

Evaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin contre le virus variant de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD)

O. LE MINOR, F. BEILVERT, T. LE MOULLEC, D. DJADOUR, J. MARTINEAU

Laboratoire FILAVIE, la Corbière – 49 450 Roussay, France.

Résumé. Un nouveau virus variant de la maladie virale hémorragique du lapin (VHD) a été identifié en 2010 suite à l'apparition d'importants épisodes cliniques dans des élevages cynicoles français. L'application de protocoles vaccinaux corrects dans de nombreux élevages touchés suggère que les vaccins classiques disponibles n'immuniseraient pas, ou mal, contre le variant. La protection conférée par un nouveau vaccin inactivé contenant une souche variante a été évaluée face à des épreuves expérimentales avec un virus variant et un virus classique, et comparée à celle conférée par un vaccin de formulation identique contenant un virus classique. Les résultats montrent l'obtention d'une protection complète face à une épreuve variante après vaccination avec le nouveau vaccin VHD variant, ainsi qu'une absence de protection croisée entre virus variant et virus classique.

Abstract. Efficacy of a novel vaccine against new variant of rabbit haemorrhagic disease virus (RHD). A new variant virus of RHD was identified after the occurrence of significant outbreaks in French rabbitries in 2010. Adequate application of vaccination protocol in many affected farms suggests that conventional vaccines do not provide correct immunity against the variant. The protection induced by a novel inactivated vaccine, which contains a variant strain, was evaluated against both variant and classic viruses (experimental challenges), and was compared to the protection conferred by an identical vaccine containing classical strain. The novel variant vaccine provided full protection against variant challenge, while no cross-protection could be obtained.

Introduction

La maladie hémorragique virale du lapin (VHD) est une maladie fortement contagieuse et mortelle pour le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). L'agent étiologique, le RHDV, est un virus de la famille des *Caliciviridae* appartenant au genre *Lagovirus*. D'abord décrite en Chine en 1984, la maladie est désormais considérée comme enzootique dans les populations sauvages de plusieurs régions du monde, dont l'Europe. Caractérisée par une mortalité élevée pouvant dépasser les 80%, la VHD se propage très rapidement par voie directe ou indirecte. L'infection se produit chez les lapins de tout âge, mais la maladie clinique est rarement observée avant 4 semaines d'âge (la sensibilité devenant complète entre l'âge de 8 à 10 semaines). La VHD évolue principalement sur un mode aigu ou suraigu, avec une période d'incubation comprise entre 1 à 3 jours. Macroscopiquement, les lésions caractéristiques sont une nécrose hépatique, une splénomégalie et une coagulopathie intravasculaire. Seul le développement de vaccins efficaces dans la fin des années 80 a permis de contrôler la maladie et de limiter les pertes économiques en élevage cynicole.

En 2010, plusieurs déclarations de pharmacovigilance faisant état d'une suspicion de manque d'efficacité des vaccins commerciaux contre la VHD sont parvenues à l'agence nationale du médicament vétérinaire suite à la diffusion de la maladie au sein de cheptels reproducteurs vaccinés (avec une mortalité pouvant atteindre 20%) (ANSES, 2012). La maladie évoluait dans ces élevages sur un mode moins aigu et plus icterique que le tableau classique de VHD et

touchait aussi des lapereaux de moins de 4 semaines d'âge habituellement peu sensibles (Boucher *et al.*, 2011). Les analyses phylogénétiques ont permis de caractériser un nouveau virus (qualifié de « variant 2010 ») qui forme à lui seul un nouveau groupe relativement distant des autres lagovirus connus (groupe nommé récemment « RHDV2 ») (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a et 2013). Ce variant a rapidement diffusé vers l'Italie (OIE, 2011) et l'Espagne (Dalton *et al.*, 2012), où il a été identifié dès 2011. Des données récentes montrent une très forte prévalence du virus variant en France au sein des populations domestique et sauvage (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013).

En raison d'une reproduction expérimentale difficile (plus faible virulence du virus variant), les premières études publiées n'ont pas permis de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une protection partielle induite par les vaccins commerciaux dirigés contre le virus classique (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011b).

L'objectif de cet article est de présenter les premières données d'efficacité issues du développement d'un nouveau vaccin inactivé contenant le virus variant de la VHD. La protection conférée par ce vaccin a été évaluée face à des épreuves effectuées avec un virus variant et un virus classique, et comparée à celle conférée par un vaccin inactivé contenant un virus classique.

