

INNOCUITÉ ET EFFICACITÉ DE LA VACCINATION À 2 ET 3 SEMAINES D'ÂGE CONTRE LE VIRUS RHDV2 DE LA MALADIE HÉMORRAGIQUE VIRALE DU LAPIN (VHD)

Le Minor O., Joudou L., Le Moullec T., Beilvert F.
Laboratoire FILAVIE, la Corbière – 49 450 Roussay-Sèvremoine, France

Correspondant: odile.leminor@filavie.com

Résumé. Depuis le printemps 2016, une augmentation de la sévérité des cas de VHD dus au RHDV2 a été constatée, tant dans la faune sauvage qu'en élevage, avec une atteinte de très jeunes lapereaux. La vaccination des lapereaux avant le sevrage présente donc un enjeu important. Afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité d'une vaccination précoce en conditions expérimentales, des lapereaux EOPS de 2 et 3 semaines ont été vaccinés avec un vaccin VHD bivalent contenant les virus inactivés RHDV1 et RHDV2 ; d'autres lapereaux ont été conservés comme témoins. Un suivi complet (état clinique, poids, température, point d'injection) a été réalisé. Sept jours après la vaccination, tous les lapereaux ont été inoculés avec un virus d'épreuve RHDV2. La mortalité a été enregistrée pendant 14 jours ou plus. Les résultats montrent la bonne innocuité générale de la vaccination dès 14 jours d'âge. Suite aux épreuves, des taux de mortalité de 50% (7/14) et 54% (7/13) ont été enregistrés dans les groupes témoins (3 semaines et 4 semaines d'âge respectivement lors de l'épreuve), confirmant la sensibilité élevée des lapereaux EOPS au RHDV2 avant le sevrage. Aucune morbidité ou mortalité n'a été enregistrée au sein des groupes vaccinés ($p < 0.05$), démontrant la mise en place d'une protection rapide et complète.

Abstract. Safety and efficacy of vaccination against rabbit hemorrhagic disease (RHDV2) at 2 and 3 weeks of age. Since spring 2016, an increase in the severity of RHD cases due to RHDV2 has been observed, both in wildlife and livestock, with infection of very young rabbits. The vaccination of young rabbits before weaning is therefore a crucial issue. In order to evaluate the safety and efficacy of an early vaccination under experimental conditions, 2 and 3 week-old SPF rabbits were vaccinated with a bivalent RHD vaccine containing RHDV1 and RHDV2 inactivated viruses. Others rabbits were kept as control. A complete follow-up (clinic, weight, temperature, injection site) was achieved. Seven days after vaccination, all the young rabbits were challenged with a virulent RHDV2. Mortality was recorded for 14 days or more. The results showed the general safety of vaccination from 14 days of age. Mortality rate of 50% (7/14) and 54% (7/13) were recorded after challenge in the control groups (3 weeks and 4 weeks of age respectively at challenge time), confirming the high sensitivity of young SPF rabbits to RHDV2. No morbidity or mortality was observed in the vaccinated groups ($p < 0.05$), demonstrating the establishment of a full and early immunity.

Introduction

La maladie hémorragique virale du lapin (VHD), une hépatite fortement contagieuse et mortelle pour le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*), a été identifiée en France en 1988. L'agent étiologique, le RHDV (Rabbit haemorrhagic disease virus), est un virus de la famille des *Caliciviridae* appartenant au genre *Lagovirus*.

Depuis son identification dans des élevages français et la faune sauvage en 2010, le RHDV2, virus variant de la VHD (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013), a largement diffusé en Europe, ainsi qu'en Afrique du Nord, Australie et Canada. Ce nouveau génotype présente un profil antigénique éloigné des virus classiques (RHDV1) et échappe à l'immunité conférée par ces derniers (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013 ; Le Minor *et al.*, 2013). Contrairement au RHDV1, il possède une affinité pour tous les types de récepteurs exprimés chez le lapin pouvant expliquer ses fortes capacités de diffusion (Le Gall-Reculé *et al.*, 2015). En quelques années, les virus RHDV2 sont devenus très largement majoritaires au sein de la faune sauvage (Le Gall-

Reculé *et al.*, 2013 ; 2015) ainsi qu'en élevage (Boucher *et al.*, 2015). Depuis 2016, un fort taux de mortalité a été enregistré dans certaines populations de lapins de garenne associé à la présence de jeunes lapereaux morts (Boucher *et al.*, 2016). On assiste également à une augmentation de la sévérité des cas dans de nombreux élevages du grand ouest avec une atteinte des lapereaux dès 2 à 3 semaines d'âge. On estime qu'environ 20% des élevages cunicoles français ont été confrontés à un épisode de VHD au cours de la dernière année, avec un taux de mortalité pouvant atteindre 80% au sein des cheptels non vaccinés. La vaccination des lapereaux avant le sevrage représente donc un véritable enjeu.

