

# Cartographie des cas de VHD à RHDV2 (virus variant 2010) à partir des virus isolés depuis 2010 de lapins domestiques en France métropolitaine, sur l'île de la Réunion et en Espagne à l'aide d'une technique de RT-PCR temps réel.

S. BOUCHER<sup>1</sup>, D. RUBEAUX<sup>2</sup>, G. LE GALL-RECULE<sup>3</sup>, A. RIGAUDEAU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal) – BP 539 - 85505 Les Herbiers cedex, France

<sup>2</sup> RESALAB, ZAC de la Buzenière - 85505 Les Herbiers cedex, France

<sup>3</sup> Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané – Unité VIPAC – BP 53 - 22440 Ploufragan, France

**Résumé.** En 1988, une hépatite virale, la VHD due au virus RHDV, a fait son apparition chez le lapin en France. En 2010, une nouvelle forme de maladie hémorragique virale due à un nouveau génotype (RHDV2) a été décrite sur cette espèce pour la première fois en France. Il est devenu le génotype majoritaire chez le lapin de garenne sauvage. Qu'en est-il de la présence de ce génotype au sein de la population captive de lapins domestiques destinés à la production de chair aujourd'hui ? A partir d'un échantillon de prélèvements de foie prélevé entre 2010 et 2014 et sélectionné en fonction de leur provenance géographique (France métropolitaine, île de la Réunion, Espagne), les auteurs dressent une liste des analyses positives en RT-PCRs temps réel RHDV2 ou RHDV, département par département pour la France. Des virus RHDV classiques sont encore présents mais le taux de résultats positifs est très faible (2,8%). En revanche, le RHDV2 est présent à 97,2 % dans l'échantillon analysé. Les auteurs concluent à la prédominance très nette de ce nouveau variant dans les populations étudiées mais conseillent néanmoins de vacciner avec un programme bivalent incluant les deux valences.

**Abstract.** Mapping cases of RHD (variant virus 2010) due to viruses isolated from domestic rabbits in France, on Reunion island and in Spain using RT-PCR technique since 2010

In 1988, viral hepatitis, due to RHDV virus, first appeared in France in rabbits. In 2010, a new form of viral haemorrhagic disease caused by a new genotype (RHDV2) has been described for this species for the first time in France. It became the predominant genotype in wild rabbit populations. What is the extent of this genotype distribution in captive populations of domestic rabbits bred for meat production today? From a sample of liver samples collected between 2010 to 2014 and selected for their geographical origin (France, Reunion Island, Spain), the authors list positive RT-PCR results for RHDV2 or classical RHDV by French departments. Classical RHD viruses are still present but the rate is very low (2.8%). However, the RHDV2 is present at 97.2% in the sample analyzed. The authors conclude with a clear predominance of this new variant on domestic populations but nonetheless advise to vaccinate with a bivalent program including two valences.

## Introduction

En 1988, une hépatite virale, la VHD, due à un calicivirus, le virus RHDV (Rabbit haemorrhagic disease virus), a fait son apparition chez le lapin en France (Morisse *et al.* 1988, Boucher, 1989, Plassiart *et al.*, 1992, Boucher et Nouaille, 2013). En 2010, une nouvelle forme de maladie hémorragique virale a été décrite pour la première fois en France dans des élevages et des lapins de garenne du grand ouest (Boucher *et al.*, 2011a, 2011 b, 2012a, 2012b, Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a, 2011b). Une étude rétrospective réalisée sur des échantillons récoltés entre 2007 et l'été 2010 envoyés par le laboratoire d'analyses vétérinaires Inovalys-Angers et positifs en ELISA VHD, a permis de mettre en évidence le RHDV2 pour la première fois en avril dans un élevage d'Ille-et-Vilaine et en mai dans une population de lapins de garenne dans la Creuse (Le

Gall-Reculé *et al.* 2013a). En 2013, Le Gall-Reculé *et al.* (2013b) font part du fait que le virus variant RHDV2 est devenu le génotype majoritaire depuis la fin 2010 chez le lapin de garenne sauvage et représentait 84 % des foyers de VHD en 2011 et 97 % en 2012.

Qu'en est-il de la présence de ce génotype au sein de la population captive de lapins domestiques destinés à la production de chair aujourd'hui ? C'est la question à laquelle nous avons voulu répondre en reprenant des prélèvements de foies infectés naturellement, stockés à -80°C depuis 2010 afin de voir si – comme dans la faune sauvage – le RHDV2 est devenu majoritaire.

