

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p.5
<u>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA VHD</u>	
I. <u>Généralités sur la VHD</u>	p.9
1. Historique et répartition géographique	p.9
2. Synonymie	p.10
II. <u>Virologie</u>	p.10
1. Généralités sur les <i>Caliciviridae</i>	p.10
2. Propriétés du virus	p.11
a. <u>Morphologie</u>	p.12
b. <u>Organisation génomique</u>	p.12
c. <u>Protéines</u>	p.14
d. <u>Propriétés physico-chimiques</u>	p.15
e. <u>Propriétés hémagglutinantes</u>	p.16
3. Caractères cultureaux	p.18
4. Pouvoir antigénique et immunogène	p.19
5. Comparaison avec l'EBHSV	p.20
III. <u>Tableau clinique</u>	p.21
1. Symptômes	p.21
2. Perturbation des paramètres sanguins	p.22
a. <u>Modifications biochimiques</u>	p.22
b. <u>Modifications hématologiques</u>	p.22
3. Lésions	p.22
a. <u>Macroscopiques</u>	p.22
b. <u>Microscopiques</u>	p.23
IV. <u>Pathogénie</u>	p.24
1. Voie d'entrée et dissémination du virus	p.24
2. Cellules cibles	p.25
3. Pathogénie de la nécrose hépatique et la CIVD	p.25
4. Survenue de la mort	p.27
V. <u>Epidémiologie</u>	p.27
1. Population atteinte	p.27
a. <u>Espèce cible</u>	p.27
b. <u>Réceptivité – sensibilité</u>	p.28

2. Répartition et évolution dans le temps et dans l'espace	p.29
3. Sources virales	p.30
4. Transmission	p.30
VI. <u>Diagnostic</u>	p.32
1. Diagnostic de terrain	p.32
2. Diagnostic de laboratoire	p.33
a. <u>Mise en évidence de l'agent</u>	p.33
b. <u>Analyses sérologiques</u>	p.36
VI. <u>Lutte contre la maladie</u>	p.37
1. Prophylaxie sanitaire	p.37
a. <u>Prophylaxie sanitaire défensive</u>	p.37
b. <u>Prophylaxie sanitaire offensive</u>	p.38
2. Prophylaxie médicale	p.38
a. <u>Nature et obtention du vaccin</u>	p.39
b. <u>Utilisation du vaccin</u>	p.39

DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CALICIVIRUS APPARENTES AU RHDV

I. <u>Preuves de l'existence de tels virus</u>	p.43
II. <u>Caractéristiques des calicivirus apparentés au RHDV</u>	p.44
1. Pouvoir pathogène	p.44
2. Propriétés antigéniques	p.45
3. Propriétés immunogènes	p.46
4. Séquences nucléotidiques et protidiques	p.47
5. Organisation génomique	p.48
III. <u>Epidémiologie des calicivirus apparentés aux RHDV</u>	p.48
IV. <u>Origine probable du RHDV</u>	p.50

TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I. <u>Matériels et méthodes</u>	p.55
1. Réalisation des prélèvements qui seront analysés en laboratoire	p.56
a. <u>Réalisation des prélèvements sanguins</u>	p.56

b. <u>Réalisation des prélèvements d'organes</u>	p.56
2. Etudes sérologiques par ELISA	p.57
a. <u>Principe de l'ELISA</u>	p.57
b. <u>Réalisation pratique</u>	p.58
3. Recherche du virus par RT-PCR	p.59
a. <u>Extraction d'ARN</u>	p.59
b. <u>Réalisation de la RT</u>	p.62
c. <u>Réalisation des PCR nichées et semi-nichées</u>	p.63
4. Séquençage du gène de la VP60	p.65
a. <u>Obtention des amplicons</u>	p.65
b. <u>Séquençage des amplicons</u>	p.66
c. <u>Analyse des séquences</u>	p.67
II. Résultats	p.67
1. Résultats sérologiques	p.67
2. Résultat de la recherche de virus	p.69
a. <u>Résultats de la recherche de virus sur les organes</u>	p.69
b. <u>Résultats de la recherche de virus dans le sérum</u>	p.71
3. Résultats de séquençage des amplicons	p.72
a. <u>Séquences</u>	p.72
b. <u>Analyse des séquences</u>	p.74
III. Discussion	p.77
CONCLUSION	p.81
TABLE DES ILLUSTRATIONS	p.83
TABLE DES ABRÉVIATIONS	p.85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.87

INTRODUCTION

La maladie hémorragique du lapin est une maladie infectieuse aiguë et souvent mortelle qui touche les lapins sauvages et domestiques de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Elle a été décrite pour la première fois en Chine en 1984 puis signalée en France dès 1988 ; désormais, elle cause des pertes importantes dans le monde entier. La maladie entraîne de forts taux de mortalité chez les adultes et les jeunes de plus de deux mois, généralement dans les 72 heures suivant l'infection, le tableau clinique étant dominé par une hépatite nécrosante et un syndrome hémorragique (Marcato *et al*, 1991), (Mitro and Krauss, 1993).

L'agent responsable a été identifié, il s'agit du RHDV, un petit virus à ARN non enveloppé appartenant à la famille des *Caliciviridae* (Parra and Prieto, 1990), (Ohlinger *et al*, 1993). La capsid virale est constituée d'une protéine structurale majeure : la VP60 agencée selon une symétrie icosaédrique ; elle renferme des ARN monocaténaires de polarité positive de 7,5 ou 2,2 kb (Clarke and Lambden 1997).

Les populations de lapin de garenne ont fortement régressé depuis le début des années 1980, la maladie hémorragique du lapin (VHD) ainsi que la myxomatose étant en partie responsables de ce déclin, en interaction avec la structure spatiale des populations. Cependant, plusieurs études sérologiques ont récemment mis en évidence l'existence de virus apparentés au RHDV de pathogénicité plus faible, voire nulle dans les populations de lapins de garenne. Leur pouvoir protecteur vis à vis du RHDV, ainsi que leur rôle dans l'épidémiologie de la VHD sont actuellement discutés (Marchandeau *et al*, 1998; Mutze *et al*, 1998; O'Keefe *et al*, 1999; Cooke *et al*, 2002; Robinson *et al*, 2002; Marchandeau *et al*, 2005).

Aucun de ces virus n'ayant été isolés à ce jour dans les populations de lapins sauvages, nous nous proposons par la présente étude, d'isoler une souche non pathogène du RHDV afin de la comparer aux souches virales connues. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des lapins sentinelles séronégatifs, d'évaluer leur statut sérologique au cours du temps par ELISA et de réaliser une recherche de virus par RT-PCR sur les animaux séroconvertis. La RT-PCR est réalisée sur les ARN totaux extraits à partir de plusieurs organes (foie, rate, intestin) et de sérum en utilisant des amorces spécifiques du gène de la VP 60.

Avant d'exposer en détail nos travaux, il convient de faire une mise au point bibliographique sur la VHD ainsi que sur les calicivirus apparentés au RHDV. Ces rappels feront l'objet des deux premières parties, alors que notre expérimentation sera exposée dans une troisième partie.

PREMIERE PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA VHD

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA VHD

I. Généralités sur la VHD

1. Historique et répartition géographique

La VHD est apparue au printemps 1984 en République Populaire de Chine sur des lapins angora importés d'Allemagne de l'ouest ; en 1985, la Corée a rapporté les premiers cas. Après avoir causé de grandes pertes, la maladie s'est rapidement répandue en Europe et aux Etats Unis. En Europe, elle a d'abord touché l'Italie en 1986 puis l'année suivante les pays de l'est (Tchécoslovaquie, Pologne, ex-URSS). En 1988, l'Espagne et la France ont été atteintes et la maladie s'est étendue à toute l'Europe (Hongrie, Allemagne, Danemark, Suisse, Belgique, Luxembourg, Portugal, Autriche, Angleterre en 1992). Elle a également touché l'Afrique (Tunisie et Egypte en 1989), le proche Orient (Israël) ainsi que le continent américain (Mexique, USA en 1988/89) (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993). Désormais, elle cause des pertes importantes dans les élevages et les populations sauvages du monde entier.

Les premières formes cliniques de VHD sont apparues en Chine mais un doute subsiste sur l'origine asiatique du virus. En effet, l'analyse de sérum collectés en Tchécoslovaquie 12 ans avant la première épidémie a révélé la présence d'anticorps spécifiques ce qui prouverait la présence du virus dès cette époque en Europe (Rodak *et al*, 1990), (Moussa *et al*, 1992), (Mitro and Krauss, 1993). La détection d'anticorps spécifiques dans le sérum de lapins sains provenant de zones indemnes de maladie souligne la possibilité d'une infection inapparente ou de l'existence de virus non pathogènes. Ceci sera décrit plus précisément dans la 2^{ème} partie.

Il est difficile d'évaluer l'extension de cette maladie qui touche préférentiellement les élevages fermiers. De même, il est pratiquement impossible d'évaluer l'incidence du problème dans les populations sauvages de lapins de garenne. Néanmoins, aucun continent n'a été épargné, ceci à la faveur des échanges commerciaux internationaux. Dans la plupart des pays, cette maladie est vécue comme un fléau et les recherches sont concentrées dans le

but de minimiser les effets du virus sur les populations sauvages et domestiques de lapins. En Australie et en Nouvelle Zélande, la situation est tout à fait différente car les lapins européens qui ont été introduits sont une des principales espèces de nuisibles. Les recherches visent à maximiser les effets du virus sur les lapins sauvages et dans ces pays, il est utilisé comme agent de contrôle biologique (Forrester *et al*, 2003), (Henning *et al*, 2005).

2. **Synonymie**

Durant les premières années, cette maladie a pris des noms divers selon les pays dans lesquels elle apparaissait. Ainsi, en Chine elle a reçu le nom de pneumonie hémorragique virale ou fièvre hémorragique virale ; en Corée, mort virale subite du lapin et en Italie, maladie X. D'autres appellations sont également retrouvées dans la littérature telles que : septicémie hémorragique, peste du lapin, hépatite nécrosante infectieuse, rabbit haemorrhagic disease... (Mitro and Krauss, 1993).

C'est en 1989 qu'elle est nommée officiellement Viral Haemorrhagic Disease (VHD) par l'office international des épizooties, soit en Français maladie hémorragique du lapin.

II. Virologie

D'abord classé parmi les *Parvoviridae* ou les *Picornaviridae*, le virus de la maladie hémorragique du lapin a finalement été identifié comme appartenant à la famille des *Caliciviridae* en 1990 (Ohlinger *et al*, 1990), (Parra and Prieto, 1990).

1. Généralités sur les *Caliciviridae*.

Les plus anciens membres de la famille des *Caliciviridae* sont le VESV (Vesicular Exanthema of Swine Virus) responsable d'exanthèmes vésiculaires chez les porcs de 1932 à 1959 aux Etats Unis, le FCV (Feline Calicivirus) identifié dès 1957, cause majeure des maladies respiratoires et des stomatites aigues du chat, et le SMSV (San Miguel Sea lion Virus) isolé en 1972 à partir de prélèvement rectal sur une otarie en Californie (Clarke and Lambden, 1997).

Cette famille est divisée en 4 genres (Fauquet *et al*, 2005) :

- le genre *Vesivirus* : auquel appartiennent les 3 virus nommés plus haut (VESV, FCV, SMSV) et plusieurs autres tels que le BCV (Bovine Calicivirus) responsable de maladies respiratoires chez les bovins ou le PCV (Primate Calicivirus) responsable de maladie vésiculaire chez les primates.

- le genre *Lagovirus*, qui nous intéresse plus particulièrement puisqu'il regroupe le RHDV (Rabbit Haemorrhagic Disease Virus) et l'EBHSV (European Brown Hare Syndrome Virus) qui atteint le lièvre.

- le genre *Norovirus* et le genre *Sapovirus* regroupent des calicivirus humains responsables de gastro-entérites (exemple : Norwalk virus du genre *Norovirus* et Sapporo virus du genre *Sapovirus*). Les symptômes sont les suivants : vomissements, nausées, diarrhées, douleurs abdominales, fièvre.

- Certains virus de cette famille ne sont pas assignés tels que le CaCV (Canine Calicivirus) et le BEC-NB (Bovine Enteric Calicivirus strain NB).

Les calicivirus doivent leur nom aux dépressions en forme de calices observées à leur surface en microscopie électronique. Il s'agit de virus approximativement sphériques, de symétrie icosaédrique et de 30 à 40 nm de diamètre.

Tous les membres de cette famille répondent à certaines caractéristiques (Clarke and Lambden, 1997) :

- Leur génome est constitué d'un ARN simple brin de 7,5 kb, de polarité positive et polyadénylé en 3' avec un arrangement caractéristique d'ORF (Open Reading Frame).