L'objectif de cette étude est d'évaluer, en conditions expérimentales, la faisabilité d'une vaccination à 14 et 21 jours d'âge, du point de vue de l'innocuité locale et générale, ainsi que du point de vue de la protection conférée face à une épreuve virulente RHDV2.

1. Matériel et Méthode

1.1. Protocole expérimental

Six portées de 9 lapereaux de 14 jours ont été incluses dans l'étude, et réparties aléatoirement entre 4 groupes (tableau 1). La moitié des lapereaux des trois premières portées a été immédiatement vaccinée (groupe G1), et l'autre moitié a été conservée comme groupe témoin (G2). L'ensemble de ces lapereaux a été éprouvé à 21 jours d'âge (épreuve E1). Les lapereaux des trois portées restantes ont été, soit vaccinés à 21 jours d'âge (G3), soit conservés comme témoins (G4), puis éprouvés à 28 jours d'âge (E2). Le projet a été évalué par un comité d'éthique et autorisé par le M.E.N.E.S.R.

Tableau 1. Protocole expérimental.

Groupes	N	Vaccination RHDV1+RHDV2	Epreuve RHDV2
G1	13	14 jours d'âge	21 jours d'âge (E1)
G2	14	-	21 jours d'âge (E1)
G3	14	21 jours d'âge	28 jours d'âge (E2)
G4	13	placébo (eau)	28 jours d'âge (E2)

1.2. Animaux

Les lapins (néo-zélandais) sont de statut EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiés). Chaque mère est installée avec sa portée dans un isolateur équipé d'une boîte à nid, avec eau et aliment *ad libitum* (Moissons du clos, Bellané).

1.3. Vaccination

FILAVAC VHD K C+V (Filavie) est un vaccin inactivé adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium, contenant les virus RHDV1 (souche « IM507.SC ») et RHDV2 (souche « LP.SV ») isolés dans des élevages français, respectivement en 2011 et 2012.

Les lapereaux ont été inoculés avec une dose de vaccin (0,2ml) par voie sous-cutanée entre les épaules (G1 et G3). Les lapereaux n'étant pas sevrés lors de la réalisation des épreuves, les mères ont également été vaccinées 7 jours avant l'épreuve afin de ne pas en biaiser l'évaluation.

1.4-Epreuve virulente RHDV2

La souche virale « CH5801.SV » a été isolée en 2012 à partir d'un lapin malade (Vendée) puis amplifiée sur lapins EOPS. La suspension virale d'épreuve est constituée du surnageant de broyat de foies prélevés sur ces lapins infectés. L'inoculum d'épreuve a été calibré lors d'essais antérieurs sur des animaux EOPS âgés de 10 semaines ou plus. Les taux de mortalité observés pour cette même dose d'épreuve varient entre 30% et 70%, avec un pic de mortalité compris entre 2 et 4 jours post-inoculation. Cet inoculum a été injecté dans les muscles de la cuisse des lapereaux (G1 à G4).

1.5. Suivi post-vaccinal

L'ensemble des animaux a fait l'objet d'un suivi clinique quotidien, ainsi que d'un examen quotidien (visuel et palpation) du point vaccinal entre 2 à 7 jours après inoculation, puis après 2 et 3 semaines. En fin d'essai, les lésions internes macroscopiques ont également été relevées au point d'injection.

Les lapereaux ont été pesés à 21 jours d'âge (G1 à G4) ainsi qu'à 28 jours (G3 et G4).