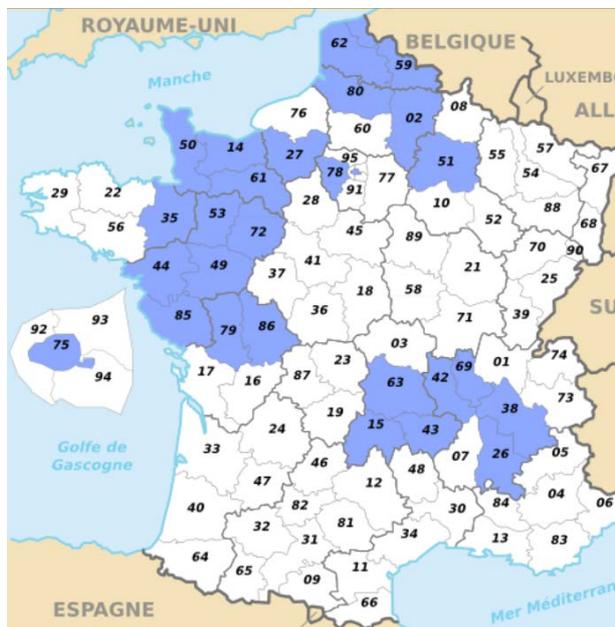
## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Prélèvements

Depuis 2010, date d'apparition du RHDV2, nous avons conservé des foies de lapins atteints d'épisodes cliniques de VHD dans un congélateur à -80°C en attendant de pouvoir disposer d'une méthode permettant de caractériser la souche virale. Seuls les foies positifs (contenant des virus de VHD) ont été comptabilisés dans l'étude. Un échantillonnage a été fait afin de représenter toutes les régions de provenance à notre disposition. Un total de 104 prélèvements, effectués entre 2010 et 2014, a été inclus dans l'étude.

Les lapins dont les foies sont issus, sont des lapins de chair – adultes ou non – provenant de l'Aine, du Calvados, du Cantal, de la Drôme, de l'Eure, d'Ile et Vilaine, d'Isère, de la Loire, de la Haute Loire, de Loire Atlantique, du Maine et Loire, de la Manche, de la Marne, de la Mayenne, du Nord, de l'Orne, du Pas de Calais, du Puy de Dôme, du Rhône, de la Sarthe, des Deux Sèvres, de la Somme, de la Vendée, de la Vienne, de Paris, des Yvelines, de l'Ile de la Réunion et d'Espagne. Ils peuvent ou non être vaccinés contre la VHD à virus classique mais ne sont pas vaccinés contre la VHD à RHDV2 (figure 1).

**Figure 1: répartition des cas de VHD en France métropolitaine sur l'échantillon observé**



### 1.2. Méthode d'analyse

Le critère retenu pour l'étude est la présence ou l'absence de matériel génétique d'un RHDV dans un premier temps, et du RHDV2 dans un second. Pour ce faire, deux analyses en RT-PCR temps réel distinctes ont été réalisées.

Une extraction des acides nucléiques a été faite à partir de foies de lapins congelés à l'aide du QIAMP RNA Mini kit (QIAGEN).

Pour les RT-PCR « One step » (RHDV et RHDV2), des couples d'amorces et des sondes ont été utilisés afin d'amplifier respectivement des fragments de 337 et 310 pb. Des contrôles positifs et négatifs ont été inclus dans chaque série d'analyses.

Les analyses PCR ont été réalisées sur un thermocycleur temps réel CFX 96 (Biorad) et dans une enceinte dédiée à la biologie moléculaire.

Les courbes d'amplifications caractéristiques obtenues ont permis de confirmer la présence d'un virus RHDV et du variant RHDV2, dans le prélèvement de foie étudié.

Nous avons obtenu deux types de réponses : présence ou absence de RHDV (toutes souches virales confondues), et une fois notée la présence d'un RHDV, mise en évidence de la présence ou l'absence de RHDV2, caractérisant la souche virale.

## 2. Résultats

Le virus de la VHD a été détecté dans les 104 prélèvements analysés (tableau 1). Cent-un prélèvements contiennent du RHDV2 et 3 contiennent un RHDV classique. Des virus RHDV classiques sont donc encore présents mais le taux de résultats positifs est très faible (2,8%). En revanche, le RHDV2 est présent à 97,2 % dans l'échantillon analysé.