- Une polyprotéine non structurale précède en 5' la protéine structurale majeure de masse moléculaire comprise entre 58 et 76 kDa.

- Une petite ORF localisée à l'extrémité 3' du génome code une protéine basique dont le rôle précis est encore inconnu même si elle jouerait un rôle dans l'encapsidation du génome viral (Wirblich *et al*, 1996).

- Ils présentent une petite protéine (10-15 kDa) liée de façon covalente à l'extrémité 5' du génome, la VPg (Viral Protein linked to the genome), qui jouerait un rôle dans l'initiation de la traduction et pourrait servir d'amorce à la polymérase pendant l'initiation de la synthèse d'ARN (Wirblich *et al*, 1996).

2. Propriétés du RHDV

Le virus a été purifié et caractérisé à partir de foies de lapins morts de la VHD.

a. Morphologie

L'observation en microscopie électronique révèle que les virions sont approximativement sphériques, de petite taille (32-35 nm de diamètre), dépourvus d'enveloppe et de symétrie icosaédrique (voir illustration 1). Plus précisément, la capsidé est un icosaèdre formé de 180 molécules de la protéine structurale majeure organisées en 90 dimères (Fauquet *et al*, 2005). La surface des virions purifiés montre des dépressions en forme de calice régulièrement arrangées (Ohlinger *et al*, 1990), (Parra and Prieto, 1990), on en retrouve 32 sur les axes 3 et 5 (Fauquet *et al*, 2005).

Sur un échantillon, la majorité des particules mesure 32-35 nm de diamètre, on peut voir un noyau dense de 23-25 nm de diamètre à partir duquel radient 10 projections périphériques courtes régulièrement distribuées. Des particules lisses (s-RHDV, pour smooth) sont également reconnaissables (en particulier lors de formes subaiguës ou chroniques de VHD). Elles correspondent à des formes virales dégradées qui ont perdu leurs portions externes ; elles sont plus petites et de forme hexagonale (Lavazza and Capucci, 2004).

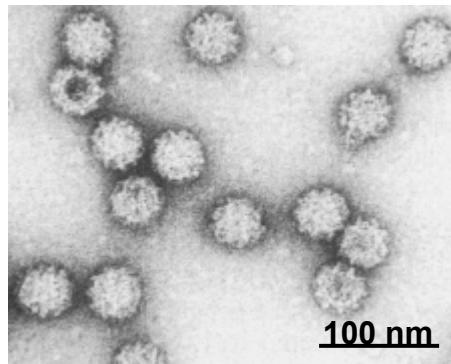


Illustration 1 : Microscopie électronique de virions de RHDV purifiés, après coloration négative (d'après Ohlinger et al, 1990).

b. Organisation génomique (Moussa *et al*, 1992) (Clarke and Lambden, 1997)

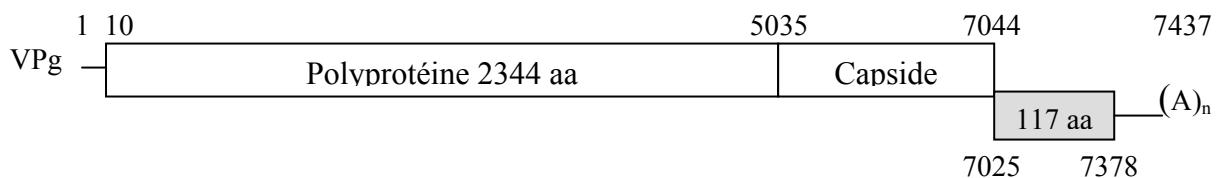
Les virions de RHDV isolés de foies de lapins contaminés puis purifiés contiennent 2 types d'ARN : un de 7,5 kb correspondant à l'ARN génomique et un de 2,2 kb correspondant

à l'ARN subgénomique, présent en majorité (Ohlinger *et al*, 1990), (Meyers *et al*, 1991), (Meyers *et al*, 1991b), (Clarke and Lambden, 1997).

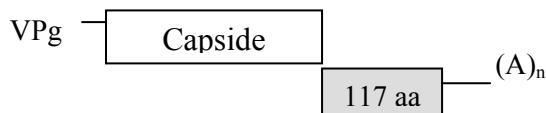
La totalité du génome d'une souche allemande a été séquencée (Meyers *et al*, 1991b) et comparée à plusieurs autres souches provenant de différents pays et ayant atteint des lapins sauvages ou domestiques. Il apparaît que l'ensemble des souches présente un haut degré de conservation, les séquences nucléotidiques sont homologues à 96%, ce qui correspond à 98% d'identité au niveau de la séquence en acides aminés. Il n'a pas été identifié de régions hypervariables, que ce soit dans les protéines structurales ou non structurales (Rasschaert *et al*, 1995).

L'ARN génomique est composé de 7437 nucléotides et contient 2 ORF, ce qui le distingue, ainsi que l'EBHSV, des autres calicivirus, qui en contiennent 3. En effet, l'ORF codant pour les protéines non structurales est fusionnée à celle de la capsidé créant ainsi une séquence codante pour une polyprotéine géante qui occupe 94% du génome viral. L'ORF 1 s'étend du nucléotide 10 au 7044 et code pour une polyprotéine de 2344 acides aminés (257 kDa). L'ORF 2 débute au nucléotide 7025, elle chevauche l'extrémité 3' de l'ORF 1 sur 17 nucléotides et code pour une protéine de 117 acides aminés (12kDa) (Meyers *et al*, 1991b), (Clarke and Lambden, 1997) (voir figure 1).

ARN génomique :



ARN subgénomique :



aa : acide aminé

(A)_n : queue polyadénylée

□ ORF1 □ ORF2

Figure 1 : Organisation génomique du RHDV (d'après Clarke and Lambden, 1997).

L'ARN subgénomique code pour la majorité des protéines de capsid. Son extrémité 5' correspond à la position 5296 de la séquence génomique ; à l'exception de 2 différences, les 16 premiers nucléotides sont identiques. La séquence nucléotidique de l'extrémité 3' est quant à elle identique à celle de l'ARN génomique (Meyers *et al*, 1991).

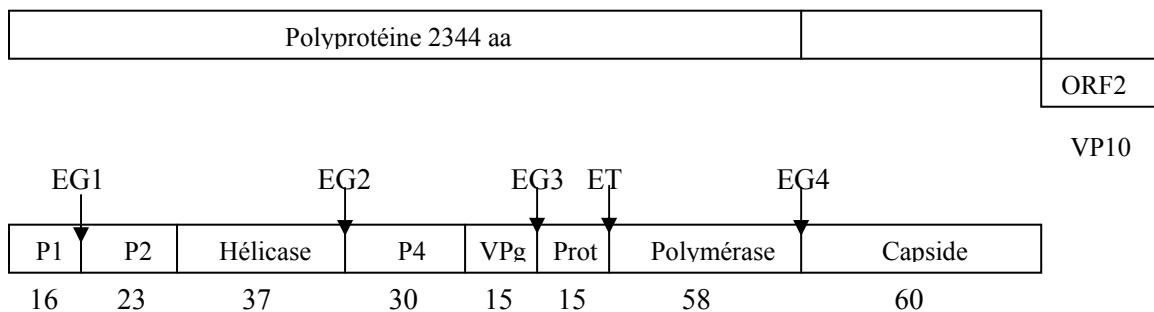
Les 2 ARN sont de polarité positive, polyadénylés en 3' et liés de manière covalente à une petite protéine : la VPg (10-15 kDa). En ce qui concerne l'ARN génomique, cette interaction a lieu avant le 179^{ème} nucléotide (Meyers *et al*, 1991). Ils contiennent tous deux des séquences répétitives à l'extrémité 5' qui auraient un rôle dans l'encapsidation, la réplication ou la transcription.

c. Protéines

Grâce à des anticorps spécifiques, deux protéines structurales ont été identifiées : une protéine de capsid majeure d'un poids moléculaire de 60 kDa, la VP60 ainsi qu'une de taille inférieure à 10 kDa qui correspond à un composant mineur des virions (Ohlinger *et al*, 1990), (Parra and Prieto, 1990), (Wirblich *et al*, 1996). Cette petite protéine, nommée VP10 est codée par l'ORF2 de l'ARN subgénomique (Clarke and Lambden, 1997).

L'ORF 1 du RHDV code pour une polyprotéine au sein de laquelle ont été identifiées 7 protéines non structurales ainsi que la protéine de capsid. L'ordre des gènes de l'ORF1 est le suivant (voir figure 2) : NH₂-p16-p23-hélicase-p30-VPg-protéase-polymérase-capsid-COOH (Wirblich *et al*, 1996), (Clarke and Lambden, 1997).

La maturation de cette polyprotéine se déroule selon une cascade enzymatique auto-catalytique impliquant la protéase 3C-like. Il s'agit d'une protéase trypsine-like à cystéine dont la triade catalytique est définie par l'His-1135, Asp-1152 et la Cys-1212 qui représente le site nucléophile (Bonatti *et al*, 1994), (Martin Alonso *et al*, 1996), (Joubert *et al*, 2000).



EG : site de clivage entre acide glutamique et glycine

ET : site de clivage entre acide glutamique et thréonine

Prot = Protéase

Figure 2 : Représentation schématique du processus de maturation de la polyprotéine du RHDV (d'après Clarke and Lambden, 1997, et Joubert *et al*, 2000).

Le nom des protéines correspond à leur fonction lorsqu'elle est déterminée. Leur poids moléculaire est indiqué en dessous (unité : kDa). Les flèches verticales indiquent les sites de clivage connus, EG1 correspond à la position 143-144, EG2 : 718-719, EG3 : 1108-1109, ET : 1251-1252, EG4 : 1767-1768.

d. Propriétés physico-chimiques :

Les particules virales obtenues après purification ont une densité en gradient de chlorure de césium de 1,32 à 1,34 g/cm³, la centrifugation sur gradient de densité dans le sucre montre 3 bandes différentes de 175, 136 et 100 S, correspondant à des particules ayant perdu ou non leur ARN ou obtenues à des pH différents. Les particules de 175 S montrent le plus haut degré d'homogénéité (Ohlinger *et al*, 1990). Les particules virales ont un maximum d'absorption UV à 260 nm et ont un rapport A₂₆₀/A₂₈₀ égal à 1,44 ce qui indique la présence d'ARN (Parra and Prieto 1990).

Le RHDV est un virus très résistant dans le milieu extérieur ce qui influence l'épidémiologie de la maladie. Il reste très stable face aux écarts de température et il résiste bien à la dessiccation. De nombreux résultats illustrant cette résistance ont été obtenus en laboratoire. Par exemple le virus reste infectant dans une suspension d'organe laissée 225 jours à 4°C, au moins 105 jours à température ambiante et 2 jours à 60°C sur du coton (Mitro and Krauss 1993). De même, des foies de lapins infectés laissés à -5°C pendant 413 jours, à -20°C pendant 560 jours ou -70°C pendant 5 ans après lyophilisation sont toujours aussi infectants (Xu, 1991). Le RHDV est insensible au chloroforme, à l'éther et il résiste à pH 3 (Mitro and Krauss, 1993). Il est par contre inactivé par l'eau de javel, la soude et les phénols

aux concentrations usuelles (Xu, 1991). Le virus est également inactivé par le formaldéhyde et la beta-propionolactone sans perte d'immunogénicité ce qui est mis à profit pour la fabrication de vaccins à virus inactivés (Lavazza and Capucci, 2004). La désinfection du matériel et des installations d'élevage (cages, sol, murs) peut être réalisée avec les désinfectants efficaces ; il est préférable de l'associer à un vide sanitaire (Xu, 1991).

Dans des conditions naturelles, la survie du virus est influencée par le temps d'exposition aux UV et aux variations de température et d'humidité mais aussi par la nature de la source virale. Lors d'une étude réalisée en Angleterre, des os de lapins morts de VHD ont été exposés aux conditions naturelles et l'ARN viral a été recherché par RT-PCR à partir de la moelle osseuse. Les résultats ont révélé que le RHDV survit pendant de longues périodes (au moins 2 mois) dans l'environnement, dans les os de lapins ce qui augmente les occasions que le virus soit dispersé par les animaux charognards (Moss *et al*, 2002). Une autre étude, menée en Nouvelle Zélande au cours de l'automne 2000 a déterminé la persistance du virus dans l'environnement à partir de 2 types d'échantillons : du coton imbibé de virus (mimant le virus sécrété dans l'environnement par les lapins infectés) et du foie de bovin préalablement contaminé (mimant les carcasses de lapins morts de VHD). Les résultats indiquent que les virus présents dans les carcasses de lapins sont infectieux pendant au moins 3 mois alors que ceux sécrétés par les lapins infectés restent infectieux moins de 1 mois (Henning *et al*, 2005). Les valeurs obtenues ici peuvent varier en fonction des régions et des saisons, ce qui peut avoir une influence sur l'épidémiologie de la maladie, mais quoi qu'il en soit, la persistance du virus dans les carcasses de lapins est longue et ces dernières représentent un réel réservoir viral.

e. Propriétés hémagglutinantes

Le RHDV est capable d'agglutiner les érythrocytes humains. Cette propriété est connue depuis longtemps et a été utilisée très tôt pour le diagnostic de laboratoire puisque le premier test utilisé a été l'hémagglutination (Capucci *et al*, 1991).