Pour les groupes G3 et G4, la température rectale a été relevée juste avant et les quatre jours suivant la vaccination, toujours au même moment de la journée. Les animaux témoins (G4) ont été inoculés avec de l'eau ppi, afin d'induire un stress identique à l'acte vaccinal. Au niveau individuel, l'augmentation maximale de température a été définie comme la différence entre la température avant vaccination et la température maximale enregistrée après vaccination. Le suivi n'a pas été effectué sur les lapereaux de 2 semaines d'âge en raison du caractère invasif de ce relevé.

1.6. Suivi post-épreuve

Un suivi post-épreuve de 14 jours (E2) et 21 jours (E1) a été effectué. L'état clinique a été évalué quotidiennement. Les animaux ayant atteint les points limites, ainsi que les animaux survivants en fin d'essai, ont été euthanasiés éthiquement par l'injection intraveineuse de pentobarbital sodique. Une autopsie a été effectuée systématiquement afin de rechercher les lésions caractéristiques de la VHD.

1.7-Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Stata® 10.0 pour Windows®. Des tests bilatéraux ont été réalisés, avec un seuil de significativité statistique fixé de 0,05 (5%). Les poids moyens ont été comparés à l'aide du test de Student, après vérification de la normalité de la distribution et de l'homoscédasticité. Les taux de mortalité ont été comparés avec le test exact de Fisher.

2. Résultats

1.1. Evaluation de l'innocuité

1.1.1. Clinique

Aucun signe clinique n'a été observé pendant les 7 jours suivant la vaccination à 14 et 21 jours d'âge. L'ensemble des animaux est resté en bonne santé jusqu'à l'épreuve.

1.1.2. Température rectale

Les températures rectales relevées lors du suivi étaient comprises entre 38,3°C et 39,4°C dans le groupe vacciné à 21 jours d'âge (G3) et entre 38,2°C et 39,3°C dans le groupe témoin (G4). L'augmentation maximale individuelle était de +0,9°C dans les deux groupes, avec une augmentation moyenne de +0,4°C et +0,2°C, dans le groupe G3 et G4 respectivement. L'évolution de la température moyenne dans chacun des groupes est illustrée dans la figure 1.

1.1.3. Poids

Une semaine après la vaccination à 14 jours d'âge, le poids moyen des animaux vaccinés (G1) n'était pas statistiquement différent de celui des animaux non vaccinés (G2 à G4) (tableau 2). Juste avant vaccination à 21 jours d'âge, les groupes G3 et G4 présentaient des poids moyens comparables, permettant de confirmer la bonne randomisation initiale. Après 7 jours, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes (tableau 3).

1.1.4. Point d'injection vaccinal

Deux jours après la vaccination et jusqu'à la fin du suivi (3 semaines post-vaccination pour G1, 2 semaines pour G3), aucune lésion locale externe n'a pu être observée au point d'injection. En revanche, un petit

nodule (assimilable à grain de riz) était palpable sur l'ensemble des animaux. Lors de l'autopsie, un petit nodule bien délimité, de consistance ferme, adhérent au tissu sous-cutané (diamètre compris entre 2 et 5 mm) a été observé sur l'ensemble des animaux.

Figure 1. Evolution de la température rectale après vaccination dans les groupes G3 et G4.

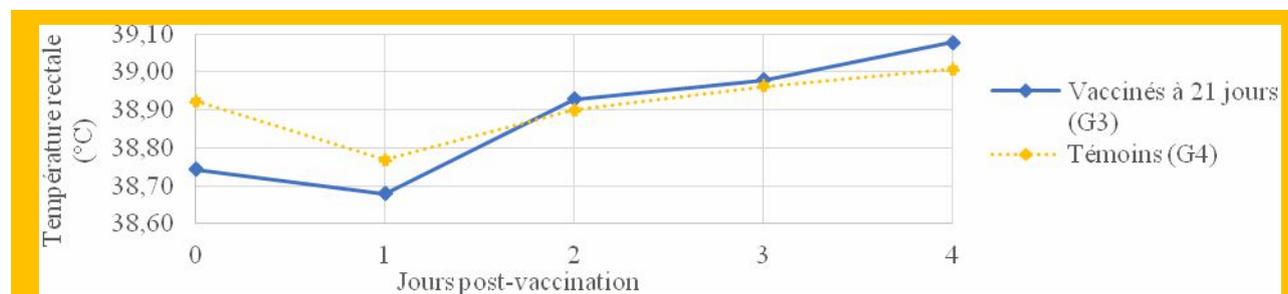


Tableau 2. Comparaison des poids moyens après une vaccination à 14 jours d'âge.

