

# Caractérisation d'un nouveau variant de virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) en France.

G. LE GALL-RECOLE<sup>1</sup>, F. ZWINGELSTEIN<sup>1</sup>, S. BOUCHER<sup>2</sup>, B. LE NORMAND<sup>3</sup>, S. BERTAGNOLI<sup>4-5</sup>, J-L. GUERIN<sup>4-5</sup>, Y. PORTEJOIE<sup>6</sup>, A. DECORS<sup>7</sup>, S. MARCHANDEAU<sup>8</sup>.

<sup>1</sup>Anses, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané - Zoopôle-Les Croix – BP 53 - 22440 Ploufragan, France.

<sup>2</sup>LABOVET Conseil (Réseau Cristal) – ZAC de la Buzenière - BP 539 – 85505 Les Herbiers cedex. France.

<sup>3</sup>Clinique Vétérinaire des Marches de Bretagne – 47 bd Leclerc, 35460 St-Brice-en-Cogles, France.

<sup>4</sup>INRA, UMR1225, IHAP – 31076 Toulouse, France.

<sup>5</sup>Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1225, IHAP – 31076 Toulouse, France.

<sup>6</sup>ANJOU LABORATOIRE-18 Boulevard Lavoisier – BP20943 – 49009 Angers cedex 01, France.

<sup>7</sup>ONCFS, Direction des études et de la recherche – 5 rue de Saint Thibaud – 78610 Auffargis, France.

<sup>8</sup>ONCFS, Direction des études et de la recherche 39 bd Albert Einstein CS 42355 44323 Nantes cedex 3, France.

**Résumé.** Depuis l'automne 2010 dans le nord et le nord-ouest de la France, plusieurs cas de mortalités dues à la VHD ont été diagnostiqués dans des élevages de lapins de chair vaccinés ou non. Dans les mêmes régions, des mortalités très importantes étaient signalées dans certaines populations de lapins de garenne. La présence d'un virus RHDV dans la plupart des échantillons a été confirmée. Les données moléculaires montrent que ce virus est assez différent des souches RHDV connues et qu'il constitue un nouveau variant RHDV. Par ailleurs, différentes observations de terrain suggèrent que les vaccins commerciaux ne confèreraient qu'une protection partielle contre ce variant. Parallèlement aux études de la propagation de ce virus et de l'adéquation des tests de diagnostic existants, les résultats d'études expérimentales préliminaires destinées à connaître sa pathogénie et le niveau de protection conféré par la vaccination sont présentés.

**Abstract. Characterisation of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus (RHD) in France.** Since the Autumn 2010 in the north and north-western France, several outbreaks of RHD have been diagnosed in rabbitries, the mortalities occurring in vaccinated and non-vaccinated animals. In the same areas, very important mortalities were reported in some wild rabbit populations. Presence of RHD virus in the majority of the samples was confirmed. Molecular data show that this virus is relatively distinct from the known RHDV strains and constitutes a new variant of RHDV. In addition, different observations from the field suggest that commercial vaccines may give only partial protection against this variant. Parallel to the studies carried out on the spread of this virus and on the appropriateness of current diagnostic tests, the results of preliminary experimental studies in order to determine its pathogenesis and the protection level induced by the vaccination are described.

## Introduction

La maladie hémorragique virale du lapin (VHD) est une maladie hautement infectieuse et souvent fatale pour le lapin domestique ou sauvage de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Elle est endémique dans les populations de lapins sauvages d'Europe, d'Australie et de Nouvelle Zélande. L'apparition de la VHD a été responsable d'importantes pertes économiques dans les élevages industriels de lapins de chair ou de lapins producteurs de fourrure mais le développement de vaccins efficaces a permis de contrôler rapidement la maladie. Cependant, celle-ci reste une menace pour les populations de lapins de garenne non vaccinées. Les lapins de moins de 4 semaines d'âge sont habituellement résistants à la VHD et la proportion d'animaux sensibles augmente progressivement avec l'âge pour être totale à l'âge de 8 semaines. Les mortalités apparaissent dès 48 heures post-infection et le taux de mortalité peut dépasser 80%. Les voies d'infections principales sont les voies orale et respiratoire par contact direct entre animaux ou avec la nourriture contaminée. Les lésions macroscopiques principales sont une hépatite nécrosante parfois associée à un ictère, une trachéite intense avec

souvent présence de sang non coagulé, une congestion pulmonaire plus ou moins hémorragique et une hypertrophie du thymus et de la rate (Morisse, 1989). L'agent étiologique de la maladie, le RHDV, est un virus non enveloppé à simple brin d'ARN appartenant au genre *Lagovirus* de la famille des *Caliciviridae*.

