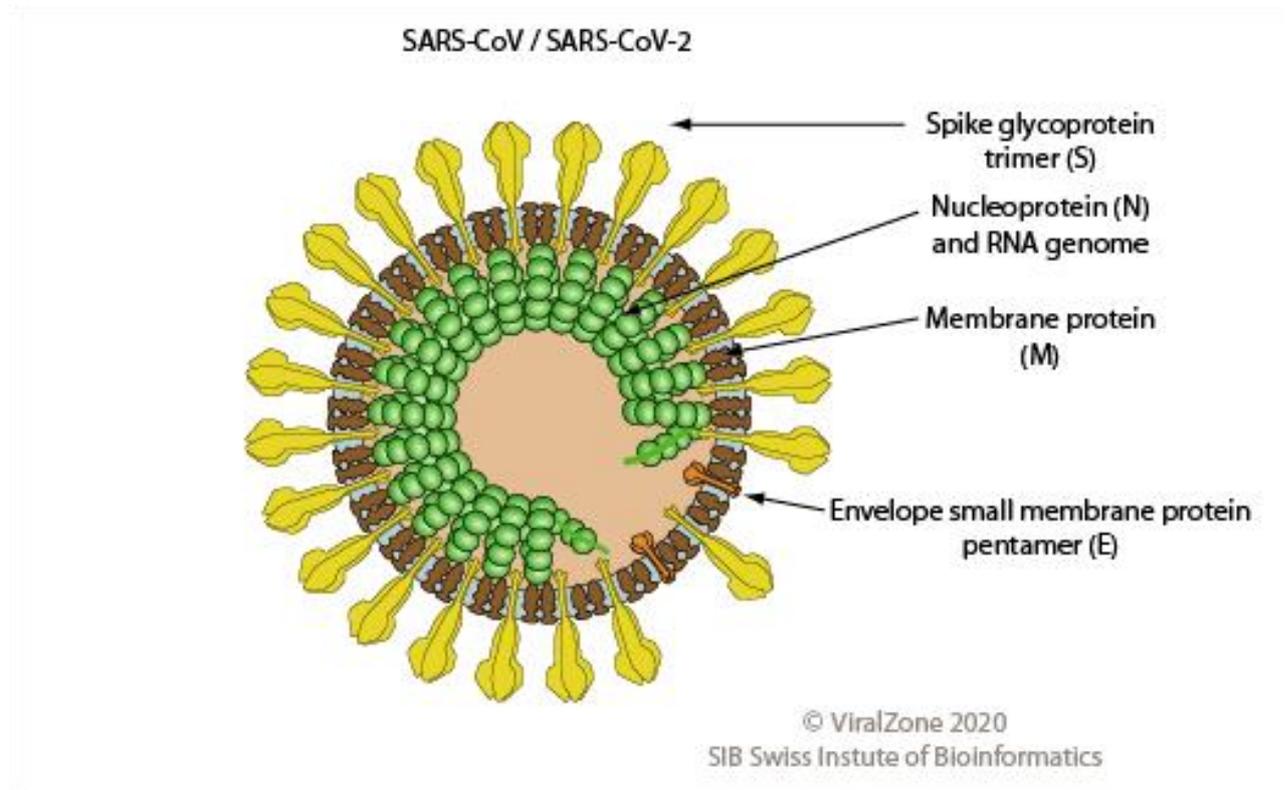


Figure 15: Schéma de la structure des virions de *Betacoronavirus*, avec l'exemple du SARS-CoV ([viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org))

## 2. Organisation du génome

Le génome des coronavirus est constitué d'ARN monocaténaire linéaire non-segmenté de polarité positive, de 26 à 32 kb de long. La structure générale est similaire entre les coronavirus et la Figure 16 illustre l'organisation du génome d'EriCoV ainsi que de trois autres coronavirus du clade C des *Betacoronavirus* (MERS-CoV, HKU4 et HKU5).

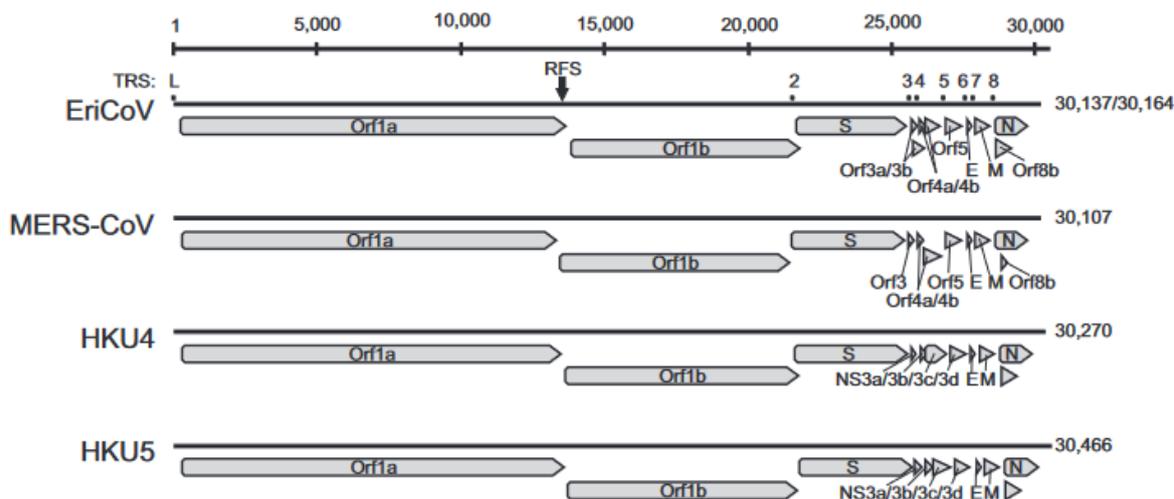


Figure 16 : Organisation du génome d'EriCoV et de trois autres betacoronavirus du clade C (Corman et al. 2014)

Le reste du génome est constitué de 7 à 14 ORFs. L'ordre des gènes est toujours le même : 5'-Polymérase-(HE)-S-E-M-N-3'. Le gène Pol occupe environ les deux tiers de cette partie codante du génome (constitué de deux ORF, ORF1a et ORF1b), et code pour la polymérase virale (Fields, Knipe, Howley 2007; Payne 2017).

### 3. Protéines

#### a) Protéines structurales

Le génome des coronavirus encode pour quatre protéines structurales majeures :

- La glycoprotéine S (spike)
- La protéine N (nucléocapside)
- La protéine M (membrane)
- La protéine E (enveloppe)

Ces protéines ont toutes un rôle dans la structure du virus, mais également dans d'autres aspects du cycle de réplication (Schoeman, Fielding 2019)

### (1) Protéine N (nucleocapsid)

La phosphoprotéine N interagit avec le génome d'ARN pour former la nucléocapside, structure longue et hélicoïdale, qui va « emballer » le génome. Elle a également un rôle dans la synthèse de l'ARN ainsi que la réplication, l'assemblage, la formation de l'enveloppe et le bourgeonnement des virions néo-formés. Enfin, par plusieurs mécanismes, elle intervient dans la régulation du cycle de la cellule hôte (inhibition de la production d'interférons et de protéines comme COX et AP1, induction de l'apoptose, réorganisation de l'actine) (Kopecky-Bromberg et al. 2007; Yan et al. 2006; He et al. 2003; Surjit et al. 2004).

### (2) Protéine M (membrane)

La glycoprotéine M constitue la protéine la plus abondante au sein du virion. Étroitement associée à l'enveloppe du virion, elle interagit avec les protéines S permettant leur incorporation dans l'enveloppe virale (de Haan et al. 1999), et avec les protéines N et E, notamment pour la libération des particules virales (Payne 2017), ainsi qu'avec la nucléocapside. Enfin, elle intervient dans la taille et la forme des virions en interagissant avec les protéines S et l'ARN (Neuman et al. 2011).

### (3) Protéine E (enveloppe)

La protéine E est la plus petite des protéines de structures et la moins abondante. Sans être essentielle à la réplication du virus, cette protéine permet, de par ses interactions avec la protéine M, de coordonner l'assemblage de l'enveloppe, la production et la libération des particules virales (bourgeonnement) (Kuo, Masters 2003). Elle serait également responsable d'induire la courbure de la membrane des enveloppes virales, permettant aux particules de coronavirus d'acquies leur forme sphérique (Fischer et al. 1998; Schoeman, Fielding 2019). Enfin, un rôle de canal ionique est démontré pour cette protéine, et pourrait être à l'origine du phénomène de bourgeonnement (Wilson et al. 2004).

#### (4) Protéine S

Les protéines S, en forme de spicules à la surface du virion forment la « couronne » des coronavirus. La protéine est divisée en trois domaines structuraux : un grand domaine externe, lui-même divisé en deux sous-domaines (S1 et S2), un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique.

La liaison aux récepteurs cellulaires est assurée par le domaine S1 et la sous-unité S2 est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et peut induire la fusion de deux cellules. Enfin, par divers processus, la protéine S intervient dans la pathogenèse des infections à coronavirus (Fields, Knipe, Howley 2007; Li 2016) et joue un rôle important dans la virulence virale.

#### (5) Hemagglutinin-esterase glycoprotein

Cette protéine n'est présente que sur certains coronavirus du groupe II et un coronavirus du groupe III (TCoV). Elle forme un petit spicule à la surface du virion. HE n'est pas essentielle à la réplication virale. Elle est capable de se lier aux résidus acides sialiques et possède une activité estérase permettant de détacher le virion de la cellule infectée (Fields, Knipe, Howley 2007; Payne 2017).

#### *b) Protéines non structurales*

Quinze à seize protéines non structurales (nsp) sont produites au début des phénomènes de réplication/transcription. Elles sont issues des clivages de deux polyprotéines, pp1a (nsp1 à nsp11) et pp1ab (nsp1 à nsp16, exceptée nsp11), codés par les ORF1a et ORF1ab. Chacune de ces nsp présente un rôle précis dans les processus de réplication/transcription. La Figure 17 présente l'organisation des polyprotéines issues de la traduction des ORF1a et ORF1b ainsi que les fonctions des différentes nsp produites à partir de ces polyprotéines (V'kovski et al. 2021).

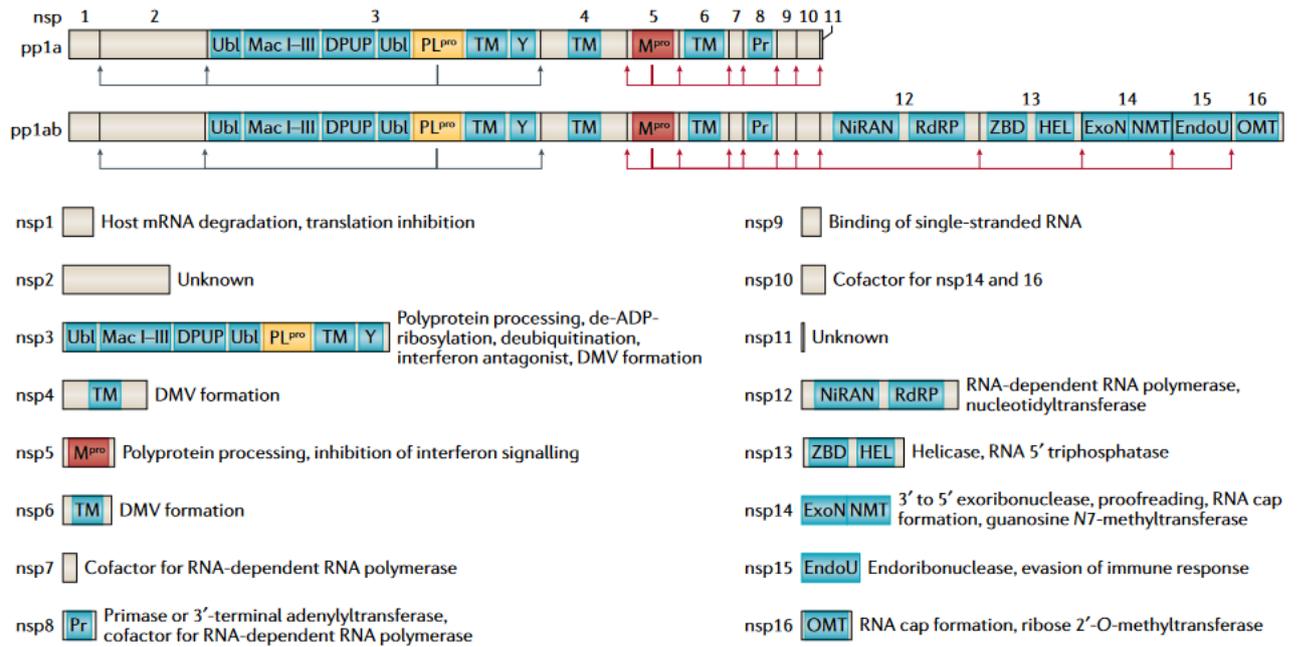


Figure 17 : Organisation des polyprotéines issues de la traduction des ORF1a et ORF1b et fonctions des différentes nsp, dans le cas d'un virus SARS-CoV (V'kovski et al. 2021)

### c) Protéines accessoires

Les protéines accessoires sont codées par les ORF3 à ORF10. Elles ne sont pas nécessaires à la réplication du virus mais favorisent la réplication et la pathogénie du virus. Les fonctions des différentes protéines accessoires varient selon les coronavirus et nous ne détaillerons pas plus ce point dans ce manuscrit.

## E. Cycle viral

Le cycle de réplication des coronavirus est présenté en Figure 18 (V'kovski et al. 2021)

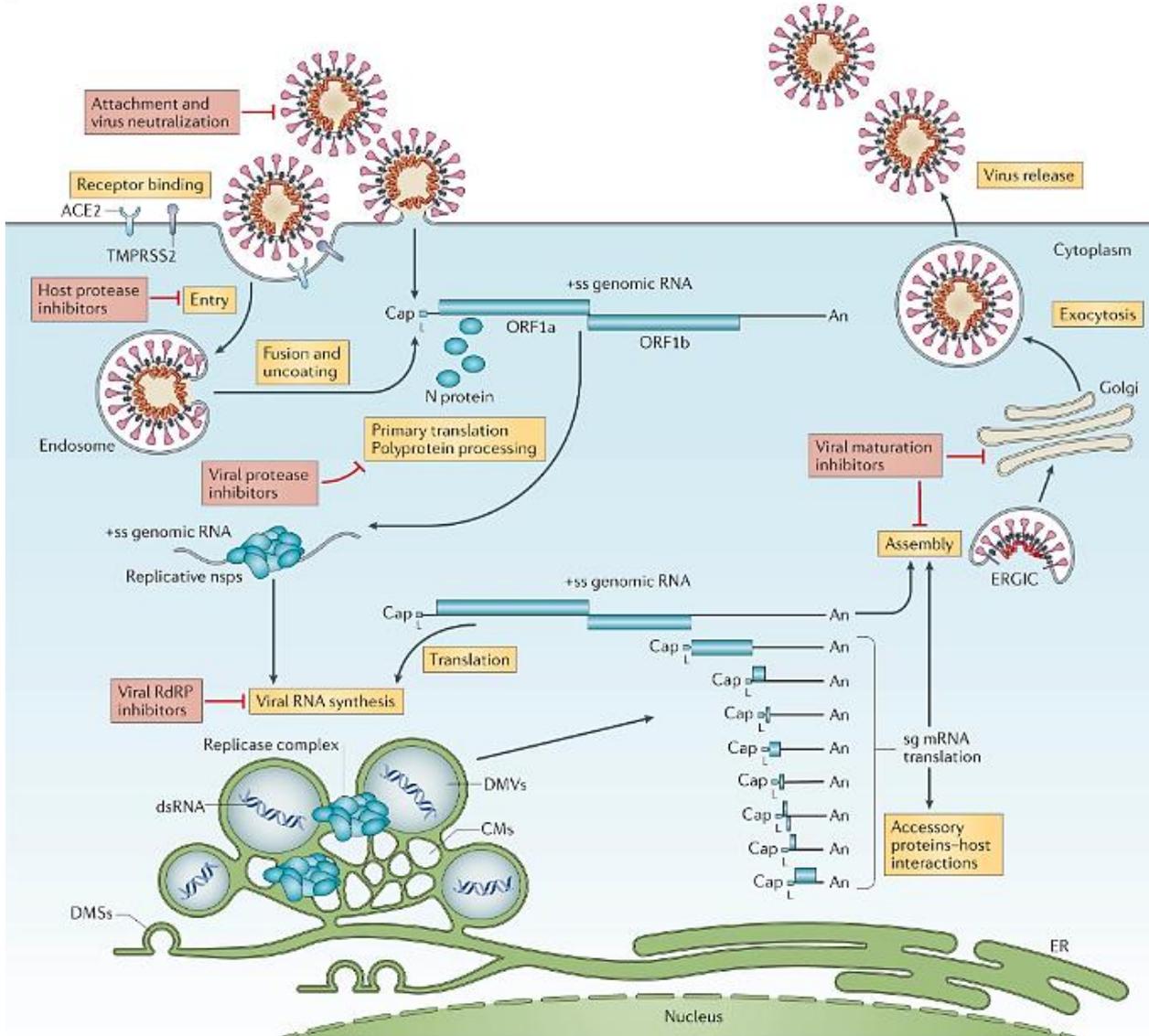


Figure 18 : Cycle de vie des coronavirus(V'kovski et al. 2021)

### 1. Attachement et fusion

Les protéines S à la surface du virion vont venir se lier à des récepteurs (glycoprotéines ou glycanes) à la surface de la cellule hôte.

Selon le coronavirus, deux voies permettent l'entrée dans la cellule : soit par fusion directe de l'enveloppe virale à la membrane plasmique cellulaire, soit par endocytose puis fusion secondaire de l'enveloppe virale à la membrane endosomale. Le clivage de la protéine S au niveau de S2 libère un peptide de fusion, lequel va s'insérer dans la membrane cellulaire et entraîner un changement de conformation des protéines S, rapprochant enveloppe virale et membrane cellulaire, et permettant leur fusion (Li 2016; Fields, Knipe, Howley 2007). L'ARN viral est ensuite libéré dans le cytoplasme et la nucléocapside est retirée.

## **2. Formation du RTC**

Une première étape de traduction va avoir lieu, par les ribosomes de la cellule, permettant la traduction des ORF1a et ORF1b en deux polypeptides, pp1a et pp1ab. Ces deux polypeptides subissent ensuite une autoprotéolyse, engendrant 16 protéines non structurales (nsp1 à nsp16) formant le complexe réplisome-transcriptase (RTC) dont la pièce centrale est nsp12, ARN polymérase ARN-dépendante (Fields, Knipe, Howley 2007).

## **3. Réplication**

Dans des vésicules à double membrane (DMV) l'ARN<sup>+</sup> est d'abord synthétisé en brin d'ARN<sup>-</sup>, complémentaire du brin initial. Ces ARN servent de matrice pour la réplication d'un nouveau génome (ARN<sup>+</sup>) modifié en 5' (pour la coiffe), et en 3' (queue poly A) pour les nouveaux virions formés (Fields, Knipe, Howley 2007).

## **4. Transcription**

La transcription est réalisée à partir des ARN<sup>-</sup> comme matrice et est séquentielle : elle s'arrête dès qu'une région de régulation de la transcription (TRS) est rencontrée par le RTC. Cinq à sept ARNm subgénomiques anti-sens de taille décroissante sont produits et vont servir de matrice à la production de brins sens sub-génomiques qui

sont ensuite traduits en protéines structurales et accessoires (Fields, Knipe, Howley 2007).

## **5. Assemblage et libération des virions néo-formés**

Le site d'assemblage des virus semble être le ERGIC, compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. L'interaction des protéines M et E détermine le site d'assemblage des virus. La nucléocapside est formée par l'interaction entre l'ARN viral et la protéine N. Le complexe s'associe à la protéine M au niveau du réticulum endoplasmique et la protéine est incluse dans la particule virale. Les protéines membranaires S et HE sont également incorporées, via leurs interactions avec la protéine M. Les particules virales subissent alors des modifications morphologiques au niveau du Golgi, ce qui leur confère leur apparence de particules virales matures, avec un cœur dense et compact. Ces particules transitent via des vésicules puis les virions néo-formés sont relâchés par exocytose dans l'espace extracellulaire (Fields, Knipe, Howley 2007).

## **F. Evolution des coronavirus**

### **1. Mutation**

Les coronavirus présentent un taux élevé de mutations, à l'image de beaucoup de virus à ARN, en raison du taux élevé d'erreurs de l'ARN polymérase. Il est à noter cependant que les coronavirus présentent une protéine possédant une activité exoribonucléase, la protéine non structurale nsp14, laquelle permet la correction des erreurs lors de la synthèse d'ARN, mais ce processus n'est pas complètement fiable, et le taux de mutations reste élevé. Cette fonction correctrice de l'exoribonucléase permet malgré tout aux coronavirus de présenter un taux de mutations deux à trois fois inférieur à celui des virus influenza.

Des mutations sont également dues à un processus d'édition génomique lié à des défenses cellulaires face aux ARN exogènes.

Cependant, les mutations ne sont pas toutes fixées dans la population et leur fixation dépend soit du hasard (événement fondateur), soit de l'avantage sélectif que cette mutation peut engendrer (Laude 2021).

Au final, il survient environ une mutation par génome et par cycle.

## **2. Recombinaison intergénomique**

Le deuxième processus de l'évolution génétique des coronavirus est la recombinaison intergénomique. Lors de la synthèse, l'ARN polymérase peut sauter à un nouveau brin, alors qu'elle est toujours attachée au brin qu'elle était en train de synthétiser. Ainsi, lorsqu'une cellule est infectée par deux souches de coronavirus différentes, un génome nouveau peut alors être créé, mélange des génomes des deux virus parentaux.

Ainsi, si le taux de mutations est faible chez les coronavirus, la recombinaison intergénomique est, elle, un phénomène beaucoup plus courant (Laude 2021) et le facteur principal de l'évolution rapide des coronavirus.

## **G. Epidémiologie**

### **1. Circulation en Europe**

Ainsi que mentionné précédemment (voir le paragraphe III.C), EriCoV a été décrit pour la première fois en Allemagne en 2014 (Corman et al. 2014).

Depuis, il a également été détecté en France en 2017 avec des taux de prévalence dans les matières fécales de près de 60% (Monchatre-Leroy et al. 2017), pour un virus partageant 96 à 98% d'identité des séquences d'acides nucléiques avec les souches allemandes de l'étude de Corman et al.

En Grande Bretagne, une première description d'infection de hérissons par EriCoV a été faite en 2019 (Saldanha et al. 2019), avec un pourcentage d'individus testés positifs plus faible qu'en France et en Allemagne. Ces recherches, réalisées par RT-PCR, n'ont révélé cependant aucune trace virale en Ecosse.

Dans le Nord de l'Italie, une prévalence similaire (58,3 %) à celles observées en Allemagne et en France est rapportée (Delogu et al. 2020).

Enfin, EriCoV a été détecté par analyse PCR à partir d'écouvillons rectaux en 2021 en Pologne, avec une prévalence de 25 % (Pomorska-Mól et al. 2022).

## **2. Circulation en Chine**

En 2019, un nouveau coronavirus apparenté au MERS-CoV et appartenant au sous-genre *Merbecovirus* a été décrit chez des Hérissons de l'Amour (*Erinaceus amurensis*). Ce coronavirus, *Ea-HedCoV* HKU31 présente 79,6% d'identité génomique avec EriCoV (Lau et al. 2019).

## **3. Données épidémiologiques relatives à l'âge, l'année, le mois, la zone d'échantillonnage**

Il a été démontré chez plusieurs espèces de chauves-souris que l'excrétion de coronavirus est plus importante chez des individus jeunes (Osborne et al. 2011), mais cette tendance n'a pu être mise en évidence jusqu'ici dans le cas du virus EriCoV (Saldanha et al. 2019).

Une variation annuelle est également rapportée dans la détection d'EriCoV. Dans l'étude de Saldanha et al., un taux significativement plus élevé de positivité a été observé en 2015 par rapport à 2014. Plusieurs explications sont avancées (variation des taux de contact, immunité fluctuante dans la population, variation de facteurs environnementaux, etc.). Ce phénomène avait déjà été observé chez d'autres espèces animales.

Pour le moment, aucune association n'a été détectée entre l'infection et le mois d'échantillonnage, bien que cette donnée mérite également d'être étudiée de façon plus approfondie (Saldanha et al. 2019).

Dans l'étude menée par Delogu et al., aucune différence significative de prévalence n'a pu être mise en évidence entre les hérissons provenant de zones urbaines et rurales (Delogu et al. 2020).

## H. Pathologie

Beaucoup de coronavirus se répliquent en priorité dans les cellules épithéliales et donc visent en particulier les appareils respiratoire et digestif causant selon les cas des infections respiratoires locales, des diarrhées... Mais certains coronavirus peuvent s'étendre à d'autres organes (foie, système nerveux, tractus urogénital, cœur, yeux, etc.) (Fields, Knipe, Howley 2007).

Une étude a été réalisée en Grande Bretagne, avec notamment pour objectif de déterminer si l'infection par EriCoV était associée à une manifestation clinique chez le Hérisson d'Europe. L'étude de la consistance fécale, de l'état corporel (maigre ou émacié), des voies respiratoires et digestives (lors d'un examen post-mortem) n'avait alors révélée aucune association avec l'infection par EriCoV, ce qui peut laisser suggérer que le Hérisson d'Europe pourrait constituer pour le moment seulement une espèce réservoir, ne développant pas de manifestation clinique de la maladie. Seule une association apparente entre l'infection par EriCoV et une couleur modifiée des fèces (jaune ou verte) a pu être mise en évidence. Cependant, l'étude a été compliquée par la présence d'infections bactériennes et parasitaires concomitantes et la capacité des coronavirus à prédisposer à des infections secondaires (connue chez l'homme, ainsi que d'autres espèces animales), ce qui rend plus difficile la mise en évidence d'une association significative entre infection par EriCoV et manifestation(s) clinique(s) (Saldanha et al. 2019).

En Italie, une étude a également été réalisée, dans le but d'évaluer la circulation de plusieurs virus (EriCoV, influenza A et D, virus de la maladie de Carré, pestivirus et virus de la maladie d'Aujeszky) dans la population de hérissons d'Europe sauvages amenés en centre de soins et de comprendre l'implication clinique engendrée, afin de proposer une gestion plus adaptée de ces animaux au sein des centres de soins. Si le virus EriCoV était bien détecté dans la population, aucune manifestation clinique n'a pu être mise en évidence, suggérant, considérant les taux élevés de prévalence observés, que le Hérisson d'Europe présente un rôle de réservoir naturel et est porteur chronique du virus. Il est à noter également que la plupart des échantillons ont été récoltés après la phase d'hibernation, c'est à dire après une phase d'affaiblissement du système immunitaire. Enfin, les autres virus recherchés n'ont pas été détectés (Delogu et al. 2020).

Le Hérisson d'Europe semble donc constituer à ce jour une espèce réservoir pour le virus EriCoV apparenté au MERS-CoV et donc un hôte possible pour d'éventuels phénomènes de mutation et de recombinaison génomique du virus.

Cependant, des nombres encore assez restreints d'études ont pour l'instant été réalisés concernant l'implication clinique de ce nouveau coronavirus chez le Hérisson d'Europe (*Erinaceus europaeus*) et il apparaît intéressant de les poursuivre.

La surveillance des agents infectieux circulant dans la faune sauvage représente un défi important à la fois pour connaître l'impact de ces agents infectieux sur les populations d'animaux sauvages mais également en raison des contacts entre faune sauvage et domestique ou encore entre faune sauvage et humains.

Les coronavirus et les virus influenza font partie des virus surveillés attentivement, de par leur fréquente implication dans les phénomènes de maladies émergentes. Par ailleurs, tous deux ont démontré leur capacité de transmission entre espèces et donc également de l'animal à l'homme. Il apparaît donc important de connaître au mieux leur circulation dans les populations animales sauvages afin de comprendre et envisager leur circulation au sein de populations d'animaux domestiques et chez l'homme.

De plus, l'infection du Hérisson d'Europe par le virus influenza D et par EriCoV a été avérée dans plusieurs travaux déjà présentés ci-dessus et il est donc important de continuer à préciser leur circulation et leur évolution dans les populations de hérissons sauvages.

**La problématique soulevée par ce travail est donc la suivante :**

***Quelle est la circulation des virus de l'influenza D et EriCoV au sein de la population de hérissons d'Europe présentés au centre de soin de la faune sauvage de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ? L'infection par l'un de ces virus est-elle responsable d'une manifestation clinique, notamment respiratoire chez les hérissons ?***

Dans la partie expérimentation de cette thèse, nous nous intéressons dans un premier temps à la circulation de deux agents pathogènes, le virus de l'influenza D et EriCoV parmi les hérissons d'Europe présentés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT entre le 01/01/21 et le 25/01/22.

Nous nous intéressons ensuite à la manifestation clinique potentielle de ces deux maladies chez le Hérisson d'Europe, notamment au niveau de la sphère respiratoire. Jusqu'à présent, il n'a pas été montré que ces deux affections étaient à l'origine de maladies cliniques chez les hérissons d'Europe. Pour étudier ceci, une évaluation clinique minutieuse a été réalisée lors de l'admission des hérissons au centre de soins et nous avons essayé de détecter la présence de ces deux virus à partir

d'échantillons de fèces et rinçages nasaux, afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la présence de signes cliniques, notamment respiratoires et l'infection par l'un de ces deux virus, ou les deux.