Groupe		Vacciné à 14 jours d'âge (G1)	Non vacciné (G2 à G4)	Test de student (P-value)
Effectif		13	41	
Poids à 21 jours d'âge	Moyenne (g)	319,7	292,6	0,07
	Ecart-type	11,5	7,2	

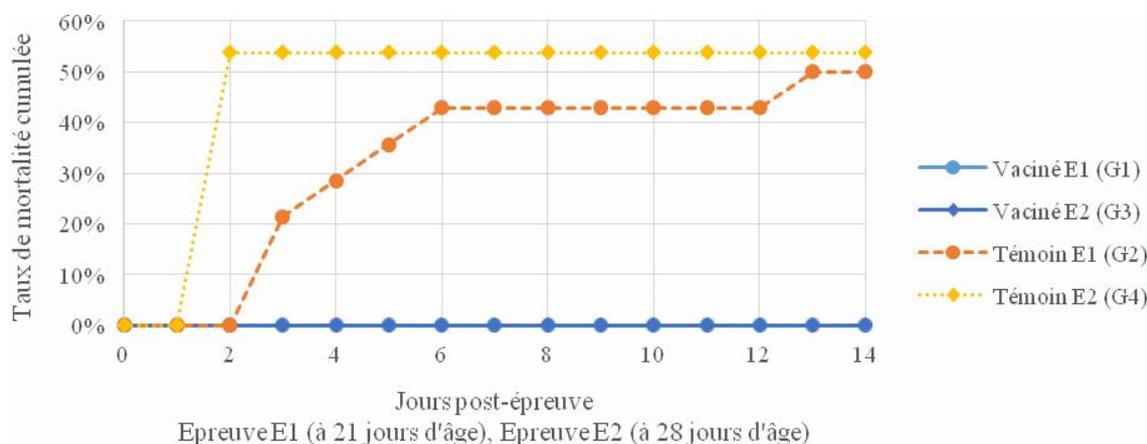
Tableau 3. Comparaison des poids moyens après une vaccination à 21 jours d'âge.

		Vacciné à 21 jours d'âge (G3)	Non vacciné (G4)	Test de student (p-value)
Effectif		14	13	
Poids à 21 jours d'âge	Moyenne (g)	293,6	279,4	0,46
	Ecart-type	12,9	10,8	
Poids à 28 jours d'âge	Moyenne (g)	457,6	432,5	0,25
	Ecart-type	13,6	16,7	

Tableau 4. Comparaison des taux de mortalité après épreuves.

Groupes	Vaccination (J0) RHDV1+RHDV2	Epreuve (J7) RHDV2	Taux de mortalité (J7-J21/J28)	Test de Fisher (p-value)
G1	14 jours	E1	0% (0/13)	0,006
G2	-	E1	50% (7/14)	
G3	21 jours	E2	0% (0/14)	0,002
G4	-	E2	54% (7/13)	

Figure 2. Evolution de la mortalité cumulée après épreuves.



1.2. Evaluation de l'efficacité de la vaccination

1.2.1. Epreuve virulente

Suite aux épreuves E1 et E2, des taux de mortalité comparables, de respectivement 50% (G2) et 54% (G4), ont été enregistrés. Lors de l'épreuve E1, à 21 jours d'âge, la mortalité était étalée jusqu'à 13 jours post-épreuve, à l'inverse elle était concentrée sur le 2^{ème} jour post-épreuve pour les animaux éprouvés à 28 jours d'âge (figure 2).

Des lésions macroscopiques caractéristiques de la VHD ont été relevées chez l'ensemble des lapereaux morts (ou euthanasiés suite à l'identification des points limites).

1.2.2. Protection clinique

Aucune altération de l'état clinique des animaux vaccinés à 14 ou 21 jours d'âge n'a été observée suite aux épreuves virulentes. De même, aucune lésion macroscopique compatible avec une infection VHD n'a été mise en évidence lors de l'autopsie en fin d'essai.

Le test de Fisher met en évidence une différence statistiquement significative entre le taux de mortalité des témoins et celui des vaccinés, après chaque épreuve (tableau 4).

