

# Le nouveau virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) : situation du RHDV2 en Europe et étude de la sensibilité des lapins à ce virus

G. LE GALL-RECULE<sup>1</sup>, J. LE PENDU<sup>2</sup>, E. LEMAITRE<sup>1</sup>, B. LE MOULLAC-VAIDYE<sup>2</sup>, A. DECORS<sup>3</sup>, V. BEAUTE<sup>4</sup>, E. FAURE<sup>5</sup>, S. MARCHANDEAU<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané – Unité VIPAC – BP 53 - 22440 Ploufragan, France.

<sup>2</sup>IRS UN, UMR Inserm 892/CNRS 6299 – 8 quai Moncouso – BP 70721 – 44007 Nantes cedex 1, France.

<sup>3</sup>ONCFS, Direction de la recherche et de l'expertise – Unité Sanitaire de la faune – 5 rue de Saint Thibaud – 78610 Auffargis, France.

<sup>4</sup>Inovalys, Laboratoire de Santé Animale-Site d'Angers - 18 Boulevard Lavoisier – CS 20943 – 49009 Angers cedex 01, France.

<sup>5</sup>FNC, 13 rue du Général Leclerc – 92136 Issy-Les-Moulineaux cedex, France

<sup>6</sup>ONCFS, Direction et de la recherche et de l'expertise – Unité Faune de plaine - 8 bd Albert Einstein – CS 42355 – 44323 Nantes cedex 3, France.

**Résumé.** Le nouveau virus de la VHD (RHDV2), initialement caractérisé en France en 2010, a été identifié dès 2011 en Italie et en Espagne, en 2012 au Portugal, en 2013 en Allemagne puis en 2014 au Royaume-Uni. Il a été caractérisé hors du continent européen, aux Açores, fin 2014. Les données récentes confirment que le RHDV2 a remplacé presque entièrement les RHDV classiques en France et en Péninsule Ibérique. Comme les RHDV classiques, le RHDV2 se fixe sur les antigènes tissulaires de groupe sanguin ABH. Alors que la sensibilité des lapins aux RHDV classiques dépend à la fois de leur phénotype ABH et du niveau d'expression de ces antigènes, la sensibilité des lapins au RHDV2 semble dépendre essentiellement du niveau d'expression des antigènes. Ainsi, bien qu'il soit moins virulent que le RHDV, la capacité du RHDV2 à infecter potentiellement tous les lapins entraîne un fort impact sur les populations.

**Abstract.** The new Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): situation of the RHDV2 in Europe and study of the susceptibility of rabbits towards this virus. The new RHD virus (RHDV2) characterised in France in 2010 has been identified as early as 2011 in Italy and Spain, 2012 in Portugal, 2013 in Germany and 2014 in the UK. It has been characterised outside the European continent in Azores at the end of 2014. Recent works confirmed that RHDV2 has almost entirely replaced the classic RHDV in France and in the Iberian Peninsula. As RHDV, RHDV2 binds histo-blood group antigens ABH. Although the susceptibility of rabbits to RHDV depends on both their phenotype ABH and the expression level of these antigens, the susceptibility of rabbits to RHDV2 seems essentially to depend on the expression level. Thus, whereas less virulent than RHDV, the RHDV2 capacity to potentially infect all the rabbits leads to a great impact in the populations.

## 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*. L'agent étiologique de la maladie, le RHDV, est un calicivirus appartenant au genre *Lagovirus*. 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 mais le développement de vaccins a permis de contrôler la maladie. Cependant, celle-ci reste une menace pour les populations de lapins de garenne.

De récents travaux menés pour mieux comprendre les mécanismes de sensibilité des lapins au RHDV ont montré que 1) le RHDV se fixait sur des antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGA) présents notamment sur la trachée, le duodénum et l'intestin grêle des lapins, 2) cette fixation était dépendante du

groupe génétique de RHDV parallèlement au niveau d'expression des différents antigènes A, B et H chez le lapin (Nyström *et al.*, 2011). Ainsi, la sensibilité à une souche virale s'exprime à la fois qualitativement (sensible vs résistant) et quantitativement (très sensible à peu sensible pour les individus sensibles). Il a été aussi montré la mise en place d'un processus de co-évolution lapin/RHDV au cours du temps.