Les virus classiques ont été isolés en 2012, 2013 et 2014 à raison d'un cas par an, deux cas en France métropolitaine et un cas sur l'Ile de la Réunion où nous n'avons pas détecté de RHDV2.

En Espagne, notre technique a permis d'isoler en 2012 et 2014 du virus variant RHDV2.

**Tableau 1: Localisation et nombre de cas positifs en RHDV et/ou RHDV2 sur l'échantillon analysé. Les cas de détection d'un virus de RHDV classique sont figurés en caractères gras.**

Année	Localisation (nombre de positifs RHDV2)	Localisation (nombre de positifs RHDV)	Total des cas
2010	85 (1)	85 (1)	1
2011	27 (2), 38 (1), 44 (1), 49 (5), 50 (1), 59 (1), 61 (1), 63 (1), 69 (1), 75 (1), 79 (4), 85 (22)	27 (2), 38 (1), 44 (1), 49 (5), 50 (1), 9 (1), 61 (1), 63 (1), 69 (1), 75 (1), 79 (4), 85 (22)	41
2012	2 (1), 15 (1), 35 (1), 38 (1), 42 (1), 43 (1), 49 (6), 59 (1), 63 (1), 79 (4), 80 (1), <b>78 (0)</b> , 85 (6), 86 (2), Espagne (1)	2 (1), 15 (1), 35 (1), 38 (1), 42 (1), 43 (1), 49 (6), 59 (1), 63 (1), 79 (4), 80 (1), <b>78 (1)</b> , 85 (6), 86 (2), Espagne (1)	29
2013	14 (1), 26 (1), 49 (1), 51 (1), <b>79 (1)</b> , 85 (3)	14 (1), 26 (1), 49 (1), 51 (1), <b>79 (2)</b> , 85 (3)	9
2014	15 (1), 26 (1), 44 (1), 49 (2), 50 (1), 53 (1), 59 (2), 62 (2), 63 (1), 72 (1), 85 (6), <b>Réunion (0)</b> , Espagne (1)	15 (1), 26 (1), 44 (1), 49 (2), 50 (1), 53 (1), 59 (2), 62 (2), 63 (1), 72 (1), 85 (6), <b>Réunion (1)</b> , Espagne (1)	24

### 3. Discussion

#### 3.1. Représentativité de l'échantillon

Seuls sont analysés les foies de lapins suspectés d'être en épisode clinique de VHD. Les lapins qui auraient contracté un virus VHD classique sont protégés et ne se retrouvent pas dans notre échantillon. Il peut être dans un premier temps surprenant de voir peu de cas analysés sur 2010, année de la découverte du virus RHDV2. A cette époque, Labovet Analyses ne disposant que d'une méthode d'analyse ELISA incapable de détecter le virus variant seul, toutes nos analyses de génotypage de virus de la VHD ont été envoyées au laboratoire Anses de Ploufragan. Les nombreux prélèvements analysés ont mis en évidence sur l'année 2010 du virus classique mais aussi du virus variant RHDV2 (Boucher *et al.*, 2011b, 2012a). Ces analyses, déjà publiées, ne figurent donc pas dans notre étude.

#### 3.2. Présence variable des virus selon les circonstances

Nos résultats montrent que le RHDV2 est depuis 2010 toujours très présent dans les élevages atteints de VHD. Cependant, on ne peut pas dire que le virus classique ait totalement disparu. Notre étude met en évidence trois cas où le foie contient du matériel génétique de *calicivirus* de la VHD autre que celui du RHDV2. Nous ne pouvons donc pas conseiller, pour obtenir une protection suffisante contre les différentes formes de VHD, de préconiser la non vaccination avec un vaccin à base de virus classique. Un vaccin ou un protocole incluant les deux valences est préférable à une vaccination n'incluant que la valence classique dans la mesure où ces vaccins classiques protègent peu ou pas contre le RHDV2. Un vaccin sous Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) a été mis sur le marché en mars 2013. Dès lors, le nombre de cas de VHD à RHDV2 (que nous pouvons supposer proportionnel au nombre de cas d'élevages touchés vue la méthode d'échantillonnage) a chuté significativement. Bon nombre d'éleveurs ont vacciné et la couverture du cheptel reproducteur était globalement bonne. En 2014 cependant, le nombre de cas a augmenté, essentiellement dans les élevages où la couverture a été moins bonne et souvent sur des lapins en phase de croissance non vaccinés. Cela signe la présence du virus RHDV2 encore forte « sur le terrain ». Cette dominance a par ailleurs été confirmée au sein des populations de lapins sauvages au cours des années 2013 et 2014 (Le Gall-Reculé *et al.*, sous presse).