Cette agglutination a lieu quel que soit le groupe sanguin (A,B,O) de l'individu en présence de particules virales (Ruvonen-Clouet *et al*, 1995), (Ruvonen-Clouet *et al*, 2000) mais également de VLPs (Virus like particules, obtenues en système baculovirus recombinant) (Ruvonen-Clouet *et al*, 2000). Par contre les cellules provenant du cordon ombilical ou de fœtus ne sont pas agglutinées. Le virus n'agglutine pas non plus les érythrocytes d'autres

animaux (lapins en particulier) excepté ceux des moutons, et ce à faible titre (Ruvoen-Clouet *et al*, 1995).

Le pH optimum pour la réaction d'hémagglutination est de 6 à 7,2. On ne note pas de différence significative concernant les titres pour des températures allant de 4 à 37°C durant 20 minutes à 2 heures. La réaction est stable après un traitement du virus à l'éther, au chloroforme ou au formaldéhyde ou après un chauffage du virus à 50°C pendant 60 minutes ou 56°C pendant 15 min. De même, le stockage au froid des organes, même durant de longues périodes, ne diminue pas les titres. Par contre, des congélations/décongélations répétées sont délétères, de même que le traitement des virus à la chloramine T ou la trypsine (Capucci *et al*, 1991), (Xu, 1991), (Gelmetti *et al*, 1998).

Le traitement des érythrocytes par l'éther ou le chloroforme inhibe l'hémagglutination ce qui est en faveur de la nature lipidique du récepteur. Des études réalisées dans le but d'identifier le récepteur viral présent sur les érythrocytes humains, ont conclu qu'il s'agirait d'un antigène porté par un glycolipide membranaire (Ruvoen-Clouet *et al*, 1995).

Le fait que les érythrocytes d'individus de phénotype Bombay, qui sont dépourvus d'antigènes ABH, ne soient pas agglutinés par le virus a fait suspecter ces antigènes comme récepteur viral sur les hématies. Cette hypothèse est en accord avec les observations précédentes car les cellules de cordon ombilical présentent beaucoup moins de ces antigènes comparé aux cellules adultes. Plus précisément, il semblerait que le virus et les VLPs reconnaissent l'antigène A ou H de type 2 (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000).

L'expression de ces antigènes n'est pas restreinte aux érythrocytes, ils sont également présents dans différents tissus. Il a été montré que le virus et les VLPs pouvaient se lier (comme dans la réaction d'hémagglutination) aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif de lapins adultes qui expriment ces antigènes. Par contre cette liaison est fortement diminuée voire absente chez les jeunes lapins qui, en parallèle, n'expriment pas (à 8 semaines) ou peu (de 8 à 12 semaines) d'antigène A et H de type 2. Ceci corrélé à la faible infectiosité du RHDV chez les jeunes lapins laisse supposer que les antigènes A et H puissent participer au processus d'infection, ces cellules étant les premières rencontrées par le virus (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000).

3. Caractères culturaux

La multiplication du RHDV en culture cellulaire n'est toujours pas réalisable à l'heure actuelle. De nombreux types cellulaires ont pourtant été testés : des cellules de lapin (rein, foie, poumon) mais aussi de nombreuses lignées cellulaires (RK, PK-15, BHK-21, MA-104, IBRS-2, HeLa, Vero...). Des premiers résultats avaient été obtenus en Chine sur des cellules de type épithéial provenant de rein de lapin nommées DJRK (pour Du and Ji Rabbit Kidney) mais ils n'ont pas été confirmés par la suite ; ils concernaient vraisemblablement un parvovirus et non le RHDV (Ji *et al*, 1991). Les méthodes d'inoculation ont également été modifiées mais sans succès ; de même, les essais de culture sur œufs embryonnés de poulet sont restés infructueux (Xu, 1991), (Mitro and Krauss, 1993).

Pour obtenir du virus, la maladie doit être reproduite chez le lapin. Pour cela, des lapins sains sont inoculés avec des broyats d'organes de lapins infectés. On observe généralement la mort des lapins inoculés dans les 48 à 72 h. Plusieurs voies d'administration peuvent être utilisées : voie intramusculaire, intraveineuse, intranasale, intrapéritonéale, orale ou sous cutanée (Mitro and Krauss, 1993), (Ohlinger *et al*, 1993).

S'il manque un système de culture cellulaire approprié pour le RHDV, il est toutefois possible de réaliser la traduction de l'ARN viral de plusieurs manières : *in vitro*, en système bactérien ou dans des cellules infectées (par exemple des hépatocytes de lapin (Konig *et al*, 1998), des cellules RK13 (Joubert *et al*, 2000)). L'expression des protéines virales grâce à ces systèmes a permis de comprendre l'organisation génomique de ce virus, la nature des protéines produites ainsi que leur mode de maturation (Meyers *et al*, 1991), (Martin Alonso *et al*, 1996), (Konig *et al*, 1998), (Joubert *et al*, 2000). Récemment, le premier clone infectieux de RHDV a été construit (Liu *et al*, 2006). Les ARN transcrits à partir de ce clone ADNc se sont effectivement révélés infectieux après injection directe à des lapins. De même, la transfection de cellules RK13 par ces ARN conduit à une synthèse de protéines virales, ce qui indique que le clone est capable de se répliquer. Cette nouvelle découverte représente donc un système d'infection *in vitro* de RHDV efficace, qui semble prometteur pour les recherches à venir, concernant en particulier l'étude de la réplication ou de la pathogénie virales (Liu *et al*, 2006).

Une expression de la protéine de capsid du RHDV a été réalisée en système baculovirus recombinant, cette technique s'étant avérée efficace pour d'autres calicivirus non cultivables, comme le Norwalk virus (Clarke and Lambden, 1997). Pour cela, des cellules d'insectes sont infectées par un baculovirus recombinant dans lequel a été inséré le gène de la protéine de capsid (VP60). La protéine recombinante est alors retrouvée dans le surnageant, elle s'auto assemble pour former des VLPs vides qui sont identiques en taille, en forme et en antigénicité au virus natif (Laurent *et al*, 1994), (Nagesha *et al*, 1995). Ce mode de production est intéressant car il permet la production de grandes quantités de protéines virales utiles pour l'étude de leur structure, assemblage, fonction mais aussi leur interaction spécifique avec les cellules cibles.

4. Pouvoir antigénique et immunogène

Le RHDV entraîne la formation d'anticorps spécifiques chez les lapins ayant survécu à l'infection et chez les jeunes lapins ayant été en contact avec le virus. Ces anticorps sont détectables 5 jours post infection, leur titre atteint un plateau au bout d'une semaine et se maintient pendant plus de 8 mois (Ohlinger *et al*, 1993). Les anticorps induits par le RHDV sont protecteurs et il a également été montré qu'il s'établissait une immunité transmissible au jeune par l'intermédiaire d'anticorps colostraux efficaces sur une période d'au moins 50 jours (Mitro and Krauss, 1993).

L'injection parentérale de VP60 purifiée entraîne une protection contre la VHD, ceci implique qu'une séroconversion contre la VP60 est corrélée à une immunité acquise contre la VHD et donc que les anticorps anti-VP60 sont protecteurs (Parra and Prieto, 1990). Plus précisément, les études réalisées avec de nombreux anticorps monoclonaux ont montré qu'ils étaient dirigés contre des épitopes externes localisés à la surface des particules virales et correspondant aux régions C-terminales de la VP60. Les épitopes viraux neutralisants sont donc exprimés en surface des particules virales alors que les épitopes non neutralisants sont enfouis dans les domaines plus internes (Moussa *et al*, 1992), (Ohlinger *et al*, 1993), (Laurent *et al*, 1997).

En 1997, un variant antigénique du RHDV nommé RHDVa a été identifié en Italie (Cappuci *et al*, 1998). Il présente un profil antigénique particulier puisqu'il ne réagit pas avec l'anticorps 1H8 qui est un anticorps protecteur contre la VHD ; par contre des lapins vaccinés classiquement en sont protégés. Le RHDVa présente en fait des modifications de la séquence

de la VP60 dans une région (acides aminés 344-434) contenant les épitopes principaux des calicivirus (Cappuci *et al*, 1998), (Lavazza and Capucci, 2004).

Les VLPs produites en système baculovirus recombinant ont les mêmes propriétés antigéniques et immunogènes que les particules virales natives. Les virus et les VLP ne peuvent pas être différenciés du point de vue antigénique car les épitopes ont une conformation identique. L'injection intra musculaire de VLPs à des lapins entraîne la production de hauts titres d'anticorps anti-RHDV, ces anticorps étant protecteurs puisque les lapins sont ensuite protégés contre une infection par le RHDV. Les VLPs ont des caractéristiques antigéniques intéressantes car elles permettent l'obtention de plus grandes quantités d'antigènes viraux qu'avec des préparations de virus provenant de foies de lapins infectés. Les VLPs semblent être de très bons candidats pour la fabrication d'un vaccin ne présentant pas de risque pour les lapins domestiques (Laurent *et al*, 1994), (Nagesha *et al*, 1995).

5. Comparaison avec l'EBHSV

L'EBHSV, l'autre membre du genre *Lagovirus*, présente de nombreuses similarités avec le RHDV. Ils présentent tous deux les mêmes caractéristiques morphologiques et leurs capsides sont constituées d'une seule protéine structurale de poids moléculaire identique. Leur organisation génomique est la même : ils possèdent deux types d'ARN (génomique et subgénomique) de même taille et ils possèdent deux ORF, ce qui les différencie des autres calicivirus, la première ORF codant pour des protéines non structurales ainsi que la protéine de capsid. La comparaison des séquences des ARN montre que 71% des nucléotides sont identiques ce qui correspond en acides aminés à une identité de 78% et une similarité de 87%. Ces deux virus partagent également les mêmes caractères culturaux puisqu'ils ne sont pas cultivables *in vitro* mais des VLPs peuvent être produites dans le même système baculovirus recombinant. L'EBHSV possède lui aussi des propriétés hémagglutinantes même si des conditions différentes sont nécessaires à la réaction d'hémagglutination. Enfin, ces deux virus sont reliés antigéniquement, ils ont en commun les épitopes internes ; par contre, les épitopes externes qui sont la cible des anticorps neutralisants sont spécifiques à chaque virus. Il existe donc une certaine variabilité antigénique entre l'EBHSV et le RHDV même s'ils sont assez proches (Wirblich *et al*, 1994), (Laurent *et al*, 1997), (Le Gall-Recule *et al*, 2001).

III. Tableau clinique

Les signes cliniques et les lésions décrits lors de VHD sont étonnamment sévères ; ils diffèrent fortement de ceux causés par la plupart des calicivirus.

1. Symptômes

Les symptômes de la VHD sont assez variés, inconstants et d'évolution rapide. Les animaux touchés sont les adultes ou les jeunes âgés de plus de 2 mois. La période d'incubation est courte : 1 à 2 jours, 3 jours maximum, elle varierait en fonction de la dose virale contaminante (Henning *et al*, 2005). La mortalité est toujours très élevée, elle est de 40 à 95 %. Il s'agit d'une maladie le plus souvent aiguë ou suraiguë, même si 4 formes évolutives ont pu être décrites (Marcato *et al*, 1991) :

- la forme suraiguë affecte les lapins les plus sensibles qui n'ont jamais été en contact avec le virus. On observe alors une mort foudroyante sans aucun signe clinique préalable. Une hématurie ou un écoulement nasal mousseux ont pu être notés parfois.
- la forme aiguë est la plus fréquente en zone d'épizootie.
- la forme subaiguë est moins fréquente, elle se produit plutôt en fin d'épizootie. Les signes sont ceux d'une forme aiguë mais très atténus.
- la forme chronique est considérée comme très rare et dépourvue de symptômes, la forme subclinique est quant à elle supposée exister chez les lapines en allaitement.