1. Matériel et Méthodes

1.1. Vaccins

FILAVAC VHD VARIANT (ATU 12 003) est un vaccin inactivé adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium, contenant un virus variant (référéncé LP.SV.2012 et qualifié de « souche

variante vaccinale») isolé en 2012 à partir de deux foies de lapins ayant succombé à la VHD dans un élevage français.

Un virus classique isolé d'un lapin d'élevage français en 2011 constitue la « souche classique vaccinale ». Il a été utilisé pour produire un lot de vaccin inactivé VHD classique expérimental préparé selon la même formulation que le vaccin FILAVAC VHD VARIANT.

1.2. Epreuves virulentes

Afin d'évaluer le pouvoir immunogène conféré par la vaccination, il a été nécessaire au préalable de mettre au point des épreuves virulentes calibrées à partir de souches classique et variante différentes de celles utilisées pour la production des vaccins (épreuves hétérologues). Le virus de référence V/RHD/4 (souche ANSES), isolé en France en 1988, sert de « souche classique d'épreuve ». Un virus variant provenant d'un élevage français en 2012 constitue la « souche variante d'épreuve ». Les lots de semence d'épreuve ont été préparés à partir du surnageant de broyats de foie de lapins infectés avec ces souches ; un titrage infectieux sur lapins (évaluation de la dose létale 50%) a été réalisé pour chaque lot de semence afin de déterminer l'inoculum à administrer lors des épreuves virulentes (données non présentées).

1.3. Essais de protection vaccinale

Dix essais de protection vaccinale menés au sein du laboratoire Filavie entre janvier et septembre 2013 sont présentés (Tableau 1). Les premiers essais (A à F) avaient pour objectif de vérifier l'efficacité de six lots successifs de vaccin VHD variant face à une épreuve variante hétérologue sur des lapins âgés d'au moins 10 semaines (test d'activité libérateur). L'essai G avait pour but d'évaluer la sensibilité des lapereaux au sevrage au virus variant et, le cas échéant, d'évaluer l'efficacité d'une vaccination VHD variant à 4 semaines d'âge. L'essai I permettait de vérifier l'efficacité du lot expérimental de vaccin VHD classique face à une épreuve classique hétérologue. Les deux derniers essais de protection croisée (H et J) étaient destinés à évaluer l'efficacité un vaccin VHD classique face à une épreuve variante et réciproquement.

Chaque essai comporte deux groupes de lapins exempts d'anticorps dirigés contre le virus VHD. Un groupe a reçu une dose de vaccin recommandée par voie sous-cutanée, un autre groupe sert de témoin. Sept jours après la vaccination, tous les lapins ont été éprouvés par voie intramusculaire avec une quantité fixée de virus d'épreuve sous un volume de 1ml. Dans les 14 jours suivant l'épreuve, un relevé quotidien des signes cliniques et de la mortalité a été réalisé. Tous les lapins morts, ainsi que les survivants euthanasiés en fin d'essai, ont fait l'objet d'un examen nécropsique.

1.4. Analyses de laboratoire

Le statut séronégatif initial des lapins a été confirmé avec le kit commercial ELISA INGENEZA (Ingezim RHDV 17.RHD.K.1).

Les foies d'une partie des animaux morts (55 témoins et 9 vaccinés) ont été analysés à l'aide d'une technique ELISA sandwich antigénique afin de vérifier la présence du virus de la VHD.

2. Résultats

2.1. Epreuves virulentes

L'inoculation de la souche variante d'épreuve aux lapins séronégatifs âgés d'au moins 10 semaines a permis de reproduire expérimentalement la maladie avec des taux de mortalité variables, s'échelonnant de 30 à 67% (Tableau 1, groupes témoins des essais A - F, H). Les premiers morts sont survenus 2 jours après l'inoculation. Le pic de mortalité se situe entre 2 et 3 jours post-épreuve, mais des morts plus tardifs ont été observés jusqu'à 9 jours. Tous les lapins témoins éprouvés avec la souche classique sont morts dans les 2 à 4 jours suivant l'épreuve (essais I et J). Une mortalité de 53% (entre 2 et 3 jours post-inoculation), a été relevée chez les lapereaux témoins de 5 semaines d'âges, confirmant une sensibilité élevée au virus variant (essai G). Comme pour le virus classique, seuls quelques signes cliniques frustes et peu spécifiques ont pu être observés chez les témoins infectés avec le virus variant dans les heures précédant la mort (anorexie, apathie, signes nerveux et respiratoires). Aucun signe clinique n'a été observé chez les témoins survivants, à l'exception d'une apathie transitoire 2 à 3 jours post-inoculation chez une minorité de sujets. Des lésions macroscopiques caractéristiques de la VHD ont pu être relevées chez tous les témoins morts. Les lapins infectés par le virus variant présentaient une décoloration plus marquée de leur foie, mais il n'a pas été observé d'ictère plus prononcé chez ces derniers. L'analyse ELISA a permis de confirmer la présence d'antigène RHDV dans les foies de tous les témoins morts prélevés (52 prélèvements pour les épreuves variantes, 4 pour les épreuves classiques).