A la fin août 2010 dans le Pas de Calais, un cas clinique de VHD a été rapporté dans un élevage entraînant plus de 25% de mortalité du cheptel reproducteur vacciné contre la VHD et une forte mortalité sur les lapins en phase de croissance non vaccinés. D'autres cas de VHD ont été répertoriés mais à partir du mois d'octobre, leur fréquence a fortement augmenté et de nombreux élevages du nord-ouest de la France, vaccinés ou non vaccinés, ont été infectés. A cette période, des épizooties de VHD ont été enregistrées par le réseau SAGIR (réseau ONCFS/FNC/FDC) dans plusieurs populations de lapins de garenne situées dans les mêmes régions. Dans certaines populations, un taux de mortalité inhabituel a été estimé (80 à 90%), similaire à ce qui avait été observé lors de l'émergence de la VHD à la fin des années 80. Des prélèvements provenant de 4 élevages ont été adressés dès la mi-octobre 2010 pour

analyses au laboratoire de Ploufragan/Plouzané de l'Anses. Le laboratoire a par ailleurs reçu début novembre, des prélèvements de foies de lapins de garenne morts avec suspicion de VHD. Nous présentons les résultats de la caractérisation moléculaire du virus, de l'adéquation des tests de diagnostic et des premières études expérimentales menées pour tenter de confirmer les observations réalisées sur le terrain.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1 Echantillons biologiques

Six échantillons de foies de lapins présentant des lésions caractéristiques de la VHD et provenant de 4 élevages différents situés dans le Maine-et-Loire, le Calvados, l'Ille-et-Vilaine et le Pas-de-Calais ont été analysés. Pour le 1<sup>er</sup> élevage, il s'agissait d'un ensemble de foies de lapines vaccinées depuis 20 jours. Pour le 2<sup>nd</sup> élevage, des foies d'une lapine vaccinée depuis 1 mois, d'une lapine revaccinée 8 jours avant sa mort, et d'un lapin d'engraissement non vacciné. Pour le 3<sup>ème</sup> élevage où aucune vaccination n'était pratiquée, il s'agissait d'un ensemble de foies de lapins d'engraissement. Pour le 4<sup>ème</sup> élevage, les foies provenaient de lapereaux âgés de 4 semaines.

Les 8 lapins de garenne analysés en novembre 2010 ont été récoltés dans le Finistère entre mi-août et fin septembre 2010 et transmis pour autopsie au laboratoire IDHESA Bretagne Océane (Quimper) par les interlocuteurs techniques départementaux du réseau SAGIR. Des prélèvements de foies ont été ensuite adressés pour analyse en ELISA VHD à Anjou Laboratoire (Angers). Sur les 8 échantillons, tous positifs en ELISA VHD, 2 provenaient de lapins de garenne d'élevage vaccinés en mai 2010.

### 1.2 Analyses moléculaires et phylogéniques

Chaque échantillon de foies a été décongelé et 100 µl d'exsudat ont été récupérés. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit "RNeasy Mini kit" (QIAGEN) et les ADN complémentaires aux ARN viraux ont été synthétisés. Pour le criblage des échantillons positifs en VHD et une première caractérisation moléculaire de la souche, une région située dans la partie plus conservée du gène codant la protéine de capside VP60 (174 pb), a été amplifiée et séquencée comme décrit par Le Gall-Reculé *et al.* (2011b). Les analyses de séquences et les alignements multiples ont été générés par la méthode CLUSTALW en utilisant le site internet "NPS". Les séquences protéiques ont été déduites à l'aide du logiciel de conversion disponible sur le site internet "Biosupport".

Par ailleurs, afin de mieux estimer les relations génétiques existant entre le virus VHD mis en évidence et les autres calicivirus connus du lapin et du lièvre, pathogènes et non pathogènes, une partie de la zone hypervariable du gène VP60 a été amplifiée et séquencée (354 pb). Les analyses phylogéniques ont été réalisées selon deux méthodes d'analyse, phénétique (minimum d'évolution) et cladistique (maximum de parcimonie) à l'aide du logiciel MEGA

version 3.1, à partir de toutes les séquences nucléiques de calicivirus du lapin et du lièvre disponibles dans les banques de données internationales. La séquence de la souche française de référence du calicivirus du lièvre européen EBHSV (souche GD) a été choisie pour enraciner l'arbre phylogénique consensus.