# Partie expérimentale

#### IV. Matériels et méthodes

L'étude est réalisée sur des hérissons d'Europe sauvages, amenés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT. Depuis 2016, le Hérisson d'Europe représente entre 13,7% (en 2019) et 18,6% (en 2017 et 2020) de l'ensemble des animaux présentés sur une année et est le mammifère le plus présenté, toutes années confondues. La Figure 19 présente la répartition mensuelle des accueils de hérissons d'Europe, entre 2016 et 2021. En 2021, notre période d'étude, 528 hérissons ont été accueillis.

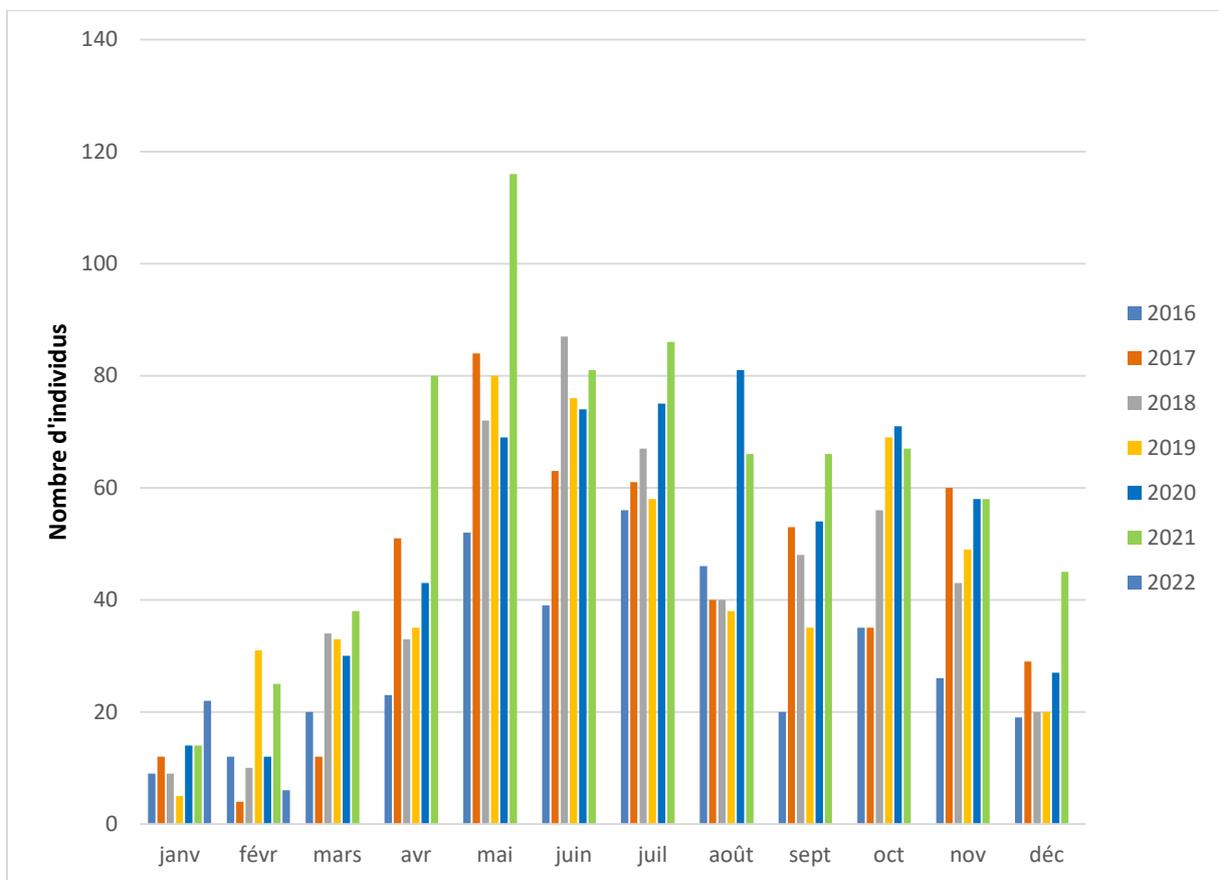


Figure 19 : Répartition mensuelle des accueils de hérissons d'Europe au centre de soins de l'ENVT, entre 2016 et 2021

## A. Réflexion sur la récolte des données d'examen clinique sur des animaux de la faune sauvage

### 1. Déroulement d'une admission en centre de soins

L'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse héberge depuis 1999 un centre de soins habilité à recevoir de la faune sauvage, dont l'enseignant chercheur en médecine zoologique M. G. Le Loc'h est actuellement le capacitare.

La Figure 20 représente le cheminement d'un hérisson depuis sa découverte en milieu naturel à son éventuel relâcher, et précise le moment où sont réalisés l'examen clinique et les prélèvements. Ces prélèvements ne sont réalisés que si l'état de l'animal le permet et ont avant tout un but diagnostique.

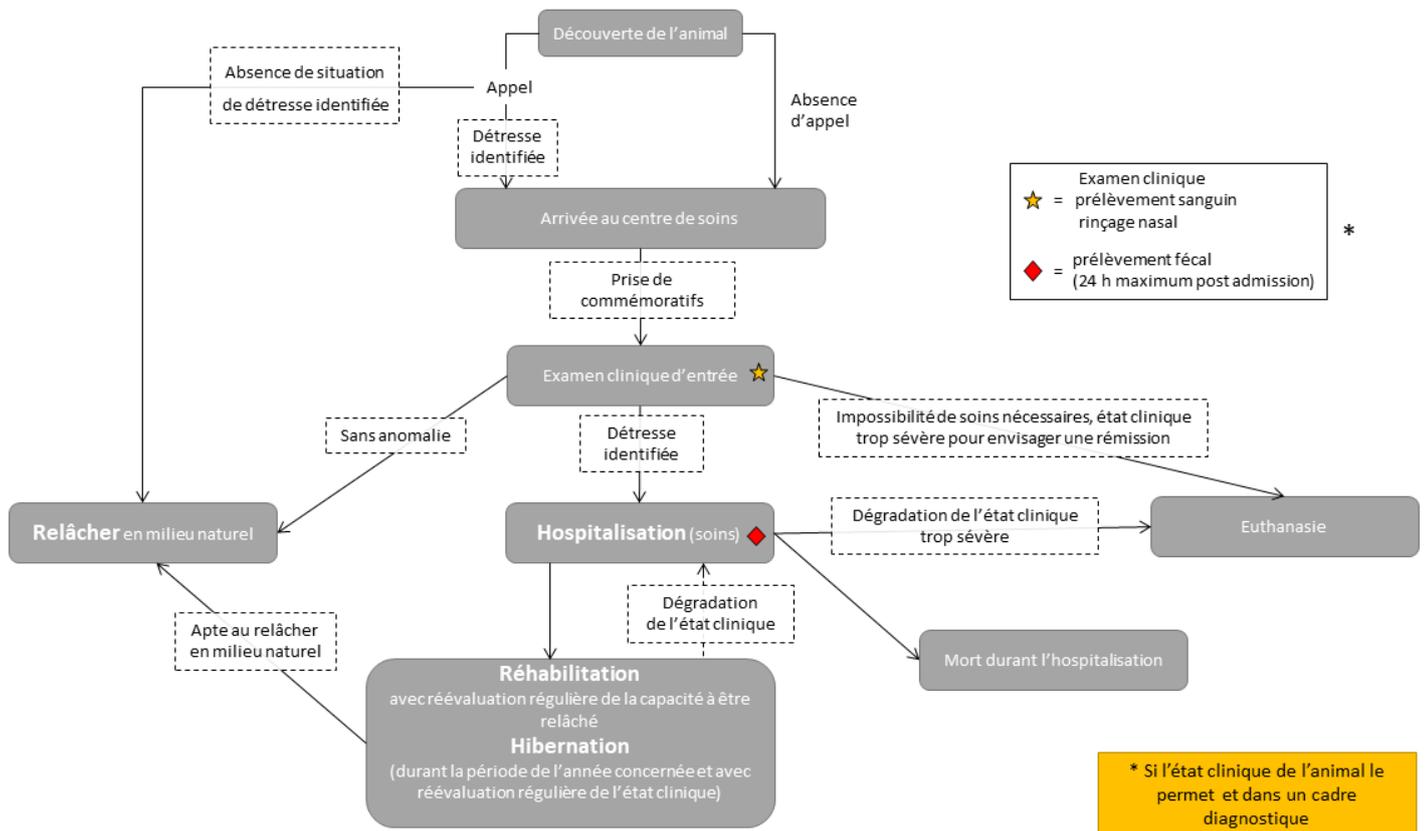


Figure 20 : Cheminement d'un hérisson au sein du centre de soins

## **2. Limiter les manipulations**

Afin de s'adapter aux contraintes de temps et d'activités du centre de soins, et par souci d'éthique, la récolte des données et des échantillons doit s'intégrer totalement à l'examen clinique d'admission de l'animal dans le centre de soins. En effet, l'objectif est de ne pas ajouter de manipulation de l'animal, dans le souci de limiter son stress et le phénomène d'imprégnation, qui représenteraient alors des obstacles à leur remise en liberté dans la nature, une fois leur état clinique jugé suffisamment satisfaisant pour pouvoir les relâcher.

## **3. Réaliser des prélèvements (invasifs)**

La recherche d'ARN viral sera réalisée à partir de rinçages nasaux et de prélèvements de fèces. Les sérologies sont réalisées sur du sérum.

Les prélèvements de fèces sont réalisés dans les 24h maximum suivant l'admission et ne constituent pas des prélèvements invasifs. En revanche, réaliser un écouvillon nasal ou une prise de sang (au niveau de la veine cave caudale chez le hérisson) constituent des actes invasifs. Ainsi, il a été décidé que ceux-ci ne seraient réalisés que dans certaines conditions bien précises. Une anesthésie est requise pour ces actes mais n'est pas réalisée dans l'unique objectif de réaliser les prélèvements. Les prélèvements ne sont donc réalisés que lorsqu'une anesthésie est par ailleurs indiquée dans un objectif diagnostique ou thérapeutique (les prélèvements ne constituent donc pas un motif d'anesthésie pour l'animal).

De plus, aucune prise de sang n'est réalisée dans l'unique objectif de ce travail de thèse. Du sang, est prélevé lorsque, par ailleurs, une prise de sang est réalisée dans un objectif diagnostique.

Si l'état clinique de l'animal requiert une euthanasie, les prélèvements ont également été réalisés, une fois l'animal anesthésié et juste avant l'euthanasie.

#### **4. Prendre en compte et limiter les risques de contamination au sein du centre**

Après leur admission au sein du centre de soin, si une hospitalisation est nécessaire, les hérissons sont placés dans des cages individuelles recouvertes en partie d'une serviette, permettant d'isoler un peu l'environnement de l'animal. Ces cages sont placées dans une pièce d'hospitalisation dédiée aux mammifères, sur des étagères.

Il n'y a pas de contact direct entre les animaux. Lors des nettoyages quotidiens des cages et du nourrissage quotidien à biquotidien des animaux, un changement de gants ou une désinfection de ceux-ci est obligatoire entre les animaux. Tous les outils touchant les animaux et n'étant pas à usage unique sont lavés et désinfectés après usage avec un animal.

En dépit des précautions prises, des phénomènes de contaminations entre animaux doivent malgré tout être envisagés. Par exemple, les linges placés sur les cages sont parfois intervertis, malgré les précautions prises. Or ces linges servent parfois à saisir les animaux et ceux-ci peuvent donc déposer des sécrétions quelconques dessus, avec lesquelles un autre animal se retrouvera donc potentiellement en contact, après interversion des linges.

Ainsi, parce que nous voulons une représentation de la situation épidémiologique au sein de la faune sauvage et afin de s'affranchir des phénomènes de contaminations au sein du centre qui fausseraient cette représentation, les prélèvements et le relevé des données d'examen clinique ne sont réalisés qu'au moment de l'admission (et maximum 24h après pour les prélèvements et les informations concernant les selles). Aucune information et aucun prélèvement pris après n'est pris en compte pour l'étude.

#### **5. Proposer un document facile et rapide à compléter**

La récolte des données a été réalisée par les personnes en charge du centre de soins et de l'admission des animaux. Etant donné l'organisation du travail du centre de soins de l'ENVT, celle-ci n'est pas toujours réalisée par la même personne, et il a

été important d'adapter la démarche, pour qu'elle soit facile à réaliser et répétable par un grand nombre de personnes.

Concernant la collecte des données d'examen clinique, un document a été réalisé, résumant l'ensemble des données d'intérêt sélectionnées pour ce travail, et destiné à être complété au moment de l'admission de l'animal. Une information doit être complétée 24h après : l'aspect des selles, car celles-ci peuvent être altérées au moment de l'admission de l'animal, en raison d'un niveau élevé de stress. Aucune autre information n'est demandée ultérieurement. Le document a été réfléchi pour être assez rapide à remplir (une seule page, cases à cocher, choix explicites), tout en laissant la possibilité de détailler en cas de besoin. Ce document est présenté en Annexe 1.

Des fiches explicatives ont été réalisées, pour évaluer l'état corporel des hérissons (Annexe 2) et réaliser les prélèvements (Annexe 3). Ces fiches ont été placées en évidence dans la salle servant à réaliser l'examen clinique d'admission des animaux.

## **B. Récolte des données cliniques et prélèvements**

### **1. Choix des individus à inclure dans l'étude**

Les individus de cette étude sont des hérissons d'Europe accueillis au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT. Aucune sélection n'est réalisée sur la présence de signes cliniques ou non. Pour des raisons de charge de travail de l'équipe du centre de soins, tous les hérissons répondant aux critères d'inclusions n'ont pas pu être inclus dans l'étude et seul un échantillon aléatoire de ceux-ci l'a été.

### **2. Données d'examen clinique**

Lors de l'admission de l'animal au centre de soins, en plus du dossier clinique complété habituellement et servant ensuite lors de l'hospitalisation, une fiche spécifique est à remplir (Annexe 1). Celle-ci se décompose en trois parties : « Identification », « Commémoratifs » et « Examen clinique d'entrée ». La partie

« Examen clinique d'entrée » est décomposée en trois sous-parties : « Examen à distance », « Examen en main » et « Examen de l'appareil respiratoire ». Les informations ont été sélectionnées pour leur intérêt dans l'investigation de signes cliniques compatibles avec des infections par le virus Influenza D ou EriCov et sont recueillies pour tout hérisson inclus dans l'étude, sans aucune connaissance préalable du statut infectieux et immunologique.

### 3. Evaluation de l'état corporel et indice de Bunnell

#### a) *Mise en boule possible*

Le score de Bunnell est un score créé pour évaluer l'état corporel des hérissons à partir du rapport circonférence latitudinale / circonférence longitudinale, mesuré sur un animal roulé en boule (Figure 21). Un score de Bunnell supérieur ou égal à 0,8 est considéré comme correspondant à un état corporel satisfaisant (Bunnell 2002).



Figure 21 Mesures réalisées sur un hérisson roulé en boule permettant la détermination de l'indice de Bunnell (à gauche : circonférence longitudinale, à droite : circonférence latitudinale)

L'état corporel peut aussi être déterminé en évaluant la forme du hérisson lorsque celui-ci est roulé en boule : plus la forme du hérisson (observée en plaçant le hérisson avec le museau centré et en face de l'observateur) est proche d'une sphère, plus l'état corporel du hérisson est jugé satisfaisant. Un hérisson présentant un

mauvais état corporel (amaigrissement, émaciation) présentera une forme plus ovale, éventuellement creusée au niveau des flancs (Figure 22).



Figure 22 : Hérissons d'Europe roulés en boule présentant des états corporels différents (de gauche à droite : hérisson « en état », hérisson « maigre », hérisson « cachectique ») (Laurent 2018)

Si le hérisson ne se met pas en boule spontanément, une légère stimulation est effectuée afin de provoquer le réflexe de mise en boule.

#### *b) Mise en boule impossible*

Si la mise en boule est impossible, l'état corporel est déterminé par observation de l'animal sur le dos (ou de l'animal déposé sur une plaque en verre, afin de pouvoir observer l'animal par en dessous) à l'aide d'une échelle disponible lors de l'examen qui permet l'évaluation (Annexe 2).

Une note comprise entre 1/5 et 5/5 est attribuée à chaque animal concernant son état corporel, 1/5 correspondant à un animal maigre, émacié ; 3/5 à un état corporel optimal, pour un animal présentant du tissu adipeux sous-cutané, sans excès ; et 5/5 à un animal en surpoids, présentant un excès de tissu adipeux sous-cutané.

#### **4. Statut parasitaire**

Nous avons essayé de compléter ces données avec le statut parasitaire, évalué par des méthodes de coproscopie lors de l'hospitalisation. Ces informations ont été

recueillies à partir des dossiers cliniques des animaux hospitalisés, conservés par le centre de soins.

## 5. Prélèvements

### *a) Fèces*

Les prélèvements de fèces sont réalisés 24h après l'admission de l'animal, car le stress du prélèvement (de l'animal) en milieu naturel et de l'arrivée au centre de soins peut entraîner une altération de l'aspect des fèces les premières heures. Afin de limiter les fèces diarrhéiques dues au stress, ce délai est donc mis en place.

Le matériel nécessaire comprend un écouvillon sec stérile et un microtube stérile de 1,5 mL.

Le bout de l'écouvillon sec stérile est plongé dans une selle assez fraîche et relativement intacte et des petits mouvements de rotations sont réalisés avant de retirer l'écouvillon et de le placer immédiatement dans le tube sec stérile. L'extrémité de l'écouvillon est tordue afin de la casser dans le microtube stérile sans la toucher. Le tube est ensuite fermé et identifié avec le numéro de dossier de l'individu, la date de prélèvement et l'inscription « F » (Fèces).

Le prélèvement est immédiatement placé à -20°C et transféré sous deux semaines à -80°C en attendant les analyses.

### *b) Rinçages nasaux*

Les écouvillons nasaux sont réalisés lors de l'admission ou au plus tard 24 heures après et si une anesthésie est nécessaire.

Le matériel nécessaire comprend une seringue stérile de 1 mL, une tubulure de cathéter 24G, un microtube stérile de 1,5 mL et du NaCl à 0,9 % stérile.

Une anesthésie générale sous isoflurane est réalisée. La tubulure de cathéter montée sur la seringue de 1 mL est introduite dans une des narines du hérisson et 0,5 mL de NaCl 0,9 % stérile y sont instillés. Le liquide est ré-aspiré au maximum et

placé immédiatement dans le microtube stérile, lequel est ensuite fermé et identifié avec le numéro de dossier de l'individu, la date de prélèvement et l'inscription « RN » (Rinçage Nasal).

Le prélèvement est immédiatement placé à -20°C et transféré sous deux semaines à -80°C en attendant les analyses.

### *c) Sérums*

Les prélèvements sanguins sont réalisés lors de l'admission ou au plus tard 24 h après, à l'occasion d'une prise de sang à visée diagnostique.

Le matériel nécessaire comprend une seringue et une aiguille neuves dont les tailles dépendent de la taille de l'individu, un tube sec stérile et un microtube stérile de 1,5 mL.

Une anesthésie générale sous isoflurane est réalisée. La ponction se fait au niveau de la veine cave crâniale, ou à défaut à la veine saphène externe. Un volume d'au maximum 0,7% du poids de l'animal est prélevé puis placé dans le tube sec. Le tube est ensuite placé 30 min à 2 h à température ambiante afin de laisser un caillot se former, puis une centrifugation à 2000 g pendant 10 min est réalisée. Le sérum est enfin prélevé, placé dans le microtube stérile de 1,5 mL qui est ensuite fermé et identifié avec le numéro de dossier de l'individu, la date de prélèvement et l'inscription « S » (Sérum).

Toutes les informations relatives aux prélèvements et à leur gestion sont synthétisées dans l'Annexe 3.

## C. Sérologies influenza D par IHA (World Health Organization 2002)

### 1. Description de la technique d'hémagglutination

Le test d'hémagglutination est une méthode indirecte de quantification de particules virales dans un échantillon.

L'hémagglutinine est la glycoprotéine la plus abondante. Elle est capable de reconnaître et interagir avec l'acide N-acétylneuraminique présent à la surface de la membrane des érythrocytes de certaines espèces animales. Un virus peut ainsi, par l'intermédiaire de ses hémagglutinines se lier à plusieurs érythrocytes (« low-bridge » ou ponts croisés). Réciproquement, un érythrocyte peut se retrouver lié à plusieurs virus. Le résultat est un grand agrégat de globules rouges à ponts croisés qui vont former un réseau au fond du puits dans lequel se trouve le mélange : c'est l'« hémagglutination » des globules rouges. Ainsi, lorsque des globules rouges sont mis en présence de virus influenza, ils ne peuvent plus sédimenter et on observe une couleur homogène dans les puits à la fin de la manipulation. A l'inverse, en l'absence de particule virale, les globules rouges sont en capacité de sédimenter et de former un culot bien défini au fond du puits et visible à l'œil nu. Cette capacité d'hémagglutination dépend également de la concentration virale. A de faibles concentrations, la quantité de ponts croisés réalisés entre globules rouges est faible et une sédimentation est donc possible, avec formation d'un culot. A des concentrations virales trop élevés, les récepteurs des membranes cellulaires sont saturés par leur liaison aux nombreux virus présents, mais avec une probabilité faible qu'un virus puisse lier deux érythrocytes différents. Il n'y a pas de formation de ponts croisés, et donc pas d'hémagglutination des globules rouges.

Le test d'inhibition de l'hémagglutination peut être utilisé pour identifier un virus et ses sous-types, déterminer leur antigénicité et pour l'identification et la quantification des anticorps viraux. Il constitue également le « gold-standard » dans l'identification de la réponse sérologique à l'influenza chez les oiseaux, les humains et les autres mammifères. Lorsqu'on les met en présence, les anticorps présents dans les sérums d'individus positifs à l'influenza D vont se lier aux particules virales, et plus spécifiquement aux sites antigéniques des hémagglutinines présentes sur les virus. Ainsi, lors de l'ajout des globules rouges, ceux-ci ne vont pouvoir se lier aux virus via

leurs hémagglutinines, en raison de la présence des anticorps, qui interfèrent donc dans cette liaison. Ainsi, le phénomène d'hémagglutination ne peut avoir lieu : on parle donc d'« inhibition » de l'hémagglutination. Lors de la présence d'anticorps anti-IDV, on observera donc une sédimentation, avec formation d'un culot.

Néanmoins, il est nécessaire, lorsque l'on réalise ce test de s'assurer que des inhibiteurs non spécifiques n'interfèrent pas avec la réaction, en se liant aux hémagglutinines virales et entraînant donc une inhibition non spécifique, ce qui fausse l'interprétation finale (présence de faux positifs). De tels inhibiteurs sont présents dans le sérum, dont ils constituent un composant sous forme de résidus d'acides sialiques, mimant les récepteurs des globules rouges et entrant donc en compétition avec ceux-ci pour la fixation aux hémagglutinines virales. Afin de s'affranchir de ce problème et détruire ces inhibiteurs non spécifiques, les sérums ont été traités avec du RDE (Receptor Destroying Enzyme), une enzyme détruisant les récepteurs à l'acide sialique.

Par ailleurs, des protéines agglutinantes présentes dans le sérum peuvent entraîner une hémagglutination des globules rouges et donc induire des faux négatifs. Ce phénomène peut être mis en évidence par le sérum contrôle positif, pour lequel une inhibition de l'hémagglutination est forcément attendue. Ces protéines agglutinantes peuvent être éliminées par une étape dite d'hémabsorption des sérums, durant laquelle des globules rouges sont ajoutés aux sérums. Après incubation et centrifugation, les sérums hémabsorbés sont récupérés.

## **2. Etape de pré-traitement : traitement des sérums avec une enzyme destructrice des récepteurs à l'acide sialique**

Pour chaque sérum, 50  $\mu$ L sont aliquotés, puis 150  $\mu$ L de RDE (Receptor Destroying Enzyme) sont ajoutés dans chaque puits. Les sérums sont laissés à incuber au moins 12h à 37°C, température à laquelle l'enzyme est active, puis placés 30 min dans un bain marie à 37°C, afin d'inactiver le RDE. Du tampon phosphate salin (PBS) (300  $\mu$ L) est ensuite ajouté. Le sérum est à ce stade dilué 10 fois.

### **3. Préparation des globules rouges**

Du sang est prélevé avec un anticoagulant sur un poulet et placé dans un tube de 15 mL. Le tube est complété avec une solution tampon (PBS), puis centrifugé 5 min à 1000 g (étape du 1<sup>er</sup> lavage).

Le surnageant est prélevé et jeté et le tube de nouveau complété avec du PBS. Après mélange, le tube est centrifugé une deuxième fois pendant 5 min à 2000 rpm (étape du 2<sup>ème</sup> lavage).

Le surnageant est prélevé et jeté et le tube de nouveau complété avec du PBS. Après mélange, le tube est centrifugé une troisième fois pendant 15 min à 2000 rpm (étape du 3<sup>ème</sup> lavage).

Le surnageant est prélevé et éliminé. La solution de globules rouges est « pure ». Une solution de globules rouges à 1% est préparée à partir de celle-ci (500 µL de globules rouges dans 50 mL de PBS pour 10 plaques).

### **4. Etape d'hémabsorption des sérums**

Sont ajoutés aux sérums 10 µL de sang lavé, puis ceux-ci sont incubés 1h à 4°C sous agitation douce. Après 10 min de centrifugation à 1000 g, le surnageant est récupéré et déposé dans un nouveau tube propre, identifié pour chaque sérum.

### **5. Etape de calibration des souches de virus**

Les souches utilisées sont les souches D/bovine/Nebraska/9-5/2012 (D/Neb), fournie par B.M. Hause de la Kansas State University, KS, USA (Collin et al. 2014) et disponible à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse et D/bovine/France/5920/2014 (D/5920) car c'est une souche présente en France, isolée à partir d'un fragment de poumons d'un veau français atteint de bronchopneumonie (Salem et al. 2019).

Dans une plaque 96 puits ronds à fonds en V lue verticalement (voir la Figure 23), 50µL de PBS sont déposés dans les puits H2 à H12, G2 à G12 et F2 à F12, 100 µL de l'antigène de souche 5920 sont disposés dans le puits H1 100 µL de l'antigène de

souche Nebraska dans le puits G1 et 100  $\mu$ L de PBS dans le puits F1. Des dilutions au demi sont réalisées depuis les puits H1/G1/F1 vers les puits H12/G12/F12 en prélevant à chaque fois 50 $\mu$ L des puits n vers les puits n+1 et en changeant les cônes utilisés pour prélever entre chaque puits afin d'éviter de fausser la dilution. Enfin, 50 $\mu$ L de globules rouges sont ajoutés dans chaque puits utilisé et le tout est laissé à incuber pendant 30 min à température ambiante. Le titre de l'antigène est alors lu. La colonne F constitue le contrôle : aucune hémagglutination ne doit avoir lieu.

Le titre lu est ensuite divisé par 8 pour obtenir le facteur de dilution de l'antigène à appliquer afin d'obtenir un titre en antigène de 8 UHA/50 $\mu$ L (Unité Hémagglutinante). Un nouveau titrage de l'antigène est réalisé suite à cette dilution, toujours par hémagglutination (« back titration »).

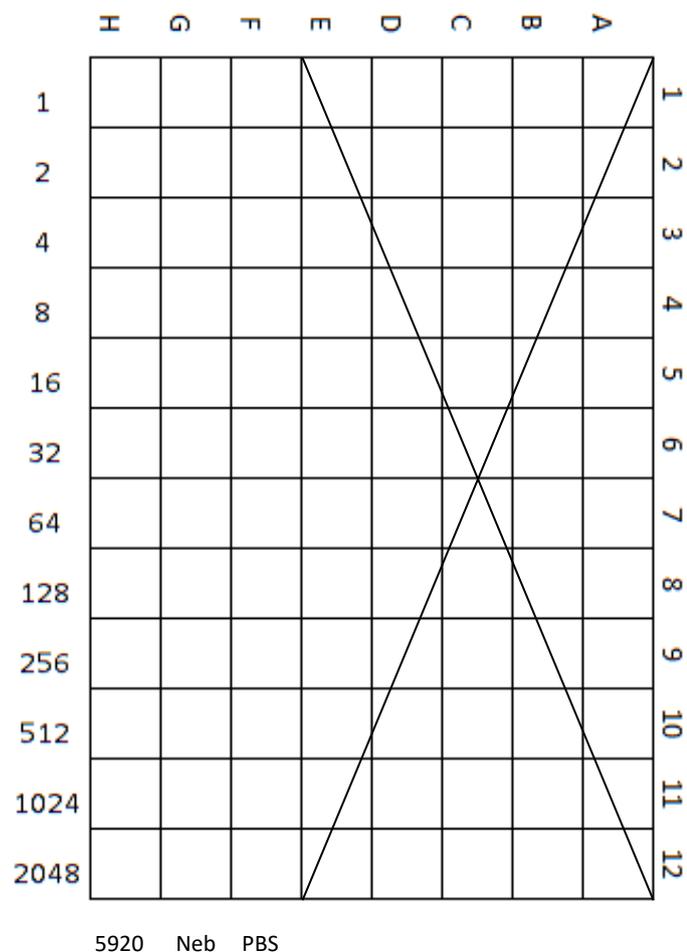


Figure 23 : Schéma de l'organisation des plaques pour l'étape de calibration des souches

## 6. Test des 4 UHA

Cette étape sert à vérifier le titre de l'antigène dilué (« back titration »).

Dans une plaque 96 puits disposée horizontalement, 50 µL de PBS sont dispensés dans chacun des puits A1 à H2, puis 50 µL de l'antigène dilué précédemment à 4 UA/25 µL sont dispensés dans les puits A1 et A2. Des dilutions au demi sont réalisées verticalement, des puits A aux puits H. Puis 50µL de globules rouges sont ajoutés dans chaque puits utilisé et le tout est laissé à incuber pendant 30 min à température ambiante. Le titre de l'antigène est ensuite lu, en considérant que le test est valide si deux à quatre puits ont hémagglutiné. Trois puits sont censés hémagglutiner (8 UA dans 50 µL).

