



## LA RESUME

**Mots clés :** Chauve-souris, Chiroptera, Zoonoses, Leptospira, Rage, West Nile, Paramyxovirus, Flavivirus, Lyssavirus, Epidémiologie, Pathologie infectieuse, OneHealth, surveillance active.

**Titre de la thèse de doctorat :** Etude concernant la présence dans les colonies de chiroptères résidant sur le territoire de la Roumanie de certains micro-organismes à potentiel zoonotique.

**Professeur coordonnateur :** Prof. Univ. Dr. Doina Daneş

**Comission guide:** Prof. Univ. Dr. Ioan Liviu Mitrea, CS I Dr. Alexandru Filip Vladimirescu, CS II Dr. Alexandru Petculescu

**Docteur :** Ciocănu Marius-Alexandru

**Objectif de la thèse:** apporter des contributions à la connaissance scientifique sur les principales maladies à potentiel zoonotique présente chez les chauves-souris de la Roumanie et le risque d'un phénomène de type spill-over chez l'Homme, ou chez les animaux. Le rôle des chiroptères comme réservoir pour certains agents infectieux et les conditions dans lesquels ceux-ci sont capables de maintenir et de multiplier les entités respectives sans montrer de signes de maladie. Les objectifs primaires consistaient dans l'identification de certains micro-organismes à potentiel zoonotique et dans l'évaluation de la propagation de ces agents pathogènes sur le territoire de la Roumanie. Cette thèse propose un screening épidémiologique des chiroptères en vue de l'identification des principaux éléments épidémiologiques et leur implication dans la santé publique. Le collectif de recherche a été représenté par l'USAMVB Ecole Doctorale de Médecine Vétérinaire – Clinique de Maladies Infectieuses et Médecine Préventive; L'institut de Spéologie Emil Racovita de l'Académie Roumaine, mais aussi des formes de collaboration scientifiques qui ont consisté dans la consultation des spécialistes dans le cadre de l'ISER, l'ouverture interdisciplinaire vers les domaines de recherche rapprochés avec la participation dans des équipes de recherche. Egalement, la recherche dans cette situation a eu un puissant caractère interdisciplinaire en se mêlant à l'entomologie, l'écologie, la médecine humaine par le fait que les agents infectieux ont un potentiel zoonotique, et une partie de ceux-ci ont une transmission vectorielle. D'un point de vue scientifique, le projet proposé a un degré élevé de nouveauté et de complexité et se base sur des données interdisciplinaires (pathologie, virusologie, bactériologie, immunologie, parasitologie, spéologie, biologie moléculaire, écologie, épidémiologie, etc). En fonction de l'agent étiologique, on peut identifier plusieurs catégories de maladie infectieuses : viroses, bactérioses, mycoses, rickettsioses. Jusqu'à présent ont été rapportés 66 virus qui ont été isolés ou détectés dans les matériaux biologiques provenant des 74 espèces différentes de chiroptères. Certains virus ont été identifiés chez plusieurs espèces différentes de chiroptères, tandis que d'autres ont été identifiés exclusivement chez une seule espèce.