### 1.2 Adéquation des tests ELISA et PCR

Quarante échantillons de foies issus de lapins d'élevage ou de garenne de tous âges, vaccinés ou non, reçus entre octobre 2010 et février 2011 ont été analysés en parallèle avec le test ELISA développé à l'Anses et permettant de détecter le virus VHD (test transféré à des laboratoires d'analyses vétérinaires), et le test PCR de criblage développé par l'Anses pour la recherche. Pour tous les échantillons positifs en PCR, le génotypage de la souche VHD a été réalisé par séquençage.

### 1.3 Expérimentations animales

Trois études expérimentales successives ont été menées à l'École nationale vétérinaire de Toulouse ou au laboratoire de Ploufragan/Plouzané de l'Anses (Tableau 1). Elles avaient pour but de décrire la pathogénie du virus, de confirmer les lésions macroscopiques observées sur le terrain et les lésions microscopiques induites. En outre, la 1<sup>ère</sup> étude était destinée à tester l'efficacité de la vaccination VHD (après une ou deux injections à 3 semaines d'intervalle) et la 2<sup>nd</sup>e étude, de déterminer si le virus infectait en plus grand nombre les lapereaux de 4 semaines qu'une souche classique de VHD. Chacun des 3 inocula de virus utilisés provenait d'un élevage différent. Le premier inoculum correspondait au surnageant dilué au 1/10 d'un foie broyé dans 3 volumes de PBS et les 2 autres, plus concentrés, au surnageant non dilué d'un foie broyé dans 2 volumes de PBS. Deux conditions d'inoculation (voie intramusculaire ou voie orale) ont été testées.

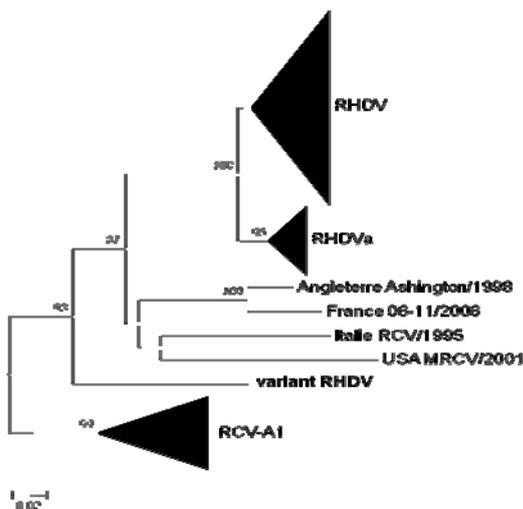
## 2. Résultats

### 2.1 Analyses des séquences et des relations génétiques

Quel que soit l'âge des animaux (dès 4 semaines) et quel que soit leur statut vaccinal, les échantillons de foie des 6 lapins de 4 élevages différents et des 8 lapins de garenne ont tous donné un résultat positif en RT-PCR VHD de criblage, confirmant la présence d'un virus de la VHD. Les séquences nucléiques (174 pb) étaient très proches les unes des autres (98,5 à 100% d'homologie) et les séquences protéiques identiques, démontrant que le même type de virus était responsable des mortalités. Cependant, les séquences nucléiques étaient très différentes des séquences des virus VHD et du variant antigénique VHD de sous-type "a" circulant actuellement en France, avec seulement 85,7 % d'homologie en moyenne. Ce résultat montre que le virus mis en évidence dans les échantillons constitue un nouveau variant de VHD. De même, ce virus ne résulte ni de l'évolution d'une souche (suite notamment à une mutation ou une délétion), ni d'une recombinaison entre souches connues à ce jour.

Les analyses phylogéniques réalisées selon deux approches différentes ont donné un résultat similaire et ont confirmé que le virus mis en évidence formait un nouveau groupe génétique. Ce groupe est relativement distant des groupes de virus VHD pathogènes (RHDV et RHDVa) et non pathogènes (Ashington, 06-11, MRCV, RCV et RCV-A1) décrits à ce jour (figure 1). Cependant, il est plus éloigné des calicivirus non pathogènes australiens (RCV-A1) qui constituent un nouveau membre du genre *Lagovirus*, intermédiaire entre les virus VHD et les calicivirus du lièvre EBHS (Strive *et al.*, 2009).