## 7. Test d'inhibition de l'hémagglutination

Dans une nouvelle plaque, 25 µL de PBS sont disposés dans les rangées B à H, sur les colonnes 1 à 12 (voir la Figure 24)

Pour chaque sérum à tester, 50 µL des sérums pré-traités sont disposés dans la rangée A, un sérum différent par colonne. L'opération est réalisée pour deux séries de plaques différentes, car deux souches différentes sont testées pour chaque sérum (5920 et Nebraska). Le témoin négatif est constitué dans les deux cas de 50 µL de virus influenza D et le témoin positif du sérum d'un alpaga positif à l'une des deux souches. Des dilutions au demi sont réalisées depuis les puits A vers les puits H, en prélevant à chaque fois 25 µL des puits A vers les puits B, puis 25 µL des puits B vers les puits C etc. et en changeant les cônes utilisés pour prélever entre chaque puits afin d'éviter de fausser la dilution. Ensuite, 25 µL d'antigène calibré à 8 UHA/50 µL sont ajoutés dans chaque puits, puis le tout est laissé à incuber pendant 30 min à température ambiante. Enfin, 50 µL de globules rouges sont ajoutés à chaque puits, puis le tout est laissé à incuber pendant 30 min à température ambiante. La lecture est réalisée immédiatement à la fin de cette incubation.

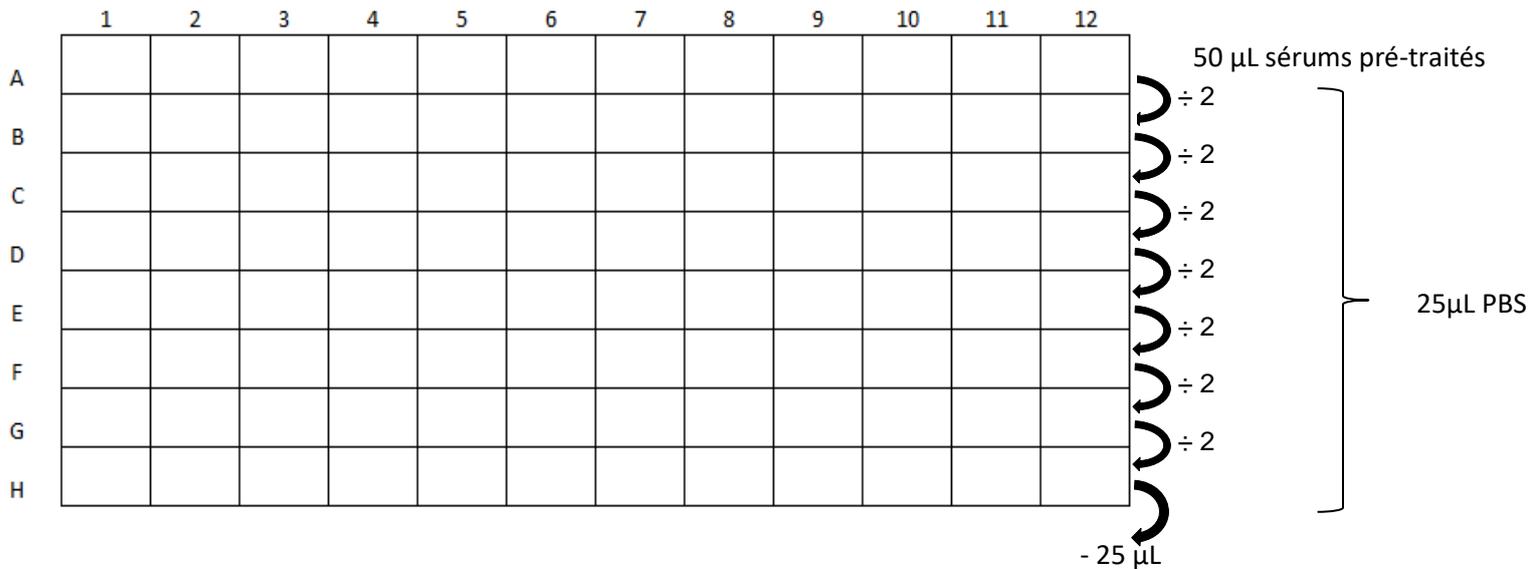


Figure 24 : Schéma de l'organisation des plaques pour le test d'inhibition de l'hémagglutination

## 8. Lecture

La lecture des puits est réalisée immédiatement après la dernière étape d'incubation. Les puits où l'hémagglutination a eu lieu présentent une turbidité homogène. Lors de l'inhibition de l'hémagglutination, les globules rouges ont pu sédimenter et ont formé un culot, visible et formant un bouton rouge dans le puits (en raison de la forme en V de celui-ci). Afin d'assurer une lecture correcte, la plaque est inclinée à la verticale. Dans les puits où l'hémagglutination n'a pas eu lieu, le culot de globules rouges formé va alors tomber, formant une larme bien visible et dont la vitesse de chute est comparable à celle visible pour le témoin positif. Le titre en anticorps est lu, en considérant qu'il correspond à l'inverse de la dilution la plus élevée permettant encore l'inhibition de l'hémagglutination.

### D. Extraction d'ARN

Le protocole d'extraction de l'ARN des prélèvements fécaux et nasaux est présenté en Annexe 4. Les extractions ont été réalisées avec le kit ID GENE™ MAG FAST Extraction Kit, selon les indications du fournisseur.

Une étape préalable de mise en solution des échantillons a été réalisée la veille. La quantité de rinçage nasal a été mesurée et complétée avec du PBS (lorsque nécessaire), pour obtenir un volume total de 500 µL pour chaque échantillon. Les prélèvements fécaux ont été écouvillonnés et l'écouvillon placé dans 500 µL de PBS. Le tout a été placé à 4°C en attendant les extractions.

## **E. Détection des ARN viraux**

### **1. Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La PCR est une technique de biologie moléculaire dont le principe est l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN in vitro, à partir d'un mélange de séquences d'ADN ou d'un génome complet. La technique permet de démultiplier le nombre de copies d'ADN grâce à une ADN polymérase. Elle est très employée dans le diagnostic de maladies génétiques et infectieuses.

Pour réaliser une réaction PCR, on utilise quatre composants : deux amorces d'ADN (complémentaires des extrémités du fragment d'ADN à amplifier et permettant de délimiter la séquence d'intérêt), une ADN polymérase thermostable, des nucléotides (ou dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et de l'ADN matrice. Le tout se déroule dans une solution tampon permettant de déterminer les bonnes conditions de salinité et de pH.

La technique consiste en une succession de cycles se déroulant au sein d'un thermocycleur qui permet de modifier automatiquement la température correspondant aux différentes étapes des cycles. Ces cycles sont constitués de trois étapes principales :

- Dénaturation : celle-ci a lieu à 94°C. La dénaturation est en effet thermique : la température entraîne la séparation des liaisons hydrogènes entre bases, ce qui a pour conséquence que l'ADN double brin se sépare et devient donc simple brin. Lors du premier cycle, cette étape permet également d'activer les Taq polymérases « Hot Start », d'éliminer les structures secondaires présentes dans le génome et de dénaturer les enzymes telles que la transcriptase inverse.

- Hybridation amorces/ADN simple brin (également désigné sous le nom d'« annelage ») : celle-ci se déroule à des températures plus basses, entre 45 et 60°C (la température exacte dépend des amorces elles-mêmes et de leur  $T_m$ , la température de fusion, c'est-à-dire la température à laquelle 50% des molécules sont sous forme double brin. Une température inférieure de 5°C à la  $T_m$  des amorces est requise en général). Les amorces, présentes en excès, s'hybrident avec le génome d'intérêt, par complémentarité des bases. Le fait que les amorces soient présentes en excès permet de diminuer les risques que les brins précédemment séparés ne se ré-apparient.
- Elongation : après passage à 72°C, la polymérisation des brins complémentaires par l'ADN polymérase à lieu sur les extrémités 3'OH des amorces vers les extrémités 5'P.

Ces cycles sont donc répétés plusieurs fois (en général 30 à 40 cycles) et les deux brins d'ADN sont copiés simultanément, ce qui permet une amplification importante de la séquence d'ADN ciblée. En théorie, après  $n$  cycles, les quantités d'ADN initiales sont multipliées par  $2^n$ .

Cette réaction PCR doit enfin être analysée, afin de confirmer que le fragment cible a bien été amplifié/était bien présent dans l'échantillon. Cela peut être réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose, sur lequel les molécules d'ADN vont migrer plus ou moins vite en fonction de leur taille et donc pouvoir être identifiés grâce à ce critère (Larzul 1989; Canene-Adams 2013).

## 2. RT-PCR

Lorsque les génomes se présentent sous forme d'ARN (ce qui est le cas des virus influenza et EriCov), une étape de transcription inverse est nécessaire. La transcriptase inverse (ADN polymérase ARN-dépendante) permet la transcription de l'ARN en ADN. L'ADN peut ensuite être lui-même amplifié, ainsi que présenté précédemment (voir IV.E.1).

### 3. qPCR

#### a) Principe

La qPCR, ou PCR quantitative, est une technique permettant de quantifier en temps réel l'amplification, ce qui permet de déterminer la quantité de matrice initiale. En effet, dans le cas de la PCR classique, l'amplification finale présente une variation, phénomène dû entre autres à une quantité de réactifs limitée, à une perte d'efficacité de l'étape de dénaturation, à une perte d'efficacité des polymérases, etc. La qPCR permet donc de suivre l'amplification en temps réel, et donc notamment de déterminer la phase d'inflexion de la courbe représentant la quantité d'ADN présente. Cette phase est beaucoup plus reproductible que la phase de plateau et est déterminée par la quantité de matrice initiale : plus elle se produit tôt, plus la quantité de matrice initiale est importante.

La quantité d'ADN est classiquement suivie par mesure de la fluorescence émise, celle-ci augmentant avec la quantité d'ADN. Pour mesurer la fluorescence, plusieurs méthodes existent, mais nous ne décrivons que la méthode TaqMan™, employée dans cette étude.

#### b) Méthode TaqMan™ (Navarro et al. 2015)

La méthode TaqMan™ est une méthode employant une sonde d'hydrolyse (TaqMan™). Le mécanisme d'action repose donc en premier lieu sur l'activité exonucléase de la Taq polymérase.

La sonde TaqMan™ est constituée d'une séquence d'oligonucléotides présentant à l'extrémité 5' un fluorochrome attaché par une liaison covalente et à l'extrémité 3' un extincteur (« Quencher »), capable d'absorber la fluorescence émise par le fluorochrome sans en émettre à son tour, le tout s'il est assez proche du fluorochrome (donc sur une sonde d'assez petite taille). Cette sonde est conçue pour être capable de s'hybrider sur une région spécifique de l'ADN, entre les deux amorces utilisées pour la PCR, et son extrémité 3' est bloquée par l'ajout d'un phosphate au niveau du groupement OH, ce qui empêche l'action de la Taq

polymérase. La sonde ne peut donc pas servir d'amorce et aucune amplification n'aura lieu à cette extrémité.

Au début de la réaction, lorsque la sonde est encore intacte, la fluorescence émise par le fluorochrome donneur est « éteinte » par le groupement extincteur (un signal résiduel peut cependant être détecté).

Au cours de l'amplification, l'ADN polymérase dégrade la sonde pour continuer la synthèse du génome (activité exonucléase en 5'-3' / détachement de la sonde du brin d'ADN) et cela induit un détachement du fluorochrome et du groupement extincteur. La fluorescence n'est plus « éteinte » par l'extincteur et au fur et à mesure de la réaction d'amplification, cette fluorescence augmente, proportionnelle à la quantité d'ADN présente. La mesure de la fluorescence permet ensuite d'établir une courbe de la fluorescence émise, présentant une phase d'inflexion se produisant d'autant plus tôt que la quantité initiale d'ADN est importante. Cela permet de remonter à la quantité initiale de matériel génétique.

#### 4. RT-qPCR influenza D

Les ARN extraits ont été analysés par RT-qPCR avec le kit Quantinova Probe™ RT-PCR (Qiagen), selon les instructions du fournisseur. Ce kit emploie la chimie Taqman™ présentée précédemment. Les amorces et les sondes sont décrites dans le Tableau 1. C'est le gène de la polymérase PB1 qui est visé par ces amorces, gène hautement conservé au sein des virus influenza (voir II.B).

Tableau 1 : Amorces et sonde utilisées dans l'amplification par RT-qPCR pour le virus de l'influenza D

D/OK Forw	5'-GCT GTT TGC AAG TTG ATG GG-3'
D/OK Rev	5'-TGA AAG CAG GTA ACT CCA AGG-3'
D/OK Probe	54-FAM-TTC AGG CAA GCA CCC GTA GGA TT-TAMRA-3'

La composition de chaque mélange pour réaliser la réaction de RT-qPCR est détaillée dans le Tableau 2, pour un volume total de 10 µL.

**Tableau 2 : Composition de chaque mélange utilisé pour la réaction de RT-qPCR influenza D**

Composants	Quantité (µL)
H2O	1,1
Mastermix 2X Quantinova Probe	5,0
D/OK-F 10µM	0,8
D/OK-R 10µM	0,8
D/OK-Probe 10 µM	0,2
RT Mix	0,1
ARN	2,0

L'analyse se déroule dans le thermocycleur (LightCycler 96). Les conditions de RT-qPCR sont résumées dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Conditions de la réaction de RT-qPCR réalisées par le thermocycleur LightCycler 96**

Étape	Température	Durée	Remarques
Préincubation	45°C	10 min	
Préincubation	95°C	5 min	
Amplification	95°C	5 sec	X 40 pour les 2 étapes combinées d'amplification (avec lecture de fluorescence)
Amplification	60°C	30 sec	

Les échantillons présentant une valeur de Ct supérieure à 40 (cycles) sont considérés comme négatif.

## 5. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons présentant des courbes douteuses à l'issue de la RT-qPCR influenza (zone d'inflexion non définie précisément, amplification faible, etc.) ont été testés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de confirmer ou non l'amplification, ainsi que les échantillons positifs par rapport à la taille attendue pour la séquence ciblée.

Le gel d'électrophorèse est préparé à 2% d'agarose, avec du TBE (tampon Tris Borate EDTA).

## 6. RT-PCR EriCoV

Les recherches du virus EriCoV ont été réalisées par l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy) à partir des échantillons obtenus par extraction de l'ARN.

L'amplification porte sur un fragment de 438 pb du gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante partagés par la plupart des coronavirus (Gouilh et al. 2011). Les amorces sont décrites dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Amorces et sondes utilisées dans l'amplification par RT-qPCR pour EriCoV

PanCoV pol 15197 (forward)	5'-GGTTGGGAYTAYCCWAARTGTGA
PanCoV pol 15635 (reverse)	CCATCRTCMGAHARAATCATCATA

La RT-PCR conventionnelle a été réalisée en une seule étape (synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN total extrait, suivie d'une PCR par contact dans un seul tube).

La RT-PCR a été réalisée dans un volume final de 20 µL contenant 5 µL d'ARN dilué dans du tampon TE (dilution 1/10), 10 µL de 2X RT-PCR tampon (Go Taq ENV, Promega, France), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4 µL de mélange enzymatique Go Script (Promega, France) et 1,0 µL des amorces avec une concentration finale de 1,4 µM. Les cycles de RT-PCR ont été réalisés comme suit : un cycle de transcription inverse à 45° pendant 60 min, la dénaturation pendant 2 min à 94°C, suivi de 9 cycles de 15 sec à 95°C, une température d'hybridation de 60° à 45°C pendant 45 sec (avec diminution de cette température de 2°C par cycle), 90 sec à 72°C, puis 40 cycles de 15 sec à 95°C, 45 sec à 50°C et 90 sec à 72°C et suivi d'une étape finale d'extension de 10 min à 72°C. (Protocole transmis par E. Picard-Meyer et M. Wasniewski, ANSES).

Les résultats ont été confirmés par électrophorèse sur gel d'agarose.

## **F. Analyses statistiques**

### *a) Analyse descriptive*

Une analyse descriptive est d'abord réalisée afin de connaître la distribution de chaque variable. Les prévalences réelles ainsi que les intervalles de confiance à 95% sont calculés à l'aide du site Epitools (© Ausvet 2022).

### *b) Questions posées*

Concernant les tests de sérologie, nous cherchons à déterminer s'il existe une association entre la séropositivité et le statut physiologique de l'animal (âge, sexe), ainsi qu'avec la période pré-hibernatoire et hibernatoire/post-hibernatoire. Nous nous intéressons également à l'association entre présence de signes cliniques respiratoires et séropositivité des individus.

Concernant les tests virologiques influenza D, nous cherchons à déterminer s'il existe une association entre l'infection par ce virus et le statut physiologique de

l'animal, la période pré-hibernatoire et hibernatoire/post-hibernatoire et la présence de signes cliniques, notamment respiratoires.

Concernant les tests virologiques EriCov, nous cherchons à déterminer s'il existe une association entre l'infection par ce virus et le statut physiologique de l'animal, la période pré-hibernatoire et hibernatoire/post-hibernatoire et la présence de signes respiratoires ou digestifs.

### *c) Sélection des variables d'intérêt*

Nous réalisons donc dans un premier temps une analyse bivariée, avec calculs de tests de Fisher afin de sélectionner les variables d'intérêt, dans le but de pouvoir ensuite réaliser une analyse multivariée nous permettant de répondre à ces questions d'association.

Pour ces tests de Fisher réalisés afin de tester les associations entre différents paramètres, des p-value inférieures à 0,2 (seuil de significativité de 20%) sont considérées comme significatives et permettent de sélectionner les variables qui seront incluses dans l'analyse multivariée.

### *d) Analyse multivariée*

Si des variables peuvent être sélectionnées lors de l'analyse bivariée, l'analyse multivariée se fera sous la forme d'une régression logistique.

Si l'analyse multivariée n'est pas envisageable (absence de données sélectionnables au seuil de 20 % lors de l'analyse bivariée), nous ne considérerons que l'analyse bivariée, avec un seuil de significativité de 5 % ( $p < 0,05$ ).

Le logiciel R (version 3.4.3) est utilisé pour toute l'analyse statistique.

## **G. Cartes de répartition**

Toutes les cartes ont été réalisées avec le logiciel QGIS (version 3.22 Białowieża).

## **V. Résultats**

### **A. Période de récolte des données et nombre de hérissons**

La période de récolte des données s'étend du 01/01/21 au 25/01/22. Durant cette période, et pour des raisons de charge de travail, seules les données cliniques de 167 hérissons ont été recueillies (soit 32% des hérissons accueillis au centre de soins de l'ENVT cette année-là). Certaines données ne sont cependant pas complètes, en raison d'impossibilités techniques inhérentes à la manipulation de l'animal et de sa coopération, l'animal n'étant pas systématiquement anesthésié lors d'un examen clinique.

Parmi ces 167 individus, au moins un des trois prélèvements envisagés (fèces, écouvillons nasaux, sérum) a été collecté dans un délai acceptable pour 108 d'entre eux. Nous nous intéresserons donc uniquement à ces 108 individus par la suite.

### **B. Identification**

Le Tableau 5 synthétise les données de sexe et d'âge des individus inclus dans l'étude.

Un jeune non-autonome est un individu incapable de se nourrir seul, dépendant encore de la mère pour cela. Un jeune autonome est un individu capable de se nourrir et se déplacer seul, mais n'étant pas encore développé comme un adulte. Un adulte est capable de se nourrir seul, avec un développement physique achevé et arrivé à sa maturité sexuelle.

Tableau 5 : Tableau des catégories d'âge et de sexe des hérissons étudiés

	Mâle	Femelle	Non renseigné	Total
Jeune non-autonome	1	2	1	4
Jeune autonome	18	16	8	42
Adulte	29	24	10	63
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>42</b>	<b>19</b>	<b>109</b>

## C. Commémoratifs

### 1. Date d'admission dans le centre de soins

Les données relatives aux dates d'admission des hérissons sont illustrées sur la Figure 25.

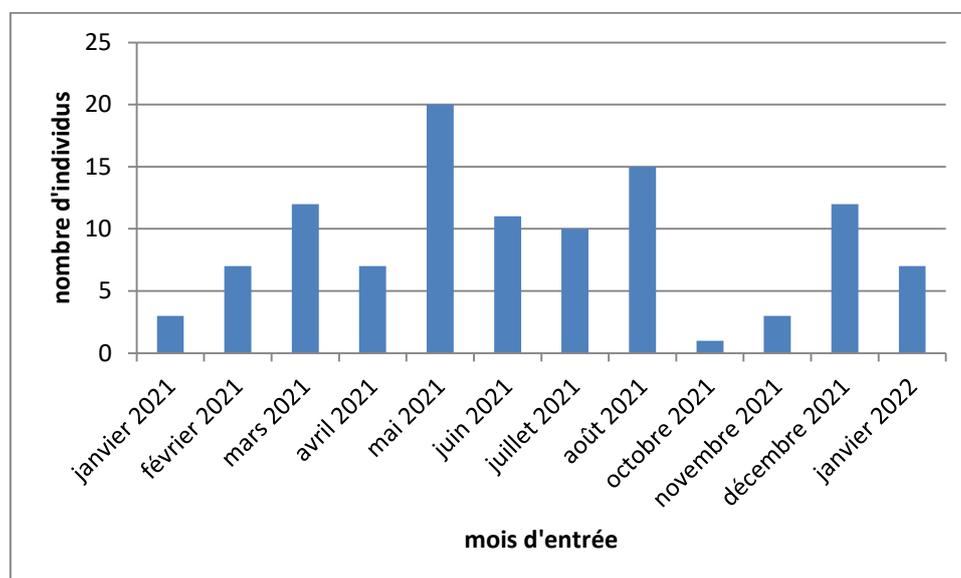


Figure 25 : Répartition par mois d'arrivée au centre de soins des hérissons inclus dans l'étude

### 2. Lieu de découverte des hérissons

Les hérissons inclus dans l'étude proviennent de quatre départements différents : la Haute-Garonne (95), le Gers (2), le Tarn (7) et le Tarn-et-Garonne (2). La

provenance de deux hérissons est inconnue. Ces provenances sont illustrées dans les Figure 27, Figure 28, Figure 29 et Figure 34.

#### **D. Etat de vigilance**

Une note a été attribuée aux différents paramètres évaluant l'état de vigilance, afin d'établir une description globale de l'état de vigilance et de simplifier les analyses. Pour les critères « marche » et « réagit à une stimulation », une note de 1 a été attribuée en cas de réponse négative, 0 sinon. Pour le critère « décubitus », une note de 1 a été attribuée en cas de réponse positive. Pour le critère « se met en boule », une note de 0 a été attribuée si le hérisson se met en boule spontanément, 1 si le hérisson se met en boule après stimulation, 2 si le hérisson ne se met pas en boule, considérant que la mise en boule est le critère le plus révélateur de l'état de vigilance, un hérisson étant supposé se mettre en boule efficacement et spontanément en cas de danger, car cet acte constitue leur principal mode de défense (voir I.H.4) Les trois autres critères précédemment évoqués permettent surtout d'affiner la note entre une vigilance « non altérée » et « moyennement altérée ». La somme de ces notes est réalisée pour obtenir l'état de vigilance globale. Une vigilance « non altérée » correspond à une note de 0 ; une vigilance « moyennement altérée » correspond à une note de 1 ou 2 ; une vigilance « gravement altérée » correspond à une note supérieure ou égale à 3.

Pour les analyses statistiques, nous considérons deux catégories : « non-altérée »/« moyennement altérée » et « gravement altérée ».

Les données relatives à l'état de vigilance sont complètes pour 107 individus. Un individu ne présente aucune donnée relative à l'état de vigilance et n'est donc pas analysable sur ce critère.

Les résultats descriptifs de chaque variable sont présentés sous forme d'histogrammes (Annexe 5, Annexe 6, Annexe 7, Annexe 8). La synthèse de ces résultats, c'est-à-dire la note globale correspondant à l'état de vigilance pour chaque hérisson, est présentée en Annexe 9.

Le Tableau 6 donne le détail des notes attribuées aux individus classés dans les différentes catégories de l'état de vigilance.

**Tableau 6 : Détail des notes attribuées aux individus des différentes classes de l'état de vigilance**

Vigilance	Nombre de hérissons	Détail
Non altérée	32	32 individus ne présentent aucun signe
Moyennement altérée	43	29 individus qui présentent un seul signe dont 7 qui ne marchent pas, 3 en décubitus, 4 ne se mettant pas en boule, 14 ne se mettant en boule qu'après stimulation et 1 ne réagissant pas du tout aux stimulations
		14 individus qui présentent deux signes dont 7 en décubitus et ne marchant pas, 4 en décubitus et ne se mettant en boule qu'après stimulation et 3 ne marchant pas et ne se mettant en boule qu'après stimulation
Gravement altérée	32	5 individus qui présentent 2 signes dont 1 individu qui ne marche pas et ne se met pas en boule, 1 individu qui ne se met pas en boule et ne réagit pas du tout aux stimulations, 3 individus en décubitus et ne se mettant pas en boule
		18 individus qui présentent 3 signes dont 2 qui ne marchent pas, ne se mettent pas en boule et ne réagissent pas du tout aux stimulations, 2 en décubitus, ne se mettent pas en boule et ne réagissant pas du tout aux stimulations, 9 en décubitus, ne marchant pas et ne se mettant en boule qu'après stimulation, 4 en décubitus, ne marchant pas et ne se mettant pas en boule et 1 individu en décubitus, ne marchant pas et ne réagissant pas du tout aux stimulations
		9 individus qui présentent 4 signes (sans mise en boule)

## E. Aspect des fèces

Une note a été attribuée aux deux paramètres permettant d'évaluer l'aspect des fèces (consistance et couleur). Concernant la consistance, une note de 0 est attribuée pour un aspect « normal » (selle bien moulée, non liquide ni sèche lors de son émission ou peu après), 1 pour une consistance « molle » ou « liquide ». Concernant la couleur, une note de 0 est attribuée pour une couleur « normale » (marron foncé), 1 sinon.

Les données relatives à l'aspect des fèces sont complètes pour 43 individus et sont manquantes pour 65.

Les résultats descriptifs de ces deux variables sont présentés sous forme d'histogrammes (Annexe 10, Annexe 11).

Les variables transformées établies à partir de ces résultats (notes de 0 et 1) sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

**Tableau 7 : Répartition des variables Couleur et Consistance transformées et proportions associées**

		Couleur		
		0	1	NE
Consistance	0	27 (25 %)	4 (3,7 %)	0 (0 %)
	1	5 (4,6 %)	7 (6,5 %)	0 (0 %)
	NE	1 (0,9 %)	1 (0,9 %)	63 (58.3 %)

## **F. Poids et score corporel**

Seule la note d'état corporel a finalement été conservée, celle-ci ayant été relevée sur tous les hérissons, contrairement à l'indice de Bunnell. Pour les analyses statistiques, nous considérons deux catégories : « inférieur à 3/5 » (états maigres et émaciés) et « supérieur ou égal à 3/5 » (état normal et embonpoint).

La répartition des hérissons selon leur état corporel est présentée en Figure 26. Un score corporel avait été évalué à « 2,5 », ce qui ne correspondait pas à une des propositions de la fiche d'examen clinique. Cependant, cette donnée est présentée telle quelle dans les résultats descriptifs.

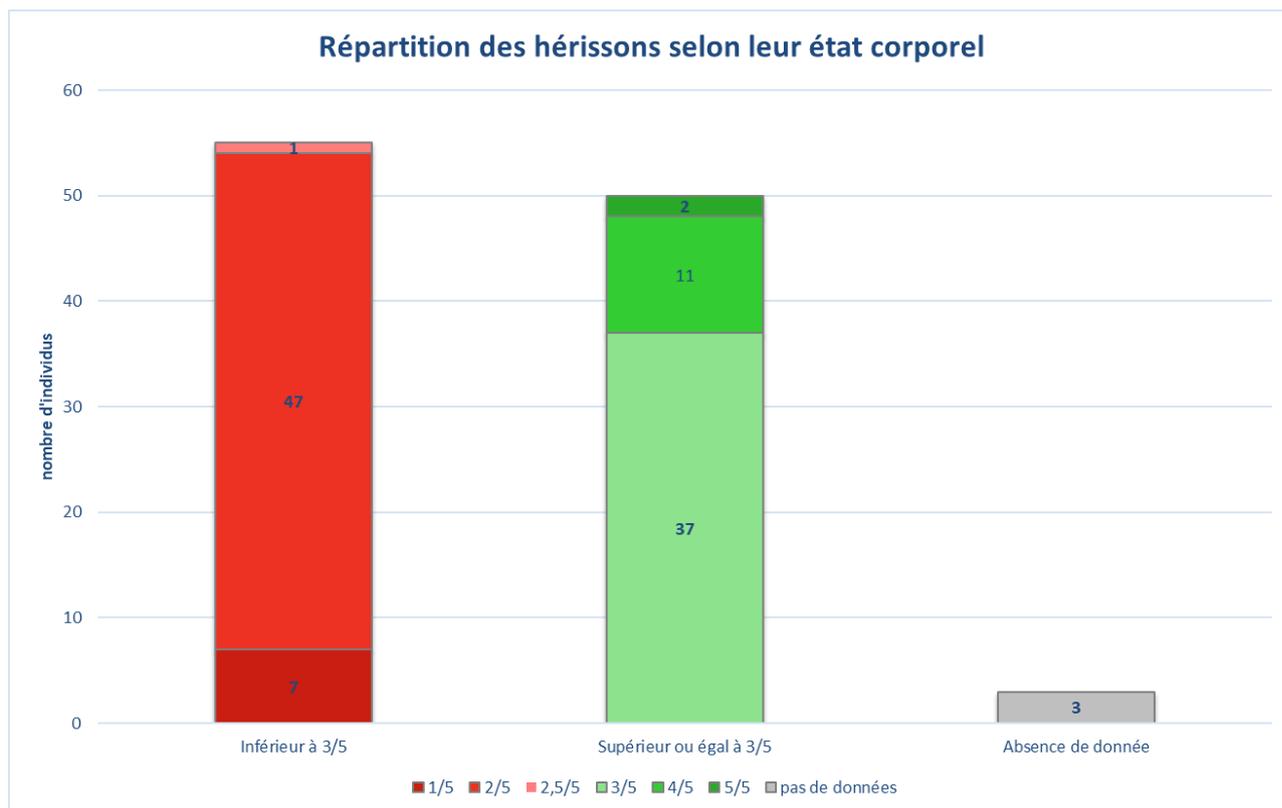


Figure 26 : Répartition des hérissons selon leur état corporel

## G. Examen de l'appareil respiratoire

L'examen de l'appareil respiratoire a pu être réalisé sur tous les individus. Pour les analyses statistiques, ces résultats ont été divisés en deux catégories, « présence » et « absence » de signes respiratoires (toux, éternuements, sifflements, bruits respiratoires amplifiés) ou de jetage (oculaire et/ ou nasal).