Lors de forme aiguë, les symptômes apparaissant le plus fréquemment sont : anorexie, hyperthermie (40-41,5°C), prostration et abattement, polypnée, dyspnée, cyanose, épistaxis ou jetage mucohémorragique, tachycardie, épiphora, hémorragies oculaires ainsi que des symptômes neurologiques tels que des convulsions, contractions, ataxie, pédalages, paralysie des postérieurs. Une dilatation de l'anus peut également apparaître, ainsi qu'une distension abdominale accompagnée de diarrhée ou constipation. Dans de rares cas, les mères avortent de fœtus morts. La période précédant la mort est caractérisée par l'apparition de cris et de gémissements des animaux (Marcato *et al*, 1991), (Mitro and Krauss, 1993), (Ohlinger *et al*, 1993).

La mort survient rapidement après l'apparition des signes cliniques, environ au bout de 12-48 heures, ce qui correspond à 48-72 h post infection. Certains animaux ne succombent pas tout de suite, ils développent un ictère sévère et meurent quelques semaines plus tard

(Marcato *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993). Lors d'infection expérimentale, les symptômes observés sont identiques à ceux décrits ici (Plassiart *et al*, 1992), (Tunon *et al*, 2003). C'est d'ailleurs en inoculant la maladie à des lapins sains qu'a été déterminée la période d'incubation de 24 à 72h.

2 . Perturbation des paramètres sanguins

a. Modifications biochimiques (Tunon *et al*, 2003)

A partir de 36 heures post-infection on note une augmentation significative des enzymes hépatiques : AST (aspartate transaminase) et ALT (alanine transaminase) avec un pic à 42 h. Une hypoglycémie se développe ainsi qu'une augmentation de l'activité de la LDH (lactate déshydrogénase) et une hyper bilirubinémie. L'expression du HGF (hepatocyte growth factor) est fortement diminuée 24 h post-infection et devient absente par la suite.

Les concentrations plasmatiques en acides aminés sont modifiées avec par exemple une augmentation de la valine, leucine, taurine et une baisse de l'arginine, de même l'ammoniémie est fortement augmentée.

b. Modifications hématologiques

Au niveau hématologique, on note une leucopénie importante avec en particulier une lymphopénie et neutropénie ainsi qu'une thrombocytopénie à partir de 30 heures post-infection (Plassiart *et al*, 1992).

Les animaux montrent également une coagulopathie avec une diminution significative des facteurs V, VII (Tunon *et al*, 2003) et X (Plassiart *et al*, 1992) ainsi qu'une augmentation des temps de coagulation qui indique des anomalies dans les voies intrinsèque et extrinsèque, et une augmentation des taux de fibrine soluble. Tout ceci est démonstratif d'une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD).

3. Lésions

a. Macroscopiques :

Un écoulement hémorragique souillant les narines est souvent observé sur les carcasses, de même que des pétéchies oculaires et un ictère particulièrement visible sur la face interne des oreilles. Plus rarement, la zone périnéale est souillée par des fèces diarrhéiques ou du mucus (Marcato *et al*, 1991).

A l'ouverture du cadavre, c'est l'appareil respiratoire qui apparaît le plus touché avec des lésions hémorragiques constantes sur la trachée et les poumons associées à une congestion marquée et un abondant liquide mousseux dans la trachée. On note aussi des pétéchies sur presque tous les organes, une hépatomégalie, un ictère, une hypertrophie du thymus, de la rate et des reins. Le foie est pâle, ponctué de petites hémorragies, de consistance diminuée avec une lobulation marquée et dans certains cas une surface granuleuse. De nombreux micro thrombi sont présents dans différents organes, en particulier les poumons et les reins. Parfois, on peut découvrir une gastrite catarrhale, une hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques, ainsi que des reins décolorés (Marcato *et al*, 1991), (Plassiart *et al*, 1992).

b. Microscopiques : (Marcato *et al*, 1991), (Plassiart *et al*, 1992), (Teifke *et al*, 2002), (Tunon *et al*, 2003).

Si d'un point de vue macroscopique le poumon et la trachée semblent être les plus touchés, l'étude histopathologique révèle que les lésions hépatiques sont les plus significatives même si leur sévérité varie d'un cas à l'autre.

- **Foie** : l'observation histologique de biopsies de foie montre une hépatite nécrosante aiguë. Il s'agit d'une nécrose multifocale associée à des hémorragies et l'apparition précoce d'un infiltrat inflammatoire léger à modéré. Il s'agit d'un afflux de lymphocytes dans les espaces portes et les sinusoides et de granulocytes dans les sinusoides des foyers de nécroses (cet afflux peut être relié à la leucopénie périphérique). Les foyers de nécrose sont disséminés et peuvent parfois devenir confluents en particulier en zone péri lobulaire. On note aussi des micro thrombi intra sinusoidaux et une prolifération des conduits biliaires.

- **Poumon et trachée** : ils sont le siège d'une congestion marquée associée à des hémorragies. Parfois, des micro thrombi sont présents dans les capillaires alvéolaires.

- **Rein** : Dès 42 heures post infection, le rein est congestionné avec de nombreux micro thrombi préférentiellement localisés dans les capillaires glomérulaires et dans les cas plus sévères dans les petites artéries corticales.

- **Organes lymphoïdes** : La zone corticale des lobules thymiques est le siège d'une nécrose lymphocytaire importante après 42 heures post-infection. Ceci peut expliquer la lymphopénie périphérique. Les lésions spléniques consistent en des foyers de macrophages contenant des corps tingibles et des cellules dégénérées. Une nécrose lymphocytaire a lieu dans la pulpe blanche alors que la pulpe rouge est le lieu d'une congestion et de dépôts hyalins.

- D'autres lésions ont pu être décrites telles que : glomérulonéphrite, encéphalomyélite non suppurative, gastrite, nécrose de la glande surrénale, congestion et hémorragie utérine, dégénérescence pancréatique, nécrose de la vésicule biliaire...

Au niveau du foie, les modifications ultrastructurales sont nombreuses et révèlent des lésions sévères de dégénérescence et de nécrose (Marcato *et al*, 1991), (Teifke *et al*, 2002). Il s'agit par exemple d'accumulation de nombreux lysosomes, épuisement du glycogène, gouttelettes de bilirubine, membranes fragmentant le cytoplasme, dilatation des vésicules et dégranulation du réticulum endoplasmique, altérations des mitochondries et des noyaux , calcifications granulaires...

Dans de nombreux hépatocytes, ont pu être observés des agrégats de particules intranucléaires rondes de 17 nm ou 22-27 nm. Dans de rares cas, des « virus like particules » de 25-30 nm de diamètre sont présentes dans le cytoplasme des hépatocytes et des cellules endothéliales (Marcato *et al*, 1991).

IV. Pathogénie

1. Voie d'entrée et dissémination du virus

La principale voie de pénétration du virus dans l'organisme semble être la voie orale suivie par les voies lacrymales et respiratoires puis la voie trans-cutanée, après blessure (Marcato *et al*, 1991).

La dissémination du virus a été étudiée par immunohistochimie en utilisant des anticorps monoclonaux. Les résultats ont montré que 12h après inoculation orale de RHDV à des lapins, des particules virales sont détectables dans le cytoplasme des cellules épithéliales de la muqueuse nasale, du nasopharynx et des cellules des canaux salivaires. 24 post inoculation, le virus est retrouvé dans le noyau et le cytoplasme des hépatocytes, et entre 72 et

106 heures, il peut être détecté dans grand nombre de phagocytes mononucléaires du sang et des tissus (Moussa *et al*, 1992).

2. Cellules cibles :

Les hépatocytes sont la cible de prédilection du RHDV, la technique d'hybridation *in situ*, plus sensible que l'immunohistochimie, a permis de mettre en évidence l'ARN du RHDV au niveau du cytoplasme des cellules hépatiques dès 8h post infection. Ces résultats suggèrent que la réplication virale débute presque immédiatement après l'inoculation (Gelmetti *et al*, 1998).

D'autres études ont montré que si les hépatocytes sont les cellules cibles privilégiées, d'autres types cellulaires sont des cibles du virus (Moussa *et al*, 1992), (Ramiro-Ibanez *et al*, 1999), (Teifke *et al*, 2002). En effet, des antigènes spécifiques ont été détectés en plus petite quantité dans la rate, les poumons et les nœuds lymphatiques. De même, des cellules intravasculaires infectées (monocytes circulants) ont été détectées dans de nombreux organes tels que les reins, le myocarde, le thymus, et le système nerveux central. Un double immunomarquage a permis de montrer que les cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires sont des hôtes majeurs du virus et présentent une morphologie apoptotique : macrophages des organes lymphoïdes, de la pulpe rouge splénique, monocytes circulants, macrophages alvéolaires, cellules de Kupffer (Ramiro-Ibanez *et al*, 1999).

3. Pathogénie de la nécrose hépatique et la CIVD

La CIVD et la nécrose hépatique surviennent simultanément lors de l'infection. La nécrose hépatique serait due à la réplication virale. Ceci est appuyé par l'observation de particules virales dans les hépatocytes (Marcato *et al*, 1991), ou d'antigènes spécifiques (Moussa *et al*, 1992), (Ramiro-Ibanez *et al*, 1999). Cependant, pour certains auteurs, l'ischémie causée par la CIVD serait responsable de la nécrose hépatique. La CIVD serait, elle, induite par la virémie. Cette hypothèse est rendue acceptable par la présence de virus à la surface des cellules sanguines (Plassiart *et al*, 1992). Nous savons aussi que la nécrose hépatique entraîne la libération de grandes quantités de thromboplastine tissulaire qui initierait la CIVD. De plus, l'insuffisance hépatique aiguë qui accompagne la nécrose hépatique ne permet pas le renouvellement des facteurs de coagulation consommés dans les différents organes, en particulier rate et foie (Plassiart *et al*, 1992).

Une induction supplémentaire de la CIVD pourrait également avoir lieu au niveau périphérique par des lésions endothéliales disséminées, c'est à dire par la voie commune de la coagulation (Plassiart *et al*, 1992), (Ramiro-Ibanez *et al*, 1999). Deux mécanismes peuvent expliquer les lésions endothéliales : la réplication virale induisant une lyse rapide ou bien un mécanisme indirect lié à l'agrégation de monocytes infectés sur la surface endothéliale des vaisseaux. La sécrétion de cytokines par ces monocytes de même que l'expression de facteurs pro-coagulants sur la surface endothéliale pourraient être les événements suivants. La découverte de monocytes intravasculaires en apoptose associés à des thrombi de fibrine dans les vaisseaux suggère un possible mécanisme d'initiation de la CIVD (Ramiro-Ibanez *et al*, 1999). Les lésions endothéliales pourraient également provenir de l'action de complexes antigènes/anticorps (Marcato *et al*, 1991). Cependant, l'évolution rapide de la maladie rend ce phénomène improbable ou mineur s'il est présent. Dans tous les cas, l'atteinte hépatique (nécrose et inflammation) joue un rôle central dans la pathogénie de la maladie (voir figure 3).

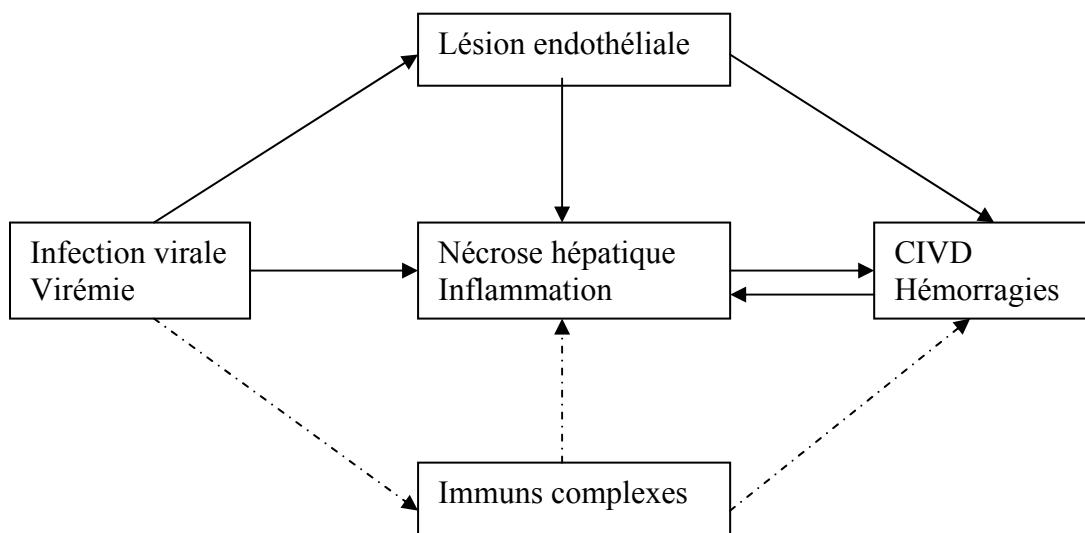


Figure 3 : Pathogénie hypothétique de la nécrose hépatique lors de VHD (d'après Marcato *et al*, 1991).