2. Discussion

Le premier objectif de notre étude était d'évaluer l'efficacité d'une vaccination précoce sur des lapereaux EOPS de 14 et 21 jours d'âge face à une épreuve virulente RHDV2 réalisée 7 jours après.

La réalisation d'épreuves à 21 et 28 jours d'âge, nous a permis de confirmer la sensibilité élevée des lapereaux non sevrés en conditions expérimentales (taux de mortalité de respectivement 50% et 54%). La mortalité a été plus étalée dans le temps chez les plus jeunes, avec un mort tardif observé 13 jours post-épreuve. Ceci pourrait traduire une augmentation de la sensibilité avec l'âge, comme cela est décrit pour le RHDV1 entre 4 et 10 semaines. Néanmoins, même si elles restent rares, des formes plus chroniques évoluant sur une dizaine de jours ont déjà été décrites lors d'essais sur des animaux plus âgés (Le Minor *et al.*, 2013). Les lapereaux vaccinés n'ont présenté aucun signe clinique suite aux épreuves, et l'autopsie n'a pas mis en évidence de lésions en fin d'essai. Cet essai permet de démontrer que, dès 14 jours d'âge, la vaccination permet d'induire une protection complète. La mise en place de cette immunité est rapide (7 jours étudiés dans cet essai, mais peut-être inférieure). Cependant, l'impact des anticorps d'origine maternelle sur cette vaccination avant le sevrage n'a pu être étudié puisque l'essai a été réalisé sur des lapereaux EOPS dépourvus d'anticorps dirigés contre les virus de la VHD. Des essais sur animaux conventionnels sont nécessaires pour évaluer l'interférence des anticorps en fonction du niveau transmis par la mère.

Le second objectif de cette étude était de recueillir des données sur l'innocuité de cette vaccination au jeune âge.

L'absence de signe clinique dans la semaine suivant la vaccination à 14 et 21 jours d'âge, ainsi que la croissance pondérale satisfaisante des animaux montrent la bonne tolérance générale d'une vaccination précoce. Ceci est confirmé par le suivi de la température rectale, effectué après une vaccination à 21 jours d'âge. En effet les résultats ont mis en évidence une augmentation individuelle maximale de +0,9°C, identique à celle du groupe témoin, et inférieure à la limite de +2°C fixée par la Pharmacopée Européenne (Phar. Eur., 2017). De même l'augmentation moyenne est restée faible (0,4°C < 1,5°C Phar. Eur.). Comme lors d'une vaccination à 4 semaines, des nodules sous-cutanés discrets (2 à 5 mm) sont visibles un mois après la vaccination. Ces observations sont habituelles après l'injection d'un vaccin adjuvé en hydroxyde d'aluminium, et comme démontrée, reste sans impact sur l'état général.

Conclusion

L'apparition fréquente de cas de VHD à RHDV2 sur des lapereaux dès leurs premières semaines de vie soulève la question d'une vaccination précoce avant le sevrage. Notre étude montre qu'en conditions expérimentales une protection rapide et complète est obtenue dès 14 jours d'âge, avec une bonne innocuité générale.

Remerciements

A Margaret Sourice et Rémi Mellet pour leur importante contribution à cette étude.

Références

- Boucher S., Le Gall-Reculé G., Le Minor O., 2016. Questions d'actualité sur la VHD à virus variant RHDV2. *Journée nationale sur l'élevage du lapin de chair*, 16 Nov. 2016, Pacé, France.
- Boucher S., Rubeaux D., Le Gall-Reculé G., Rigaudeau A., 2015. 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. *Compte-rendu des 16^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole*, 24-25 nov. 2015, Le Mans, France; 25-28.
- Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guerin J.L., 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.
- Le Gall-Reculé G., Le Pendu J., Lemaitre E., Le Moullac-Vaidye B., Decors A., Beauté V., Faure E., Marchandeu 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. *Compte-rendu des 16^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole*, 24-25 nov. 2015, Le Mans, France. 21-24.
- Le Minor O., Beilvert F., Le Moullac T., Mellet R., Djadour D., Martineau J., 2013. Evaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin contre le virus variant de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD). *Compte-rendu des 15^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole*, 19-20 nov. 2013, Le Mans, France. 241-244.
- PHARMACOPEE EUROPEENNE. Monographie 2325 : Vaccin inactivé de la maladie hémorragique du lapin. 01/2017. Version 9.0.