Le détail des données d'examen clinique de l'appareil respiratoire est présenté dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Détail des données d'examen clinique de l'appareil respiratoire

Absence	Présence		
	Jetage seul	Signes respiratoires	Signes respiratoires et jetage
Aucun signe			
77	5	14	12

## H. Statut parasitaire

Le statut parasitaire n'a pas pu être pris en compte dans cette étude, en raison d'un nombre de données manquantes trop important.

## I. Prélèvements

Un prélèvement de sang a pu être réalisé sur 38 hérissons, dans le cadre d'une prise de sang diagnostique (cf IV.A.3) ou d'une euthanasie.

Un écouvillon nasal a pu être réalisé sur 83 hérissons, dans le cadre d'une anesthésie diagnostique ou thérapeutique (voir IV.A.3).

Un prélèvement fécal a pu être réalisé sur 79 hérissons.

Le détail des individus par nombre et type de prélèvements est présenté dans le Tableau 9.

**Tableau 9 : Répartition des individus par nombre et type de prélèvements réalisés**

Fèces	Sérum	RN	Sérum + RN	Sérum + Fèces	Fèces + RN	Sérum + RN + Fèces
23	2	14	13	0	33	23

## J. Résultats de PCR et sérologies

L'Annexe 12 récapitule les résultats des sérologies et des PCR réalisées sur les différents prélèvements des 108 hérissons conservés dans cette étude. Nous détaillerons et analyserons ces résultats dans la suite. Le Tableau 10 synthétise ces résultats.

Tableau 10 : Synthèse des résultats de tests IHA et PCR réalisés

	Effectif analysé	Positif	Prévalence (avec intervalle de confiance)
<b>Sérologie IDV</b>	38	D/5920 : 11	0.2895 [0.17-0.4476]
		D/Neb : 10	0.2632 [0.1497-0.4201]
<b>PCR IDV</b> (prélèvements fécaux)	79	1	0.0127 [0.0022-0.0683]
<b>PCR EriCov</b> (prélèvements fécaux)	79	38	0.481 [0.3743-0.5895]

## K. Sérologie influenza D par inhibition de l'hémagglutination

### 1. Description des résultats

Trente-huit sérums de hérissons arrivés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT entre le 09/03/21 et le 26/11/21 et conservés à -80°C ont servi pour réaliser des sérologies influenza D. Les individus ont été prélevés dans des cadres diagnostiques sans relation avec l'influenza D et du sérum a pu être conservé pour réaliser ces sérologies. L'intégralité des sérums provenaient de la région Occitanie, deux du Gers, deux du Tarn, un sérum du Tarn-et-Garonne et tous les autres (33) du département de la Haute-Garonne.

Tableau 11 : Résultats des tests d'inhibition de l'hémagglutination pour les souches D/Neb et D/5920

(<1:10 = négatif ; 1:10 ou 1:20 = positif)

		D/5920		
		<1:10	1:10	1:20
D/Neb	<1:10	25	3	
	1:10	2	4	1
	1:20			3

Le Tableau 11 résume les résultats obtenus pour les 38 sérums. On peut constater que les résultats obtenus pour les deux souches sont assez similaires.

Les titres en anticorps positifs sont compris entre 1:10 et 1:20. ce qui est bien plus faible que les titres précédemment mis en évidence sur des hérissons, allant jusqu'à 1:640 (Oliva 2019).

## 2. Séroprévalences

Les titres en anticorps supérieurs ou égaux à 1 :10 sont considérés comme positifs (Saegerman et al. 2021). Les séroprévalences apparentes sont de 26 % pour la souche D/Neb et 29 % pour la souche D/5920.

En se basant sur les sensibilités et spécificités déterminées dans l'étude de Saegerman et al. (Saegerman et al. 2021) pour les souches D/Neb et D/5920 utilisées dans le cadre de test d'IHA (Tableau 12), les séroprévalences réelles peuvent être calculées, ainsi que les intervalles de confiance, à l'aide du site Epitools (©Ausvet 2022).

**Tableau 12 : Sensibilités et spécificités des tests d'IHA déterminées pour les souches D/Neb et D/5920 (Saegerman et al. 2021)**

	D/Neb	D/5920
Sensibilité	73.20 %	68.04 %
Spécificité	94.17 %	96.12 %

On obtient ainsi les résultats suivants, exposés dans les Tableau 13 et Tableau 14 :

Tableau 13 : Séroprévalences apparentes et réelles (en pourcentages) et intervalles de confiance associés des résultats des tests d'IHA pour la souche D/Neb (IC = Intervalle de Confiance)

<b>Souche D/Neb</b>	<b>Estimation</b>	<b>Borne inférieure de l'IC à 95%</b>	<b>Borne supérieure de l'IC à 95%</b>
<b>Prévalence apparente (IC Wilson)</b>	26 %	15 %	42 %
<b>Prévalence réelle (IC Blaker)</b>	30 %	14 %	54 %

Tableau 14 : Séroprévalences apparentes et réelles (en pourcentages) et intervalles de confiance associés des résultats des tests d'IHA pour la souche D/5920 (IC = Intervalle de Confiance)

<b>Souche D/5920</b>	<b>Estimation</b>	<b>Borne inférieure de l'IC à 95%</b>	<b>Borne supérieure de l'IC à 95%</b>
<b>Prévalence apparente (IC Wilson)</b>	29 %	17 %	45 %
<b>Prévalence réelle (IC Blaker)</b>	39 %	20 %	64 %

### 3. Carte de répartition des résultats de sérologies

Une carte de répartition des résultats de sérologie a été réalisée, en combinant les résultats des deux souches testées, c'est-à-dire que les individus indiqués positifs sont les individus positifs pour au moins une des deux souches. Deux autres cartes différencient ces souches, en indiquant également les titres en anticorps. Ces cartes sont présentées en Figure 27, Figure 28 et Figure 29.

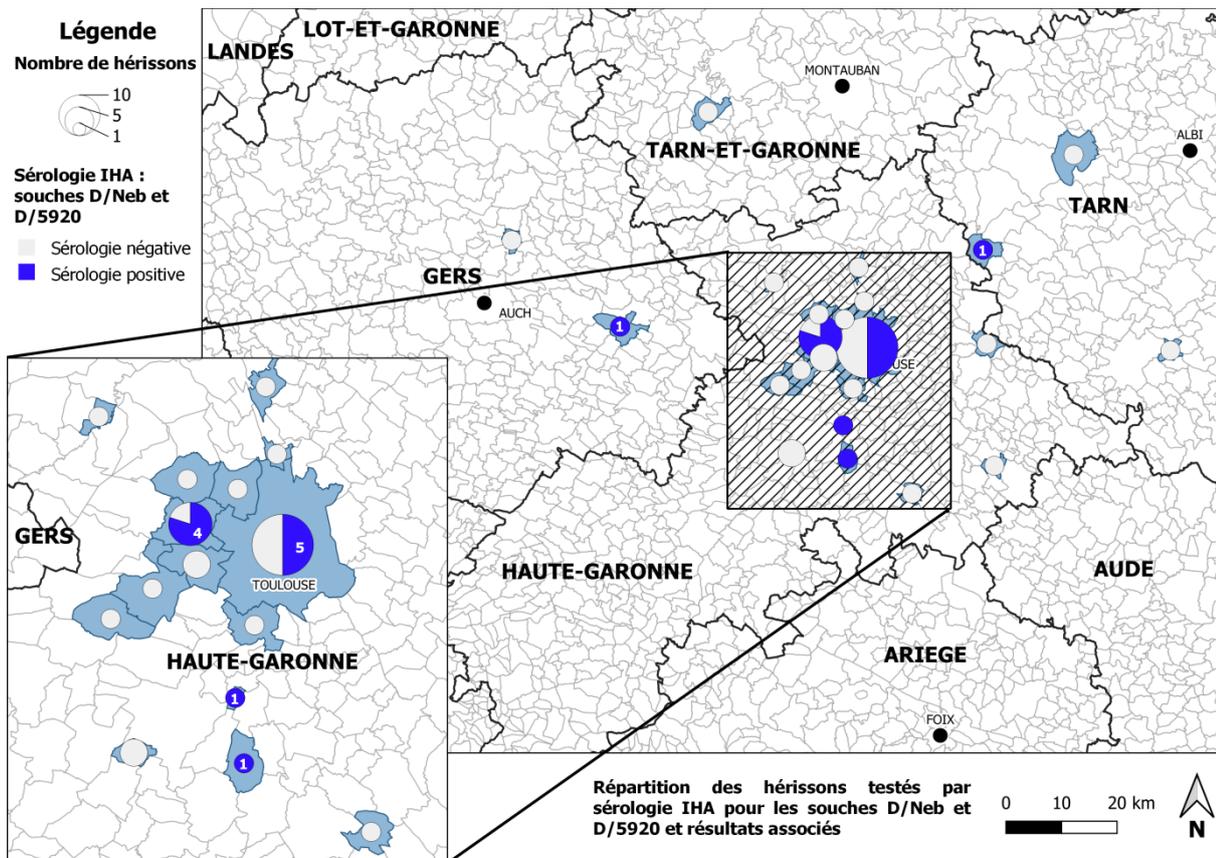


Figure 27 : Carte de répartition des hérissons testés par sérologie IHA pour les souches D/Neb et D/5920 et résultats associés

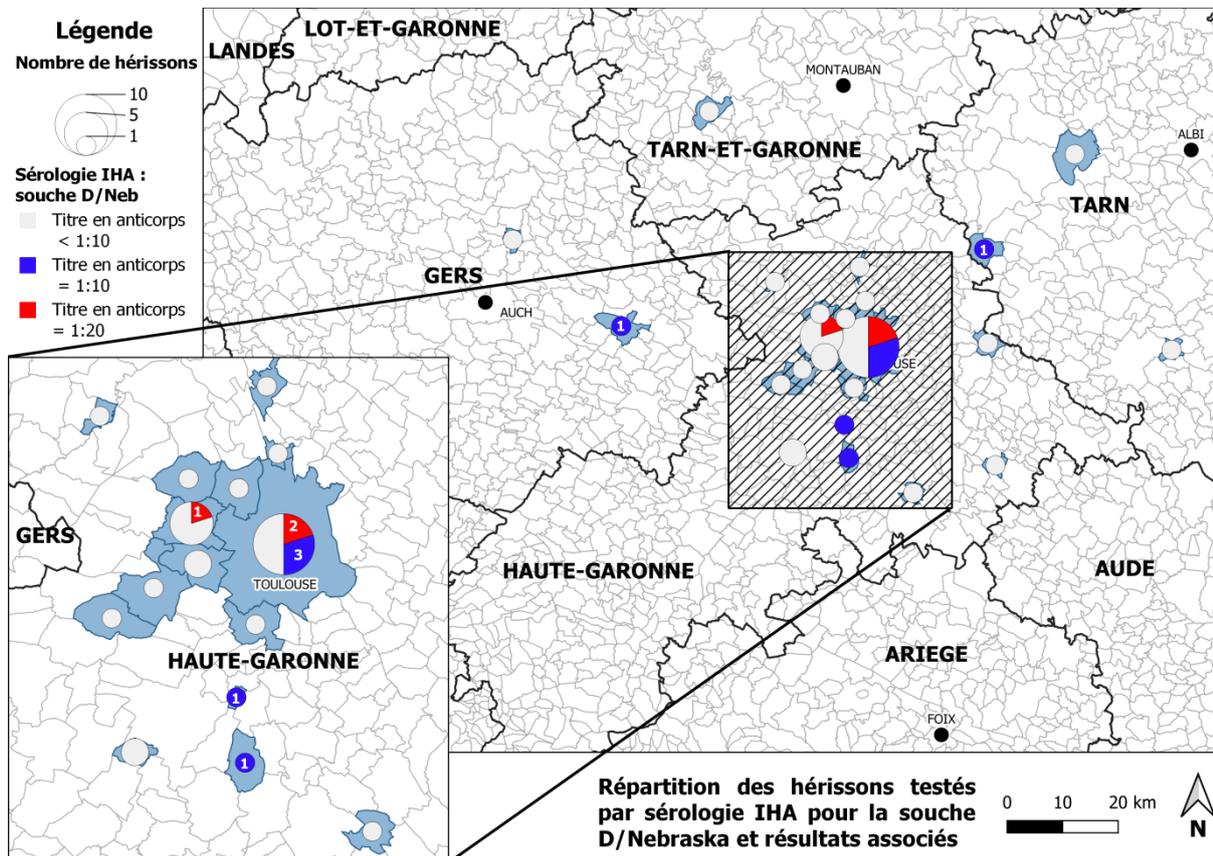


Figure 28 : Cartes de répartition des hérissons testés par sérologie IHA pour la souche D/Neb et résultats associés

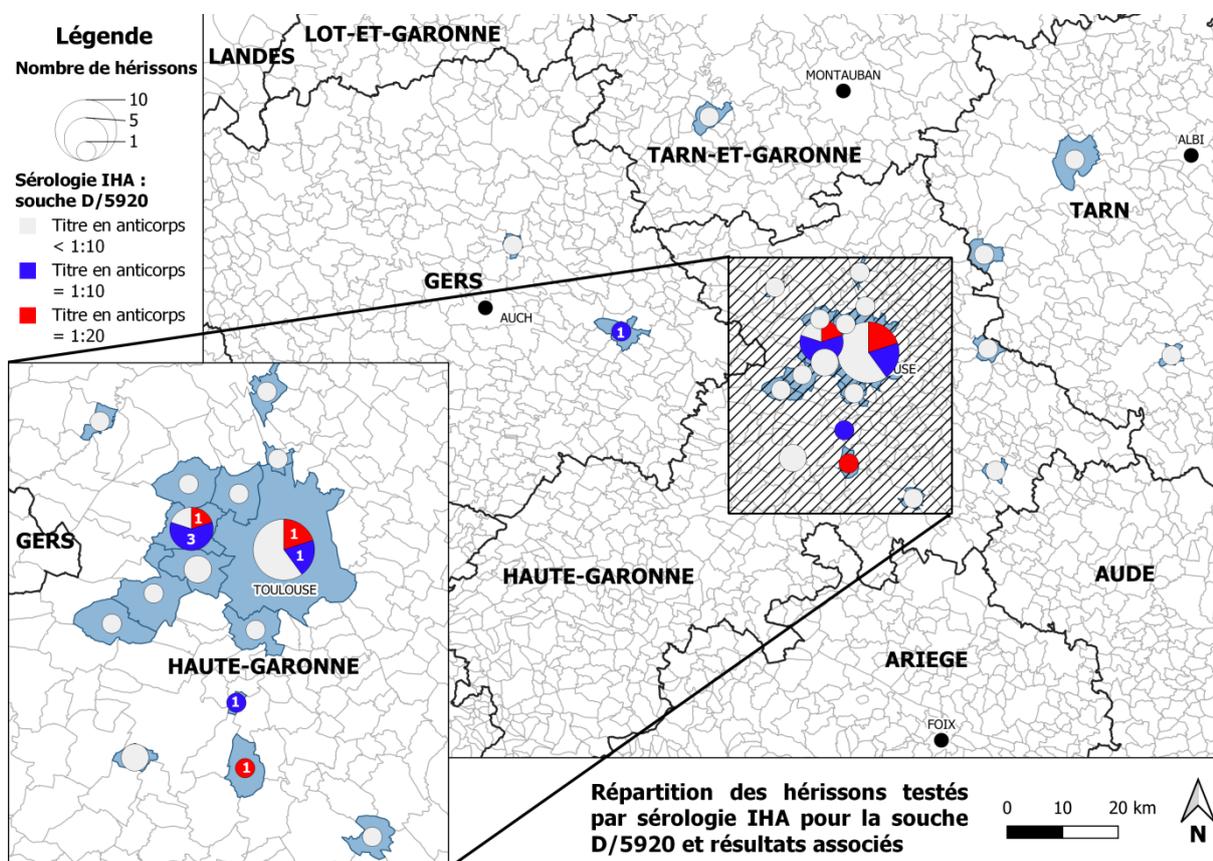


Figure 29 : Cartes de répartition des hérissons testés par sérologie IHA pour la souche D/5920 et résultats associés

#### 4. Analyses statistiques

##### a) *Sélection des variables*

A l'aide du logiciel R, nous avons testé l'association entre un statut sérologique positif (c'est-à-dire un résultat positif pour au moins l'une des deux souches testées) pour l'influenza D et plusieurs critères : l'âge et le sexe, ainsi que la période pré ou post-hibernation afin d'étudier les effets du statut physiologique, ainsi que de la période, du niveau d'activité (réduit en phase d'hibernation) et de contact et enfin de l'état de santé car nous avons vu que la période d'hibernation et de post hibernation correspond à un affaiblissement du système immunitaire (cf I.K.2). Nous considérons que de Décembre à Mai les hérissons sont en phase d'hibernation ou post-hibernation (périodes où le système immunitaire est potentiellement affaibli) et que de Juin à Novembre ils sont en phase de pré-hibernation. Ceci permet d'étudier le profil des animaux présentant des anticorps, donc ayant déjà rencontré le virus de l'influenza D et développé une immunité, par rapport à la phase d'hibernation.

Enfin, nous avons testé l'association entre un statut sérologique positif et la présence de signes respiratoires, le virus de l'influenza D étant connu pour son tropisme respiratoire et la survenue de signes cliniques respiratoires chez d'autres espèces (cf II.G).

La proportion de hérissons femelles présentant un test sérologique positif dans cette étude n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons mâles présentant un test sérologique positif, avec un seuil de significativité de 20% ( $p$ -value = 0,4735). De même la proportion de jeunes avec un test sérologique positif n'est pas non plus significativement différente de celle des adultes avec un test positif ( $p$ -value = 0,4732).

En revanche, une association statistiquement significative, avec un seuil de significativité de 20%, a été mise en évidence entre le statut sérologique et la présence de signes cliniques respiratoires ( $p$ -value = 0,1355), ainsi qu'entre le statut sérologique et la période pré-hibernation ou hibernation/post-hibernation ( $p$ -value = 0,1818). Nous allons réaliser une analyse multivariée avec comme variable à expliquer le statut sérologique et comme variables explicatives la présence de signes cliniques respiratoires et la période pré-hibernatoire ou hibernatoire/post-hibernatoire.

### a) Analyse multivariée

```
> reg3 <- glm(SeroNeb5920~EvalRespiBool+Hibernation, family=binomial(link=logit))
> summary(reg3)

Call:
glm(formula = SeroNeb5920 ~ EvalRespiBool + Hibernation, family = binomial(link = logit))

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.3573  -0.9261  -0.6448   1.0076   1.8292

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -0.6247    0.5634  -1.109  0.268
EvalRespiBool  1.0382    0.7736   1.342  0.180
Hibernation   -0.8404    0.7527  -1.117  0.264

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 48.824  on 37  degrees of freedom
Residual deviance: 44.786  on 35  degrees of freedom
AIC: 50.786

Number of Fisher Scoring iterations: 4

> step(reg3)
Start:  AIC=50.79
SeroNeb5920 ~ EvalRespiBool + Hibernation

              Df Deviance   AIC
- Hibernation  1  46.061 50.061
- EvalRespiBool 1  46.595 50.595
<none>         44.786 50.786

Step:  AIC=50.06
SeroNeb5920 ~ EvalRespiBool

              Df Deviance   AIC
<none>         46.061 50.061
- EvalRespiBool 1  48.824 50.824

Call:  glm(formula = SeroNeb5920 ~ EvalRespiBool, family = binomial(link = logit))

Coefficients:
(Intercept)  EvalRespiBool
   -1.050         1.232

Degrees of Freedom: 37 Total (i.e. Null);  36 Residual
Null Deviance:      48.82
Residual Deviance: 46.06      AIC: 50.06
```

**Figure 30 : Détail de l'analyse multivariée réalisée sous R (Variable à expliquer : Statut sérologique ; Variables explicatives : présence de signes cliniques respiratoires et période pré-hibernatoire ou hibernatoire/post-hibernatoire)**

La Figure 30 présente le détail de l'analyse multivariée réalisée sous R. Nous avons considéré la variable « SeroNeb5920 », qui prend la valeur de 1 si le test d'IHA est supérieur ou égal à 1 : 10 avec au moins l'une des deux souches testées.

La fonction step va nous permettre de sélectionner ou d'écartier pas à pas les variables explicatives testées. Le modèle initial a un AIC de 50,79. A la première étape, la suppression du critère « Hibernation » permet de diminuer l'AIC à 50 ,06. Cependant, à l'étape suivante, toute autre suppression de critère ferait augmenter

l'AIC (50,824). Nous arrêtons donc là cette première étape concernant la recherche du modèle. Le critère de la période par rapport à l'hibernation ne présente donc pas de lien statistiquement significatif avec le statut sérologique.

Le modèle le plus statistiquement significatif n'inclut que la variable explicative « Signes respiratoires ».

Cependant, la différence d'AIC entre le modèle n'incluant comme variable explicative que le critère « Signes respiratoires » et celui supprimant ce critère est inférieure à 2 ( $\Delta AIC = |50,06 - 50,824| = 0,764 < 2$ ). Cette différence n'est pas considérée comme significative. Il convient dans ce cas de choisir le modèle le plus parcimonieux concernant les variables explicatives (par ailleurs, ceci était également le cas lors de la première étape, mais cela conduit dans tous les cas de figure à écarter la variable « Hibernation »). Cela signifie donc que le modèle le plus significatif n'inclut pas le critère « Signes respiratoires » comme variable explicative.

Néanmoins, et afin de caractériser cette relation entre le statut sérologique et le critère « Signes respiratoires », nous avons quand même réalisé une régression logistique avec comme variable à expliquer le statut sérologique et comme variable explicative le critère concernant la présence de signes respiratoires (Figure 31).

```

> reg2 <- glm(SeroNeb5920~EvalRespiBool, family=binomial(link=logit))
> summary(reg2)

Call:
glm(formula = SeroNeb5920 ~ EvalRespiBool, family = binomial(link = logit))

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.2557  -0.7747  -0.7747   1.1010   1.6431

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -1.0498    0.4392  -2.391  0.0168 *
EvalRespiBool  1.2321    0.7480   1.647  0.0995 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 48.824  on 37  degrees of freedom
Residual deviance: 46.061  on 36  degrees of freedom
AIC: 50.061

Number of Fisher Scoring iterations: 4

> step(reg2)
Start: AIC=50.06
SeroNeb5920 ~ EvalRespiBool

              Df Deviance   AIC
<none>                46.061 50.061
- EvalRespiBool    1   48.824 50.824

Call:  glm(formula = SeroNeb5920 ~ EvalRespiBool, family = binomial(link = logit))

Coefficients:
(Intercept)  EvalRespiBool
    -1.050           1.232

Degrees of Freedom: 37 Total (i.e. Null);  36 Residual
Null Deviance:      48.82
Residual Deviance: 46.06      AIC: 50.06

```

Figure 31 : Détail de régression logistique réalisée sous R (Variable à expliquer : Statut sérologique ; Variable explicative : présence de signes cliniques respiratoires)

Le signe du log de l'Odds Ratio (OR) nous permet de donner le sens de cette association, étant donné que pour réaliser nos analyses statistiques, un statut sérologique positif a été associé à une valeur de 1, tout comme la présence de signes respiratoires pour le critère « Signes respiratoires ». Ce signe est ici positif. Ainsi, dans notre étude, la présence de signes respiratoires est associée à un statut sérologique positif. Néanmoins, la p-value associée est supérieure à 0.05 (p-value = 0.09) : cette association n'est donc pas significative, au seuil de 5 %.

Nous pouvons donc dire qu'il n'y a pas d'association forte entre le statut sérologique et la présence de signes respiratoires.

## **L. Virologie influenza D par RT-qPCR**

Quatre-vingt-trois rinçages nasaux et soixante-dix-neuf prélèvements fécaux de hérissons arrivés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT entre le 19/01/21 et le 24/01/22 ont servis pour réaliser des recherches du virus influenza D par RT-qPCR.

### **1. Rinçages nasaux**

Sept échantillons ont présenté une amplification, mais avec des courbes sans zone d'inflexion bien marquée, ce qui laisse soupçonner la présence de faux positifs. Ces échantillons concernés ont donc été vérifiés par électrophorèse sur gel et tous les échantillons se sont révélés négatifs pour le virus de l'influenza D.

### **2. Prélèvements fécaux**

Deux échantillons ont présenté une amplification lors de la RT-qPCR, avec des Ct assez tardifs de 39,05 et 27,96. Après vérification par électrophorèse sur gel, un seul échantillon s'est révélé réellement positif, et présentait un Ct de 39,05 (photographie du gel en Figure 32). Ce hérisson a été trouvé en mars 2021 dans la commune de Toulouse.

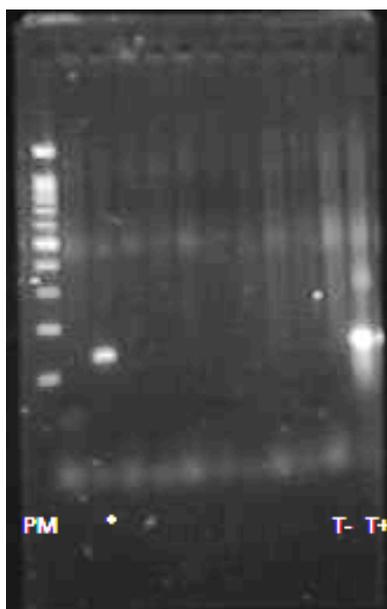


Figure 32 : Résultats de la vérification par électrophorèse des PCR influenza D (PM : échelle de poids moléculaire, T+ : Témoin positif, T- : Témoin négatif, \* : Résultat positif)

Une viroprévalence apparente de 1.3 % est calculée et afin de calculer la prévalence réelle ainsi que les intervalles de confiance à 95 % associés à l'aide du site Epitools (© Ausvet 2022), une spécificité de test de 99 % et une sensibilité de 95 % sont fixées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Viroprévalences apparente et réelle et intervalles de confiance associés des résultats de PCR Influenza D sur prélèvements fécaux (IC = Intervalle de Confiance)

PCR Influenza D (prélèvements fécaux)	Estimation	Borne inférieure de l'IC à 95%	Borne supérieure de l'IC à 95%
Prévalence apparente (IC Wilson)	1,3 %	0,2 %	6,8 %
Prévalence réelle (IC Blaker)	0,3 %	0	6,5 %

## **M. Virologie EriCoV par RT-PCR**

Les échantillons utilisés pour les analyses sont présentés ci-dessus (cf V.L).

### **1. Rinçages nasaux**

Aucun échantillon n'a présenté d'amplification. Tous les échantillons se sont donc révélés négatifs pour le virus EriCov.

### **2. Prélèvements fécaux**

#### ***a) Description des résultats***

Une amplification par RT-PCR a été détectée dans 38 des 79 prélèvements fécaux. Parmi les 38 positifs, 12 se situaient à la limite de détection.

Les photographies des gels d'électrophorèse, avec mise en évidence des positifs sont présentées en Figure 33. Il est à noter cependant que des individus n'ayant par la suite pas pu être retenus dans l'étude (pour défaut de date de prélèvement) sont également présents sur ces photographies.