2.2. Pouvoir protecteur du vaccin VHD variant vis-à-vis d'une épreuve variante hétérologue

Les résultats des essais A à F ont montré une absence complète de morbidité et de mortalité dans les six groupes vaccinés avec différents lots de vaccin VHD variant suite à l'épreuve variante (30 à 67% de mortalité chez les témoins), confirmant l'efficacité de la vaccination variante chez les lapins âgés d'au moins 10 semaines. Un résultat similaire a été obtenu chez les lapereaux vaccinés dès 4 semaines d'âge (essai G), avec dans tous les essais une mise en place rapide de l'immunité (7 jours). Aucune lésion de VHD n'a été relevée lors de l'autopsie des lapins vaccinés.

2.3. Pouvoir protecteur du vaccin VHD classique vis-à-vis d'une épreuve classique hétérologue

Le lot de vaccin expérimental VHD classique a permis de protéger les lapins vaccinés (absence de morbidité, de mortalité et de lésions post-mortem de VHD) face à l'épreuve classique (100% mortalité chez les témoins) (essai I).

2.4. Protection croisée des vaccins VHD

Dans nos conditions expérimentales, la vaccination avec le lot de vaccin VHD classique n'a pas permis de protéger les lapins face une épreuve avec le virus variant, les taux de mortalité obtenus dans les groupes

témoin et vacciné étant comparables (respectivement, 40% et 50%) (essai H). Les recherches ELISA ont confirmé la présence du virus VHD dans les foies des animaux vaccinés morts (2/2 analyses positives associées à un tableau lésionnel de VHD). De même, tous les lapins vaccinés avec le vaccin VHD variant ont succombé suite à l'inoculation du virus classique (7/7 analyses ELISA positives dans foies associées à un tableau lésionnel de VHD), indiquant là encore une absence de protection croisée (essai J). Cependant la mortalité a été légèrement retardée chez les vaccinés comparativement aux témoins.

Tableau 1. Mortalités obtenues dans les groupes témoins et vaccinés dans les 14 jours suivant l'épreuve virulente.

Essai	Age (J0)	Vaccination (J0) Souche vaccinale	Epreuve (J7) Souche d'épreuve	Mortalité groupe témoin		Mortalité groupe vacciné	
				%	Période	%	Période
Activité des lots de vaccin - Vaccin VHD variant / Epreuve VHD Variant							
A	12s	SV _V (lot vaccin n°1)	SV _E	30% (3/10)	J10	0% (0/15)	
B	11s	SV _V (lot vaccin n°2)	SV _E	60% (9/15)	J9 -J14	0% (0/10)	
C	12s	SV _V (lot vaccin n°3)	SV _E	67% (10/15)	J9-J11	0% (0/10)	
D	12s	SV _V (lot vaccin n°4)	SV _E	40% (6/15)	J9-J15	0% (0/10)	
E	12s	SV _V (lot vaccin n°5)	SV _E	40% (6/15)	J9-J13	0% (0/10)	
F	10s	SV _V (lot vaccin n°6)	SV _E	47% (7/15)	J9-J15	0% (0/10)	
Activité suite à une vaccination au sevrage - Vaccin VHD variant / Epreuve VHD variant							
G	4s	SV _V (lot vaccin n°3)	SV _E	53% (8/15)	J9-J10	0% (0/10)	
Activité croisée - Vaccin VHD classique / Epreuve VHD variant							
H	12s	SC _V (lot vaccin R&D)	SV _E	40% (4/10)*	J9-J16	50% (5/10)*	J10-J12
Activité- Vaccin VHD classique / Epreuve VHD classique							
I	12s	SC _V (lot vaccin R&D)	SC _E	100% (2/2)	J10	0% (0/3)	
Activité croisée - Vaccin VHD variant/ Epreuve VHD classique							
J	12s	SV _V (lot vaccin n°1)	SC _E	100% (5/5)	J9-J11	100% (10/10)	J9-J14