La nécrose primaire serait causée par la réplication virale, qui initierait la CIVD celle ci aggravant en retour la nécrose hépatique. De plus, les lésions endothéliales, elles aussi directement liées à l'action du virus contribueraient à l'évolution rapide de la maladie en entraînant CIVD et hémorragies ; le tout conduisant au choc fatal. Le rôle des dépôts d'immuns complexes est figuré en pointillé car le caractère aiguë de la maladie rend cette hypothèse difficile à envisager.

4. Survenue de la mort

Lors de VHD, la mort brutale est due à la défaillance de plusieurs organes : oedème et hémorragies pulmonaires, nécrose des surrénales, troubles circulatoires au niveau rénal et nécrose hépatique.

La VHD correspond à une hépatite qui ressemble beaucoup sur le plan clinique, pathogénique et biochimique aux hépatites fulminantes qui sévissent en médecine humaine. Le fait que cette infection soit facilement déclenchée expérimentalement sur des lapins, de façon reproductive et sans risque pour les manipulateurs en fait un bon candidat pour un modèle animal des hépatites aiguës humaines (Tunon *et al*, 2003).

V. Epidémiologie

1. Population atteinte

La VHD est une maladie aiguë, hautement contagieuse caractérisée par une forte morbidité qui approche les 100% et une forte mortalité allant de 40% le premier jour jusqu'à 80 à 100% les jours suivants chez les lapins adultes.

a. Espèce cible :

Le RHDV a un spectre d'hôte très étroit, seuls le lapin européen *Oryctolagus cuniculus* (lapin de garenne) et ses descendants domestiques sont atteints. Les autres espèces de la famille des lagomorphes tels que *Sylvilagus florianus*, *Romerolagus diazzi*, *Lepus californicus* ne sont pas sensibles. La sensibilité du lièvre brun européen (*Lepus europeaus*) a parfois été décrite, mais ne semble pas effective. Par contre, une maladie similaire nommée European Brown Hare Syndrome (EBHS) atteint le lièvre depuis les années 1980. Ces deux maladies se ressemblent beaucoup, elles conduisent à une nécrose hépatique s'accompagnant des mêmes lésions et signes cliniques et entraînant rapidement une forte mortalité chez les adultes. Comme vu précédemment, l'agent étiologique de l'EBHS est un calicivirus relié antigéniquement au RHDV mais différent de celui ci.

Les tentatives d'infection expérimentale de nombreux animaux ainsi que la recherche d'anticorps anti-RHDV se sont toujours révélées infructueuses excepté sur un chat qui vivait en zone d'épizootie de VHD (Mitro and Krauss, 1993). L'homme n'est pas non plus sensible à la VHD qui n'est pas une zoonose (Xu, 1991).

b. Réceptivité – sensibilité :

En plus de l'espèce d'autres facteurs peuvent influencer la réceptivité-sensibilité des individus :

- **L'âge** a une influence très nette sur la sensibilité à la maladie. En effet, les lapereaux de moins de 1 mois ne présentent pas de signes cliniques, entre 1 et 2 mois ils peuvent être infectés mais ils représentent un faible pourcentage, enfin la majorité des infections concerne les lapins de plus de 3 mois (Xu, 1991), (Gelmetti *et al*, 1998), (Marchandea *et al*, 1998). La première hypothèse formulée a été une protection des plus jeunes par l'immunité passive transmise par le colostrum (Mitro and Krauss, 1993). Cependant l'évolution foudroyante de la maladie chez la mère et l'absence d'anticorps détectables chez la plupart des lapereaux de moins de 400 grammes (Marchandea *et al*, 1998) ne vont pas dans le sens d'une telle hypothèse. Les jeunes lapins auraient en réalité une sensibilité naturelle plus faible liée à l'absence de récepteurs pour le RHDV qui ne sont pas encore exprimés au niveau des cellules de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000). Cependant, même si les jeunes lapins (moins de 3 semaines) ne sont pas sensibles au virus, ils ne sont pas épargnés lors d'une épidémie de VHD puisque leur nombre dans les populations sauvages chute fortement. Ceci peut s'expliquer par un déficit de naissances dû à la mort de nombreuses femelles en gestation ou par une forte mortalité des jeunes due à un sevrage prématuré (Mutze *et al*, 1998).

- **Le type d'élevage** apparaît comme un facteur de variation. En effet, la VHD atteint préférentiellement les élevages fermiers où les conditions d'hygiène et la prophylaxie sont moins bonnes que dans les élevages industriels. La nature de l'aliment distribué peut également jouer un rôle puisque l'herbe utilisée en élevage traditionnel, de même que la litière, peuvent être contaminés par les animaux sauvages. De plus, les élevages où les lapins se trouvent en cages métalliques individuelles sont très peu touchés alors que ceux où les lapins sont élevés en groupe accusent une mortalité importante (Mitro and Krauss, 1993).

- **Le sexe** n'a pas d'influence sur la sensibilité (Xu, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Marchandea *et al*, 1998).

- Toutes les **races** de lapins domestiques sont sensibles, on observe la même morbidité et mortalité lorsque l'on inocule des lapins de race différente (angora, rex, chinchilla...). Cependant, lors d'épidémie naturelle, les lapins à laine semblent être plus sensibles que ceux à viande et à fourrure (Xu, 1991). De même les lapins sauvages semblent être plus sensibles que les lapins d'élevage (Ohlinger *et al*, 1993).

- Le **stress**, une **maladie intercurrente**, les **parasites** et tout ce qui entraîne une diminution de l'état général des lapins favorisent l'apparition de la VHD (Mitro and Krauss, 1993). Par exemple, en ce qui concerne les maladies, les caractéristiques immuno-suppressives du virus de la myxomatose pourraient être responsables de l'augmentation de la mortalité due au RHDV dans les populations sauvages où les 2 virus cohabitent (Marchandeau *et al*, 1998).

2. Répartition et évolution dans le temps et dans l'espace

La VHD est apparue en 1984 en République Populaire de Chine, en 1986, elle touchait la Corée. La VHD s'est ensuite étendue à toute l'Europe, a atteint l'Afrique ainsi que l'Amérique (Ohlinger *et al*, 1993). Elle est aujourd'hui présente sur tous les continents.

Lorsque le RHDV apparaît dans une région indemne, sa propagation est très rapide et conduit à des épizooties caractérisées par des taux de morbidité et mortalité très élevés allant jusqu'à 100 % chez les adultes. Dans les régions enzootiques, la morbidité et la mortalité sont significativement inférieures probablement à cause de la fréquence plus élevée d'animaux présentant des anticorps anti-RHDV (Ohlinger *et al*, 1993), (Mutze *et al*, 1998), (Calvete *et al*, 2002). En ce qui concerne les populations sauvages, ce sont les colonies à plus forte densité qui se rétablissent le mieux après les épidémies (Villafuerte *et al*, 1995).

Le caractère saisonnier de la VHD ne fait pas l'objet d'un consensus. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence un cycle annuel dans l'occurrence de la maladie avec une augmentation des cas en hiver et au printemps (Mitro and Krauss, 1993), (Villafuerte *et al*, 1995), (Calvete *et al*, 2002), (White *et al*, 2004). C'est le cas d'une étude réalisée entre 1993 et 1996 sur une population sauvage de lapins en Espagne qui montre que la maladie est enzootique avec des pics associés aux périodes de reproduction, les plus forts taux de mortalité étant observés chez les adultes lorsque la proportion de femelles en gestation est maximale (Calvete *et al*, 2002).

3. Sources virales

Les sources de virus sont les animaux malades et les cadavres d'animaux ayant succombé à la VHD. Le virus est présent dans le sang, les organes (même congelés), les sécrétions, excréptions, la peau et les muqueuses en particulier en fin d'évolution de la maladie et après la mort (Xu, 1991). Le virus étant hautement résistant dans le milieu extérieur, la litière, les cages, les vêtements et tout matériel ou être vivant entrant en contact avec les lapins malades sont susceptibles d'être contaminés (Mitro and Krauss, 1993).

Les jeunes lapereaux de moins de 2 mois ont été suspectés d'être des sources de virus mais des lapins adultes maintenus en contact étroit avec des lapereaux de 4 semaines ayant rencontré le virus n'ont pas présenté de signes cliniques ou de séroconversion même après une immunodépression (Ohlinger *et al*, 1993).

Les fourrages constituent une source non négligeable de virus, ils peuvent être contaminés par les lapins sauvages. De même, les cadavres d'animaux morts de VHD sont des réservoirs de virus qui jouent un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie puisqu'ils contribuent à sa pérennité.

4. Transmission

Les portes d'entrées naturelles du virus sont l'appareil respiratoire supérieur (contamination oculo-nasale), le tractus digestif (contamination orale) et les lésions cutanées (Mitro and Krauss, 1993). Il semblerait que la voie aérogène sans contact direct entre les lapins ne soit pas contaminante (Henning *et al*, 2005).

La transmission du virus est horizontale, elle peut être directe ou indirecte (voir figure 4). La transmission directe se fait par contact entre un individu sain et un individu infecté ou son cadavre. Dans la nature c'est le mode de contamination le plus fréquent, par la voie fécale/orale. Cette voie est particulièrement efficace car les fèces de lapins de garenne ayant survécu à la maladie sont infectants jusqu'à 4 semaines après l'infection (Ohlinger *et al*, 1993). Il semblerait également que les terriers, où des lapins sont morts (Marchandeau *et al*, 1998), (Mutze *et al*, 1998) et où le virus persiste, jouent un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie en tant que réservoir du virus. Pendant la période de reproduction, la fréquentation des terriers par les adultes est fortement augmentée (creusage)

ce qui pourrait faciliter l'infection simultanée de nombreux adultes causant ainsi l'épidémie hivernale annuelle (Calvete *et al*, 2002).

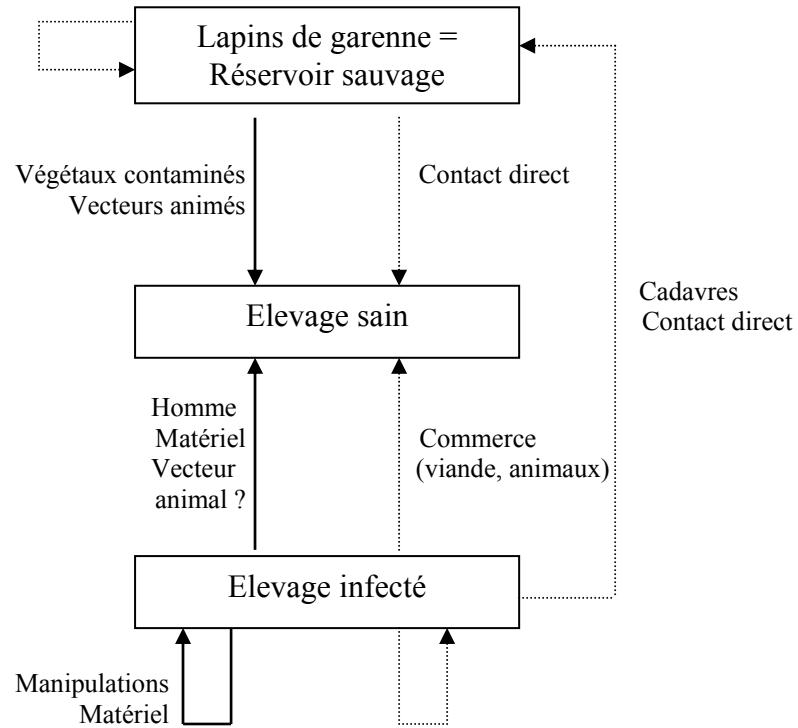


Figure 4 : Cycle épidémiologique de la VHD (d'après Marcus, S., 1996).

- ► Transmission directe
- Transmission indirecte

La transmission indirecte est la voie majeure d'introduction de la maladie dans un élevage, elle est favorisée par la grande résistance du virus dans le milieu extérieur. Il peut s'agir de vecteurs animés ou inanimés. Les vecteurs inanimés peuvent être contaminés au sein de l'élevage ou par les lapins sauvages, il s'agit par exemple d'aliment, litière, matériel, vêtements, viande de lapins contaminés, objets de soins aux animaux, poils, véhicules... Les hommes font parti des vecteurs animés, ils peuvent contaminer des lapins sains lors de manipulations, de soins ou lors de la venue de visiteurs dans l'élevage. Les lapins sauvages sont aussi des vecteurs de la maladie, des épizooties chez les lapins domestiques ont été observées simultanément à un déclin des populations sauvages. D'autres vecteurs passifs animaux sont suspectés comme les rongeurs, insectes, animaux de compagnie, animaux

sauvages (Mitro and Krauss, 1993), (Ohlinger *et al*, 1993), (Marchandeau *et al*, 1998), (Henning *et al*, 2005).