Nous pourrions légitimement nous dire que la forte prédominance du RHDV2 sur les populations domestiques rend la vaccination contre le RHDV classique moins utile. C'est sans doute une hypothèse louable mais, dans la mesure où le coût engendré par la vaccination anti-VHD reste économiquement abordable face au risque encouru par une forme très septicémique de la maladie, il est sans doute judicieux de continuer à vacciner avec un programme bivalent incluant les deux valences : RHDV et RHDV2.

### Conclusions

Nous pouvons conclure que la forme dominante de la VHD actuellement dans les élevages concernés par notre échantillon (essentiellement régions de forte production de lapins de chair), est la forme due au variant 2010, le RHDV2, tout comme dans la faune cunicole sauvage. Néanmoins, afin de ne pas prendre le risque de voir réapparaître une maladie presque totalement éradiquée en élevage, il est conseillé de poursuivre la vaccination avec les deux valences disponibles pour le vaccin et ce d'autant plus que le « relâchement » de la vaccination a permis une recrudescence de cas de VHD à RHDV2 en 2014.

## Références

- BOUCHER S. 1989. La VHD ou maladie hémorragique virale du lapin. *Cuniculture* n°89, 16 (5), septembre/octobre, 242-246.
- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., PLASSIART G., 2011a. maladie hémorragique virale du lapin : un nouveau variant du virus de la VHD est mis en évidence en France. *La Semaine Vétérinaire* N° 1437, fév. P 40-41.
- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., PLASSIART G., SRAKA B., 2011b. 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 201-2011. *14èmes Journées de la Recherche Cunicole, 22-23 novembre, Le Mans, France*, 143-146.
- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., LE NORMAND B., BERTAGNOLI S., GUERIN J-L., DECORS A., MARCHANDEAU S., PLASSIART G., 2012a. Nouvelle forme de maladie hémorragique virale due au virus "variant 2010". *Le Point Vétérinaire*, juillet-août 2012, 327, 30-34.
- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., LE NORMAND B., BERTAGNOLI S., GUERIN J-L., DECORS A., MARCHANDEAU S., PLASSIART G., 2012b. Aspect clinique de la maladie hémorragique virale due au virus "variant 2010". *Le Point Vétérinaire*, juillet-août 2012, 327, 35-38.
- BOUCHER S., NOUAILLE L., 2013. Maladies des lapins. France Agricole 3<sup>e</sup> éd. p 128 - 135.
- LE GALL-RECLÉ G., BOUCHER S., LE NORMAND B., PLASSIART G., PORTEJOIE Y., DECORS A., BERTAGNOLI S., MARCHANDEAU S., 2011a. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record* Feb.5, 137, 138.
- LE GALL-RECLÉ G., ZWINGELSTEIN F., BOUCHER S., LE NORMAND B., BERTAGNOLI S., GUÉRIN J-L., PORTEJOIE Y., DECORS A., MARCHANDEAU S., 2011b. Caractérisation d'un nouveau variant de virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) en France. *Compte rendus des 14èmes Journées de la Recherche Cunicole, 22-23 novembre, Le Mans, France*, 147-150.
- 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., 2013 b. 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. *15èmes Journées de la Recherche Cunicole, 19-20 novembre 2013, Le Mans, France*, 237-240.
- LE GALL-RECLÉ G., LE PENDU J., LEMAITRE E., LE MOULLAC-VAYDE B., DECORS A., BEAUTÉ V., FAURE E., MARCHANDEAU S., 2015. 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. *16èmes Journées de la Recherche Cunicole, 21-22 novembre 2015, Le Mans, France, sous presse*.
- MORISSE J-P., 1988. Le syndrome « septicémique hémorragique » chez le lapin : premières observations en France. *Point Vétérinaire* 20(117):79-83.
- PLASSIART G., GUELFY, J-F., GANIÈRE J-P., WANG,B., ANDRÉ-FONTAINE, G., WYERS, M. 1992 Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic disease. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 39, 443-453