SV_(V/E) = Souche Variante (Vaccinale/d'Epreuve); SC_(V/E) = Souche Classique (Vaccinale/d'Epreuve); * essai arrêté à J16

3. Discussion

Si la forme variante de la VHD reste cliniquement très proche de la forme classique, la plus faible virulence du virus rend sa reproduction expérimentale plus difficile (taux de mortalité plus faible et contrasté, associé à une évolution moins aiguë). Il nous a cependant été possible dans le cadre de nos essais d'obtenir un niveau d'épreuve virulente satisfaisant et cohérent avec les observations de terrain (Boucher *et al.*, 2011).

Nos résultats confirment le défaut d'efficacité des vaccins VHD classique observé dans les élevages depuis 2010, puisqu'aucune protection croisée, même partielle, n'a pu être mise en évidence face à une épreuve variante. La vaccination avec le vaccin VHD variant a en revanche permis d'induire une protection complète et rapide face à cette même épreuve variante hétérologue. Ce vaccin variant s'est révélé inefficace face au virus classique, alors que la possibilité d'une

protection très partielle a été récemment suggérée par Le Gall-Reculé *et al.* (2013).

Le défaut de protection croisée est cohérent avec la distance antigénique décrite entre les deux virus et la découverte chez le variant de mutations affectant des déterminants antigéniques majeurs (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013).

Conclusion

La diffusion rapide du nouveau variant en France et dans d'autres pays européens est une menace majeure pour la filière cunicole. En l'absence de protection croisée entre le virus classique et variant, il est impératif de disposer de vaccins dirigés contre les deux virus pour contrôler efficacement la VHD.

Le vaccin FILAVAC VHD variant permet de conférer une immunité complète face au virus variant en condition expérimentale. Son utilisation dans les élevages français depuis avril 2013 (ATU), puis

espagnols depuis juillet 2013, a permis de confirmer son efficacité et son innocuité sur le terrain.

Références

- ANSES, 2012. Pharmacovigilance vétérinaire, Rapport annuel (2011). p45-46
- BOUCHER S., LE GALL-RECOLE G., PLASSIART G., SRAKA B., 2011. Description clinique, nécropsique et histologique de cas de la Maladie Virale Hémorragique (VHD) à virus variant, survenus dans 60 élevages de lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) vaccinés ou non vaccinés en France en 2010/2011. 13^{ème} Jour. Rech. Cunicole, 22-23 nov., Le Mans, France.
- DALTON KP., NICIEZA I., BALSEIRO A., MUGUERZA MA., ROSELL JM., CASAIS R., ALVAREZ AL., PARRA F., 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *EID*, 12 : 2009-12.
- LE GALL-RECOLE G., BOUCHER S., LE NORMAND B., PLASSIART G., PORTEJOIE Y., DECORS A., BERTAGNOLI S., GUERIN JL., MARCHANDEAU S., 2011a. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.*, 168: 137-138.
- LE GALL-RECOLE G., ZWINGELSTEIN F., BOUCHER S., LE NORMAND B., BERTAGNOLI S., GUERIN JL., PORTEJOIE Y., DECORS A., MARCHANDEAU S., 2011b. Caractérisation d'un nouveau variant du virus de la maladie virale hémorragique du lapin (VHD) en France. 13^{ème} Jour. Rech. Cunicole, 22-23 nov., Le Mans, France.
- LE GALL-RECOLE G., Lavazza A., MARCHANDEAU S., BERTAGNOLI S., ZWINGELSTEIN F., CAVADINI P., MARTINELLI N., LOMBARDI G., GUERIN JL., LEMAITRE E., DECORS A., BOUCHER S., LE NORMAND B., CAPUCCI L., 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.*, 44:81.
- OIE, 2011. Rabbit haemorrhagic disease, immediate notification report ref 10837, report date 27/07/2011.
- WANG X., XU F., LIU J., GAO B., LIU Y., ZHAI Y., MA J., ZHANG K., BAKER TS., SCHULTEN K., ZHENG D., PANG H., SUN F., 2013. Anatomic model of rabbit Hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *Plos Pathog*, 9(1): e1003132