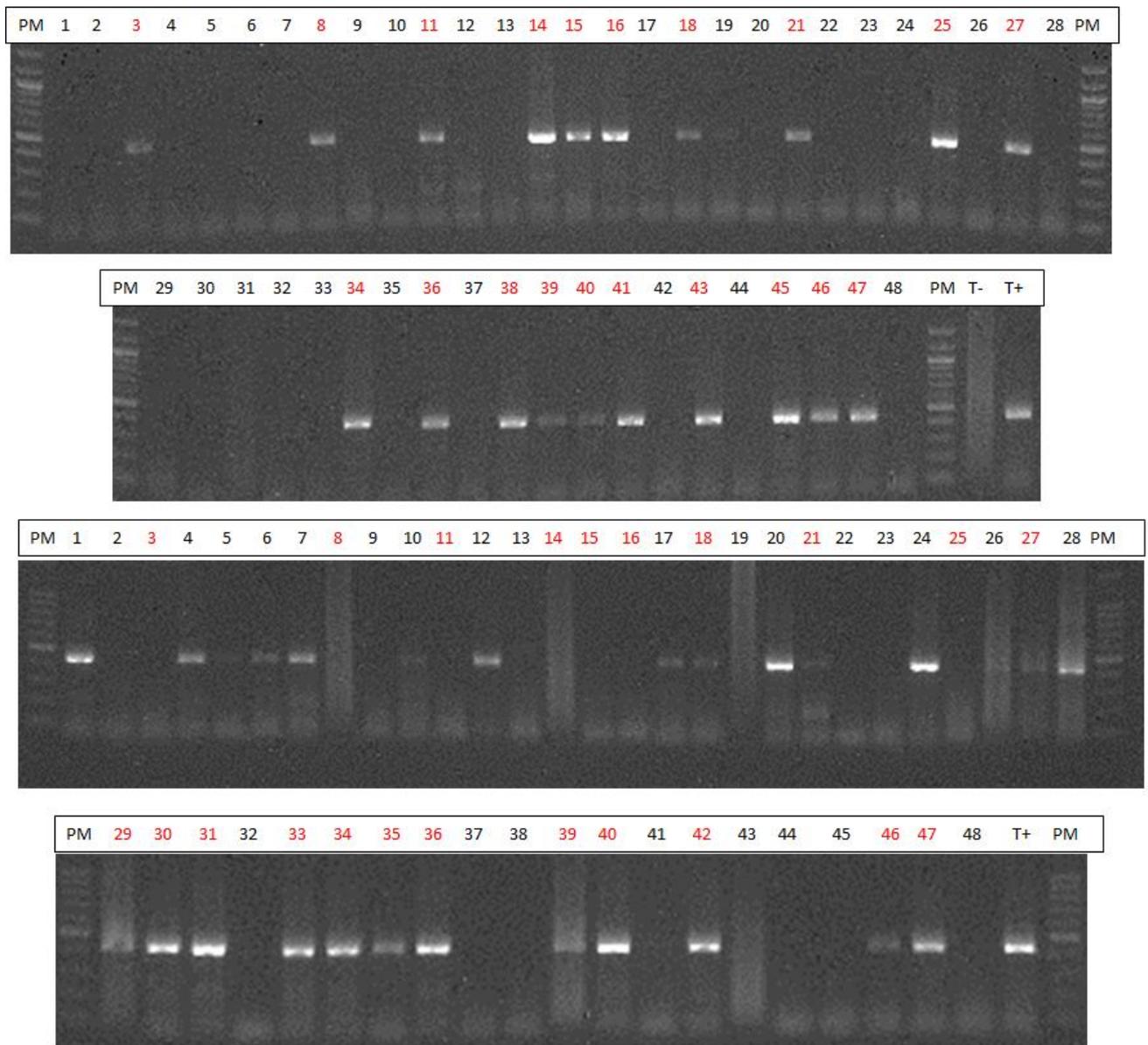


Figure 33 : Résultats des RT-PCR EriCoV (PM : échelle de poids moléculaire, T+ : Témoin positif, T- : Témoin négatif, les résultats positifs sont indiqués en rouge, les résultats négatifs en noir). Photographies fournies par M. Wasniewski et E. Picard-Meyer, ANSES

Le Tableau 16 résume les résultats obtenus.

Tableau 16 : Tableau résumé des associations avec l'infection par EriCoV et prévalence et p-value associées

Variables étudiées	Catégories	Nombre de positifs/nombre testé par catégorie	prévalence	p-value
<b>Age</b>	Jeune	19/34	56 %	0.2615 <sup>1</sup>
	Adulte	19/45	42 %	
<b>Sexe</b>	Mâle	16/36	44 %	0.8061
	Femelle	14/29	48 %	
<b>Hibernation</b>	Pré-hibernation	13/28	46 %	1 <sup>2</sup>
	Post-hibernation	25/51	49 %	
<b>Données cliniques</b>				
<b>Consistance des fèces</b>	Normale	14/25	56 %	0.7496 <sup>3</sup>
	Dure	2/2	100 %	
	Molle	4/9	44 %	
	Liquide	1/3	33 %	
<b>Couleur des fèces</b>	Normale (marron foncé)	15/30	50 %	1 <sup>4</sup>
	Noire	3/5	60 %	
	Verdâtre	3/6	50 %	
<b>Appareil respiratoire</b>	Aucune anomalie clinique	28/58	48 %	1 <sup>5</sup>
	Signes respiratoires	10/19	53 %	
	Jetage	4/8	50 %	
<b>Etat corporel</b>	<3/5	17/35	49 %	1
	≥3/5	21/44	48 %	
<b>Etat de vigilance</b>	Normal	13/26	50 %	0.4472 <sup>6</sup>
	Moyennement altéré	13/31	42 %	
	Gravement altéré	12/21	57 %	

<sup>1</sup> Les sous catégories « adulte » et « jeune » (cette dernière regroupant les sous catégories « jeune non-autonome » et « jeune autonome ») ont été considérées pour le calcul de la p-value

<sup>2</sup> Les catégories « pré-hibernatoire » et « hibernatoire »/ « post-hibernatoire » (définies dans la partie V.K.4.a) ont été considérées pour le calcul de la p-value

<sup>3</sup> Les sous-catégories « normale » et « anormale » (cette dernière regroupant les sous-catégories « dure », « molle » et « liquide ») ont été considérées pour le calcul de la p-value

<sup>4</sup> Les sous-catégories « normale » et « anormale » (cette dernière regroupant les sous-catégories « noire » et « verdâtre ») ont été considérées pour le calcul de la p-value

<sup>5</sup> Les sous-catégories « absence » et « présence » (cette dernière regroupant les sous-catégories « signes respiratoires » et « jetage ») ont été considérées pour le calcul de la p-value

<sup>6</sup> Les sous-catégories « normale » et « altéré » (cette dernière regroupant les sous-catégories « moyennement altéré » et « gravement altéré ») ont été considérées pour le calcul de la p-value

### *b) Viroprévalence*

Une viroprévalence apparente de 48 % est calculée à partir des résultats exposés ci-dessus. Afin de calculer la prévalence réelle ainsi que les intervalles de confiance à 95 % associés à l'aide du site Epitools (© Ausvet 2022), nous fixons une spécificité de test de 99 % et une sensibilité de 95 %. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17.

**Tableau 17 : Viroprévalences apparente et réelle et intervalles de confiance associés des résultats de PCR EriCov sur prélèvements fécaux (IC = Intervalle de Confiance)**

<b>PCR EriCov (prélèvements fécaux)</b>	<b>Estimation</b>	<b>Borne inférieure de l'IC à 95%</b>	<b>Borne supérieure de l'IC à 95%</b>
<b>Prévalence apparente (IC Wilson)</b>	48 %	37 %	59 %
<b>Prévalence réelle (IC Blaker)</b>	50 %	39 %	62 %

### *c) Carte de répartition des résultats de PCR EriCoV sur fèces*

Une carte de répartition des résultats de PCR recherchant la présence d'EriCoV sur fèces a été réalisée et est présentée en Figure 34.

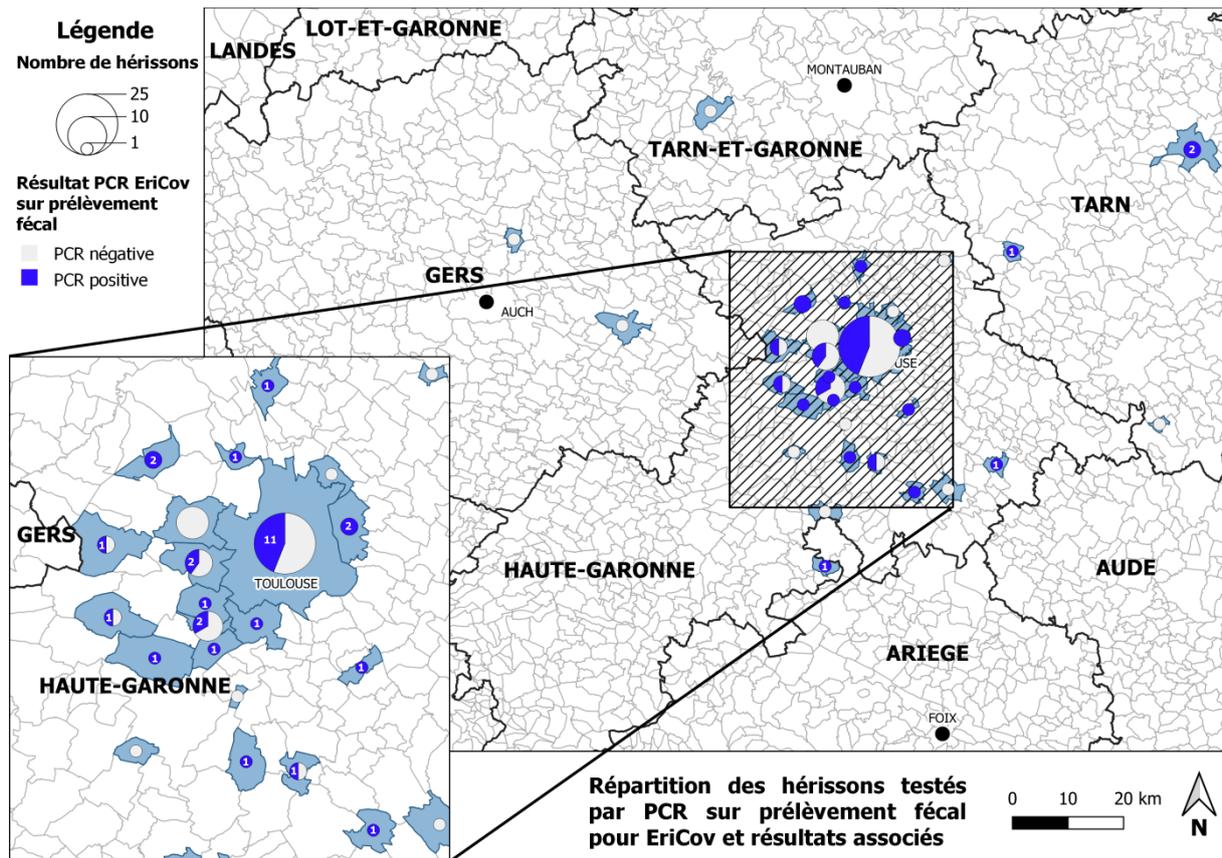


Figure 34 : Carte de répartition des hérissons testés par PCR sur prélèvement fécal pour EriCov et résultats associés

#### d) Analyse statistique : sélection des variables

Tous les résultats de p-value sont présentés dans le Tableau 16.

Nous nous intéressons dans un premier temps aux facteurs possiblement associés à l'infection (âge, sexe, statut hibernatoire), ainsi qu'aux manifestations cliniques éventuelles du virus EriCoV. Afin de déterminer s'il existe des associations significatives, les analyses bivariées avec calcul des tests de Fisher ont été réalisées.

La proportion de hérissons femelles présentant un test PCR EriCov positif dans cette étude n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons mâles présentant un test PCR EriCov positif, avec un seuil de significativité de 20% (p-value = 0,8061). De même la proportion de jeunes avec un test sérologique positif

n'est pas non plus significativement différente de celle des adultes avec un test positif (p-value = 0,2615). Enfin, la proportion de hérissons en stade pré-hibernatoire avec un test PCR EriCov positif n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons en stade hibernatoire/post-hibernatoire avec un test PCR EriCov positif (p-value  $\approx$  1)

La proportion d'individus présentant une consistance anormale des fèces n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons présentant des fèces de consistance normale, au seuil de 20 % (p-value = 0.7496). De même, la proportion d'individus présentant une couleur anormale des fèces n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons présentant des fèces de couleur normale (p-value  $\approx$  1). La proportion d'individus présentant des signes cliniques respiratoires n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons n'en présentant pas (p-value  $\approx$  1). La proportion d'individus présentant une note d'état corporel inférieure à 3/5 n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons en présentant une supérieure à 3/5 (p-value  $\approx$  1) et la proportion d'individus présentant un état de vigilance altéré n'est pas significativement différente de la proportion de hérissons présentant un état de vigilance normal (p-value = 0.4472).

Les résultats de cette recherche n'ont pas permis de sélectionner des variables significatives au seuil de 20% et l'analyse bivariée au seuil de 5% montre donc une absence d'association significative entre l'infection par EriCoV et les facteurs possiblement associés à l'infection, ainsi qu'avec la présence de signes cliniques dans la population de hérissons d'Europe accueillis au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT.

## VI. Discussion

### 1. Séroprévalence influenza D

La séroprévalence observée dans cette étude est assez similaire à celle déterminée auparavant (Oliva 2019) sur des hérissons d'Europe accueillis au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT (29,1 %). Le Hérisson d'Europe serait donc une espèce sensible à l'IDV, mais la détection du virus chez cette espèce est nécessaire pour confirmer ceci.

Il a été montré chez plusieurs espèces une réaction croisée entre ICV et IDV et cela reste donc ici une possibilité. Il serait donc intéressant de tester les animaux en sérologie ICV afin de déterminer la possibilité d'une réaction croisée dans cette étude.

Une association est suspectée ici entre la présence de signes cliniques respiratoires et un test sérologique positif. Cependant cette association est, d'après les analyses statistiques, non significative. La taille de l'échantillon analysé est relativement faible (n=38), ce qui diminue donc la fiabilité des conclusions des analyses. Des études incluant un nombre plus important d'échantillons sont nécessaires afin de pouvoir conclure de façon plus précise sur cette association. Cette association signifierait alors que présenter un test sérologique positif augmente le risque de présenter des signes cliniques respiratoires, ce qui pourrait s'expliquer par une certaine fragilité de l'appareil respiratoire suite à l'infection par le virus, pouvant par exemple prédisposer au développement d'affections secondaires, ou bien encore par une persistance de lésions de l'appareil respiratoire suite à l'infection par le virus, maintenant des troubles respiratoires. Bien sûr, la relation n'est pas établie d'un point de vue statistique et mériterait donc d'être réétudiée, notamment en prenant en compte des co-infections.

Par ailleurs, une autre association possible mais non significative est suspectée entre hibernation et résultat du test sérologique, avec un risque plus important d'être séropositif en pré-hibernation. En pré-hibernation, une réaction immunitaire pourrait donc être plus souvent observée contre l'influenza D. Plusieurs facteurs (plus ou moins combinés) peuvent l'expliquer, notamment un risque plus accru de

transmission du virus lors de la phase de pleine activité, avec un système immunitaire plus compétent avant la phase d'hibernation et donc plus susceptible de développer cette réaction face à l'infection. D'une autre façon, en raison d'un système immunitaire plus faible, il pourrait y avoir un risque de décès suite à l'infection plus important en hibernation/post-hibernation (même si des décès imputables à l'IDV n'ont jamais été mis en évidence). Il est également envisageable que cette réaction ne soit pas durable et que le titre en anticorps diminue progressivement pendant l'hibernation, empêchant de le détecter en post-hibernation.

Il est à noter que, dans un second temps, tous les sérums testés par IHA ont été soumis à des tests sérologiques ELISA afin de confirmer la présence d'anticorps anti-influenza D (ISZLER Brescia, Italie, Ana Moreno Martin, Maria Gaudino). Cependant, tous les sérums ont été testés négatifs. Mais des sérums de bovins testés de façon concomitante et pour lesquels l'IHA avait révélé une séroprévalence nettement plus élevée (avec des titres en anticorps largement plus élevés que pour les hérissons) ont également tous été testés négatifs par ELISA, ce qui peut laisser suspecter que la manipulation a échoué ou bien qu'il y a eu une dégradation des échantillons. Une séroneutralisation serait donc intéressante à envisager, afin de confirmer les statuts sérologiques des individus.

## **2. Circulation de l'influenza D dans la population de hérissons d'Europe amenés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT**

Dans cette étude, nous avons constaté que peu d'individus étaient excréteurs du virus de l'influenza D, puisqu'un seul hérisson s'est révélé positif sur les 107 individus testés par PCR sur rinçages nasaux et/ou prélèvement fécaux. Cela ne nous permet pas de pouvoir étudier les manifestations cliniques de l'infection par le virus de l'influenza D chez le Hérisson d'Europe. Cette étude ne nous permet donc pas de conclure qu'IDV infecte de manière significative cette espèce. Cependant, l'étude réalisée précédemment sur des hérissons d'Europe du même centre avait mis en évidence la présence de virus dans des écouvillons nasaux ainsi que dans des

fragments de poumons (Oliva 2019), en quantité certes relativement faible (II.F.5. Ceci semble donc confirmer que le virus infecte bien cette espèce, mais que notre étude n'a pas permis de le mettre en évidence. Plusieurs hypothèses sont présentées ci-après afin d'expliquer ce résultat.

Il est possible que les prévalences plus élevées précédemment mises en évidence soient dues à un phénomène de contamination au sein même du centre. En effet, les prélèvements n'avaient pas seulement été effectués au moment de l'admission de l'animal. Ainsi, il est possible que la transmission entre les individus ait eu lieu pendant l'hospitalisation (infection nosocomiale) et que donc la viroprévalence observée ne rende pas vraiment compte de la situation des populations sauvages hors de la clinique. Dans cette étude, nous avons pu nous affranchir de ce phénomène en réalisant les prélèvements au moment de l'admission. La viroprévalence observée dans notre étude s'avère alors beaucoup plus faible (1,3 %, avec une prévalence réelle calculée de 0.3 %) qu'observée précédemment (environ 30 %).

Mais cette très faible viroprévalence peut également s'expliquer par une dégradation des particules virales, due au protocole de récolte des échantillons. Ceux-ci étaient d'abord conservés à -20°C puis transférés à -80°C sous deux semaines en moyenne. Ce long délai entre les transferts a pu être à l'origine de la dégradation du génome viral et donc expliquer la très faible viroprévalence observée ainsi que la valeur élevée du Ct pour l'échantillon positif (qui ne contenait alors plus beaucoup de génome viral).

Une variation annuelle peut également expliquer cette viroprévalence plus faible par rapport à l'étude menée précédemment dans le même centre. Des contacts moindres entre individus (de la même espèce ou d'autres espèces porteuses), des facteurs environnementaux ou encore une immunité plus ou moins forte en fonction des années peuvent ainsi faire varier les taux d'infection entre individus.

Par ailleurs, le résultat positif de notre étude a été détecté sur fèces. Dans l'étude menée précédente, le virus avait été détecté dans les rinçages nasaux mais jamais dans les écouillons rectaux. Dans notre étude, le virus n'a pas été détecté dans les rinçages nasaux. La présence de virus a déjà été mise en évidence sur des prélèvements rectaux de chèvres, ce qui pourrait laisser envisager une multiplication

intestinale pour ce virus. Cependant, et compte tenu de la très faible prévalence observée, une ingestion directe du virus peut également être envisagée, ou encore une contamination de l'échantillon au cours de la réalisation de la PCR.

### **3. Circulation d'EriCoV dans la population de hérissons d'Europe amenés au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT et prévalence**

Le virus EriCoV a été détecté dans la population de hérissons d'Europe amenés en 2021 au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT. En Europe, le virus avait déjà été détecté en Allemagne (Corman et al. 2014), en Grande Bretagne (Saldanha et al. 2019), en Italie (Delogu et al. 2020), en Pologne (Pomorska-Mól et al. 2022) et dans le Nord de la France (Monchatre-Leroy et al. 2017) et cette étude nous permet d'élargir sa circulation au Sud de la France, en particulier la région Occitanie. Le virus semble donc largement réparti en Europe.

Aucun séquençage du génome de virus détecté n'a cependant été réalisé dans le cadre de cette thèse, nous ne connaissons donc pas la nature de la ou des souches circulant dans cette population de hérissons ni leur proximité avec les virus détectés précédemment en Allemagne par exemple et surtout en France. Ce séquençage permettrait de continuer à étudier l'évolution des souches de virus circulant dans la population sauvage. Compte tenu de la capacité des coronavirus à sauter la barrière d'espèce, connaître la diversité des souches et comprendre l'évolution des coronavirus au sein de la faune sauvage demeure un point important dans la prévision de potentiels déclenchements d'épidémies suite à des phénomènes de saut de barrière d'espèce, comme cela a été le cas avec le MERS en 2012. Les prélèvements ont été conservés et pourront à l'avenir éventuellement servir à un tel séquençage, dans la mesure où l'isolement d'une particule virale est possible.

La viroprévalence observée dans cette étude est légèrement inférieure à celles observées en Allemagne (58,9 %), en Italie (58,3 %) et dans le Nord de la France (60 %) et quatre fois supérieure à celle observée en Grande Bretagne. Comme mentionné précédemment, les conditions de conservation ont également pu provoquer la dégradation de particule virale, diminuant artificiellement la prévalence. Cependant ce résultat nous permet de dire que le virus EriCoV semble être assez commun chez les hérissons d'Europe, qui pourraient constituer l'hôte principal de

ce virus. Cette forte viroprévalence a été détectée à partir d'échantillons fécaux, confirmant la multiplication intestinale du virus. Le virus n'a pas été détecté dans les rinçages nasaux.

Si dans l'étude allemande il n'était pas mentionné le moment de l'échantillonnage, dans toutes les autres études, y compris celle-ci, les prélèvements étaient réalisés peu après l'admission et dans un délai de 48 heures maximum après l'admission. Les transmissions nosocomiales au sein de centre ne sont donc pas à l'origine des différences de prévalence observées entre l'Europe continentale et la Grande Bretagne. La prévalence observée au cours de cette étude vient donc compléter les données déjà existantes et confirmer l'hypothèse émise dans l'étude réalisée en Grande Bretagne (Saldanha et al. 2019) selon laquelle la prévalence au sein des populations de hérissons d'Europe continentale est plus élevée que la prévalence au sein des hérissons de Grande Bretagne.

Aucune association n'a été détectée entre l'infection par EriCoV et la période pré ou post-hibernation, ce qui concorde avec l'absence d'association avec le mois d'échantillonnage relevé précédemment dans l'étude menée sur des hérissons en Grande Bretagne (Saldanha et al. 2019), ce qui laisse supposer qu'il existe une persistance du virus chez les hérissons pendant l'hibernation ou une circulation permanente au sein des populations. Cependant, il est à noter que le nombre d'individus prélevés par mois est très variable (Figure 25) et que ce nombre reste relativement faible (en moyenne neuf individus par mois). Une étude incluant un nombre plus élevé d'individus serait intéressante à envisager. Par ailleurs, afin de confirmer la persistance de l'infection, un échantillonnage longitudinal est à envisager, en testant des animaux avant et après leur hibernation, ce qui avait déjà été suggéré par l'étude de Saldanha et al. Un tel échantillonnage n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette thèse, mais constitue une piste d'exploration ultérieure.

#### 4. Manifestation clinique

L'étude n'a pas permis de détecter de manifestations cliniques dues à l'infection par EriCoV chez les hérissons d'Europe. Une précédente étude avait permis de mettre en évidence une association significative entre une infection par EriCoV et une couleur jaune des fèces, phénomène qui n'a pas été rapporté ici (Saldanha et al. 2019). Cependant, il est à noter que seul un peu plus de la moitié des individus testés pour la présence d'EriCoV comportait également des données complètes pour la couleur des fèces, et que donc cette association entre l'infection par EriCoV et la couleur des fèces n'a été testée que sur un nombre restreint d'individus. Ces données parcellaires s'expliquent par la méthode employée pour la récolte des données, avec un prélèvement fécal différé par rapport aux restes du recueil de données, ce qui entraîne des oublis pour compléter les données relatives à l'aspect des fèces accompagnant le prélèvement.

L'absence de signes cliniques avait déjà été montrée dans deux études (Saldanha et al. 2019; Delogu et al. 2020) s'intéressant à la pathogénicité d'EriCoV chez le Hérisson d'Europe et, sous réserve des limites de l'étude, nous avons également fait cette observation.

Si EriCoV ne semble pas être à l'origine de manifestations cliniques (qu'elles soient respiratoires ou digestives), le Hérisson d'Europe, qui présente des valeurs de prévalence assez élevées dans la population accueillie au centre de soins de l'ENVT, pourrait ainsi jouer un important rôle de réservoir pour le virus, permettant la maintenance et la diffusion du virus.

#### 5. Co-infections

L'état parasitaire n'a pas pu être pris en compte dans cette étude, en raison d'un nombre de données manquantes trop important.

Evaluer l'état parasitaire d'un individu nécessite de réaliser des coproscopies individuelles, ce qui représente un travail supplémentaire conséquent. Cependant, les infestations parasitaires sont très fréquentes chez cette espèce (I.L.1) et peuvent être à l'origine de manifestations cliniques respiratoires ou digestives.

De la même manière, les hérissons sont également sensibles à des infections bactériennes, pouvant également induire des signes cliniques chez les individus.

Ces co-infections constituent des variables confondantes dans notre étude. Il serait donc intéressant de poursuivre des recherches en incluant un diagnostic étiologique plus complet, afin de s'assurer de pouvoir détecter des signes cliniques étant réellement la conséquence de l'infection par le virus de l'influenza D ou EriCoV.

## **6. Infections expérimentales**

Des infections expérimentales de hérissons d'Europe par les virus de l'influenza D ou EriCoV pourraient nous permettre de mieux comprendre la pathogénicité de ces virus chez cette espèce. C'est particulièrement le cas pour le virus de l'influenza D, pour laquelle nous n'avons eu que très peu d'individus présentant une infection active. Cela nous permettrait également de nous affranchir des phénomènes de co-infections, probablement très présents dans cette étude. Les infestations parasitaires (notamment respiratoires et digestives) sont en effet très fréquemment observées chez le Hérisson d'Europe. Cependant, le Hérisson d'Europe étant une espèce protégée, la mise en œuvre d'un tel projet est complexe d'un point de vue éthique et réglementaire.

## Conclusion

Notre étude a permis la détection du virus EriCoV dans la population de hérissons d'Europe (*Erinaceus europaeus*) accueillie au centre de soin de la faune sauvage de l'ENVT, avec une prévalence de 48 %, similaire aux prévalences observées dans des études précédentes dans le Nord de la France (Monchatre-Leroy et al. 2017), en Allemagne (Corman et al. 2014) et en Italie (Delogu et al. 2020), ce qui nous permet de préciser la circulation du virus en Europe continentale. En revanche, aucune association significative n'a été mise en évidence entre l'infection et une manifestation clinique chez les hérissons, renforçant l'hypothèse d'un rôle de réservoir asymptomatique de l'espèce pour ce virus.

Le virus de l'influenza D n'a été détecté que chez un seul individu, à partir d'un prélèvement fécal, ce qui n'avait pas encore été observé chez le Hérisson. Ce résultat cependant est à considérer avec précaution étant donné les limites exposées dans ce travail. D'autres études doivent être envisagées, afin de confirmer ou non cette faible viroprévalence et ce mode d'excrétion. Les manifestations cliniques potentiellement associées n'ont donc pas pu être étudiées, étant donné le nombre trop faible d'individus présentant une excrétion.

Pour investiguer la circulation de ces deux virus et l'exploration des manifestations cliniques possiblement associées chez le Hérisson d'Europe, de futures études seraient donc intéressantes à envisager, incluant notamment des tailles d'échantillons plus importantes et la prise en compte de potentielles co-infections.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Pour autorisation d'impression de la thèse d'exercice en vue de l'obtention du  
diplôme d'Etat de docteur vétérinaire

Je soussigné, Guillaume LE LOCH, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de BIROT Flore, Marie, Monique intitulée « Etude de la circulation des virus influenza D et EriCoV et de leurs manifestations cliniques chez les hérissons d'Europe (*Erinaceus europaeus*) accueillis au centre de soin de la faune sauvage de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 22/06/2022  
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Guillaume LE LOCH

Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
M. Pierre SANS



Vu :  
Le Président du jury  
Professeur Christophe PASQUIER

Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université Paul  
Sabatier  
Monsieur Jean-Marc BROTO  
Par délégation, le Doyen de la faculté de  
Médecine de Toulouse  
Monsieur Philippe POMAR



BIROT Flore, Marie, Monique  
a été admis(e) sur concours en : 2017  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 01/07/2021  
a validé l'ensemble des crédits ECTS relatifs à la préparation de la thèse d'exercice le : 09/06/2022



Université  
de Toulouse

## Bibliographie

ALVAREZ, Ignacio J., FORT, Marcelo, PASUCCI, Juan, MORENO, Fabiana, GIMENEZ, Hugo, NÄSLUND, Katarina, HÄGGLUND, Sara, ZOHARI, Siamak et VALARCHER, Jean François, 2020. Seroprevalence of influenza D virus in bulls in Argentina. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* juillet 2020. Vol. 32, n° 4, pp. 585-588. DOI 10.1177/1040638720934056.

*Arrêté du 23 avril 2007 fixant la liste des mammifères terrestres protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection - Légifrance*, 2019. [en ligne]. [Consulté le 5 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFARTI000001716537/2999-01-01/>

*Article L411-1 - Code de l'environnement - Légifrance*, 2016. [en ligne]. [Consulté le 5 mars 2022]. Disponible à l'adresse : [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000033035411/](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000033035411/)

*Article L415-3 - Code de l'environnement - Légifrance*, 2019. [en ligne]. [Consulté le 5 mars 2022]. Disponible à l'adresse : [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000038846323/](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038846323/)

ASHA, Kumari et KUMAR, Binod, 2019. Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *Journal of Clinical Medicine*. 5 février 2019. Vol. 8, n° 2, pp. 192. DOI 10.3390/jcm8020192.