La thèse intitulée **Etude concernant la présence de colonies de chiroptères résidant sur le territoire de la Roumanie de certains micro-organismes à potentiel zoonotique** est composée de deux parties : **Partie I** : correspond à l'étude bibliographique, dans cette partie de la thèse ont été faites des mises à jour des plus récentes études en collectant, réactualisant et synthétisant les informations de la littérature de spécialité en vue de l'approfondissement du thème abordé. L'activité de documentation a eu comme objectif l'établissement de types d'agents infectieux identifiés chez les chauves-souris des zones tempérées. Pour cela, une courte présentation a été faite sur les *Données concernant l'encadrement systématique des chiroptères* dans laquelle l'accent a été mis sur les 3 familles de chauve-souris existant sur le territoire de la Roumanie. Ensuite, ont été mises en évidence les *Particularités biologiques, écologiques et étiologiques des chiroptères résidant sur le territoire de la Roumanie et leur relevance dans l'épidémiologie*. En pratique, dans ce chapitre a été décrite la niche écologique et l'étiologie des différentes espèces de chauve-souris. L'accent a été mis sur les éléments clés dans l'épidémiologie : l'adaptation au vol et les implications physiologiques, la migration présente chez certaines espèces, la formation des colonies et le type de colonies, l'hibernation et les modifications des paramètres morpho-fonctionnels. Tous les éléments mentionnés pouvant avoir un rôle déterminant dans l'évolution d'une maladie infectieuse. Aussi, des recherches ont été faites sur les *Dates concernant la faune et la distribution des chiroptères en Roumanie*, où ont été présentées des informations liées au statut légal de ces espèces d'animaux. Ont été évaluées la niche écologique, les habitats utilisés, la plasticité de certaines espèces concernant l'adaptation aux zones urbaines et l'importance économique des chauves-souris, donnée par leur capacité à tenir sous contrôle des populations d'insectes. Ont été sélectionnées de la littérature des *Zoonoses et des maladies infectieuses émergentes, associées aux espèces de chiroptères*, se rapportant exclusivement aux entités morbides qui ont été signalisées chez des espèces de chauve-souris de zones tempérées qui appartiennent aux mêmes genres qui sont présentes aussi en Roumanie. Ce tri a été nécessaire car dans le monde existe plus de 1100 espèces de chauve-souris, chacune avec la pathologie spécifique associée, et en Roumanie il existe seulement 32 espèces. Et une grande partie des espèces virales à potentiel zoonotique identifiées chez les représentants de l'ordre Chiroptera proviennent des megachiroptères des zones tropicales. Toujours dans ce chapitre il a été évidentié le fait que ces animaux expriment rarement des signes cliniques dans le cas de maladies infectieuses. *Le rôle des chiroptères comme réservoir de certaines entités à potentiel zoonotique en Europe* approfondit les cas rapportés dans la région. Vu que une partie des chauve-souris présentes sur le territoire du pays peuvent migrer sur des distances de jusqu'à 2000 km, et la formation de colonies faisant part de la stratégie de survie, les rapports Européens ont été recherchés concernant la présence des *Lyssavirus, Hendra* et

*Nipah*, *Paramyxovirus* et certains arbovirus. La situation a été investiguée au niveau national par l'intermédiaire de *Recherches concernant la monitorisation des populations de chiroptères de Roumanie*, où le cadre législatif a été présenté, par lequel sont protégées ces espèces de mammifères et la mention des directions de recherche nationales qui ont eu comme sujet les Chiroptères. La majorité des études étant axée sur des actions de conservation et d'écologie, étant mentionnées quelques études qui ont investigué des hémoparasites et la présence de *Borrelia sl.* Aussi, ont été *présentées les espèces de l'étude* organisée par familles et par genres, où ont été présentés sommairement les détails essentiels pour chacune des 19 espèces testées sur la durée de l'étude. De cette manière a été évincée la distribution de chaque espèce et du statut de cette dernière. L'accent a été mis sur le type d'abri préféré et sur l'écologie, où a été mentionnée la stratégie de chasse et la niche écologique. Un autre détail important à mettre en évidence pour chaque espèce a été lié aux colonies, car ont été constatées plusieurs variantes : des individus solitaires allant jusqu'aux colonies de milliers d'exemplaires, les colonies mixtes avec les autres espèces ou les colonies de maternité etc. A été mentionnée la distance parcourue dans la recherche de la nourriture et respectivement de la migration, mais également la longévité moyenne et maximale et les prédateurs (aussi bien ceux du milieu rural que ceux du milieu urbain). Pour chaque espèce ont été sélectionnées de la littérature toutes les maladies qui ont été signalées. En se basant sur ces détails, une estimation de l'importance épidémiologique de toutes les 19 espèces. Dans *l'analyse de la stratégie préventive et du contrôle des zoonoses d'origine infectieuse en Roumanie*, il a été question de Lyssavirus, où ont été mentionnées les espèces de mammifères terrestres mais l'accent a été mis sur les *Chiroptères*, au final étant présenté le cadre légal concernant l'agissement en cas de suspicion/confirmation d'un cas de rage. Aussi, ont été présentés les Flavivirus, en mettant l'accent sur le virus de West Nile et sur le virus de l'Encéphalite de la tique, aussi sur un envoi aux chauves-souris avec la mention du cadre légal des actions. De cette manière, en étapes, a été structurée la présentation des *Leptospires* et des *Paramyxovirus*.