A partir de l'été 2010, plusieurs cas cliniques de VHD ont été rapportés en élevage chez des lapins vaccinés vis-à-vis de la VHD dans le nord-ouest de la France (Boucher *et al.*, 2011) ainsi que dans la faune sauvage par le réseau de Surveillance épidémiologique de la faune sauvage SAGIR (réseau ONCFS/FNC/FDC) avec parfois une mortalité significative. L'agent étiologique correspond à un nouveau génotype de RHDV, nommé RHDV2. Il présente un profil antigénique unique, échappe partiellement à l'immunité dirigée contre les souches de RHDV, y compris les souches vaccinales disponibles à l'époque,

et touche plus fréquemment les lapereaux de 4 semaines d'âge (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013a). Une étude a été conduite entre 2011 et 2014 par l'Anses, l'Office National de la Chasse et de la Faune sauvage (ONCFS) et la Fédération Nationale des Chasseurs (FNC) pour rechercher la présence du RHDV2 dans les populations de lapins de garenne avant sa première description en élevage, suivre sa propagation géographique et son évolution génétique, afin de mieux connaître le type de virus susceptible de circuler à la fois au sein des populations sauvage et domestique. Les résultats acquis fin 2012 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013a ; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013b) ont signalé la présence du RHDV2 dès le mois de mai 2010 dans une population sauvage et ont montré qu'il avait diffusé en moins d'un an dans toute la France. Dès la fin 2011, il avait remplacé à plus de 95 % les souches classiques de RHDV dans les populations sauvages ainsi qu'en élevage, remplacement confirmé en 2012. Il a été identifié peu de temps après sa détection en France, en Espagne (mai 2011) et en Italie (juin 2011).

Nous décrivons ici les résultats des deux dernières années de cette étude (2013 et 2014) et rapportons l'état des connaissances sur la propagation géographique du RHDV2 dans les autres pays. Nous présentons également les premiers résultats des travaux sur la reconnaissance par le RHDV2 des différents types d'HBGA présents chez le lapin.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1 Echantillons biologiques

Une sélection des échantillons de lapins reçus à l'Anses a été réalisée parmi ceux transmis par le réseau SAGIR 1) pour analyse de confirmation en ELISA VHD aux laboratoires Inovalys-Angers et LEAV85 selon le protocole établi (Decors *et al.*, 2015) et 2) pour confirmation du diagnostic VHD en RT-PCR-séquençage par l'Anses de lapins présentant des lésions caractéristiques (LVD25 et LVD34). La sélection a été faite en fonction de critères géographiques (priorisation des prélèvements issus de départements non analysés l'année précédente) et épidémiologiques (fortes mortalités). Cent trente-cinq échantillons de foies de lapins de garenne (78% des échantillons SAGIR) ont été ainsi étudiés (97 en 2013 et 38 en 2014).

### 1.2 Analyses moléculaires

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'exsudat de foie (kit "RNeasy Mini kit" QIAGEN) et les ADN complémentaires ont été synthétisés. Pour le génotypage des virus étudiés et la phylogénie, une région de 794 pb du gène codant la protéine de capsid VP60 a été amplifiée par PCR. Les amplifiats ont été séquencés en utilisant les amorces de PCR. Les échantillons négatifs avec cette première PCR ont été analysés à l'aide d'une seconde PCR permettant d'amplifier une région plus conservée du gène (274

pb). Les séquences obtenues n'ont servi qu'au génotypage.