AULAGNIER, Stéphane, HAFFNER, Patrick, MOUTOU, François et ZIMA, Jan, 2020. *Mammifères d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient*. Nouvelle éd. mise à jour et augmentée. Paris : Delachaux et Niestlé. ISBN 978-2-603-02742-4. 599

BAILEY, Emily S., FIELDHOUSE, Jane K., ALARJA, Natalie A., CHEN, David D., KOVALIK, Maria E., ZEMKE, Juliana N., CHOI, Jessica Y., BORKENHAGEN, Laura K., TOH, Teck-Hock, LEE, Jeffrey Soon Yit, CHONG, Kuek-Sen et GRAY, Gregory C., 2020. First sequence of influenza D virus identified in poultry farm bioaerosols in Sarawak, Malaysia. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*. 12 mars 2020. Vol. 6, pp. 5. DOI 10.1186/s40794-020-0105-9.

BOULO, Sébastien, AKARSU, Hatice, RUIGROK, Rob W. H. et BAUDIN, Florence, 2007. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research*. mars 2007. Vol. 124, n° 1-2, pp. 12-21. DOI 10.1016/j.virusres.2006.09.013.

BOUMA, Hjalmar R., CAREY, Hannah V. et KROESE, Frans G. M., 2010. Hibernation: the immune system at rest? *Journal of Leukocyte Biology*. 2010. Vol. 88, n° 4, pp. 619-624. DOI 10.1189/jlb.0310174.

BOUMA, Hjalmar R., DUGBARTEY, George J., BOEREMA, Ate S., TALAEI, Fatemeh, HERWIG, Annika, GORIS, Maaïke, VAN BUITEN, Azuwerus, STRIJKSTRA, Arjen M., CAREY, Hannah V., HENNING, Robert H. et KROESE, Frans G. M., 2013. Reduction of body temperature governs neutrophil retention in hibernating and nonhibernating animals by margination. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013. Vol. 94, n° 3, pp. 431-437. DOI 10.1189/jlb.0611298.

BUI, M, WHITTAKER, G et HELENIUS, A, 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *Journal of Virology*. décembre 1996. Vol. 70, n° 12, pp. 8391-8401.

BUNNELL, Toni, 2002. The Assessment of British Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) Casualties on Arrival and Determination of Optimum Release Weights Using a New Index Toni Bunnell. *Journal of Wildlife Rehabilitation*. 1 décembre 2002. Vol. 25.

BURT, William Henry, 1943. Territoriality and Home Range Concepts as Applied to Mammals. *Journal of Mammalogy*. août 1943. Vol. 24, n° 3, pp. 346. DOI 10.2307/1374834.

CANENE-ADAMS, Kirstie, 2013. General PCR. In : *Methods in Enzymology* [en ligne]. Elsevier. pp. 291-298. [Consulté le 10 mai 2022]. ISBN 978-0-12-418687-3. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124186873000240>

CHIAPPONI, Chiara, FACCINI, Silvia, DE MATTIA, Aurora, BAIONI, Laura, BARBIERI, Ilaria, ROSIGNOLI, Carlo, NIGRELLI, Arrigo et FONI, Emanuela, 2016. Detection of Influenza D Virus among Swine and Cattle, Italy. *Emerging Infectious Diseases*. février 2016. Vol. 22, n° 2, pp. 352-354. DOI 10.3201/eid2202.151439.

COLLIN, Emily A., SHENG, Zizhang, LANG, Yuekun, MA, Wenjun, HAUSE, Ben M. et LI, Feng, 2014. Cocirculation of Two Distinct Genetic and Antigenic Lineages of Proposed Influenza D Virus in Cattle. *Journal of Virology*. 29 octobre 2014. Vol. 89, n° 2, pp. 1036-1042. DOI 10.1128/JVI.02718-14.

Committee on Taxonomy of Viruses ICTV, 2021. *International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV* [en ligne]. [Consulté le 18 mai 2022]. Disponible à l'adresse : <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

CONSEIL DE L'EUROPE, 1979. *Convention relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe (STE n°104)* [en ligne]. 19 septembre 1979. [Consulté le 2 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=LEGISSUM%3A128050>

CORMAN, Victor Max, KALLIES, René, PHILIPPS, Heike, GÖPNER, Gertraude, MÜLLER, Marcel Alexander, ECKERLE, Isabella, BRÜNINK, Sebastian, DROSTEN, Christian et DREXLER, Jan Felix, 2014. Characterization of a Novel Betacoronavirus Related to Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in European Hedgehogs. *Journal of Virology*. janvier 2014. Vol. 88, n° 1, pp. 717-724. DOI 10.1128/JVI.01600-13.

DANE, Hannah, DUFFY, Catherine, GUEL BENZU, Maria, HAUSE, Ben, FEE, Sean, FORSTER, Fiona, MCMENAMY, Michael J. et LEMON, Ken, 2019. Detection of influenza D virus in bovine respiratory disease samples, UK. *Transboundary and Emerging Diseases*. septembre 2019. Vol. 66, n° 5, pp. 2184-2187. DOI 10.1111/tbed.13273.

DA SILVA, Mariana S., MOSENA, Ana Cristina S., BAUMBACH, Letícia, DEMOLINER, Meriane, GULARTE, Juliana S., PAVARINI, Saulo P., DRIEMEIER, David, WEBER, Matheus N., SPILKI, Fernando R. et CANAL, Cláudio W., 2022. Cattle influenza D virus in Brazil is divergent from established lineages. *Archives of Virology*. 2022. Vol. 167, n° 4, pp. 1181-1184. DOI 10.1007/s00705-022-05416-8.

DE HAAN, C. A., SMEETS, M., VERNOOIJ, F., VENNEMA, H. et ROTTIER, P. J., 1999. Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *Journal of Virology*. septembre 1999. Vol. 73, n° 9, pp. 7441-7452. DOI 10.1128/JVI.73.9.7441-7452.1999.

DELOGU, Mauro, COTTI, Claudia, LELLI, Davide, SOZZI, Enrica, TROGU, Tiziana, LAVAZZA, Antonio, GARUTI, Giacomo, CASTRUCCI, Maria Rita, VACCARI, Gabriele, DE MARCO, Maria Alessandra et MORENO, Ana, 2020. Eco-Virological Preliminary Study of Potentially Emerging Pathogens in Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) Recovered at a Wildlife Treatment and Rehabilitation Center in Northern Italy. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*. 1 mars 2020. Vol. 10, n° 3, pp. 407. DOI 10.3390/ani10030407.

DENAES, Chloé, 2019. *Etude épidémiologique et enjeux de la dermatophytose chez les hérissons européens (Erinaceus europaeus) accueillis en 2016 au Centre de Soins de la Faune Sauvage d'Alfort (CEDAF)* [en ligne]. phd. Disponible à l'adresse : <https://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=2521>

DICKMAN, C. R., 1988. Age-related dietary change in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *Journal of Zoology*. 1988. Vol. 215, n° 1, pp. 1-14. DOI 10.1111/j.1469-7998.1988.tb04881.x.

DUCATEZ, Mariette F., PELLETIER, Claire et MEYER, Gilles, 2015. Influenza D Virus in Cattle, France, 2011–2014. *Emerging Infectious Diseases*. février 2015. Vol. 21, n° 2, pp. 368-371. DOI 10.3201/eid2102.141449.

FERGUSON, Lucas, ECKARD, Laura, EPPERSON, William B., LONG, Li-Ping, SMITH, David, HUSTON, Carla, GENOVA, Suzanne, WEBBY, Richard et WAN, Xiu-Feng, 2015. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology*. décembre 2015. Vol. 486, pp. 28-34. DOI 10.1016/j.virol.2015.08.030.

FERGUSON, Lucas, OLIVIER, Alicia K., GENOVA, Suzanne, EPPERSON, William B., SMITH, David R., SCHNEIDER, Liesel, BARTON, Kathleen, MCCUAN, Katlin, WEBBY, Richard J. et WAN, Xiu-Feng, 2016. Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle. *Journal of Virology*. 27 mai 2016. Vol. 90, n° 12, pp. 5636-5642. DOI 10.1128/JVI.03122-15.

FIELDS, Bernard N., KNIPE, David M. et HOWLEY, Peter M. (éd.), 2007. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6060-7. QR360 .V5125 2007

FISCHER, Françoise, STEGEN, Carola F., MASTERS, Paul S. et SAMSONOFF, William A., 1998. Analysis of Constructed E Gene Mutants of Mouse Hepatitis Virus Confirms a Pivotal Role for E Protein in Coronavirus Assembly. *Journal of Virology*. octobre 1998. Vol. 72, n° 10, pp. 7885-7894.

FLYNN, Orla, GALLAGHER, Clare, MOONEY, Jean, IRVINE, Claire, DUCATEZ, Mariette, HAUSE, Ben, MCGRATH, Guy et RYAN, Eoin, 2018. Influenza D Virus in Cattle, Ireland. *Emerging Infectious Diseases*. février 2018. Vol. 24, n° 2, pp. 389-391. DOI 10.3201/eid2402.170759.

FONI, Emanuela, CHIAPPONI, Chiara, BAIONI, Laura, ZANNI, Irene, MERENDA, Marianna, ROSIGNOLI, Carlo, KYRIAKIS, Constantinos S., LUINI, Mario Vittorio, MANDOLA, Maria Lucia, BOLZONI, Luca, NIGRELLI, Arrigo Daniele et FACCINI, Silvia, 2017. Influenza D in Italy: towards a better understanding of an emerging viral infection in swine. *Scientific Reports*. 15 septembre 2017. Vol. 7, n° 1, pp. 11660. DOI 10.1038/s41598-017-12012-3.

GAGLIO, Gabriella, ALLEN, Simon, BOWDEN, Lee, BRYANT, Mark et MORGAN, Eric, 2010. Parasites of European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Britain: Epidemiological study and coprological test

evaluation. *European Journal of Wildlife Research*. 1 décembre 2010. Vol. 56, pp. 839-844. DOI 10.1007/s10344-010-0381-1.

GASTAMINZA, Pablo, PERALES, Beatriz, FALCÓN, Ana M. et ORTÍN, Juan, 2003. Mutations in the N-Terminal Region of Influenza Virus PB2 Protein Affect Virus RNA Replication but Not Transcription. *Journal of Virology*. mai 2003. Vol. 77, n° 9, pp. 5098-5108. DOI 10.1128/JVI.77.9.5098-5108.2003.

GAUDINO, Maria, MORENO, Ana, SNOECK, Chantal J., ZOHARI, Siamak, SAEGERMAN, Claude, O'DONOVAN, Tom, RYAN, Eoin, ZANNI, Irene, FONI, Emanuela, SAUSY, Aurelie, HÜBSCHEN, Judith M., MEYER, Gilles, CHIAPPONI, Chiara et DUCATEZ, Mariette F., 2021. Emerging Influenza D virus infection in European livestock as determined in serology studies: Are we underestimating its spread over the continent? *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021. Vol. 68, n° 3, pp. 1125-1135. DOI 10.1111/tbed.13812.

GOECKE, Nicole B., LIANG, Yuan, OTTEN, Nina D., HJULSAGER, Charlotte K. et LARSEN, Lars E., 2022. Characterization of Influenza D Virus in Danish Calves. *Viruses*. 18 février 2022. Vol. 14, n° 2, pp. 423. DOI 10.3390/v14020423.

GÓMEZ-PUERTAS, Paulino, ALBO, Carmen, PÉREZ-PASTRANA, Esperanza, VIVO, Amparo et PORTELA, Agustín, 2000. Influenza Virus Matrix Protein Is the Major Driving Force in Virus Budding. *Journal of Virology*. décembre 2000. Vol. 74, n° 24, pp. 11538-11547.

GORIN, Stéphane, FABLET, Christelle, QUÉGUINER, Stéphane, BARBIER, Nicolas, PABOEUF, Frédéric, HERVÉ, Séverine, ROSE, Nicolas et SIMON, Gaëlle, 2019. Assessment of Influenza D Virus in Domestic Pigs and Wild Boars in France: Apparent Limited Spread within Swine Populations Despite Serological Evidence of Breeding Sow Exposure. *Viruses*. 24 décembre 2019. Vol. 12, n° 1, pp. 25. DOI 10.3390/v12010025.

GOUILH, Meriadeg Ar, PUECHMAILLE, Sébastien J., GONZALEZ, Jean-Paul, TEELING, Emma, KITTAYAPONG, Pattamaporn et MANUGUERRA, Jean-Claude, 2011. SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory. *Infection, Genetics and Evolution*. octobre 2011. Vol. 11, n° 7, pp. 1690-1702. DOI 10.1016/j.meegid.2011.06.021.

HAUSE, Ben M., COLLIN, Emily A., LIU, Runxia, HUANG, Bing, SHENG, Zizhang, LU, Wuxun, WANG, Dan, NELSON, Eric A. et LI, Feng, 2014. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. *mBio*. 4 mars 2014. Vol. 5, n° 2, pp. e00031-14. DOI 10.1128/mBio.00031-14.

HAUSE, Ben M., DUCATEZ, Mariette, COLLIN, Emily A., RAN, Zhiguang, LIU, Runxia, SHENG, Zizhang, ARMIEN, Anibal, KAPLAN, Bryan, CHAKRAVARTY, Suvabrata, HOPPE, Adam D., WEBBY, Richard J., SIMONSON, Randy R. et LI, Feng, 2013. Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. *PLoS Pathogens*. 7 février 2013. Vol. 9, n° 2, pp. e1003176. DOI 10.1371/journal.ppat.1003176.

HE, Runtao, LEESON, Andrew, ANDONOV, Anton, LI, Yan, BASTIEN, Nathalie, CAO, Jingxin, OSIOWY, Carla, DOBIE, Frederick, CUTTS, Todd, BALLANTINE, Melissa et LI, Xuguang, 2003. Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochemical and Biophysical*

*Research Communications*. 28 novembre 2003. Vol. 311, n° 4, pp. 870-876.  
DOI 10.1016/j.bbrc.2003.10.075.

HERRLER, Georg et KLENK, Hans-Dieter, 1991. Structure and Function of the Hef Glycoprotein of Influenza C Virus. *Advances in Virus Research*. 1991. Vol. 40, pp. 213-234. DOI 10.1016/S0065-3527(08)60280-8.

HOF, A. R. et BRIGHT, P. W., 2010. The value of agri-environment schemes for macro-invertebrate feeders: hedgehogs on arable farms in Britain: Agri-environment schemes benefit hedgehogs. *Animal Conservation*. 23 avril 2010. Vol. 13, n° 5, pp. 467-473. DOI 10.1111/j.1469-1795.2010.00359.x.

HOF, Anouschka R. et BRIGHT, Paul W., 2016. Quantifying the long-term decline of the West European hedgehog in England by subsampling citizen-science datasets. *European Journal of Wildlife Research*. août 2016. Vol. 62, n° 4, pp. 407-413. DOI 10.1007/s10344-016-1013-1.

HOF, Anouschka R., SNELLENBERG, Jolanda et BRIGHT, Paul W., 2012. Food or fear? Predation risk mediates edge refuging in an insectivorous mammal. *Animal Behaviour*. avril 2012. Vol. 83, n° 4, pp. 1099-1106. DOI 10.1016/j.anbehav.2012.01.042.

HORIMOTO, Taisuke, HIONO, Takahiro, MEKATA, Hirohisa, ODAGIRI, Tomoha, LEI, Zhihao, KOBAYASHI, Tomoya, NORIMINE, Junzo, INOSHIMA, Yasuo, HIKONO, Hirokazu, MURAKAMI, Kenji, SATO, Reičhiro, MURAKAMI, Hironobu, SAKAGUCHI, Masahiro, ISHII, Kazunori, ANDO, Takaaki, OTOMARU, Kounosuke, OZAWA, Makoto, SAKODA, Yoshihiro et MURAKAMI, Shin, 2016. Nationwide Distribution of Bovine Influenza D Virus Infection in Japan. *PLOS ONE*. 28 septembre 2016. Vol. 11, n° 9, pp. e0163828. DOI 10.1371/journal.pone.0163828.

HOSEINI, Seyed Mohammad, YOUSSEFI, Mohammad Reza, MOUSAPOUR, Aliasghar, DOZOURI, Rohollah, ESHKEVARI, Shahab Ramezanpour, NIKZAD, Mohammad, NIKZAD, Reza et OMIDZAHIR, Shila, 2014. HISTOPATHOLOGIC STUDY OF EOSINOPHILIC BRONCHOINTERSTITIAL PNEUMONIA CAUSED BY CRENOSOMA STRIATUM IN THE HEDGEHOG. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. juin 2014. Vol. 45, n° 2, pp. 335-338. DOI 10.1638/2013-0219.1.

HUBERT, Pauline, JULLIARD, Romain, BIAGIANTI, Sylvie et POULLE, Marie-Lazarine, 2011. Ecological factors driving the higher hedgehog (*Erinaceus europaeus*) density in an urban area compared to the adjacent rural area. *Landscape and Urban Planning*. octobre 2011. Vol. 103, n° 1, pp. 34-43. DOI 10.1016/j.landurbplan.2011.05.010.

HUTCHINSON, E. C. et FODOR, E., 2012. Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine*. 7 décembre 2012. Vol. 30, n° 51, pp. 7353-7358. DOI 10.1016/j.vaccine.2012.04.085.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database, 2022. *Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database* [en ligne]. [Consulté le 28 février 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.itis.gov/citation.html>

IUCN, 2016. *Erinaceus europaeus: Amori, G.: The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T29650A2791303* [en ligne]. 9 septembre 2016. International Union for Conservation of Nature. [Consulté le 20 juin 2022]. Disponible à l'adresse : <http://www.iucnredlist.org/details/29650/0>

JIANG, Wen-Ming, WANG, Su-Chun, PENG, Cheng, YU, Jian-Min, ZHUANG, Qing-Ye, HOU, Guang-Yu, LIU, Shuo, LI, Jin-Ping et CHEN, Ji-Ming, 2014. Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China. *Virus Genes*. décembre 2014. Vol. 49, n° 3, pp. 493-496. DOI 10.1007/s11262-014-1107-3.

JOHNSON, Dan H., 2011. Hedgehogs and Sugar Gliders: Respiratory Anatomy, Physiology, and Disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 1 mai 2011. Vol. 14, n° 2, pp. 267-285. DOI 10.1016/j.cvex.2011.03.006.

JONES, Chris, MOSS, Kirsten et SANDERS, Mark, 2005. Diet of hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in the upper Waitaki Basin, New Zealand: Implications for conservation. *New Zealand Journal of Ecology*. 2005. Vol. 29, n° 1, pp. 29-35.

JOURDE, Philippe et LENARTOWSKI, Nicolas, 2020. *Le hérisson d'Europe: description, comportement, vie sociale, mythologie, observation*. Nouvelle éd. Paris : Delachaux et Niestlé. ISBN 978-2-603-02720-2. 599.332

KIM, Hyeon Jin, JEONG, Mi Suk et JANG, Se Bok, 2021. Structure and Activities of the NS1 Influenza Protein and Progress in the Development of Small-Molecule Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*. 19 avril 2021. Vol. 22, n° 8, pp. 4242. DOI 10.3390/ijms22084242.

KOPECKY-BROMBERG, Sarah A., MARTÍNEZ-SOBRIDO, Luis, FRIEMAN, Matthew, BARIC, Ralph A. et PALESE, Peter, 2007. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Open Reading Frame (ORF) 3b, ORF 6, and Nucleocapsid Proteins Function as Interferon Antagonists. *Journal of Virology*. janvier 2007. Vol. 81, n° 2, pp. 548-557. DOI 10.1128/JVI.01782-06.

KRAMMER, Florian, SMITH, Gavin J. D., FOUCHIER, Ron A. M., PEIRIS, Malik, KEDZIERKA, Katherine, DOHERTY, Peter C., PALESE, Peter, SHAW, Megan L., TREANOR, John, WEBSTER, Robert G. et GARCÍA-SASTRE, Adolfo, 2018. Influenza. *Nature Reviews. Disease Primers*. 2018. Vol. 4, n° 1, pp. 3. DOI 10.1038/s41572-018-0002-y.

KUO, Lili et MASTERS, Paul S., 2003. The Small Envelope Protein E Is Not Essential for Murine Coronavirus Replication. *Journal of Virology*. avril 2003. Vol. 77, n° 8, pp. 4597-4608. DOI 10.1128/JVI.77.8.4597-4608.2003.

LARZUL, D., 1989. La PCR : principes et applications. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. septembre 1989. Vol. 4, n° 4, pp. 19-26. DOI 10.1016/S0923-2532(89)80086-9.

LAU, Susanna K. P., LUK, Hayes K. H., WONG, Antonio C. P., FAN, Rachel Y. Y., LAM, Carol S. F., LI, Kenneth S. M., AHMED, Syed Shakeel, CHOW, Franklin W. N., CAI, Jian-Piao, ZHU, Xun, CHAN, Jasper F. W., LAU, Terrence C. K., CAO, Kaiyuan, LI, Mengfeng, WOO, Patrick C. Y. et YUEN, Kwok-Yung, 2019. Identification of a Novel Betacoronavirus (Merbecovirus) in Amur Hedgehogs from China. *Viruses*. novembre 2019. Vol. 11, n° 11, pp. 980. DOI 10.3390/v11110980.

LAUDE, Hubert, 2021. Coronavirus, des animaux et des Hommes: faits & méfaits. [en ligne]. conférence. 26 avril 2021. Disponible à l'adresse : <https://www.youtube.com/watch?v=2BnTVuexrFs>

LAURENT, Gautier, 2018. *Création d'un nouveau dossier clinique permettant l'amélioration de la prise en charge des animaux de la faune sauvage européenne reçus au centre d'accueil de la faune*

sauvage (CEDAF), ainsi que l'enregistrement et le traitement statistique des données de l'année 2017 [en ligne]. phd. Disponible à l'adresse : <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=3428>

LEE, Jinhwa, WANG, Liping, PALINSKI, Rachel, WALSH, Tim, HE, Dongchang, LI, Yonghai, WU, Rui, LANG, Yuekun, SUNWOO, Sun-Young, RICHT, Juergen A. et MA, Wenjun, 2019. Comparison of Pathogenicity and Transmissibility of Influenza B and D Viruses in Pigs. *Viruses*. 27 septembre 2019. Vol. 11, n° 10, pp. 905. DOI 10.3390/v11100905.

LI, Fang, 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*. 29 septembre 2016. Vol. 3, n° 1, pp. 237-261. DOI 10.1146/annurev-virology-110615-042301.

LINNÉ, Carl von et SALVIUS, Lars, 1758. *Caroli Linnaei...Systema naturae per regna tria naturae :secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. [en ligne]. Holmiae : : Impensis Direct. Laurentii Salvii,. Disponible à l'adresse : <https://www.biodiversitylibrary.org/item/10277>

LUGTON, I. W., JOHNSTONE, A. C. et MORRIS, R. S., 1995. Mycobacterium bovis infection in New Zealand hedgehogs (*Erinaceus europaeus*). *New Zealand Veterinary Journal*. décembre 1995. Vol. 43, n° 7, pp. 342-345. DOI 10.1080/00480169.1995.35917.

LUO, Junrong, FERGUSON, Lucas, SMITH, David R., WOOLUMS, Amelia R., EPPERSON, William B. et WAN, Xiu-Feng, 2017. Serological evidence for high prevalence of Influenza D Viruses in Cattle, Nebraska, United States, 2003–2004. *Virology*. 15 janvier 2017. Vol. 501, pp. 88-91. DOI 10.1016/j.virol.2016.11.004.

MAJEED, S. K. et COOPER, J. E., 1984. Lesions associated with a *Capillaria* infestation in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Journal of Comparative Pathology*. 1 octobre 1984. Vol. 94, n° 4, pp. 625-628. DOI 10.1016/0021-9975(84)90069-0.

MANZOCCHI, Simone, VENCO, Luigi et DI CESARE, Angela, 2016. What is your diagnosis? Squash preparation from the lung of a hedgehog. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016. Vol. 45, n° 4, pp. 715-716. DOI 10.1111/vcp.12409.

MARIACHER, Alessia, SANTINI, Andrea, DEL LESTO, Irene, TONON, Sara, CARDINI, Elena, BARONE, Antonino, ELEN, Claudia, FICHI, Gianluca et PERRUCCI, Stefania, 2021. Endoparasite Infections of the European Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Central Italy. *Animals*. novembre 2021. Vol. 11, n° 11, pp. 3171. DOI 10.3390/ani11113171.

MATHEWS, Fiona, KUBASIEWICZ, L. M., GURNELL, J., HARROWER, Colin Andrew, MCDONALD, R.A. et SHORE, 2018. *A Review of the Population and Conservation Status of British Mammals: Technical Summary*. [en ligne]. [Consulté le 6 mars 2022]. ISBN 978-1-78354-485-1. Disponible à l'adresse : [https://nls.idls.org.uk/welcome.html?ark:/81055/vdc\\_100062489599.0x000001](https://nls.idls.org.uk/welcome.html?ark:/81055/vdc_100062489599.0x000001)

MITRA, Namita, CERNICCHIARO, Natalia, TORRES, Siddartha, LI, Feng et HAUSE, Ben M., 2016. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. *The Journal of General Virology*. août 2016. Vol. 97, n° 8, pp. 1771-1784. DOI 10.1099/jgv.0.000492.

MNHN & OFB [ED], 2003. Fiche de *Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN). *INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel* [en ligne]. 2022 2003. [Consulté le 1 mars 2022]. Disponible à l'adresse : [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/60015](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/60015)

MOLINI, Umberto, CURINI, Valentina, JACOBS, Eugene, TONGO, Eesie, BERJAOUI, Shadia, HEMBERGER, Maria Yvonne, PUGLIA, Ilaria, JAGO, Mark, KHAISEB, Siegfried, CATTOLI, Giovanni, DUNDON, William G., LORUSSO, Alessio et DI GIALLONARDO, Francesca, 2022. First influenza D virus full-genome sequence retrieved from livestock in Namibia, Africa. *Acta Tropica*. 1 août 2022. Vol. 232, pp. 106482. DOI 10.1016/j.actatropica.2022.106482.

MONCHATRE-LEROY, Elodie, BOUÉ, Franck, BOUCHER, Jean-Marc, RENAULT, Camille, MOUTOU, François, AR GOUILH, Meriadeg et UMHANG, Gérald, 2017. Identification of Alpha and Beta Coronavirus in Wildlife Species in France: Bats, Rodents, Rabbits, and Hedgehogs. *Viruses*. 29 novembre 2017. Vol. 9, n° 12, pp. 364. DOI 10.3390/v9120364.

MORRIS, Pat, BERTHOUD, Guy, TROUGHTON, Guy, SCHMID, Oskar et VISAGE, Albert, 1998. *La vie du hérisson*. 2e éd. Nauchâtel Paris : Delachaux et Niestlé. ISBN 978-2-603-00863-8. 59

MULLINEAUX, Elizabeth et KEEBLE, Emma J. (éd.), 2016. *BSAVA manual of wildlife casualties*. Second edition. Quedgeley : British Small Animal Veterinary Association. ISBN 978-1-905319-80-0.

MURAKAMI, Shin, ENDOH, Maiko, KOBAYASHI, Tomoya, TAKENAKA-UEMA, Akiko, CHAMBERS, James K., UCHIDA, Kazuyuki, NISHIHARA, Masugi, HAUSE, Benjamin et HORIMOTO, Taisuke, 2016. Influenza D Virus Infection in Herd of Cattle, Japan. *Emerging Infectious Diseases*. août 2016. Vol. 22, n° 8, pp. 1517-1519. DOI 10.3201/eid2208.160362.

MURAKAMI, Shin, ODAGIRI, Tomoha, MELAKU, Simenew Keskes, BAZARTSEREN, Boldbaatar, ISHIDA, Hiroho, TAKENAKA-UEMA, Akiko, MURAKI, Yasushi, SENTSUI, Hiroshi et HORIMOTO, Taisuke, 2019. Influenza D Virus Infection in Dromedary Camels, Ethiopia. *Emerging Infectious Diseases*. juin 2019. Vol. 25, n° 6, pp. 1224-1226. DOI 10.3201/eid2506.181158.

MURET, Lorris, 2020. Mise en ligne d'un atlas d'images tomодensitométriques physiologiques du hérisson d'Europe (*Erinaceus europaeus*). . 2020. pp. 54.

NAEM, S., TAVAKOLI, M., JAVANBAKHT, J., ALIMOHAMMADI, S., FARSHID, A. A. et MOHAMMAD HASSAN, M. A., 2014. Macroscopic and microscopic examination of pulmonary *Crenosoma striatum* in hedgehog. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*. juin 2014. Vol. 38, n° 2, pp. 185-189. DOI 10.1007/s12639-012-0211-3.

NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTAÑO, M.J. et SOLERA, J., 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. janvier 2015. Vol. 439, pp. 231-250. DOI 10.1016/j.cca.2014.10.017.

NEDLAND, H., WOLLMAN, J., SREENIVASAN, C., QUAIST, M., SINGREY, A., FAWCETT, L., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., NELSON, E., KAUSHIK, R. S., WANG, D. et LI, F., 2018. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. *Zoonoses and public health*. février 2018. Vol. 65, n° 1, pp. e148. DOI 10.1111/zph.12423.