**La partie II** représente les recherches personnels, et chaque chapitre présente les résultats obtenus après avoir effectué les études rétrospectives et prospectives, chaque chapitre étant dédié à une certaine entité morbide. Par la réalisation des études épidémiologiques, l'identification de facteurs de risque a été recherchée, associés à des entités morbides étudiés dans un contexte de type One Health, s'encadrant dans la sphère des préoccupations existantes sur le plan mondial. La structure des chapitres est similaire, étant composée de 3 parties dans lesquelles se présentent le contexte cadre et la situation épidémiologique spécifique à chaque entité, suivie par la présentation des outils et des méthodes utilisées dans l'identification de la pathologie infectieuse,

les résultats et les discussions sur la base de l'analyse des échantillons et des conclusions. Les méthodes de détection utilisées ont eu un degré de spécificité élevé pour chaque pathogène à part et les résultats obtenus ont été mis dans le contexte épidémiologique. L'actualité et l'opportunité du thème abordé est donné par l'obtention de données qui se fondent sur des moyens adéquats avec un impact positif sur la santé des Chiroptères, sur le milieu et sur la population à risque. Les conclusions et les recommandations ont été basées sur la réalité pratique concernant la morbidité, la mortalité et la perte effective des chauves-souris (espèces protégées) et sur la base de la situation épidémiologique signalée dans la médecine humaine. De cette manière ont été élaborées des recommandations utilisables dans la limitation des infections chez les Hommes et des considérants concernant la protection du milieu environnemental par la réduction de l'émission d'agents pathogènes et la réduction/limitation des souches circulantes à potentiel pathogène. Dans le déroulement de l'étude ont été touchés des points critiques en ce qui concerne la pathologie des Chiroptères, l'intérêt pour la mise en valeur des résultats étant donné par le statut d'animal protégé. Les résultats ont généré un volume important d'informations utiles dans le milieu scientifique, informations qui ont été présentées lors de manifestations scientifiques. Les méthodes élaborées dans la Partie II et les études de type One Health ont un caractère de nouveauté pour la recherche dans le domaine. Les recherches personnelles débutent par la *Caractérisation des territoires recherchés et le cadre de l'organisation*, où sont présentée brièvement les coordonnées géographiques des principales zones étudiées et les critères d'inclusion de ces zones. Aussi, il a été décrit comment la surveillance des zones étudiées a été réalisée mais aussi les événements particuliers qui ont été signalés sur la durée de l'étude. En partant des informations que 48% des roumains du milieu urbain détiennent des animaux de compagnie, a été réalisée *Une étude concernant la relation dynamique entre les chauves-souris, les Hommes et les animaux de compagnie dans le contexte urbain*. Dans cette étude ont été poursuivie plusieurs aspects : le degré d'interaction des animaux de compagnie (spécialement les chats) avec la faune urbain, l'étude montrant le fait qu'en Roumanie, annuellement la population de chats attaque approximativement 15000000 mammifères et 7000000 oiseaux, situation inquiétante en ce qui concerne la conservation des espèces mais aussi au risque épidémiologique associé à l'interface animal de compagnie/animal sauvage. Cette étude a suivi aussi les interactions entre les chauves-souris et la population humaine, étant examinées les sollicitations d'intervention qui ont été adressées à diverses plateformes de conservation des espèces. A été présentée également la *Récolte des échantillons biologiques et la stratégie d'échantillonnage*, utilisée pendant la période 2013-2018. Vu que dans l'étude bibliographique réalisée dans la Partie I de la thèse a été constatée une basse incidence des pathogènes et le manque de symptomatologie clinique ces les Chiroptères, dans la présente ont été récoltées 2 types