Le virus s'est principalement répandu à travers le monde par le biais d'exportations de lapins et de viande. Désormais, il est avéré que l'épidémie qui s'est déclarée au Mexique en 1989 était due à l'importation de viande de lapin congelée en provenance de Chine. Apparemment, la tradition Italienne et Française d'importation de viande de lapin en provenance de Chine et d'Europe de l'Est a été responsable de l'introduction de la maladie dans ces pays. Par exemple, l'Italie a augmenté ses importations de lapins et de viande de lapin de 20% entre 1987 et 1988 ; la marchandise provenait majoritairement de Chine, Hongrie et Tchécoslovaquie. La Suisse a été le seul pays à recevoir des exportations en provenance d'Italie et la maladie y est apparue en novembre/décembre 1988 (Mitro and Krauss, 1993). L'introduction de la VHD en Australie a été plus originale puisque le virus a été introduit en 1993 pour étudier sa capacité à être utilisé comme agent de contrôle des populations de lapins sauvages qui sont considérés comme nuisibles. En octobre 1995, le virus s'est échappé d'une station de quarantaine et dans le mois qui a suivi, plus de 30 millions de lapins sont morts de VHD, soit une réduction de 95% de la population de la région (Mutze *et al*, 1998). De même, les fermiers l'ont illégalement introduite en Nouvelle-Zélande en 1997, en tant qu'agent de contrôle biologique (Forrester *et al*, 2003).

VI. Diagnostic

1. Diagnostic de terrain

La VHD peut être suspectée selon des critères épidémiologiques, cliniques ou lésionnels de la maladie. En effet, une mortalité élevée et brutale sur les lapins de plus de 2 mois en bon état général fait penser à la VHD. La présence de signes cliniques tels que des épistaxis ou des signes nerveux renforcent la suspicion même s'ils ne sont pas toujours présents. De même, à l'autopsie, les lésions macroscopiques peuvent être assez évocatrices de la maladie (aspect congestivo-hémorragique des organes, lésions pulmonaires, trachéales, hépatiques...). Le diagnostic différentiel doit être fait avec les intoxications, coup de chaleur, septicémie à pasteurelles, staphylocoques... (Mitro and Krauss, 1993).

Les observations de terrain permettent d'établir une suspicion qui doit être confirmée par les analyses de laboratoire afin d'obtenir un diagnostic de certitude. Le laboratoire peut

également s'avérer utile pour l'étude de l'épidémiologie de la maladie dans certaines régions, pour déterminer par exemple si les différentes épizooties sont dues à la même source d'infection et les caractériser (Chasey *et al*, 1995).

2. Diagnostic de laboratoire

a. Mise en évidence de l'agent

Le foie est l'organe de choix pour l'identification virale car il contient les plus hauts titres viraux. La répartition du virus dans les autres parties du corps est proportionnelle à la vascularisation, ainsi la rate et le sérum sont assez riches en virus et peuvent être également utilisés pour le diagnostic. Quelle que soit la méthode utilisée, le traitement initial de l'échantillon est le même : un fragment de l'organe est mécaniquement homogénéisé dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) puis il est filtré et centrifugé (Capucci *et al*, 1991), (Lavazza and Capucci, 2004).

- L'isolement *in vitro* du RHDV n'est pas réalisable à l'heure actuelle puisque aucun système de culture cellulaire adapté n'a encore été identifié.

- L'infection expérimentale n'est pas pratiquée en routine mais elle peut s'avérer utile en cas de résultats non interprétables avec les autres tests ou pour le diagnostic initial de la maladie dans un pays indemne. Elle doit être réalisée sur des lapins sensibles au virus, de plus de 40-50 jours et dépourvus d'anticorps spécifiques. Les lapins sont inoculés avec des suspensions de foie filtrées ayant subi un traitement antibiotique. L'inoculation se fait indifféremment par la voie intramusculaire, intraveineuse ou oronasale. Quand la maladie se manifeste cliniquement les signes cliniques et les lésions sont les mêmes que lors d'une infection naturelle. On note une augmentation de la température corporelle entre 18 et 24 heures post infection suivie dans 70 à 90% des cas de la mort entre 24 et 72 heures même si certains individus peuvent survivre jusqu'à 6 jours après l'infection. Si la maladie persiste et devient chronique, l'ictère est le symptôme majeur. Les animaux surmontant la maladie montrent une hyperthermie, dépression et anorexie passagères et présentent une séroconversion détectable 5-6 jours post infection (Capucci *et al*, 1991), (Lavazza and Capucci, 2004).

- Le test d'hémagglutination a été le premier utilisé pour le diagnostic de laboratoire de la VHD. Il est fondé sur la capacité du RHDV à agglutiner les hématies humaines. Il est réalisé

avec des hématies de groupe sanguin O fraîchement collectées. Même s'il a été longtemps utilisé, ce test simple et rapide a été remplacé par l'ELISA à cause de sa faible sensibilité et spécificité, des difficultés de standardisation et d'approvisionnement en hématies. Une comparaison du test d'hémagglutination (HA), de la microscopie électronique (ME) et de l'ELISA a été réalisée sur 1000 prélèvements traités en parallèle avec les 3 techniques. Les résultats ont montré que le taux de faux positifs était de 8% avec l'HA ce qui peut s'expliquer par la présence de facteurs d'hémagglutination non spécifiques tels que des pasteurelles ou des parvovirus. De même, le taux de faux négatif est de 9% ce qui s'explique pour 5% d'entre eux par la présence de formes dégradées de la capsid virale et par un trop faible taux d'antigène pour les 4% restants (Capucci *et al*, 1991), (Chasey *et al*, 1995), (Lavazza and Capucci, 2004).

- La microscopie électronique après coloration négative consiste en l'identification des particules virales selon ses caractéristiques morphologiques. Pour le diagnostic et en particulier lorsque les autres méthodes donnent des résultats douteux, la meilleure méthode de ME est l'immuno-électromicroscopie (IEM). Des sérums hyper immuns anti-RHDV ou des anticorps monoclonaux spécifiques sont incubés avec l'échantillon puis centrifugés. La réaction immunologique qui se produit induit la formation d'agrégats de particules virales qui sont alors plus facilement et rapidement identifiées par ME. L'IEM a une sensibilité et une spécificité supérieures à l'HA et à peu près équivalentes à l'ELISA. Les limites de cette techniques sont son coût et le temps qu'elle nécessite (Capucci *et al*, 1991), (Lavazza and Capucci, 2004).
- L'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) permet également la détection des antigènes viraux. Plusieurs techniques sont disponibles, il s'agit de méthodes « sandwich » qui diffèrent par le système enzymatique et les réactifs immunologiques utilisés. Dans tous les cas, du sérum hyper immun anti-RHDV de lapin est adsorbé sur une plaque puis l'antigène capturé peut être révélé par différents types d'anticorps couplés à une enzyme (peroxydase, phosphatase...). Pour bien caractériser l'antigénicité du virus, il est préférable de tester chaque échantillon avec un sérum polyclonal anti-RHDV (qui pourrait identifier un potentiel nouveau variant ou un calicivirus apparenté) et aussi deux types d'anticorps monoclonaux. Le premier type d'anticorps reconnaît des déterminants antigéniques présents à la surface du virus qui sont exprimés par la forme classique et également par le variant RHDVa. Le second

type d'anticorps reconnaît les épitopes internes ce qui permet de détecter les particules lisses, dégradées et également l'EBHSV.

L'ELISA est une technique qui peut être facilement utilisée en pratique, sa sensibilité et sa spécificité sont bonnes (avec les anticorps monoclonaux, la sensibilité est la même que pour l'IEM) (Capucci *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004). Les antigènes recherchés proviennent classiquement de broyats de foies mais il a été montré que pour simplifier la préparation de l'échantillon, il était possible d'utiliser directement l'exsudat qui se forme après décongélation de l'organe (Le Gall-Recule *et al*, 2001).

- L'immunostaining est également utilisé pour la détection d'antigènes viraux sur des coupes d'organes. Une coloration intense du noyau ainsi qu'une coloration plus diffuse du cytoplasme des cellules hépatiques nécrotiques, en particulier dans les zones péri portales est caractéristique et spécifique. Une coloration des macrophages et des cellules de Kupffer peut également être observée (Lavazza and Capucci, 2004).

- La technique de Western blot peut être utile pour donner le diagnostic final lorsque les autres tests tels que l'HA ou l'ELISA donnent des résultats douteux (faible positivité) ou lorsque l'on suspecte la présence de particules lisses. Les protéines peuvent être révélées par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Les anticorps monoclonaux sont plus efficaces que les sérum hyper immuns anti-RHDV de lapin pour reconnaître une même bande. Pour les échantillons positifs, on détecte des protéines de différents poids moléculaire : certaines de 60 kDa correspondant à la protéine structurale majeure et d'autres, plus petites allant de 41 à 28 kDa correspondant aux fragments de VP60 (associées à la transition entre les particules RHDV et les particules lisses) (Lavazza and Capucci, 2004).

- La RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) permet la détection de l'acide nucléique du RHDV à partir d'organes, de sérum, d'urine ou de fèces. Une RT-PCR avec immunocapture a également été décrite, utilisant directement l'exsudat de foies décongelés. Des anticorps adsorbés sur une phase solide permettent la capture des virus, la réaction de RT est ensuite réalisée directement à partir de l'ARN viral sans qu'une étape de purification ou d'extraction ne soit nécessaire. Cette méthode est donc plus simple et plus rapide qu'une RT-PCR classique (Le Gall-Recule *et al*, 2001).

La RT-PCR est une méthode très sensible pour la détection du RHDV (10^4 fois plus que l'ELISA) mais il n'est pas réellement nécessaire de la pratiquer pour le diagnostic de routine.

Son utilisation est plus appropriée pour les études d'épidémiologie moléculaire ou pour les recherches portant par exemple sur la pathogénie, la détection de virus chez des hôtes non spécifiques ou des vecteurs (Lavazza and Capucci, 2004).

b. Analyses sérologiques (Capucci *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004).

Une infection par le RHDV peut être diagnostiquée par la détection des antigènes spécifiques. La réponse humorale ayant une grande importance dans la protection des animaux, la détermination du titre en anticorps spécifiques après la vaccination ou sur des animaux convalescents a une valeur prédictive sur la capacité des lapins à résister à une infection par le RHDV. Des données épidémiologiques suggèrent l'existence d'une forme non pathogène antigéniquement reliée au RHDV. En effet, des anticorps spécifiques conférant une protection contre le RHDV virulent ont été mis en évidence dans des colonies de lapins n'ayant subi aucune épizootie ou vaccination préalables.

Trois techniques sont utilisées pour le dépistage sérologique : le test d'inhibition de l'hémagglutination, l'ELISA indirecte et l'ELISA compétition.

- Test d'inhibition de l'hémagglutination : des antigènes de RHDV provenant de foies de lapins infectés sont ajoutés au sérum à tester (préalablement traité) ainsi que des hématies humaines de groupe sanguin O. Le titre sérique correspond à la dernière dilution du sérum pour laquelle la réaction d'hémagglutination est inhibée. L'ELISA est préférée à ce test qui présente les mêmes inconvénients que le test d'hémagglutination.

- ELISA indirecte : les anticorps spécifiques sont mis en évidence par des IgG anti-lapins conjuguées à une enzyme (disponible dans le commerce). Le titre du sérum correspond à la plus grande dilution donnant une valeur d'absorbance qui soit encore considérée comme positive.

- ELISA compétition : le sérum est incubé avec une concentration connue d'antigènes de RHDV puis les anticorps spécifiques présents dans le sérum sont indirectement quantifiés par la liaison entre l'antigène et des anticorps anti-RHDV conjugués à une enzyme ajoutés à la réaction. On peut utiliser du sérum contenant un haut titre en anticorps anti-RHDV (sérum de

lapins convalescents ou sérum de chèvre ou de mouton immunisés par du RHDV purifié) ou bien des anticorps monoclonaux. Le titre du sérum correspond à la dilution qui réduit de 50% l'absorbance du contrôle négatif.

Les ELISA sont les techniques les plus rapides et faciles à réaliser, en particulier lorsque un grand nombre d'échantillons sont à tester. La sensibilité des deux méthodes est identique ; par contre la spécificité de l'ELISA compétition est supérieure.