Le génotypage a été réalisé par alignements multiples des séquences obtenues avec celles de RHDV représentatifs des différents groupes génétiques et le RHDV2 (méthode CLUSTAL W). Par ailleurs, afin de confirmer les relations de parentés entre les virus et d'apprécier leur évolution génétique dans le temps, des analyses phylogéniques ont été réalisées à l'aide du logiciel MEGA 5 (méthode Neighbor-joining).

### 1.3 Expériences de fixation du RHDV2 aux antigènes tissulaires ABH et de reconnaissance sur les glycannes de duodenum de lapin

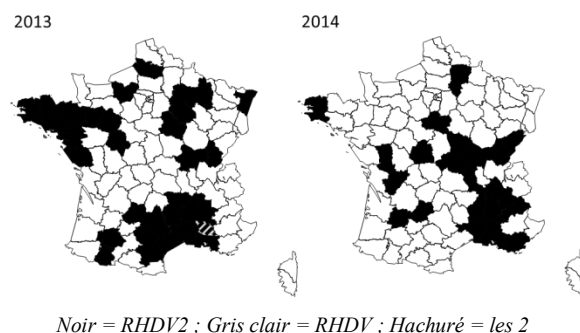
Afin de caractériser la fixation aux récepteurs glycosylés par deux souches RHDV2 (10.28 et 10.32) des pseudo-particules virales recombinantes (VLPs) ont été préparées en système baculovirus. Ces VLPs correspondent à des capsides vides non infectieuses identiques structurellement et antigéniquement aux particules virales. Une série de 50 oligosaccharides synthétiques ont été immobilisés au plastique de plaques ELISA puis incubés en présence des VLPs de chacune des deux souches. La fixation des VLPs a été ensuite quantifiée à l'aide d'anticorps dirigés contre la VP60. Par ailleurs, les glycannes de la surface du duodénum de 15 lapins phénotypés pour les sous-groupes d'antigènes A et B (5 par sous-groupe) à l'aide d'anticorps anti-A, anti-B et anti-H, ont été immobilisés sur plaque. Des VLPs RHDV2 10.28 ont ensuite été incubées sur ces glycannes et leur capacité de fixation a été détectée comme précédemment pour les oligosaccharides synthétiques.

## 2. Résultats

### 2.1 Epidémiologie moléculaire

Les résultats (présentés en nombre d'épidémies) confirment le quasi-remplacement des RHDV classiques par le RHDV2 observé depuis fin 2011 puisqu'une seule épidémie due au RHDV classique a été détectée depuis 2013. Le RHDV2 est ainsi responsable de 99% des épidémies détectées par le réseau SAGIR en 2013 (68/69) et de 100% des épidémies détectées en 2014 (31/31).

**Figure 1 : Distribution spatiale des différents génotypes de souches de VHD caractérisées dans les populations sauvages de lapins en France en 2013-2014.**



Les résultats des études phylogéniques ont montré que sur la période considérée, les souches RHDV et RHDV2 analysées ont évolué génétiquement mais de façon attendue pour cette famille de virus. Aucun nouveau génotype de RHDV n'a été mis en évidence.

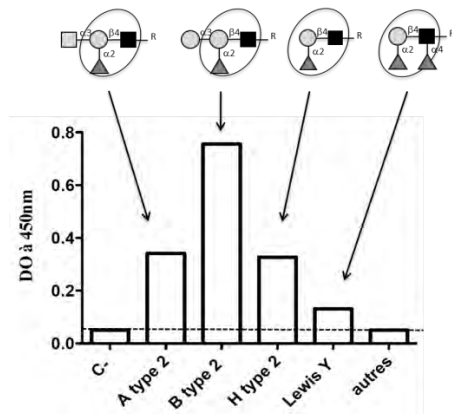
## 2.2 Situation du RHDV2 hors de France