d'échantillons biologiques des animaux cliniquement sains et d'un autre côté ont été récoltés des échantillons de carcasses entières des animaux trouvé en état d'agonie. Ont été décrits les *Matériaux pathologique, les techniques utilisées et leur valeur dans le diagnostic* où a été mentionnée la méthode d'acquisition des échantillons biologiques et pour chaque type d'échantillon récolté quel pathogène ont pu être identifiés et les techniques de détection des pathogènes. Aussi, a été mentionné le nombre moyen d'individus qui doivent être testés pour atteindre le degré de confiance. A été réalisée *l'Analyse des aspects pathologiques identifiés chez les Chiroptères*, où ont été décrites les principales lésions signalées, desquelles ont été présentées de façon détaillée les plus fréquemment rencontrées : lésions ostéo-articulaires, lésions traumatiques consécutives aux morsures, lésions hémorragiques, lésions décelables macroscopiquement du système nerveux central et les aspects morpho pathologiques des avortements. Par la suite ont été présentées les données concernant la détection de certains virus à potentiel zoonotique, d'une manière logique et en étapes. Dans le cadre du chapitre intitulé *Investigations épidémiologiques concernant la présence des Lyssavirus dans les populations de Chiroptères résident sur le territoire de la Roumanie*, a été réalisé une Etude rétrospective et descriptive des facteurs de risque associés à la transmission des Lyssavirus dans lequel ont été collectées des données sur une période de 5 ans dans lesquels ont été évalués l'incidence des facteurs de risque de l'infection à Lyssavirus et la présence de ce pathogène dans les populations d'animaux. Cette étude a été suivie d'une autre étude prospective intitulée *Stratégie de détection des Lyssavirus chez les Chiroptères, outils et méthodes*, où ont été exposés les outils et les méthodes utilisées en vue de la Détection de la présence des anticorps antirabiques par le test de virus neutralisation avec des anticorps fluorescents, la Détection de la présence des Lyssavirus par la technique de l'immunofluorescence direct et la Détection de la présence de Lyssavirus, utilisant des méthodes in vitro d'isolement et de culture sur des cultures cellulaires. Aussi, il a été essayé la Détection de la présence des Lyssavirus chez les Chiroptères en utilisant les techniques d'épidémiologie moléculaire, pour cela a été décrit un protocole d'extraction des acides nucléiques totaux des échantillons de cerveau et un protocole d'extraction des échantillons de salive. A été exposé également le protocole d'évaluation de la concentration du matériel génétique extrait pour déterminer si ont existé des contaminations et pour évincer la quantité de matériel génétique extrait. A été réalisée la réaction d'amplification du matériel génétique en vue de détecter un fragment spécifique pour les lyssavirus où ont été décrits les outils et les méthodes nécessaires au mixage, au couplage de ce dernier, à l'amplification et à l'électrophorèse où ont été mentionnés le calcul des résultats et le mode d'expression. Dans le chapitre *Résultats et discussion* concernant la présence des Lyssavirus dans les populations de chiroptères, ont été détaillées les espèces examinées et leur