VI. Lutte contre la maladie

La VHD étant une affection virale, aucun traitement spécifique n'est disponible à l'heure actuelle. Toute la lutte contre cette maladie repose donc sur la prophylaxie qui se divise en deux volets : prophylaxie sanitaire et prophylaxie médicale.

1. Prophylaxie sanitaire

a. Prophylaxie sanitaire défensive

Les mesures sanitaires défensives permettent d'éviter l'entrée de la maladie dans un territoire ou à plus faible échelle dans une exploitation. Pour cela, toutes les portes d'entrée du virus doivent être contrôlées. Les lapins introduits doivent être placés en quarantaine quinze jours au contact de lapins sentinelles et s'ils proviennent d'un élevage où la vaccination n'est pas pratiquée, ils doivent être contrôlés sérologiquement. Les contacts avec les lapins sauvages, les visites, foires et expositions doivent être évités au maximum. Les aliments préparés (foin, granulés) doivent être préférés aux fourrages verts et des mesures d'hygiène strictes doivent être prises (désinfection du matériel, changement de vêtements ...). Une lutte contre les vecteurs potentiels (dératisation, grillage contre les oiseaux...) doit également être mise en place (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993).

A l'échelle nationale et internationale les mesures défensives portent sur les échanges commerciaux qui sont strictement réglementés. Les normes sont précisément définies dans le chapitre 2.8.2 du code sanitaire pour les animaux terrestres (OIE. Code sanitaire pour les animaux terrestres. 15^{ème} édition. 2006). Par exemple, les administrations vétérinaires de pays indemnes de VHD peuvent interdire l'importation ou le transit sur leur territoire, en

provenance de pays considérés comme infectés, de tout lapin vivant, de leur semence, de leurs viandes et peaux non traitées. Lorsque l'importation en provenance d'un pays considéré comme infecté est autorisée, des conditions bien définies doivent être remplies par les animaux et l'exploitation d'origine. Des normes différentes sont décrites pour tous les types de marchandises (lapins domestiques ou lapereaux d'un jour destinés à la reproduction, lapins domestiques destinés à l'abattage immédiat, semence, viandes, peaux non traitées) en provenance d'un pays indemne ou considéré comme infecté. Le certificat vétérinaire international qui doit accompagner les animaux et qui est exigé par les administrations vétérinaires des pays importateurs atteste que les conditions sont bien remplies. Par exemple, lors d'importation de viandes de lapins domestiques en provenance d'un pays considéré comme infecté, les viandes doivent provenir d'animaux :

- ayant séjournés dans des exploitations dans lesquelles aucun cas de maladie n'a été déclarée pendant les 60 jours ayant précédé leur transport vers l'abattoir agréé (le code terrestre fixe la période d'infectiosité de la VHD à 60 jours),
- ayant été soumis à une inspection ante mortem pour la recherche de la VHD dont le résultat s'est révélé favorable,
- ne présentant pas de lésions de VHD lors de l'inspection post mortem.

b. Prophylaxie sanitaire offensive

Les mesures sanitaires offensives sont mises en place lorsque la maladie se déclare. Ils s'agit d'éliminer le virus d'un élevage contaminé par un abattage des animaux malades et suspects, une destruction efficace des carcasses (incinération), une désinfection des locaux et du matériel en utilisant par exemple du formol à 10%, de la soude à 2% et la réalisation d'un vide sanitaire (6 semaines). Il est souvent nécessaire d'associer la vaccination à ces mesures sanitaires, en particulier dans les élevages industriels (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993).

2. Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale est fondée sur la vaccination puisqu'il n'existe pas de traitement spécifique contre la VHD. Dans la mesure où il existe un réservoir sauvage de virus sur lequel il est difficile d'agir, il est préférable de l'associer à la prophylaxie sanitaire. Cependant, les anticorps induits par la vaccination ne pouvant pas être différenciés de ceux

induits par une infection, la vaccination ne peut pas être pratiquée dans les exploitations souhaitant exporter des animaux séronégatifs ; dans ce cas, seule la prophylaxie sanitaire est applicable.

a. Nature et obtention du vaccin

Les vaccins utilisés actuellement sont des vaccins à virus inactivés et adjuvés préparés à partir d'organes homogénéisés de lapins infectés expérimentalement. De nombreuses études ont été réalisées durant les dix dernières années sur l'expression de la capsidé protéique du RHDV dans différents systèmes (*Escherichia coli*, virus recombinés, baculovirus, plantes transgéniques...). Les premiers résultats obtenus sur la vaccination avec des virus recombinés sont concluants puisqu'ils entraînent une protection efficace des animaux, mais ils ne sont pas encore commercialisés (Bertagnoli *et al*, 1996), (Bertagnoli *et al*, 1996b), (Barcena *et al*, 2000). C'est le cas, par exemple, de l'administration intramusculaire ou par voie orale de VP60 obtenue en système baculovirus recombinant qui entraîne une immunisation active des lapins (Laurent *et al*, 1994). La possibilité d'administration par voie orale offre de belles perspectives pour la vaccination des animaux sauvages, de même que les travaux portant sur des plantes transgéniques (plants de pomme de terre) qui expriment la VP60 et sont capables d'immuniser des lapins après administration orale (Castanon *et al*, 1999), (Martin-Alonso *et al*, 2003), (Lavazza and Capucci, 2004).

De nombreuses pistes ont été suivies dans le domaine de la vaccination mais pour l'instant seuls les vaccins à virus inactivés sont disponibles. Ces vaccins sont fabriqués à partir de foies infectés et homogénéisés obtenus par passages successifs sur des lapins inoculés avec des suspensions virales de RHDV partiellement purifiées. Les foies sont prélevés sur les lapins mourant dans les 24 et 72 heures qui suivent l'inoculation puis ils sont broyés. L'inactivation du virus peut être obtenue par un traitement au formaldéhyde, à la beta-propionolactone ou par la chaleur ; quant aux adjuvants utilisés, il s'agit de l'hydroxyde d'alumine ou d'adjuvants huileux (Ohlinger *et al*, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004).

b. Utilisation du vaccin

En pratique, le vaccin est administré par la voie sous cutanée, dans la région du cou le plus souvent. Deux injections de primo-vaccination peuvent être recommandées avec un intervalle minimum de deux semaines entre les deux injections. Dans les élevages qui n'ont

pas été victimes de VHD, il convient de ne vacciner que les reproducteurs, la primo-vaccination pouvant être faite à 2 ou 3 mois. Un rappel annuel est fortement recommandé pour assurer un bon niveau de protection même si les données expérimentales indiquent que la protection dure plus de 15 mois. La vaccination des lapins de chair n'est pas nécessaire si la maladie n'a pas atteint l'élevage. Par contre, après un épisode de VHD même si les mesures de prophylaxie sanitaire sont mises en place, la vaccination des lapins est fortement recommandée à l'âge de 40 jours. Ce n'est qu'après plusieurs cycles de production qu'il est alors envisageable de stopper la vaccination des lapins, en commençant par un petit groupe de lapins sentinelles afin de vérifier l'absence de RHDV au sein de l'unité (Lavazza and Capucci, 2004).

Lorsqu'un élevage subit un épisode de VHD, les lapins ayant survécu doivent être vaccinés le plus rapidement possible, dès que la VHD a été confirmée sur les cadavres ou les animaux malades. Les pertes sont diminuées dès les 5 ou 6 jours qui suivent la vaccination. Il est également possible d'administrer un sérum hyperimmun qui entraîne une protection rapide, mais de courte durée contre l'infection par le RHDV ; on note une forte diminution de la mortalité 2 jours seulement après l'administration (Mitro and Krauss, 1993), (Ohlinger *et al*, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004).

DEUXIEME PARTIE :

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CALICIVIRUS
APPARENTES AU RHDV**

DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CALICIVIRUS APPARENTES AU RHDV

I. Preuves de l'existence de tels virus

Plusieurs études sérologiques réalisées dans différents pays sur des lapins ne présentant pas de signes cliniques de VHD ont conduit à des résultats assez surprenants. En effet, de nombreux lapins sains ont été contrôlés séropositifs dans des zones indemnes de VHD et des anticorps anti-RHDV ont été détectés dans des sérums prélevés avant l'apparition de la maladie dans le pays. Pourtant, une infection par le RHDV cause habituellement une maladie aiguë entraînant un mortalité importante et rapide chez les lapins adultes. Ces résultats ont donc conduit les auteurs à suspecter l'existence de virus proches du RHDV mais non pathogènes, c'est à dire capables d'entraîner une séroconversion des animaux infectés sans signes cliniques, qui seraient plus anciens que le RHDV.

Par exemple, des études sérologiques réalisées dans différentes régions d'Italie ont montré que la fréquence de séropositivité des lapins était élevée sans qu'elle soit corrélée aux signes cliniques sévères normalement associés à une infection par le RHDV (Capucci *et al*, 1996). De même, des tests ELISA recherchant des anticorps anti-RHDV réalisés en Tchécoslovaquie sur 1461 lapins apparemment sains ont montré que 19,4% d'entre eux étaient séropositifs et 19,7% douteux ; pourtant, ils ne présentaient aucun signe clinique (Rodak *et al*, 1990). La même équipe a également détecté des anticorps anti-RHDV dans du sérum collecté sur des lapins de laboratoires 12 ans avant la première épizootie de RHDV (entre 1975 et 1985). Ces résultats suggèrent donc que ces lapins ont été infectés par un virus proche du RHDV mais présentant une virulence plus faible et ne causant pas de troubles majeurs, plusieurs années avant que le RHDV soit identifié en Chine.

De tels virus ont également été identifiés en Australie et en Nouvelle-Zélande avant l'apparition du RHDV dans ces pays. Des études réalisées en Australie sur de nombreux sérums collectés avant que le RHDV ne s'échappe de la zone de quarantaine et n'apparaisse dans ce pays, ont respectivement montré qu'une proportion significative des 657 sérums testés (Robinson *et al*, 2002), et 50% des 392 sérums (Nagesha *et al*, 2000) donnaient des résultats positifs en ELISA. Des observations similaires ont été faites en Nouvelle-Zélande, où 47%

des 139 sérum qui avaient été collectés en 1997 avant la première épizootie de VHD ont été testés positifs en ELISA à une dilution de 1/10^e (O'Keefe *et al*, 1999). Ces résultats ont alors conduit les auteurs à conclure à la présence d'un calicivirus apparenté au RHDV non-pathogène dans les populations de lapins en Australie et en Nouvelle-Zélande avant l'arrivée du RHDV.

Des taux de séroprévalence importants en l'absence de mortalité associée ont poussé les équipes travaillant en Angleterre à suspecter, elles aussi, l'existence de virus non pathogènes qui seraient présents de manière endémique dans ce pays (White *et al*, 2004), (Moss *et al*, 2002). La détection d'ARN de RHDV dans des sérum de lapins sains prélevés à partir de 1955 suggère également que ces virus non pathogènes étaient présents bien avant que les premiers cas de VHD ne se déclarent et donc avant que les souches pathogènes de RHDV n'apparaissent dans ce pays (Moss *et al*, 2002).

II. Caractéristiques des calicivirus apparentés au RHDV

Afin d'étudier les caractéristiques des virus apparentés au RHDV, nous prendrons principalement l'exemple du RCV (Rabbit calicivirus) mais également d'autres virus car des différences existent. Le RCV est un calicivirus non pathogène qui a été identifié en Italie en 1996 sur des lapins provenant d'un élevage où le taux de séropositivité était important sans que la maladie n'ait jamais été rapportée (Capucci *et al*, 1996), (Moss *et al*, 2002).

1. Pouvoir pathogène

La caractéristique majeure qui différencie le RCV et les autres virus apparentés au RHDV est qu'ils ne sont pas pathogènes. Comme nous l'avons vu, leur découverte est liée aux analyses sérologiques réalisées sur des lapins ne présentant pas de signes cliniques. De même, lors de l'autopsie de tels animaux, on ne détecte aucune lésion sur le foie ou les autres organes.

Les virus apparentés au RHDV ont des sites d'accumulation dans l'hôte différents du RHDV qui se concentre principalement au niveau du foie des lapins infectés. Le RHDV est responsable d'une nécrose importante du foie entraînant une hépatite sévère ainsi que d'autres complications comme la CIVD, et finalement de la mort des lapins. Le RCV a un tropisme différent puisqu'il n'est quasiment détecté que dans l'intestin des lapins où a probablement

lieu la réplication primaire (Capucci *et al*, 1996). Il n'est que très rarement détecté au niveau du foie et aucune lésion n'est retrouvée sur cet organe lors des autopsies.