**Figure 1 : Arbre phylogénique** (obtenu par la méthode du minimum d'évolution) réalisé à partir des séquences nucléotidiques de 354 pb (nucléotides 1188 à 1541) du gène VP60 du variant VHD 2010 ("variant RHDV"), de 93 souches pathogènes de VHD ("RHDV"), de 32 souches pathogènes du variant antigénique de sous-type "a" ("RHDVa"), d'une souche supposée pathogène ("Ashington"), d'une souche faiblement pathogène ("MRCV") et de souches non pathogènes ("06-11", "RCV" et 36 souches australiennes "RCV-A1"). Les branches RHDV, RHDVa et RCV-A1 ont été comprimées pour mettre en valeur les principaux groupes génétiques.



## 2.2 Adéquation des tests ELISA et PCR

Sur les 40 échantillons analysés en ELISA et en PCR, 30 ont été trouvés positifs par les 2 techniques, 4 étaient ELISA-/PCR+, 5 ELISA+ (dont 2 juste au dessus du seuil)/PCR- et 1 ELISA-/PCR-. Le séquençage des souches VHD des 24 échantillons positifs en PCR a confirmé la présence du virus variant sur tous les échantillons. Le test ELISA permet donc de détecter le nouveau virus, même si les D.O. obtenues sont généralement plus faibles que celles obtenues jusqu'à présent avec les souches de VHD classiques.

## 2.3 Etudes expérimentales

En bilan des différentes études expérimentales menées (tableau 1), nous confirmons le pouvoir pathogène du virus VHD variant avec cependant une grande

variation des taux de mortalité en fonction des expérimentations et des inocula utilisés, allant de 0% (étude B) à 75% (étude C).

**Tableau 1. Résultats des taux de mortalité obtenus après épreuve virulente au cours de 3 études expérimentales.**

Etude	Lot de lapins (Ep. = épreuve virale, V = vaccinés)	morts/inoculés
A	Ep. classique	3/5
	Ep. variant	1/5
	V+Ep. classique	0/5
	V+Ep. variant	0/8
	V+V+Ep. variant	0/8
B	Ep. classique - 10 semaines	8/8
	Ep. classique - 4,5 semaines	0/8
	Ep. variant - 10 semaines	0/8
	Ep. variant - 4,5 semaines	0/8
C	Ep. variant	6/8

A = inoculum 1, voie intramusculaire ; B = inoculum 2, voie orale, plus concentré ; C = inoculum 3, voie orale, plus concentré.

Les lésions macroscopiques observées sur les lapins inoculés avec le virus VHD variant quel que soit l'âge testé, ont été comparables à celles observées avec le virus VHD de référence (souche V/VHD/4 de 1989), avec cependant pour certains cas, la présence d'ictère plus prononcé (muqueuses et urine jaune vif chez des lapins âgés de 9-10 semaines). Ces données confirment celles recueillies en élevage (Boucher *et al.*, 2011). Les analyses histologiques restent à réaliser. Concernant sa pathogénie, le virus variant se transmet par les voies intramusculaire et orale. Les premiers cas de mortalité ont été observés à 3 jours post-infection avec des animaux présentant une forme aiguë de la maladie. Cependant, des lapins morts à 6 jours post-infection présentaient les mêmes symptômes associés à une épistaxis. Des formes qualifiées de chroniques ont aussi été observées. Nous avons ainsi noté un étalement des mortalités un peu plus important dans le temps qu'avec la VHD classique.

Nous n'avons pas pu confirmer de différence de protection des lapins vaccinés contre la VHD suite à une épreuve virulente avec le virus variant (Etude A). En effet lors de cette première étude et contrairement à ce nous attendions, le taux de mortalité chez les 5 lapins non vaccinés a été trop faible (20%) pour pouvoir détecter une différence significative entre le lot vacciné et le lot non vacciné.

L'inoculation au cours de l'essai suivant (Essai B) d'une suspension virale plus concentrée n'a pas permis d'augmenter les taux de mortalité. Alors que l'essai a eu des résultats escomptés en terme de taux de mortalité pour les 2 lots de lapins de 10 et 4,5 semaines d'âge inoculés avec le virus VHD de référence (100% et 0%, respectivement), l'absence de mortalité chez les lapins inoculés avec le virus variant n'a pas permis de confirmer si celui-ci infectait en plus grand nombre les lapereaux de 4 semaines.