Outre sa détection dès les mois de mai et de juin 2011 au nord de l'Espagne et de l'Italie continentale, puis en octobre en Sardaigne, les publications rapportent que le RHDV2 a été identifié pour la 1<sup>ère</sup> fois au Portugal en août 2012, au Royaume-Uni (RU) en août 2013 et en Allemagne dans un élevage vacciné de Rhénanie-du-Nord-Westphalie en septembre 2013. Toutefois au RU, une étude rétrospective réalisée sur dix cas diagnostiqués VHD entre mai 2006 et septembre 2010 (par microscopie et tests HA) récoltés sur tout le territoire, révèle la présence du RHDV2 dès le mois de mai 2010. Le RHDV2 a été identifié pour la 1<sup>ère</sup> fois hors du continent européen, dans plusieurs îles de l'archipel des Açores (décembre 2014). Par ailleurs, il infecte naturellement d'autres espèces de léporidés : le lièvre Sarde (*Lepus capensis mediterraneus*) et le lièvre corse (*lepus corsicanus*).

## 2.3 Profils de fixation et de reconnaissance sur les glycannes du duodenum du RHDV2

Sur un total de 50 oligosaccharides synthétiques, seuls quatre ont montré une fixation significative des VLPs. Il s'agit des mêmes structures pour les deux souches de RHDV2 analysées dont le profil de reconnaissance apparaît identique (figure 2).

**Figure 2 : Profil de fixation du RHDV2 sur des sucres complexes de type HBGA.**

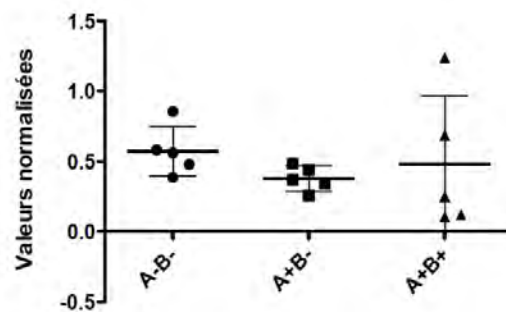


Le contrôle négatif (C-) donne la valeur du bruit de fond du système. Les valeurs obtenues avec l'ensemble des 46 structures de sucres sur lesquelles aucune fixation n'a été observée ont été regroupées (autres). Les 4 valeurs de fixation sur les 4 seules structures reconnues sont montrées. Elles possèdent un motif commun (entouré). Les monosaccharides constituant ces sucres complexes sont figurés par des symboles. Galactose : rond gris clair ; N-acétylgalactosamine : carré noir ; fucose : triangle gris foncé ; galactose : rond gris clair ; N-acétylgalactosamine : carré gris clair.

Les oligosaccharides concernés partagent deux caractéristiques communes. Ils possèdent une structure de base formée par une lactosamine (Gal $\beta$ 4GlcNAc) et un fucose en position  $\alpha$ 1,2 sur le galactose (Gal) de la lactosamine. Cette structure

minimale reconnue correspond à l'antigène H type 2 de la famille des antigènes tissulaires de groupe sanguin. La substitution par un galactose en  $\alpha$ 1,3, correspondant à l'antigène B type 2, augmente nettement la reconnaissance par le RHDV2, tandis que la substitution par une N-acétylgalactosamine, qui donne l'antigène A type 2, ne change pas le niveau de reconnaissance. En revanche une légère diminution apparaît avec l'addition d'un deuxième résidu fucose en position  $\alpha$ 1,3 sur la N-acétylglucosamine de la lactosamine de base (GlcNAc), ce qui donne l'antigène Le<sup>y</sup>. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance des lapins devrait se faire à peu près indépendamment de leur phénotype ABH puisque les motifs A type 2 et B type 2 sont bien reconnus et qu'en absence de ces motifs, ce sont les motifs H type 2 et éventuellement Le<sup>y</sup> qui pourraient servir de ligand pour le RHDV2. Pour vérifier cette hypothèse, des préparations de glycannes du duodénum d'une série de lapins ont été immobilisées sur des plaques ELISA. On peut voir sur la figure 3 que la fixation sur ces glycannes se fait indépendamment du groupe ABH des animaux, bien qu'il existe des différences de reconnaissance au niveau individuel.