nombre, le type d'échantillons et le type de test réalisés sur chaque échantillon. Dans l'ensemble, ont été testés par la technique PCR un nombre de 493 échantillons individuels de cerveaux provenus de 19 espèces différentes de chauves-souris. Aussi, a été effectué un nombre de 453 échantillons de salive par la technique PCR et par le RTCIT, les échantillons de salive ayant été récoltés d'individus de l'espèce *Nyctalus noctula* qui ont été tenus en quarantaine et réhabilités. Des individus tenus en quarantaine ont été examinés 90 échantillons de sérum par la technique FAVN. Chaque individu étant testé par au moins 2 méthodes de diagnostic. Malgré tous ces éléments, il n'a pas été possible de détecter la présence du virus de la rage ou des anticorps antirabiques dans aucun des environ 1000 individus testés. Dans le chapitre Investigations épidémiologiques concernant la présence des Paramyxovirus dans les populations de Chiroptères résidant sur le territoire de la Roumanie a été réalisée l'investigation de la présence de Parayxovirus par une étude bivalente qui compte : une étude rétrospective et une étude prospective. Ont été collectées des données concernant l'incidence et les facteurs de risque associés à différents représentants de cette famille virale d'intérêt pour la médecine humaine et celle vétérinaire. De cette façon a été faite l'Etude rétrospective et descriptive des facteurs de risque associés à la transmission des Paramyxovirus. L'étude prospective a été composée de la Détection de la présence des Paramyxovirus et de l'évaluation de la concentration du matériel génétique extrait. La technique de l'amplification du matériel génétique en vue de la détection d'un fragment spécifique pour les Paramyxovirus doit être optimisée. A été décrite l'Optimisation de la température d'hybridation dans laquelle ont été utilisées 21 combinaisons d températures pour trouver les paramètres qui permettent le couplage spécifique des primers et a été décrite l'analyse de l'électrophorèse, le calcul des résultats et le mode d'expression de ces derniers. En ce qui concerne les résultats et les discussions concernant la présence des Paramyxovirus dans les populations de Chiroptères, après analyse par la technique de PCR de 493 échantillons d'individus provenant de 19 espèces différentes, a été constatée une réaction positive chez un nombre de 12 individus testés par PCR qui ont exprimé des bandes spécifiques avec des dimensions d'approximativement 500pb. Les échantillons positifs sont provenus des espèces suivantes : *Nyctalus noctula* (n=9), *Pipistrellus kuhlii* (n=1) et *Myotis daubentonii* (n=1). Lors des examens nécropsiques n'ont pas été détectées de modifications décelables macroscopiquement pour les individus positifs, suggérant un statut d'infection asymptomatique. Les chauves-souris testées positives ont été trouvées dans 3 zones urbaines : Baia Mare, Constanta, Bucuresti, Brasov. 0 l'exception de chauves-souris tenues en quarantaine, les chauves-souris testées sont provenues de zones distinctes. Dans ce contexte, la relation dynamique entre chauves-souris-Hommes-animaux de compagnie peut créer les bases d'un phénomène de type spill-over vu le nombre de contact entre ces espèces. En ce qui concerne Les

investigations épidémiologiques concernant la présence des Flavivirus dans les populations de Chiroptères, après l'étude rétrospective et descriptive des facteurs de risque associés à la transmission des Flavivirus a été constatée une corrélation entre le nombre de cas de la population humaine et le nombre de cas de la population animale. Aussi, le caractère saisonnier de la maladie et la présence des différentes espèces de Culicidae capables de transmettre le virus s'est reflété aussi dans le facteur occupationnel des individus affectés (activités en plein air). La seroprévalence limitée des chevaux (1,5-7%) est très différente de celle rapportée chez les autres espèces (5,1-45%). La Détection de la présence des Flavivirus utilisant des techniques de biologie moléculaire a été réalisée en utilisant le même système d'étapes successives : extraction des acides nucléiques des échantillons de cerveau et évaluation des concentrations et contamination du matériel génétique extrait, suivi de la réaction d'amplification du matériel génétique en vue de détecter un fragment spécifique pour les Flavivirus. Les résultats et les discussions concernant la présence des Flavivirus dans la population des chiroptères ont mis en évidence le fait que, même si toutes les chauves-souris étudiées sont insectivores et dans leur diète se trouvent des espèces de Culicidae, capables d'abriter des arboviroses (dans la même mesure les mêmes insectes peuvent parasiter les chauves-souris), il n'a été identifié aucun individu positif de ceux 483 examinés par la technique PCR. L'absence de l'antigène viral des échantillons de cerveau atteste le fait que les individus n'ont pas porté le virus au moment du test. Le fait que ceux-ci soient entrés en contact ou pas avec le virus West Nile est encore inconnu vu qu'ils n'ont pas été examinés sérologiquement. Par la suite, des données ont été présentées concernant la détection de certaines bactéries à potentiel zoonotique, par les Investigations épidémiologiques concernant la présence des Leptospires dans les populations de Chiroptères. La même structure présentée antérieurement a été utilisée, par une Etude rétrospective et descriptive des facteurs de risque associés à la transmission des Leptospires, effectué sur une période de 5 années, pendant laquelle l'incidence et les facteurs de risque associés à cette maladie infectieuse a été examinée. Le caractère professionnel de la maladie a été constaté mais également l'incidence maximale des mois août /septembre. Aussi, le fait qu'il existe des différences en ce qui concerne l'incidence chez les animaux domestiques a été constatée, la plus grande étant chez les chiens des refuges. Pour la détection de la présence de la Leptospire chez les Chiroptères, en utilisant des techniques d'épidémiologie moléculaire, il a été recouru à l'extraction des acides nucléiques totaux des échantillons de reins pour les individus trouvés en état d'agonie et respectivement les échantillons d'urine pour les individus des centres de réhabilitation, et après l'extraction, le protocole d'évaluation de la concentration de matériel génétique a été appliqué. La réaction d'amplification du matériel génétique en vue de la détection d'un fragment spécifique pour les Leptospires pathogènes a discriminé entre ces