### 3. Discussion

L'émergence d'une nouvelle souche de virus de la VHD, génétiquement très distante des souches de lagovirus décrites à ce jour dans le monde, est la cause des mortalités rapportées dans de nombreux élevages de lapins de chair et dans la faune sauvage du nord-ouest et nord de la France depuis la fin août 2010 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a). Son origine reste encore inconnue. Une comparaison avec les séquences VHD obtenues antérieurement à l'Anses dans le cadre de nos travaux de surveillance de l'évolution génétique des souches de calicivirus, a permis de confirmer rétrospectivement la présence du variant dans un élevage touché par la VHD en Ille-et-Vilaine fin mai 2010. Les observations de terrain accumulées depuis l'automne 2010 montrent un impact contrasté en terme de taux de mortalité, que ce soit en élevage ou dans les populations de lapins de garenne dont certaines sont fortement atteintes alors que d'autres n'enregistrent que de faibles mortalités. De même et à la différence des souches classiques, le virus variant semble persister pendant de longues périodes dans les populations sauvages entraînant des mortalités en faible nombre mais régulières. Ce taux variable de mortalité et l'étalement de cette dernière dans le temps ont été aussi observés dans nos études expérimentales. Lors des deux premières études réalisées dans deux laboratoires différents (ENVT et Anses), nous avons été surpris du faible taux de mortalité obtenus rendant insuffisant le nombre de lapin par lot habituellement utilisé pour reproduire la VHD. Ces expérimentations ne nous ont pas permis d'obtenir du matériel viral en grande quantité pour notamment le titrer sur lapins. Le 3<sup>ème</sup> essai devrait nous permettre de le faire. Les variations de taux de mortalité observées peuvent s'expliquer pour partie par l'inoculation de doses virales et d'inocula différents.

Les mortalités semblent par ailleurs toucher plus fréquemment les lapereaux de 4 semaines d'âge dans les élevages et les observations réalisées dans certaines populations de la faune sauvage tendent à montrer une diminution du nombre de jeunes alors que les conditions de reproduction et de survie des jeunes sont très favorables cette année. Les signes cliniques et le mode de transmission, confirmés lors de nos études expérimentales, sont néanmoins similaires à ceux provoqués par les souches classiques de la VHD.

Les tests de diagnostic ELISA de la VHD permettent la détection de la nouvelle souche. Cependant, les valeurs des D.O. obtenues sont en moyenne plus

faibles que celles obtenues avec les souches classiques. Cette observation pourrait montrer l'existence d'une parenté antigénique partielle entre les deux types de souches, en accord avec le faible degré d'homologie des séquences protéiques. Cela reste à confirmer au travers de la caractérisation du profil antigénique du variant, en cours d'analyse au laboratoire OIE (Office International des Epizooties) de référence des lagovirus. Les premiers résultats semblent montrer que le variant n'est pas reconnu par plusieurs anticorps spécifiques du virus de la VHD. Concernant la protection induite par les vaccins commerciaux, l'étude expérimentale n'a pas pu infirmer ou confirmer l'hypothèse d'une protection partielle. Une vaccination d'urgence réalisée lors de l'apparition des premières mortalités en élevage arrête les mortalités, même si le délai est plus long qu'en cas de VHD classique. Par ailleurs, plusieurs observations sur le terrain rapportent des cas de VHD chez des animaux d'élevages ou sauvages vaccinés depuis seulement quelques mois. Il semble ainsi que les vaccins protègent mais que la durée de protection induite soit plus courte vis-à-vis du variant.

### Conclusion

Une étude moléculaire de souches diagnostiquées à Anjou Laboratoire dès 2009 sera prochainement menée jusqu'en 2013 à l'Anses avec l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage et la Fédération Nationale des Chasseurs. Elle a pour but de suivre la propagation du virus et son évolution moléculaire. De même, les études de caractérisation pathogénique et antigénique en collaboration avec des équipes internationales seront poursuivies.

### Références

- BOUCHER S., LE GALL-RECULE G., PLASSIART G. 2011. Maladie hémorragique du lapin : un nouveau variant du virus de la VHD est mis en évidence en France. *La Semaine Vétérinaire* N° 1437, 11 février, 40-41.
- LE GALL-RECULE G., ZWINGELSTEIN F., BOUCHER S., LE NORMAND B., PLASSIART G., PORTEJOIE Y., DECORS A., BERTAGNOLI S., GUERIN J-L., MARCHANDEAU S. 2011a. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Record* Feb. 5, 137-138.
- LE GALL-RECULE G., ZWINGELSTEIN F., FAGES M-P., BERTAGNOLI S., GELFI J., AUBINEAU J., ROOBROUK A., BOTTI G., LAVAZZA A., MARCHANDEAU S. 2011b. Characterisation of a non-apthogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* 410, 395-402.
- MORISSE J-P. 1989. La maladie hémorragique virale du lapin (VHD). *L'éleveur du lapin* 26, 18-27.
- STRIVE T., WRIGHT J., ROBINSON A.J. 2009. Identification and partial characterization of a new lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 384, 97-105.