**Figure 3 : Profil de reconnaissance du RHDV2 sur les glycannes de la surface du duodénum de lapins.**



Le polymorphisme des antigènes A et B permet de définir 3 sous-groupes de lapins (A-B- ; A+B- et A+B+). Les antigènes H type 2 et Lewis Y servent de précurseurs et sont présents chez tous les animaux testés à des niveaux variables (non montrés). La capacité du virus à reconnaître ces épitopes (voir Fig. 2) explique pourquoi les animaux A-B- peuvent être bien reconnus.

## 3. Discussion

L'étude d'épidémiologie moléculaire menée en 2013-2014 en France a confirmé la quasi-disparition des souches classiques de RHDV au profit du RHDV2. Cette constatation est importante à prendre en compte pour la filière cynicole notamment en termes de stratégie vaccinale. La diffusion de ce nouveau virus aux autres pays européens et récemment hors d'Europe, a été très rapide. Il a notamment causé de fortes mortalités dans les élevages espagnols ainsi que dans les populations sauvages de la Péninsule Ibérique, y impactant à nouveau la conservation de la biodiversité et notamment celle des espèces protégées comme le lynx ibérique (Delibes-Mateos *et al.*, 2014). De même dans la plupart des pays où il est présent, il a rapidement remplacé presque entièrement les virus

classiques qui circulaient dans les populations sauvages. Son origine reste inconnue mais la description en Angleterre en mai 2010 de deux foyers géographiquement distants suggère qu'il circulait également dans ce pays.

Au cours d'une étude antérieure (Nyström *et al.*, 2011) nous avons montré que différents groupes génétiques de RHDV collectés entre 1990 et 2006 présentaient des profils de fixation différents qui avaient évolué au cours du temps. La proportion d'animaux préférentiellement reconnus par les souches anciennes avait diminué sous la pression de sélection de la maladie. Le virus avait ensuite évolué pour reconnaître les animaux résistants aux premières souches. On avait ainsi pu observer une co-évolution entre les lapins de garenne et le virus. Le motif B type 2 était toujours le motif le mieux reconnu, ce que l'on a retrouvé pour le nouveau virus RHDV2. Cependant les souches classiques anciennes ne reconnaissent pas le motif A type 2 ni le motif difucosylé Le<sup>y</sup>. La capacité de reconnaissance de l'antigène H type 2 avait diminué au cours du temps avec à l'inverse une augmentation de la reconnaissance de l'antigène A chez les souches plus récentes. De ce point de vue le RHDV2 ressemblerait aux souches dites G3 qui ont circulé entre 1993 et 2000. Nous avons pu aussi corrélérer les capacités de reconnaissance des glycanes par les souches classiques à la présence en quantité variable de chacun de ces glycanes chez les lapins. Au moment de son apparition en 2010, le RHDV2 reconnaît tous les lapins indépendamment de leur phénotype ABH. Toutefois, comme pour les souches classiques, sa capacité de reconnaissance des glycanes est liée au niveau d'expression des antigènes ABH.

Il reste à déterminer si le niveau d'expression des antigènes ABH constitue un facteur de sélection par la maladie et donc si la fréquence des animaux exprimant faiblement ces antigènes augmentera au cours du temps dans les populations de lapins de garenne, conduisant le virus à évoluer à son tour vers une meilleure reconnaissance de ces lapins. Ceux-ci se caractérisent par une faible expression du motif H type 2. Nous avons récemment pu caractériser, au moins partiellement, les bases moléculaires de cette faible expression. Chez le lapin, le récepteur H type 2 est synthétisé par les enzymes  $\alpha$ 1,2fucosyltransférases Fut1 et Fut2 dont le niveau d'activité est le même chez tous les individus. Il existe une troisième  $\alpha$ 1,2fucosyltransférase, appelée Sec1, qui est inactive ou quasi-inactive selon les formes alléliques. Le niveau d'expression de cette protéine est extrêmement variable, les lapins qui ne présentent que faiblement le récepteur H type 2 sont ceux qui expriment le plus fortement Sec1. Il serait intéressant de déterminer le niveau d'expression de Sec1 chez les lapins faiblement reconnus par le RHDV2 afin de s'assurer que le mécanisme préalablement identifié pour le virus classique est en cause dans la faible reconnaissance par ce nouveau virus.