NEUMAN, Benjamin W., KISS, Gabriella, KUNDING, Andreas H., BHELLA, David, BAKSH, M. Fazil, CONNELLY, Stephen, DROESE, Ben, KLAUS, Joseph P., MAKINO, Shinji, SAWICKI, Stanley G., SIDDELL,

- Stuart G., STAMOU, Dimitrios G., WILSON, Ian A., KUHN, Peter et BUCHMEIER, Michael J., 2011. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*. avril 2011. Vol. 174, n° 1, pp. 11-22. DOI 10.1016/j.jsb.2010.11.021.
- NG, Terry Fei Fan, KONDOV, Nikola O., DENG, Xutao, VAN EENENNAAM, Alison, NEIBERGS, Holly L. et DELWART, Eric, 2015. A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. *Journal of Virology*. mai 2015. Vol. 89, n° 10, pp. 5340-5349. DOI 10.1128/JVI.00064-15.
- NISHIMURA, Hidekazu, HARA, Masahiro, SUGAWARA, Kanetsu, KITAME, Fumio, TAKIGUCHI, Kazuhiko, UMETSU, Yoriko, TONOSAKI, Akira et NAKAMURA, Kiyoto, 1990. Characterization of the cord-like structures emerging from the surface of influenza C virus-infected cells. *Virology*. 1 novembre 1990. Vol. 179, n° 1, pp. 179-188. DOI 10.1016/0042-6822(90)90287-2.
- NODA, Takeshi et KAWAOKA, Yoshihiro, 2010. Structure of Influenza Virus Ribonucleoprotein Complexes and Their Packaging into Virions. *Reviews in medical virology*. novembre 2010. Vol. 20, n° 6, pp. 380-391. DOI 10.1002/rmv.666.
- OLIVA, Justine, 2019. *Eco-épidémiologie du virus influenza D : évaluation du spectre d'hôtes et du risque d'émergence* [en ligne]. phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier. [Consulté le 16 juin 2022]. Disponible à l'adresse : <http://thesesups.ups-tlse.fr/4492/>
- OLIVA, Justine, EICHENBAUM, Amit, BELIN, Jade, GAUDINO, Maria, GUILLOTIN, Jean, ALZIEU, Jean-Pierre, NICOLLET, Philippe, BRUGIDOU, Roland, GUENEAU, Eric, MICHEL, Evelyne, MEYER, Gilles et DUCATEZ, Mariette F., 2019. Serological Evidence of Influenza D Virus Circulation Among Cattle and Small Ruminants in France. *Viruses*. 5 juin 2019. Vol. 11, n° 6, pp. 516. DOI 10.3390/v11060516.
- OSBORNE, Christina, CRYAN, Paul M., O'SHEA, Thomas J., OKO, Lauren M., NDALUKA, Christina, CALISHER, Charles H., BERGLUND, Andrew D., KLAVETTER, Mead L., BOWEN, Richard A., HOLMES, Kathryn V. et DOMINGUEZ, Samuel R., 2011. Alphacoronaviruses in New World Bats: Prevalence, Persistence, Phylogeny, and Potential for Interaction with Humans. *PLoS ONE*. 12 mai 2011. Vol. 6, n° 5, pp. e19156. DOI 10.1371/journal.pone.0019156.
- PAYNE, Susan, 2017. Family Coronaviridae. *Viruses*. 2017. pp. 149-158. DOI 10.1016/B978-0-12-803109-4.00017-9.
- PÉREZ-LOSADA, Marcos, ARENAS, Miguel, GALÁN, Juan Carlos, PALERO, Ferran et GONZÁLEZ-CANDELAS, Fernando, 2015. Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution*. mars 2015. Vol. 30, pp. 296-307. DOI 10.1016/j.meegid.2014.12.022.
- PEUKES, Julia, XIONG, Xiaoli et BRIGGS, John A. G., 2021. New structural insights into the multifunctional influenza A matrix protein 1. *Febs Letters*. octobre 2021. Vol. 595, n° 20, pp. 2535-2543. DOI 10.1002/1873-3468.14194.
- POMORSKA-MÓL, Małgorzata, RUSZKOWSKI, Jakub J., GOGULSKI, Maciej et DOMANSKA-BLICHAZ, Katarzyna, 2022. First detection of Hedgehog coronavirus 1 in Poland. *Scientific Reports*. février 2022. Vol. 12, n° 1, pp. 2386. DOI 10.1038/s41598-022-06432-z.

PRENDERGAST, Brian J., FREEMAN, David A., ZUCKER, Irving et NELSON, Randy J., 2002. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. avril 2002. Vol. 282, n° 4, pp. R1054-R1062. DOI 10.1152/ajpregu.00562.2001.

QUAST, Megan, SREENIVASAN, Chithra, SEXTON, Gabriel, NEDLAND, Hunter, SINGREY, Aaron, FAWCETT, Linda, MILLER, Grant, LAUER, Dale, VOSS, Shauna, POLLOCK, Stacy, CUNHA, Cristina W., CHRISTOPHER-HENNINGS, Jane, NELSON, Eric et LI, Feng, 2015. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. *Veterinary microbiology*. 18 novembre 2015. Vol. 180, n° 0, pp. 281-285. DOI 10.1016/j.vetmic.2015.09.005.

REEVE, Nigel et LINDSAY, Ruth, 1994. *Hedgehogs*. 1. publ. London : Poyser. Poyser natural history. ISBN 978-0-85661-081-3.

ROBINSON, Ian et ROUTH, Andrew, 1999. Veterinary care of the hedgehog. *In Practice*. 1999. Vol. 21, n° 3, pp. 128-137. DOI 10.1136/inpract.21.3.128.

ROOS, Staffan, JOHNSTON, Alison et NOBLE, David, 2012. UK Hedgehog Datasets and their Potential for Long-Term Monitoring. . 2012. N° 598, pp. 65.

SAEGERMAN, Claude, GAUDINO, Maria, SAVARD, Christian, BROES, André, ARIEL, Olivier, MEYER, Gilles et DUCATEZ, Mariette F., 2022. Influenza D virus in respiratory disease in Canadian, province of Québec, cattle: Relative importance and evidence of new reassortment between different clades. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2022. Vol. 69, n° 3, pp. 1227-1245. DOI 10.1111/tbed.14085.

SAEGERMAN, Claude, SALEM, Elias, AIT LBACHA, Hicham, ALALI, Said, ZOUAGUI, Zaid, MEYER, Gilles et DUCATEZ, Mariette F., 2021. Formal estimation of the seropositivity cut-off of the hemagglutination inhibition assay in field diagnosis of influenza D virus in cattle and estimation of the associated true prevalence in Morocco. *Transboundary and Emerging Diseases*. mai 2021. Vol. 68, n° 3, pp. 1392-1399. DOI 10.1111/tbed.13805.

SALDANHA, I. F., LAWSON, B., GOHARRIZ, H., RODRIGUEZ-RAMOS FERNANDEZ, J., JOHN, S. K., FOOKS, A. R., CUNNINGHAM, A. A., JOHNSON, N. et HORTON, D. L., 2019. Extension of the known distribution of a novel clade C betacoronavirus in a wildlife host. *Epidemiology and Infection*. 3 avril 2019. Vol. 147, pp. e169. DOI 10.1017/S0950268819000207.

SALEM, Elias, COOK, Elizabeth A.J., LBACHA, Hicham Ait, OLIVA, Justine, AWOUME, Félix, APLOGAN, Gilbert L., HYMANN, Emmanuel Couacy, MULOI, Dishon, DEEM, Sharon L., ALALI, Said, ZOUAGUI, Zaid, FÈVRE, Eric M., MEYER, Gilles et DUCATEZ, Mariette F., 2017. Serologic Evidence for Influenza C and D Virus among Ruminants and Camelids, Africa, 1991–2015. *Emerging Infectious Diseases*. septembre 2017. Vol. 23, n° 9, pp. 1556-1559. DOI 10.3201/eid2309.170342.

SALEM, Elias, HÄGGLUND, Sara, CASSARD, Hervé, CORRE, Tifenn, NÄSLUND, Katarina, FORET, Charlotte, GAUTHIER, David, PINARD, Anne, DELVERDIER, Maxence, ZOHARI, Siamak, VALARCHER, Jean-François, DUCATEZ, Mariette et MEYER, Gilles, 2019. Pathogenesis, Host Innate Immune Response, and Aerosol Transmission of Influenza D Virus in Cattle. *Journal of Virology*. 21 mars 2019. Vol. 93, n° 7, pp. e01853-18. DOI 10.1128/JVI.01853-18.

- SALTZ, David, 2001. Wildlife Management. In : *Encyclopedia of Biodiversity* [en ligne]. Elsevier. pp. 823-829. [Consulté le 26 avril 2022]. ISBN 978-0-12-226865-6. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122268652002844>
- SAMJI, Tasleem, 2009. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. décembre 2009. Vol. 82, n° 4, pp. 153-159.
- SANOGO, Idrissa Nonmon, KOUAKOU, Casimir, BATAWUI, Komla, DJEGUI, Fidélia, BYARUGABA, Denis K., ADJIN, Rachidatou, ADJABLI, Komlan, WABWIRE-MANGEN, Fred, ERIMA, Bernard, ATIM, Gladys, UKULI, Qouilazoni A., TUGUME, Titus, DOGNO, Koffi, GO-MARO, Wolali, COUACY-HYMANN, Emmanuel, KAYALI, Ghazi, MCKENZIE, Pamela, WEBBY, Richard J. et DUCATEZ, Mariette F., 2021. Serological Surveillance of Influenza D Virus in Ruminants and Swine in West and East Africa, 2017–2020. *Viruses*. 2 septembre 2021. Vol. 13, n° 9, pp. 1749. DOI 10.3390/v13091749.
- SCHOEMAN, Dewald et FIELDING, Burtram C., 2019. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal*. 27 mai 2019. Vol. 16, n° 1, pp. 69. DOI 10.1186/s12985-019-1182-0.
- SILVEIRA, Simone, FALKENBERG, Shollie M., KAPLAN, Bryan S., CROSSLEY, Beate, RIDPATH, Julia F., BAUERMANN, Fernando B., FOSSLER, Charles P., DARGATZ, David A., DASSANAYAKE, Rohana P., VINCENT, Amy L., CANAL, Cláudio W. et NEILL, John D., 2019. Serosurvey for Influenza D Virus Exposure in Cattle, United States, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*. novembre 2019. Vol. 25, n° 11, pp. 2074-2080. DOI 10.3201/eid2511.190253.
- SMITH, Donald B., GAUNT, Eleanor R., DIGARD, Paul, TEMPLETON, Kate et SIMMONDS, Peter, 2016. Detection of influenza C virus but not influenza D virus in Scottish respiratory samples. *Journal of Clinical Virology*. janvier 2016. Vol. 74, pp. 50-53. DOI 10.1016/j.jcv.2015.11.036.
- SNOECK, Chantal J., OLIVA, Justine, PAULY, Maude, LOSCH, Serge, WILDSCHUTZ, Félix, MULLER, Claude P., HÜBSCHEN, Judith M. et DUCATEZ, Mariette F., 2018. Influenza D Virus Circulation in Cattle and Swine, Luxembourg, 2012–2016. *Emerging Infectious Diseases*. juillet 2018. Vol. 24, n° 7, pp. 1388-1389. DOI 10.3201/eid2407.171937.
- SREENIVASAN, Chithra, THOMAS, Milton, SHENG, Zizhang, HAUSE, Ben M., COLLIN, Emily A., KNUDSEN, David E. B., PILLATZKI, Angela, NELSON, Eric, WANG, Dan, KAUSHIK, Radhey S. et LI, Feng, 2015. Replication and Transmission of the Novel Bovine Influenza D Virus in a Guinea Pig Model. *Journal of Virology*. 16 septembre 2015. Vol. 89, n° 23, pp. 11990-12001. DOI 10.1128/JVI.01630-15.
- STEGMANN, Toon, 2000. Membrane Fusion Mechanisms: The Influenza Hemagglutinin Paradigm and its Implications for Intracellular Fusion. *Traffic*. 2000. Vol. 1, n° 8, pp. 598-604. DOI 10.1034/j.1600-0854.2000.010803.x.
- SU, Shuo, FU, Xinliang, LI, Gairu, KERLIN, Fiona et VEIT, Michael, 2017. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*. 17 novembre 2017. Vol. 8, n° 8, pp. 1580-1591. DOI 10.1080/21505594.2017.1365216.
- SURJIT, Milan, LIU, Boping, JAMEEL, Shahid, CHOW, Vincent T. K. et LAL, Sunil K., 2004. The SARS coronavirus nucleocapsid protein induces actin reorganization and apoptosis in COS-1 cells in the

absence of growth factors. *Biochemical Journal*. 1 octobre 2004. Vol. 383, n° Pt 1, pp. 13-18. DOI 10.1042/BJ20040984.

SYMONDS, Matthew R. E., 2005. Phylogeny and life histories of the « Insectivora »: controverses and consequences. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. février 2005. Vol. 80, n° 1, pp. 93-128. DOI 10.1017/s1464793104006566.

TAUCHER, Anouk L., GLOOR, Sandra, DIETRICH, Adrian, GEIGER, Madeleine, HEGGLIN, Daniel et BONTADINA, Fabio, 2020. Decline in Distribution and Abundance: Urban Hedgehogs under Pressure. *Animals*. septembre 2020. Vol. 10, n° 9, pp. 1606. DOI 10.3390/ani10091606.

TROMBETTA, Claudia Maria, MONTOMOLI, Emanuele, DI BARTOLO, Ilaria, OSTANELLO, Fabio, CHIAPPONI, Chiara et MARCHI, Serena, 2022. Detection of antibodies against influenza D virus in swine veterinarians in Italy in 2004. *Journal of Medical Virology*. juin 2022. Vol. 94, n° 6, pp. 2855-2859. DOI 10.1002/jmv.27466.

UICN, 2012. *Catégories et Critères de la Liste rouge de l'UICN : Version 3.1*. Gland, Suisse. ISBN 978-2-8317-1540-7.

UICN FRANCE, MNHN, FEPM et ONCFS, 2017. *La Liste rouge des espèces menacées en France – Chapitre Mammifères de France métropolitaine* [en ligne]. [Consulté le 2 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://uicn.fr/>

V'KOVSKI, Philip, KRATZEL, Annika, STEINER, Silvio, STALDER, Hanspeter et THIEL, Volker, 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*. mars 2021. Vol. 19, n° 3, pp. 155-170. DOI 10.1038/s41579-020-00468-6.

WANG, Mingyang et VEIT, Michael, 2016. Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus. *Protein & Cell*. janvier 2016. Vol. 7, n° 1, pp. 28-45. DOI 10.1007/s13238-015-0193-x.

WEBB, Peter I. et ELLISON, Jodelle, 1998. Normothermy, torpor, and arousal in hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) from Dunedin. *New Zealand Journal of Zoology*. janvier 1998. Vol. 25, n° 2, pp. 85-90. DOI 10.1080/03014223.1998.9518139.

WHITE, Sarah K., MA, Wenjun, MCDANIEL, Clinton J., GRAY, Gregory C. et LEDNICKY, John A., 2016. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *Journal of Clinical Virology*. 1 août 2016. Vol. 81, pp. 31-33. DOI 10.1016/j.jcv.2016.05.017.

WHO, 2019. Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV). [en ligne]. 2019. [Consulté le 4 juin 2022]. Disponible à l'adresse : [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))

WILLIAMS, Ben M., BAKER, Philip J., THOMAS, Emily, WILSON, Gavin, JUDGE, Johanna et YARNELL, Richard W., 2018. Reduced occupancy of hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in rural England and Wales: The influence of habitat and an asymmetric intra-guild predator. *Scientific Reports*. décembre 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 12156. DOI 10.1038/s41598-018-30130-4.

WILSON, Lauren, MCKINLAY, Carolyn, GAGE, Peter et EWART, Gary, 2004. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology*. 5 décembre 2004. Vol. 330, n° 1, pp. 322-331. DOI 10.1016/j.virol.2004.09.033.

WOO, Patrick C. Y., LAU, Susanna K. P., LAM, Carol S. F., LAU, Candy C. Y., TSANG, Alan K. L., LAU, John H. N., BAI, Ru, TENG, Jade L. L., TSANG, Chris C. C., WANG, Ming, ZHENG, Bo-Jian, CHAN, Kwok-Hung et YUEN, Kwok-Yung, 2012. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*. avril 2012. Vol. 86, n° 7, pp. 3995-4008. DOI 10.1128/JVI.06540-11.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002. *WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance* [en ligne]. 2002. [Consulté le 21 avril 2022]. Disponible à l'adresse : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68026>

YALDEN, D. W., 1976. The food of the hedgehog in England. *Acta Theriologica*. 10 août 1976. Vol. 21, pp. 401-424. DOI 10.4098/AT.arch.76-39.

YAMASHITA, Makoto, KRYSTAL, Mark et PALESE, Peter, 1989. Comparison of the three large polymerase proteins of influenza A, B, and C viruses. *Virology*. 1 août 1989. Vol. 171, n° 2, pp. 458-466. DOI 10.1016/0042-6822(89)90615-6.

YAN, Xiaohong, HAO, Qian, MU, Yongxin, TIMANI, Khalid Amine, YE, Linbai, ZHU, Ying et WU, Jianguo, 2006. Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates the expression of cyclooxygenase-2 by binding directly to regulatory elements for nuclear factor-kappa B and CCAAT/enhancer binding protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006. Vol. 38, n° 8, pp. 1417-1428. DOI 10.1016/j.biocel.2006.02.003.

YILMAZ, Aysun, UMAR, Sajid, TURAN, Nuri, AYDIN, Ozge, TALI, H. Emre, OGUZOGLU, Tuba C., YILMAZ, Huseyin, RICHT, Juergen A. et DUCATEZ, Mariette F., 2020. First report of influenza D virus infection in Turkish cattle with respiratory disease. *Research in Veterinary Science*. 1 juin 2020. Vol. 130, pp. 98-102. DOI 10.1016/j.rvsc.2020.02.017.

YOUNG, R. P., DAVISON, J., TREWBY, I. D., WILSON, G. J., DELAHAY, R. J. et DONCASTER, C. P., 2006. Abundance of hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in relation to the density and distribution of badgers (*Meles meles*). *Journal of Zoology*. 2006. Vol. 269, n° 3, pp. 349-356. DOI 10.1111/j.1469-7998.2006.00078.x.

YU, Jieshi, LI, Feng et WANG, Dan, 2020. The first decade of research advances in influenza D virus. *The Journal of General Virology*. 19 novembre 2020. Vol. 102, n° 1, pp. jgv001529. DOI 10.1099/jgv.0.001529.

ZECCHINI, Béatrice, 1992. *Les Serpents de France : systématique, biologie des venins, clinique et thérapeutique des morsures : expérience du Centre anti-poisons de Marseille* [en ligne]. These de doctorat. Université d'Aix-Marseille II. Faculté de médecine (1970-2011). [Consulté le 1 septembre 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.theses.fr/1992AIX20212>

ZHAI, Shao-Lun, ZHANG, He, CHEN, Sheng-Nan, ZHOU, Xia, LIN, Tao, LIU, Runxia, LV, Dian-Hong, WEN, Xiao-Hui, WEI, Wen-Kang, WANG, Dan et LI, Feng, 2017. Influenza D Virus in Animal Species in Guangdong Province, Southern China. *Emerging Infectious Diseases*. août 2017. Vol. 23, n° 8, pp. 1392-1396. DOI 10.3201/eid2308.170059.

ZHANG, Maodong, HILL, Janet E., FERNANDO, Champika, ALEXANDER, Trevor W., TIMSIT, Edouard, VAN DER MEER, Frank et HUANG, Yanyun, 2019. Respiratory viruses identified in western Canadian beef cattle by metagenomic sequencing and their association with bovine respiratory disease. *Transboundary and Emerging Diseases*. mai 2019. Vol. 66, n° 3, pp. 1379-1386. DOI 10.1111/tbed.13172.

N°dossier :

**Fiche hérissons – travail de thèse**  
**(à remplir en plus du dossier normal)**

Date :

Identification			
phénotype	<input type="checkbox"/> Nouveau-né <i>Glabres, roses, yeux et oreilles fermés, pas de mise en boule, &lt;25g</i>	<input type="checkbox"/> Jeune non-autonome <i>Apparition poils et piquants <u>bruns</u> (après les blancs), yeux ouverts, mise en boule, (&lt;100g)</i>	<input type="checkbox"/> Jeune autonome <i>Aspect d'un adulte en miniature &gt;100g</i>
	<input type="checkbox"/> Adulte	<input type="checkbox"/> indéterminé	
Sexe	<input type="checkbox"/> mâle	<input type="checkbox"/> femelle	

Commémoratifs	
Date et lieu de découverte	
Circonstances de découverte	

Examen clinique d'entrée (réalisé dans les 12-24h max après l'admission)	
Contexte de l'examen clinique	<input type="checkbox"/> calme <input type="checkbox"/> agité
Examen à distance	
Vigilance / attitude / démarche	• Marche : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> NE
	• Se met en boule <input type="checkbox"/> spontanément <input type="checkbox"/> après stimulation <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> NE (anesthésie)
	• Décubitus : <input type="checkbox"/> sternal <input type="checkbox"/> latéral <input type="checkbox"/> non
	• Réagit à une stimulation : <input type="checkbox"/> Oui* <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> NE <i>(claquement de doigts) *tressaille/se met en boule/fuit</i>
Fèces : (à observer et à récolter environ 24h après l'admission)	Consistance : <input type="checkbox"/> liquide <input type="checkbox"/> molle <input type="checkbox"/> normale <input type="checkbox"/> dure Couleur : <input type="checkbox"/> normale (marron foncé) <input type="checkbox"/> noire <input type="checkbox"/> jaune <input type="checkbox"/> verdâtre
Examen en main	
Poids (g) + score corporel (cf fiche dédiée : reporter toute les informations en fonction de la catégorie)	
Couleur des muqueuses	<input type="checkbox"/> rose <input type="checkbox"/> Blanc-rosé <input type="checkbox"/> pâle <input type="checkbox"/> NE
TRC (s)	<input type="checkbox"/> 1-2sec <input type="checkbox"/> >2 sec
Etat d'hydratation	<input type="checkbox"/> énophtalmie <input type="checkbox"/> pli de peau persistant <input type="checkbox"/> muqueuses buccales sèches
Lésion dermatologique visible	Si oui préciser la localisation :
Présence de plaie	Si oui préciser la localisation :
Examen de l'appareil respiratoire	
FR	
Bruits respiratoires	<input type="checkbox"/> toux <input type="checkbox"/> éternuements <input type="checkbox"/> sifflements <input type="checkbox"/> Bruits respiratoires. amplifiés <input type="checkbox"/> Autre**
Présence de jetage	<input type="checkbox"/> oculaire <input type="checkbox"/> nasal
Autres signes cliniques / remarques	

\*\* détailler : .....

.....

.....

PS  Ecouvillon nasal  Prélèvement fèces

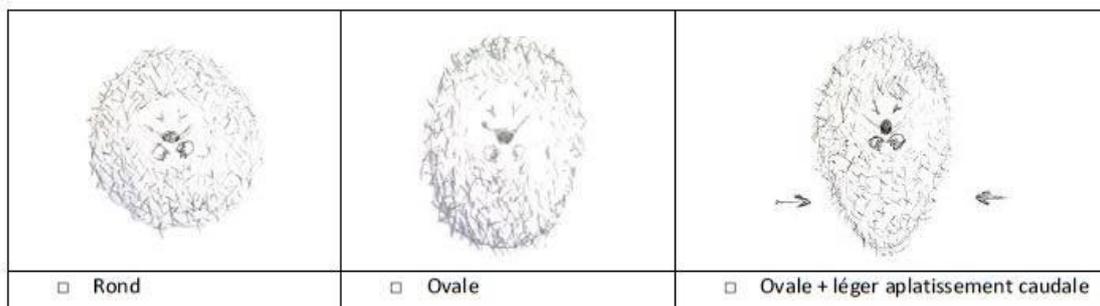
*(ajouter également la T°C et la FC et toute autre information si elles ont été prises lors de l'examen)*

Annexe 1 : Fiche d'examen clinique à remplir lors de l'admission d'un hérisson au centre de soins

## Evaluer l'état corporel d'un hérisson

**1<sup>er</sup> cas : le hérisson se met en boule** (*s'il ne le fait pas spontanément, essayer de le stimuler légèrement en le touchant simplement*)

1) Evaluer la forme du hérisson roulé en boule, tenu dans la main ou posé sur la table



2) Calculer l'indice de Bunnell

Poser le mètre sur une surface plane

Déposer le hérisson roulé en boule par-dessus, face dorsale contre la table

→ l'animal doit être le plus en boule possible et ne pas pencher d'un côté !

Prendre les 2 mesures suivantes, au demi-centimètre près :



→ Faire le tour de l'animal sans serrer le mètre, ne pas aplatir les piquants en faisant la mesure.

**A : circonférence longitudinale**

*la mesure passe par l'axe de symétrie bilatérale de l'animal*

**B : Circonférence latitudinale**

*la mesure passe par le bout du nez de l'animal*

Calculer le rapport **B/A = indice de Bunnell**

→ Arrondir le résultat au centième près (*0.805 devient 0.81*)

Annexe 2 : Fiche d'évaluation de l'état corporel d'un hérisson (réalisée par F. Birot-Zecchini)

**2<sup>ème</sup> cas : le hérisson ne se met pas en boule** (*traumatisme, faiblesse trop importante, trop jeune, etc.*)

Si possible, le poser sur le dos et observer la face ventrale.

Placer le hérisson sur cette échelle illustrée et reporter l'état clinique associé (chiffre entier, sans virgule).



1

2

3

4

5

apparence mince  
extrémité arrière pointue  
côtes saillantes et  
facilement palpables  
proéminences osseuses

apparence ronde  
en boule, il forme un O  
palpation sans saillie  
osseuse particulière

**Sources :**

CRÉATION D'UN NOUVEAU DOSSIER CLINIQUE PERMETTANT L'AMÉLIORATION DE LA PRISE EN CHARGE DES ANIMAUX DE LA FAUNE SAUVAGE EUROPÉENNE REÇUS AU CENTRE D'ACCUEIL DE LA FAUNE SAUVAGE (CEDAF), AINSI QUE L'ENREGISTREMENT ET LE TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES DE L'ANNÉE 2017, thèse d'exercice vétérinaire (2018), Gautier Laurent

ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE ET ENJEUX DE LA DERMATOPHYTOSE CHEZ LES HÉRISSONS EUROPÉENS (ERINACEUS EUROPAEUS) ACCUEILLIS EN 2016 AU CENTRE DE SOINS DE LA FAUNE SAUVAGE D'ALFORT (CEDAF), thèse d'exercice vétérinaire (2019), Chloé Denoës

BUNNELL T. - The Assessment of British Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) Casualties on Arrival and Determination of Optimum Release Weights Using a New Index. <http://www.tonibunnell.co.uk/casualties.htm/>

### Prélèvements hérissons (thèse de F. Birot-Zecchini)

**Pour les hérissons de plus de 200g, réaliser les prélèvements suivants :**

Prélèvements obligatoires		Prélèvement facultatif (3)		
Nom Quand ?	RINÇAGE NASAL A l'admission (au plus tard 24h après)	ECOUVILLON DE FECES	PRISE DE SANG	
Matériel	- Seringue 1ml - Tubulure cathéter jaune - NaCl 0.9% - Tube stérile 1,5ml	- Ecouvillon sec stérile - Tube stérile 1,5ml	- Seringue - Aiguille - Tube Microvet EDTA - Tube sec - Tube 1.5ml	Dans les 24h suivant l'admission
			AG isoflurane (2) ↓ Ponction à la veine cave craniale, ou à défaut à la veine saphène externe : 1ml (min) à 2ml <b>MAXIMUM</b>	
<b>Réalisation</b>				
id. tube Stockage	N° dossier + date + « RN »	N° dossier + date + « F »	N° dossier + date + « S » sur chaque tube	
	Mettre le tube à -20°C dans la boîte marquée « PIVts thèse F. Birot-Zecchini »	Mettre le tube au réfrigérateur Envoi dans les 24h max au labo central de l'ENVT pour NFS	Mettre le tube à -20°C dans la boîte marquée « PIVts thèse F. Birot-Zecchini »	
Instiller 0,5ml de NaCl dans la narine gauche à l'aide de la seringue munie de la tubulure Aspirer du liquide ↓ Déposer ce liquide dans le tube stérile (1)		Introduire le bout de l'écouvillon dans un tube stérile puis tordre l'écouvillon de façon à casser l'extrémité dans le tube ↓ Déposer immédiatement 0,2ml dans le tube EDTA (1)		
AG isoflurane (2) ↓ S'il reste du sang, le déposer dans le tube sec ↓ Stockage 30 min (minimum) à 2h (maximum) à T° ambiante ↓ Centrifugation 2000g pendant 10min ↓ Prélever le sérum et le déposer dans un tube 1.5ml		AG isoflurane (2) ↓ (2)		

(1) A défaut si ce n'est pas réalisable, éponger du liquide avec un écouvillon et casser l'écouvillon dans le tube stérile. Les instructions suivantes sont inchangées

(2) pas d'AG isoflurane pour les animaux ne se mettant pas en boule (débilites)

(3) Le prélèvement de sang doit être réalisé dans le cadre d'un prélèvement diagnostique (étranger au travail de thèse)

Annexe 3 : Fiche explicative pour la réalisation des prélèvements dans le cadre de la thèse (réalisée par F. Birot-Zecchini)

 	<b>MODE OPERATOIRE-PROTOCOLE</b>	Réf : MO-PROT-000
	<b>Extraction MagFAST ARN/ADN viral a l'aide de l'IDEAL 32</b>	Version 1 date : 18/02/2021 page 3

### 1. Objet et domaine d'application

Extraction de 1 à 32 échantillons d'ARN ou d'ADN viral à l'aide du Robots IDEAL 32 en vue d'une qPCR ou/ et PCR de diagnostic.

### 2. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Équipe IHVV - UMR 1225 IHAP

### 3. Hygiène et sécurité

Ajout des échantillons biologiques dans le tampon de lyse (plus mélange billes) à réaliser sous PSM avec gants et blouse. Elimination des déchets biologiques dans le bac de récupération des déchets d'activités de soins à risque infectieux.