derniers d'autres spirochètes apparentés qui pourraient donner des réactions fausses positives. Par la technique PCR ont été examinés des échantillons de reins provenant de 16 espèces des familles : Vespertilionidae (n=483 individus), Rhinolophidae (n=6 individus) et Miniopteridae (n=2 individus). Suite aux résultats et discussions concernant la présence des Leptospires dans les populations de Chiroptères, en Roumanie a été identifiée la présence de la Leptospire chez 4 espèces de chauve-souris : *N. noctula*, *P. pipistrellus*, *P. nathusii*, *M. daubentonii*. L'infection à leptospires active a été identifiée par la présence de spirochètes dans l'urine de 15 individus. La provenance de ces derniers étant Bucarest, Iasi et Babadag, où les infections à leptospires chez les Hommes ont été fréquemment rapportées sur la durée de l'étude. *Les Conclusions générales et les recommandations* De ce que l'on connaît, celui-ci est le premier rapport de la présence du leptospire chez l'espèce *P. nathusii* et le premier rapport de 3 espèces de chauves-souris résidentes sur le territoire de l'Europe continentale (*N. noctula*, *P. pipistrellus*, *M. daubentonii*). Les moyens de surveillance dans les zones endémiques pour la leptospire devraient inclure aussi les animaux sauvages, et les chauve-souris restés contre le virus de la rage devraient être testés aussi pour la présence de leptospires. De nos connaissances, ceci est la première investigation au niveau national qui aborde les maladies infectieuses présentes chez les chauves-souris et le potentiel zoonotique de ces derniers avec un abord multidisciplinaire de type one health. Même si les cas rapportés chez les chauves-souris ont été signalés dans des zones où ont été signalés des cas aussi en médecine humaine, même si elles utilisent des abris anthropiques vu l'inaccessibilité d'autres espèces, les chauves-souris ne semblent pas avoir une importance épidémiologique importante dans la transmission directe à chez les êtres humains. La prévalence réduite dans le rang des individus de Babadag suggèrent plutôt un phénomène accidentel, probablement une source d'eau contaminée. Une mesure de prévention dans ce cas est représentée par les gants de protection et une bonne hygiène après avoir interagi avec ces animaux. Les mesures prises pour les deux colonies testées positives ont été la mise en quarantaine, le traitement avec des antibiotiques et la relocalisation des individus. Cette manière d'aborder est aussi bien écologique qu'éthique, contribuant à la conservation des espèces de chauves-souris. La plasticité des chauves-souris en ce qui concerne les abris permet la relocalisation avec succès de ces colonies ou individus qui représentent un risque épidémiologique, pour la relocalisation qui peut choisir n'importe quel endroit, naturel ou artificiel, qui offre une série de conditions qui s'accordent avec leurs besoins métaboliques.