## Conclusion

Le RHDV2 est présent dans plusieurs pays européens ainsi qu'aux Açores, confirmant sa grande et rapide capacité de dispersion. Dans les pays à forte densité de lapins sauvages (France, Espagne, Portugal, Ile de Sardaigne, Açores) le remplacement des virus classiques de la VHD est presque total. Même si tous les lapins ne sont pas également reconnus par le RHDV2, leur sensibilité semble ne dépendre que de leur niveau d'expression des antigènes tissulaires, induisant ainsi un impact plus important du RHDV2 que du RHDV sur les populations.

## Remerciements

Nous remercions D. Toullec, M. Thevanne et B. Le Gac, étudiants, pour leurs travaux de caractérisation moléculaire. Nous remercions les ITD SAGIR, agents de l'ONCFS et techniciens de FDC, qui ont fait remonter les cas d'épizooties dans les populations de lapins de garenne et M. Moinet (Anses, LRFSN de Nancy) pour son soutien logistique dans la gestion de la base de données SAGIR. L'étude d'épidémiologie moléculaire a été soutenue par l'ONCFS et de la FNC, et celle portant sur les récepteurs tissulaires au virus par l'ANR et la région Pays de Loire.

## Références

- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., PLASSIART G., SRAKA B., 2011. Description clinique, nécropsique et histologique de cas de Maladie Hémorragique Virale (VHD) à virus variant, survenus dans 60 élevages de lapins de chairs (*Oryctolagus cuniculus*) vaccinés ou non vaccinés en France en 2010-2011. *Compte rendu des 14èmes Journées de la Recherche Cunicole, 22-23 novembre, Le Mans, France*, 143-146.
- DECORS A., HARS J., FAURE E., QUINTAINE T., CHOLLET J-Y., ROSSI S., 2015. Le réseau SAGIR : un outil de vigilance vis-à-vis des agents pathogènes exotiques. *Bulletin épidémiologique Santé animale – Alimentation. Spécial vigilance vis-à-vis des maladies exotiques*, 66, 35-39.
- DELIBES-MATEOS M., FERREIRA C., CARRO F., ESCUDERO M.A., and GORTÁZAR C., 2014. Ecosystem effects of variant Rabbit Hemorrhagic Disease virus, Iberian Peninsula. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (12): 2166.
- LE GALL-RECLÉ G., LAVAZZA A., MARCHANDEAU M., BERTAGNOLI S., ZWINGELSTEIN F., CAVADINI P., MARTINELLI N., LOMBARDI G., GUERIN J-L., LEMAITRE E., DECORS A., BOUCHER S., LE NORMAND B., CAPUCCI L., 2013a. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit haemorrhagic disease virus. *Veterinary Research*, 44:81.
- LE GALL-RECLÉ G., LEMAITRE E., ZWINGELSTEIN F., DECORS A., PORTEJOIE Y., FAURE E., MARCHANDEAU S., 2013b. Suivi de la propagation dans les populations françaises de lapins de garenne du nouveau virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) caractérisé en 2010. *Compte rendu des 15èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 19-20 novembre 2013*, 237-240.
- NYSTRÖM K., LE GALL-RECLÉ G., GRASSI P., ABRANTES J., RUVÉEN-CLOUET N., LE MOULLAC-VAIDYÉ B., LOPES AM, ESTEVES PJ, STRIVE T, MARCHANDEAU S, DELL A, HASLAM SM, LE PENDU J, 2011. Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathogen*, 7:e1002188.