### 4. Principe de la méthode

Obtention d'ARN/ADN à partir d'échantillons biologiques multiples (de 1 à 32) grâce au principe de capture par billes magnétiques.

### 5. Matériels nécessaires et stockage

- Plaque 96 pour IDEAL 32
- Pipettes multicanaux 1250µl et 200µl
- Pipette 1ml et 200µl
- Cônes de 1250µl et 200µl (jaune)
- 6 Réservoirs
- Falcon de 50ml
- Tips IDEAL 32
- Tube de 1,5ml
- Propipette
- Pipette 25ml ou 10ml
- Barrettes PCR (optionnel)

### 6. Réactifs (chimiques et biologiques) et stockage

- MagFAST Extraction kit
- Ethanol absolue
- PBS
- Eau distillée

### 7. Contraintes de la méthode

Attention lors de la préparation de la plaque effectuer le mélange billes (Buffer BB-FAST + billes) au dernier moment.

### 8. Contenu du mode opératoire

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laetitia		
Fonction :	Technicienne Diag		
Visa :			

 	<b>MODE OPERATOIRE-PROTOCOLE</b>	Réf : MO-PROT-000
	<b>Extraction MagFAST ARN/ADN viral a l'aide de l'IDEAL 32</b>	Version 1 date : 18/02/2021 page 3

1. Préparation des échantillons pour extraction :

**-Ecouillons :**

- Ajouter 500µl de PBS dans un tube eppendorf de 2 ou 1.5ml
- Casser l'écouvillon dans ce tube ou pour la plume ajouter un petit morceau de pulpe.
- Vortexer 10 a 20sec puis prélever 150µl à ajouter colonne 1 ou 7.

*Remarque : Il est préférable de les traiter la veille ou de les laisser tremper au moins 1heure dans le PBS.*

2. Préparation de la plaque 96 pour IDEAL 32 :

a. Préparation du Wash 3 (Ethanol a 80%)

-Peut être préparé en avance et en grande quantité. Mélanger pour 100ml d'éthanol a 80% => 20ml d'eau distillé + 80ml d'éthanol absolue.

b. Ajout des différents réactifs dans leur colonne respective via la pipette multicanaux 1250µl et les réservoirs :

*Verser chaque solution dans leurs réservoirs respectifs :*

- Lyse 125µl colonne 1 et 7. (si ecouvillon)
- Wash 1 300µl colonne 2 et 8.
- Wash 2 300µl colonne 3 et 9.
- Wash 3 (éthanol 80%) colonne 4 et 10.
- Buffer Elution colonne 5 et 11.
- Les colonnes 6 et 12 sont vide.

Attention lors de l'extraction de tissu ou sang au paragraphe 1 pour remplir les colonne 1 et 7.

c. Préparation et ajoute du mélange billes :

-Pour 1 puit il faut 300µl de BB-FAST et 10µl de billes. Prévoir une marge de 10% soit **330µl de BB-FAST et 11µl de billes.**

=>Préparer la solution avec le volume adéquate dans un Falcon de 50ml.

-Ajouter ce mélange au dernier moment. (Avant l'ajout des échantillons)

=> **Mélange Billes 310µl** colonne 1 et 7.

d. Plan de plaque

	1	W1	W2	W3	ELU	6	7	W1	W2	W3	ELU	12
A	Lyse 125ul + Mélange billes 310ul	WASH1 300uL	WASH2 300uL	WASH3 300uL	Elution 80ul	VIDE	Lyse 125ul + Mélange billes 310ul	WASH1 300uL	WASH2 300uL	WASH3 300uL	Elution 80ul	VIDE
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

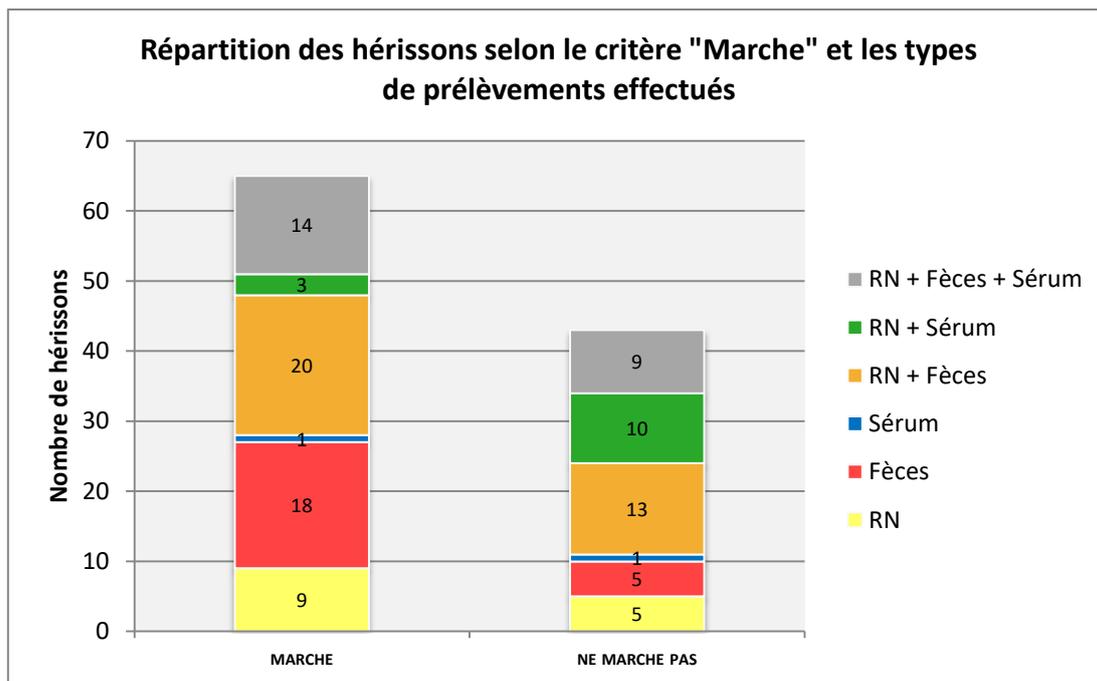
	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laetitia		
Fonction :	Technicienne Diag		
Visa :			

 	<b>MODE OPERATOIRE-PROCOLE</b>	Réf : MO-PROT-000
	<b>Extraction MagFAST ARN/ADN viral a l'aide de l'IDEAL 32</b>	Version 1 date : 18/02/2021 page 3

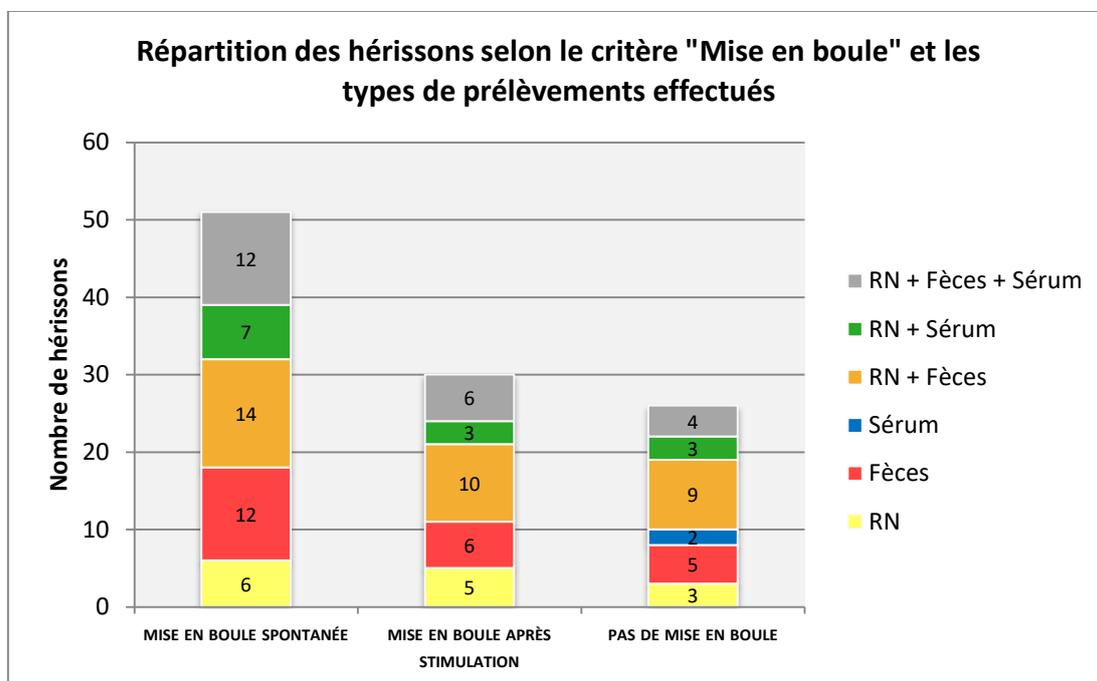
→ **Allumer le robot et mettre les UV pendant 15 à 30min.**

- e. Ajout des échantillons :
  - Sous le PSM ajouter 150µl à 100µl d'échantillons correctement reconditionner (cf paragraphe 1 préparation des échantillons pour extraction).
  - Lorsque tous les échantillons ont été rajouter filmer à l'aide d'un film aluminium, désinfecter et attendre 5 min pour sortir la plaque.
3. Mise en place et lancement du robot :
  - a. Mise en place :
    - Mettre les Tips en place. **ATTENTION : Bien enfoncer et vérifier.**
    - Placer la ou les plaques dans l'appareil aux emplacement définis.
  - b. Lancement
    - Cliquer sur le protocole MagFAST. Cliquer sur RUN.
    - Vérifier que les Tips sont bien en place et cliquer sur CONFIRM.
    - **Durée du run 21 min.**
4. Fin du run :
  - a. Récupérer la/les plaques dans le robot.
  - b. A l'aide d'une pipette de 200µl transférer directement les ARN/ADN se trouvant dans les colonnes 5 et 10 dans un tube 1,5ml correctement annoter.
  - c. Ou à l'aide d'une pipette multicanaux de 200µl (Cône 200 jaune) transfère les ARN/ADN des colonnes 5 et 10 dans une barrette PCR (Pour faciliter la mise en place de la PCR ou qPCR).
  - d. Ranger le robot :
    - Retirer et jeter les Tips usager.
    - Puis lancer un cycle d'UV de 15 a 30min.

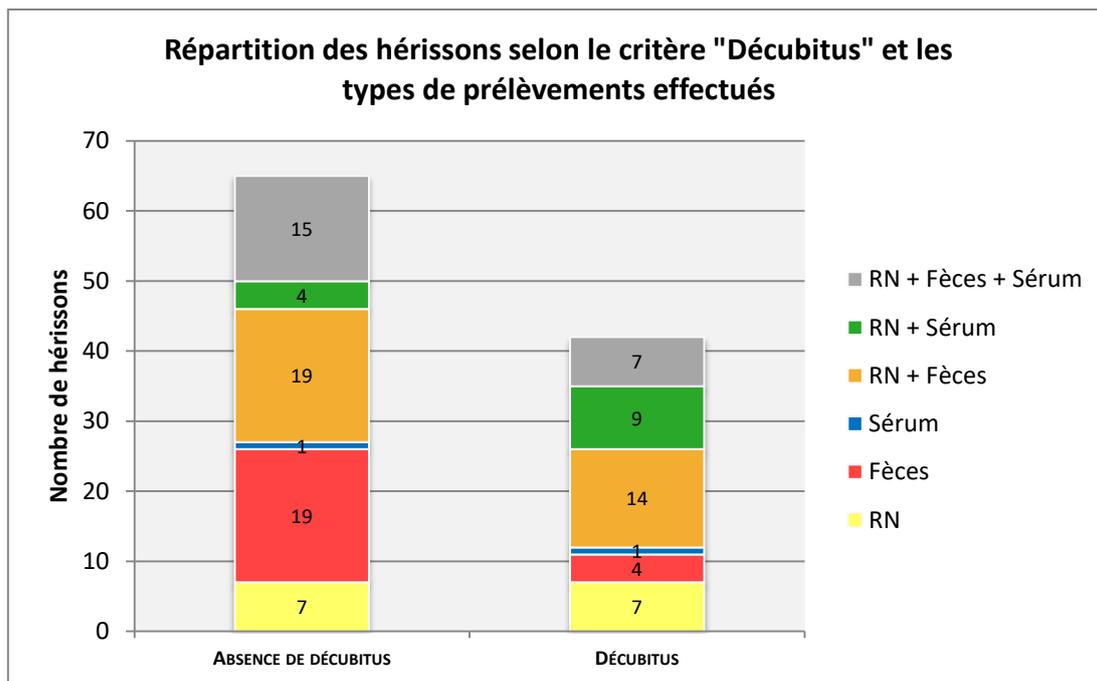
	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Laetitia		
Fonction :	Technicienne Diag		
Visa :			



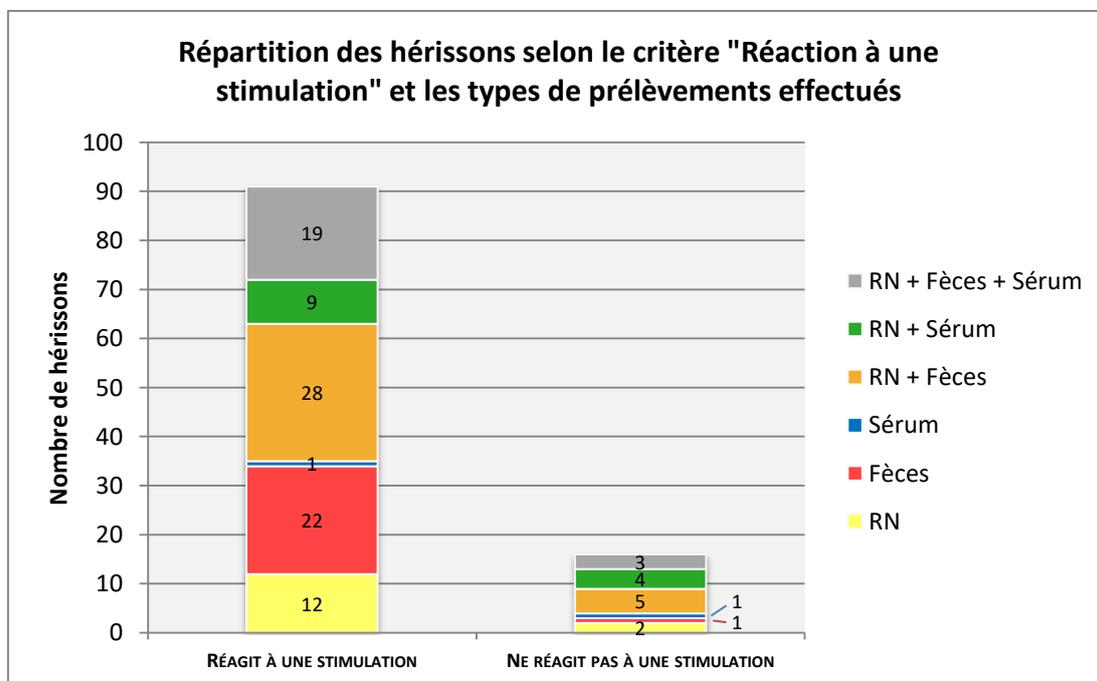
Annexe 5 : Répartition des hérissons selon le critère "Marche" et les types de prélèvements effectués



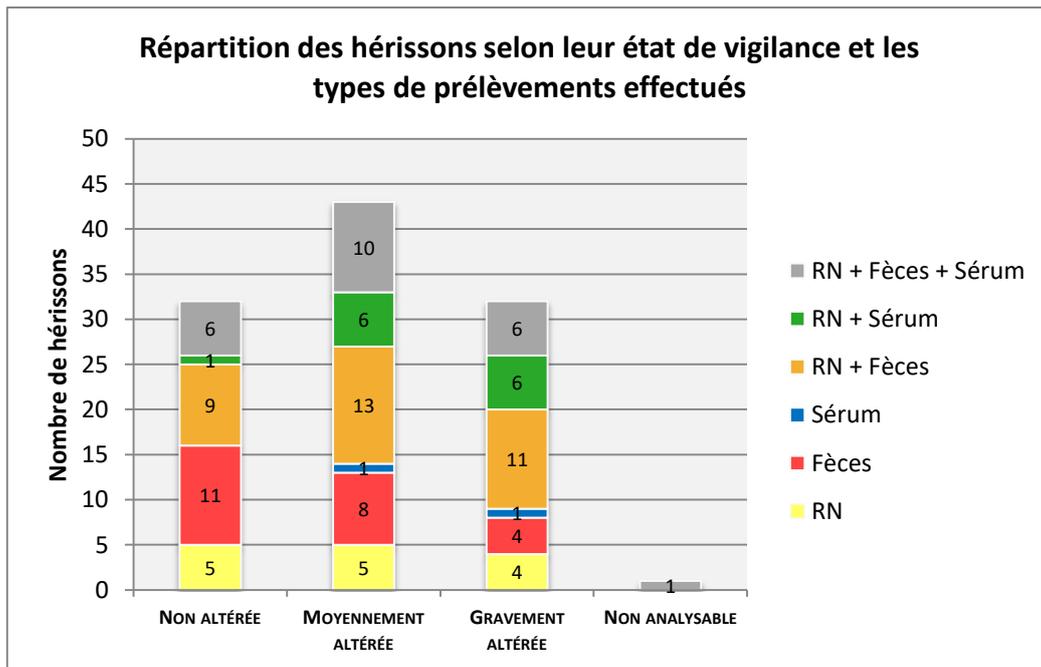
Annexe 6 : Répartition des hérissons selon le critère "Mise en boule" et les types de prélèvements effectués



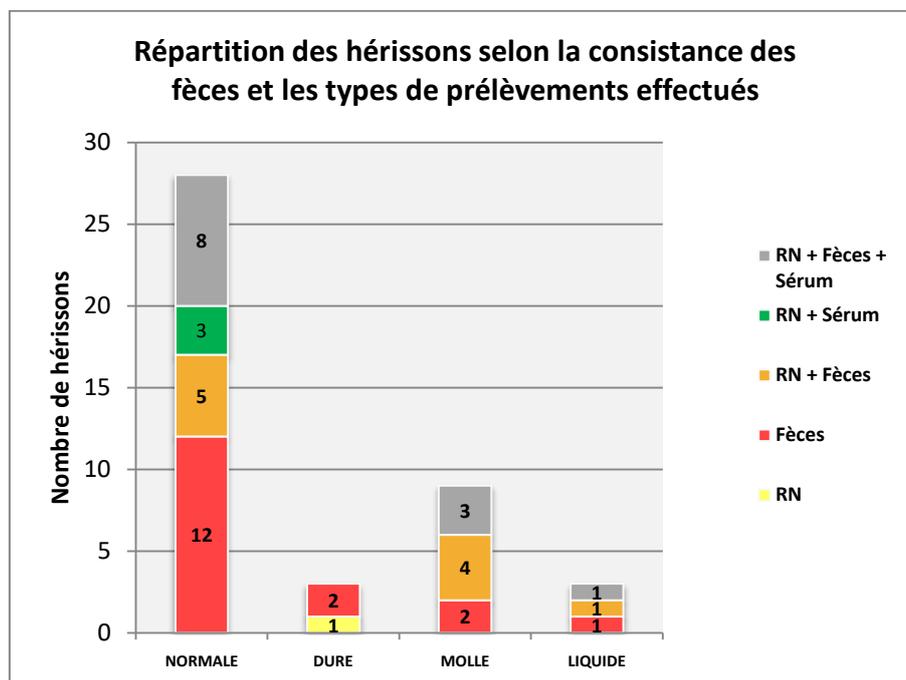
Annexe 7 : Répartition des hérissons selon le critère "Décubitus" et les types de prélèvements effectués



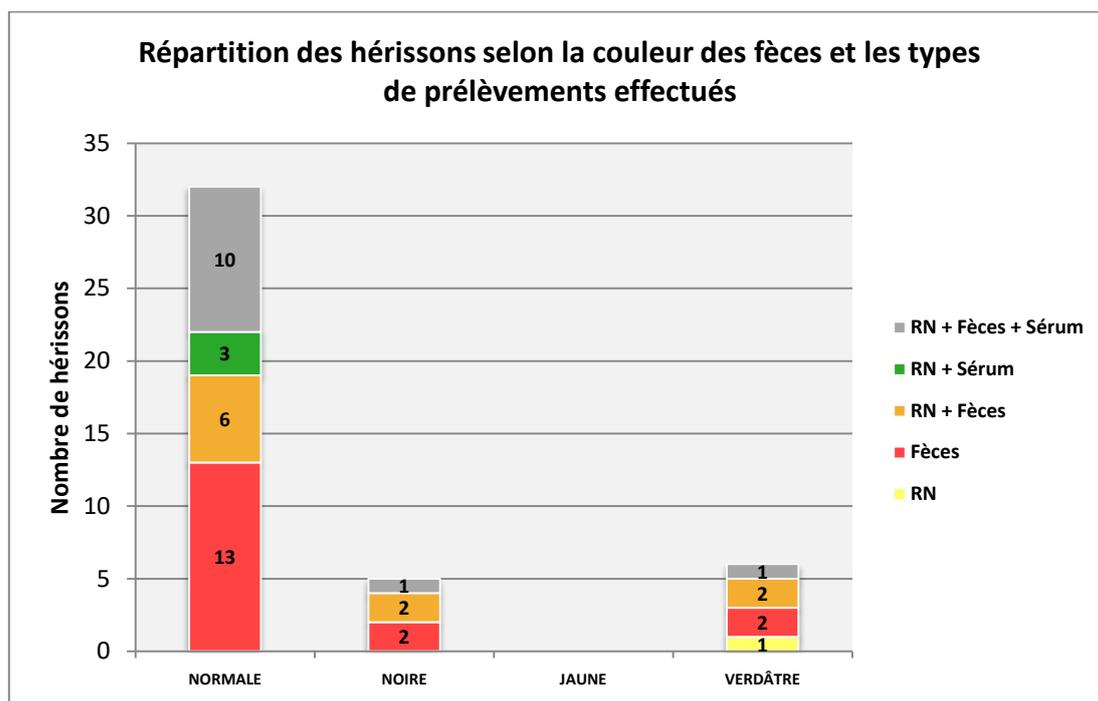
Annexe 8 : Répartition des hérissons selon le critère "Réaction à une stimulation" et les types de prélèvements effectués



Annexe 9 : Répartition des hérissons selon leur état de vigilance et les types de prélèvements effectués



Annexe 10 : Répartition des hérissons selon la consistance des fèces et les types de prélèvements effectués



Annexe 11 : Répartition des hérissons selon la couleur des fèces et les types de prélèvements effectués

Hérisson	Résultat de sérologie influenza D (souche Nebraska)	Résultat de sérologie influenza D (souche 5920)	Résultat de PCR influenza D sur écouvillon rectal	Résultat de PCR influenza D sur rinçage nasal	Résultat de PCR EriCov sur écouvillon rectal	Résultat de PCR EriCov sur rinçage nasal
1	NE	NE	-	-	-	-
2	NE	NE	-	-	-	-
3	NE	NE	-	-	+	-
4	NE	NE	-	NE	-	NE
5	NE	NE	-	NE	-	NE
6	NE	NE	NE	-	NE	-
7	NE	NE	NE	-	NE	-
8	NE	NE	NE	-	NE	-
9	NE	NE	-	NE	-	NE
10	NE	NE	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	-
12	NE	NE	-	NE	-	NE
13	-	-	-	-	-	-
14	NE	NE	-	-	+	-
15	NE	NE	+	-	-	-
16	NE	NE	-	-	-	-
17	-	-	-	-	+	-
18	NE	NE	-	-	+	-
19	-	-	NE	-	NE	-
20	-	-	-	-	+	-
21	NE	NE	-	-	-	-
22	NE	NE	-	-	+	-
23	-	-	NE	-	NE	-
24	NE	NE	-	-	+	-
25	NE	NE	NE	-	NE	-
26	NE	NE	-	-	-	-
27	NE	NE	-	-	-	-
28	NE	NE	-	-	+	-
29	NE	NE	NE	-	NE	-
30	NE	NE	NE	-	NE	-
31	NE	NE	-	-	+	-
32	NE	NE	-	-	-	-
33	NE	NE	-	-	-	-
34	NE	NE	-	NE	-	NE
35	-	+	-	-	-	-
36	-	-	NE	-	NE	-
37	-	-	-	-	-	-
38	NE	NE	NE	-	NE	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	+	-
41	NE	NE	NE	-	NE	-
42	-	+	-	-	-	-
43	NE	NE	-	-	+	-

44	-	-	NE	NE	NE	NE
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	NE	-	NE	-
47	-	-	-	-	+	-
48	NE	NE	-	-	+	-
49	-	-	-	-	+	-
50	NE	NE	-	-	+	-
51	NE	NE	NE	-	NE	-
52	-	-	-	-	-	-
53	NE	NE	-	-	+	-
54	-	-	-	-	-	-
55	NE	NE	-	NE	+	NE
56	NE	NE	-	-	+	-
57	NE	NE	-	NE	+	NE
58	+	-	NE	-	NE	-
59	NE	NE	NE	-	NE	-
60	+	+	-	-	-	-
61	-	-	-	-	+	-
62	NE	NE	-	-	-	-
63	-	-	NE	-	NE	-
64	NE	NE	-	-	-	-
65	+	+	-	-	+	-
66	NE	NE	-	NE	-	NE
67	-	-	NE	-	NE	-
68	-	-	-	-	+	-
69	NE	NE	NE	-	NE	-
70	-	+	NE	-	NE	-
71	+	-	NE	-	NE	-
72	NE	NE	NE	-	NE	-
73	NE	NE	-	-	+	-
74	NE	NE	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
76	-	-	NE	-	NE	-
77	NE	NE	-	NE	+	NE
78	-	-	-	-	-	-
79	+	+	NE	-	NE	-
80	-	-	NE	-	NE	-
81	+	+	-	-	-	-
82	+	+	-	-	-	-
83	-	-	NE	-	NE	-
84	NE	NE	-	-	-	-
85	NE	NE	-	NE	-	NE
86	+	+	NE	NE	NE	NE
87	-	-	-	-	-	-
88	+	+	-	-	+	-

89	+	+	-	-	-	-
90	NE	NE	-	NE	-	NE
91	NE	NE	-	-	-	-
92	NE	NE	-	NE	+	NE
93	NE	NE	NE	-	NE	-
94	NE	NE	-	NE	+	NE
95	NE	NE	-	NE	+	NE
96	NE	NE	-	NE	+	NE
97	NE	NE	-	NE	+	NE
98	NE	NE	-	NE	+	NE
99	NE	NE	-	-	+	-
100	NE	NE	-	NE	+	NE
101	NE	NE	-	NE	+	NE
102	NE	NE	-	-	+	-
103	NE	NE	-	-	-	-
104	NE	NE	-	-	+	-
105	NE	NE	-	NE	-	NE
106	NE	NE	-	-	-	-
107	NE	NE	-	NE	+	NE
108	NE	NE	NE	-	NE	-

**Annexe 12 : Tableau récapitulatif des résultats de sérologie et de PCR**

*(NE : Non évalué ; - : résultat négatif ; + : résultat positif)*



**Etude de la circulation des virus influenza D et EriCoV et de leurs manifestations cliniques chez les Hérissons d'Europe (*Erinaceus europaeus*) accueillis au centre de soins de la faune sauvage de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**

Nom et Prénom : BIROT-ZECCHINI Flore

Résumé :

Le virus de l'influenza D (IDV) a été isolé pour la première fois en 2011 chez les animaux et détecté quelques années plus tard chez le Hérisson d'Europe, chez qui sa signification clinique n'a jamais été explorée. Un second virus, EriCoV, un coronavirus, a lui été isolé chez le hérisson dès 2012, sans qu'aucune association significative avec des signes cliniques ait été établie. L'objectif de ce travail est de déterminer si ces virus circulent dans la population de Hérissons d'Europe accueillie au centre de soin de l'ENVT et s'ils peuvent être associés à la présence de signes cliniques. Des recherches d'ARN viral par RT-PCR sur prélèvements fécaux de 94 individus ont été réalisées ainsi que des sérologies IDV sur 40 individus. Un examen clinique minutieux de chaque animal a été également réalisé. L'IDV a été détecté par RT-PCR chez un individu et des anticorps ont été détectés chez 33% d'entre eux. Aucune association significative avec des signes cliniques n'a pu être établie. EriCoV a été détecté dans 48.1 % des échantillons et une association significative n'a pas pu être établie avec une manifestation clinique.

Mots-clés : Hérisson d'Europe, *Erinaceus europaeus*, *Deltainfluenzavirus, influenzae*, EriCoV, *Betacoronavirus*, infection, signes cliniques respiratoires

**Study of the circulation of influenza D and EriCoV viruses and their clinical manifestations in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) admitted at the Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse wildlife care center.**

Summary :

Influenza D virus (IDV) was first isolated in animals in 2011 and detected a few years later in European hedgehogs, in which its clinical significance has never been investigated. A second virus, EriCoV, a coronavirus, was isolated in hedgehogs in 2012, without any significant association with clinical signs. This study aims at determining if these viruses circulate in the European hedgehog population admitted at the ENVT wildlife care center and if they can be associated with the presence of clinical signs. RT-PCR targeting both viruses were performed on fecal samples from 94 individuals as well as IDV serologies on 40 individuals. A thorough clinical examination of each animal was also performed. IDV was detected by RT-PCR in one individual and antibodies were detected in 33% of them. No significant association with clinical signs could be established. EriCoV was detected in 48.1 % of the samples and no significant association was established with clinical signs.

Keywords : European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, *Deltainfluenzavirus, influenzae*, EriCoV, *Betacoronavirus*, infection, respiratory clinical signs