De même, l'infection expérimentale de lapins séronégatifs par le RCV (fragments d'intestin homogénisés et administrés par voie orale), entraîne une séroconversion rapide des lapins mais aucun signe clinique ou mortalité ne sont notés.

2. Propriétés antigéniques

Grâce à la méthode d'ELISA compétition utilisant différents anticorps monoclonaux, les relations antigéniques entre le RCV et le RHDV ainsi que l'EBHSV ont été définies (Capucci *et al*, 1996). Le RCV partage un grand nombre d'épitopes similaires avec le RHDV et présente probablement quelques épitopes similaires à l'EBHSV mais les profils antigéniques généraux de ces deux virus sont clairement très différents.

Une étude sérologique réalisée en Italie dans un élevage industriel dépourvu de VHD a permis de mieux caractériser la réponse immunitaire engendrée par le RCV (Capucci *et al*, 1997). Il apparaît que dans cet élevage, l'ensemble des reproducteurs sont séropositifs avec des titres en anticorps importants, la situation étant différente chez les lapins à l'engraissement, pour lesquels les taux de séropositivité et les titres sont directement reliés à l'âge des animaux. Au sevrage, 33 % des lapins sont séropositifs puis leur proportion augmente fortement pour atteindre un taux de 100% 1 mois après le sevrage lorsqu'ils deviennent des lapins d'engraissement.

Les anticorps des lapins sevrés sont certainement transmis par leur mère par immunisation passive. Plusieurs observations vont dans ce sens : d'abord, il s'agit d'immunoglobulines G, ensuite, il y a une nette corrélation entre les titres en anticorps des mères et de leur portée, et enfin on note une diminution rapide des titres chez des lapins isolés après le sevrage qui deviennent séronégatifs au bout de 3 semaines et le restent par la suite. Par contre, l'origine de ces anticorps est différente lorsque les lapins passent à l'engraissement : il semblerait que la forte augmentation des séropositifs (qui passent de 56 % 13 jours après le sevrage à 90% après 20 jours) soit due à une infection. En effet, ce pourcentage augmente rapidement en quelques jours avec un très haut niveau d'IgM et d'IgA. Par la suite, les titres croissent avec le temps, en particulier les IgG qui persistent après 6 mois. Les lapins se contaminent surtout lorsqu'ils passent à l'engraissement, dans un environnement stressant où la concentration en animaux est importante. Le virus n'est

probablement pas excrété par toutes les femelles dans les cages de reproduction et les jeunes se contaminent entre eux à l'engraissement.

Le RCV et le RHDV étant proches antigéniquement, il est difficile de différencier la réponse humorale dirigée contre ces 2 virus. On a observé que les titres en anticorps sont beaucoup plus faibles chez les lapins infectés par le RCV, ou les autres calicivirus apparentés au RHDV, que chez des lapins ayant survécu à la VHD, ce qui suggère une moindre réplication de ces virus (Capucci *et al*, 1996), (Robinson *et al*, 2002). Cette observation a permis l'élaboration d'une méthode permettant de distinguer d'une manière indirecte les anticorps produits contre le RHDV de ceux produits contre les virus apparentés. Il s'agit de méthodes sérologiques utilisant l'ELISA compétition et l'isoELISA qui permet de détecter et titrer les différents isotypes IgA, IgG et IgM. Les lapins présentant des titres importants d'IgG, mais pas d'IgA ou d'IgM, et des titres en anticorps à l'ELISA compétition inférieurs ou égaux à 10 sont considérés comme infectés par un virus apparenté au RHDV. Ceux présentant des titres à l'ELISA compétition supérieurs à 10 sont considérés comme infectés par le RHDV, la présence d'IgA confirme alors une infection passée alors que la présence d'IgM indique que les lapins ont récemment guéri de la VHD (Cooke *et al*, 2002).

3. Propriétés immunogènes

Le RCV et le RHDV sont assez proches antigéniquement, il est donc logique de s'interroger sur la capacité de la réponse immunitaire mise en œuvre contre le RCV et les virus apparentés au RHDV à protéger les lapins contre la VHD. Pour répondre à cela, des lapins infectés par le RCV ont été infectés expérimentalement par une forte dose de RHDV par voie intramusculaire. Les lapins ont survécu et n'ont pas montré de signes cliniques ; on peut donc conclure que la réponse immunitaire induite par le RCV est protectrice contre le RHDV (Capucci *et al*, 1996). De même, les lapins de l'étude réalisée en Tchécoslovaquie ont été infectés par le RHDV. La mortalité est très différente en fonction du statut sérologique des animaux : elle est de 97 % chez les séronégatifs, 78% chez les douteux contre seulement 22% chez les faiblement séropositifs et 4% chez les fortement positifs (Rodak *et al*, 1990), (Moussa *et al*, 1992). Les anticorps produits contre le virus non pathogène ayant infecté les lapins dans cette dernière étude sont donc partiellement protecteurs contre le RHDV.

Si les premiers résultats ont d'abord conclu à l'existence de virus non pathogènes mais protecteurs contre le RHDV, d'autres observations ont abouti à des conclusions différentes. C'est le cas d'une étude menée en France en 2001 sur des lapins sauvages lors d'une épizootie de VHD, qui a mis en évidence l'existence d'anticorps non protecteurs dirigés contre un virus apparenté au RHDV. En effet, des lapins présentant des titres en anticorps anti-RHDV suffisants pour conférer une protection contre toutes les souches de RHDV ou virus apparentés, donc présumés protégés, ont déclaré une forme aiguë de VHD qui leur a été fatale (Marchandeau *et al*, 2005). Cette observation a également été faite en Australie où un calicivirus non pathogène relié sérologiquement au RHDV mais ne protégeant pas les animaux d'une infection naturelle par le RHDV a été détecté (Robinson *et al*, 2002). Cependant, des lapins positifs en ELISA provenant de régions indemnes de VHD du même pays ont survécu à une épreuve avec une dose létale de RHDV (Nagesha *et al*, 2000). Ces résultats semblent être contradictoires mais ils peuvent s'expliquer par des titres en anticorps protecteurs différents en fonction de l'intensité de la réponse immunitaire. En fait, les virus apparentés au RHDV protègent partiellement les lapins de la VHD, cette protection étant fonction des titres en anticorps. Il semble exister une relation entre la mortalité due à la VHD et les titres en anticorps anti-virus apparentés au RHDV : la mortalité diminue quand les titres en IgG augmentent (Cooke *et al*, 2002).

4. Séquences nucléotidiques et protidiques

La séquence du gène de la protéine de capsidé de différents virus apparentés au RHDV, dont le RCV, a été obtenue après amplification par RT-PCR, et comparée à celle du RHDV pathogène.

Ainsi, la comparaison de la séquence de la protéine de capsidé du RCV à celle de la VP60 de différentes isolats de RHDV montre une identité moyenne en acides aminés de 91,5%. Si ce degré d'identité est élevé il est toutefois significativement inférieur à celui des membres du groupe des RHDV qui est de 98% (Capucci *et al*, 1996). L'identité entre le RCV et l'EBHSV est de 75% ce qui est comparable à la valeur moyenne entre l'EBHSV et les isolats de RHDV (76,4%). Si on limite la comparaison à la moitié C-terminale de la protéine de capsidé (acides aminés 301-434) qui constitue la surface externe des virions, l'identité est réduite à 83,4% ce qui souligne davantage les différences entre le RCV et le RHDV. Nous savons que des différences minimes dans la séquence primaire des protéines virales peuvent occasionner de profonds changements dans le tropisme viral et la pathologie, les différences

décrivées ici sont ainsi probablement liées au tropisme original du RCV et de son absence de pathogénicité.

La comparaison des séquences génomiques du RCV et des souches pathogènes connues, permet donc de différentier facilement ces 2 types de virus : le RCV a une réelle identité génétique, contrairement à d'autres virus apparentés au RHDV. En effet, plusieurs études réalisées en Angleterre (Moss *et al*, 2002), (White *et al*, 2004) et en Nouvelle-Zélande (Forrester *et al*, 2003) ont permis d'isoler des souches de RHDV non pathogènes dont la séquence nucléotidique n'est pas distinguable de celle des souches pathogènes. Des parties de séquences d'ARN codant pour la protéine de capsid provenant de foies ou de sérum de lapins sains séropositifs ont été séquencées puis étudiées par analyses phylogéniques. Celles-ci ont révélé que ces isolats occupaient la même branche que les virus isolés à partir de cadavres apparemment victimes de VHD prélevés sur les mêmes sites d'études, et également que les différents isolats connus pour être pathogènes (Moss *et al*, 2002), (White *et al*, 2004). Aucune différence significative et caractéristique n'a pu être mise en évidence dans la région du génome testée.

5. Organisation génomique

L'organisation de la région 3' du génome du RCV et sa comparaison au RHDV a permis de rattacher ce virus au genre *Lagovirus* comprenant déjà le RHDV et l'EBHSV. En effet, la séquence des bornes entre le gène de l'ARN polymérase et celui de la VP60 est strictement identique entre le RHDV et le RCV, ce qui suggère que la continuité du cadre de lecture est conservée chez le RCV (Capucci *et al*, 1996). De plus, la maturation de la polyprotéine entre les domaines de l'ARN polymérase et la VP60 semble être identique au RHDV puisque le site de clivage pour la protéase est conservé chez le RCV (Capucci *et al*, 1996). L'organisation génomique du RCV est donc la même que celle du RHDV.

III. Épidémiologie des calicivirus apparentés aux RHDV

Les données concernant l'épidémiologie des virus apparentés au RHDV sont encore assez rares et se rapportent surtout au RCV qui est le mieux caractérisé.

Comme le RHDV, le RCV a une spécificité d'hôte, les lièvres n'y sont pas sensibles, il n'est pas possible de les infecter expérimentalement (Capucci *et al*, 1996). Les infections par

les virus apparentés au RHDV touchent les lapins d'élevage et les populations sauvages, et aucun anticorps n'a été détecté sur des lièvres.

Une transmission horizontale du RCV par contact a été mise en évidence puisque des lapins séropositifs introduits dans une cage abritant des lapins infectés par le RCV se séropositive en 1 à 2 jours. Par contre des lapins placés dans la même pièce mais n'étant pas en contact avec les lapins infectés (autre cage à proximité) ne sont pas contaminés : ils restent séronégatifs (Capucci *et al*, 1996). En ce qui concerne le RCV, l'origine du virus semble être externe à l'élevage sujet de l'étude, la séroconversion ayant été attribuée à l'introduction de lapins provenant d'un fournisseur commercial (Capucci *et al*, 1997).

Apparemment, les virus apparentés au RHDV sont présents dans la plupart des populations de lapins sauvages et sont responsables d'infections persistantes (Marchandeau *et al*, 1998), (Cooke *et al*, 2002), (White *et al*, 2004). Ces virus modifieraient alors l'épidémiologie de la VHD car dans la nature, les anticorps qu'ils induisent confèrent souvent une certaine protection aux lapins face à la maladie. Ainsi, en Australie, il a été observé que la mortalité causée par les épizooties de VHD dans les régions plutôt fraîches et où les précipitations sont importantes était inférieure à celle observée dans les régions plus arides. En parallèle, les analyses sérologiques ont révélé que les lapins peuplant ces régions avaient des titres plus élevés en anticorps anti-virus apparentés au RHDV (Cooke *et al*, 2002). Ainsi, ces virus qui affectionnent les zones où les précipitations sont importantes seraient responsables de la baisse de mortalité durant les épizooties de VHD et modifieraient la répartition géographique du RHDV en fonction du climat des régions. Les virus apparentés au RHDV sont également suspectés d'être responsables de la répartition particulière de la VHD dans les populations sauvages en France (Marchandeau *et al*, 1998) et en Angleterre (White *et al*, 2001). En France, par exemple, la VHD se manifeste sous forme de nombreux cas ponctuels sans liens ni continuités géographiques. La plupart des populations sauvages contiennent une forte proportion de séropositifs sans que des cas de VHD n'aient été suspectés ou rapportés. Il est donc possible que le RHDV ne s'exprime que dans les populations où ces virus non ou peu pathogènes n'ont pas provoqué une protection immunitaire suffisante ou dans les populations ayant subi un stress responsable d'une diminution de l'immunité (Marchandeau *et al*, 1998).

Plusieurs autres hypothèses ont été formulées pour expliquer les forts taux de séropositivité des populations sauvages en l'absence de mortalité, en sachant que les analyses

phylogénétiques réalisées n'ont pas permis d'identifier une souche non pathogène différente des souches pathogènes connues (White *et al*, 2004). Les auteurs ont alors suggéré que certains lapins avaient été infectés par une souche pathogène lorsqu'ils avaient moins de 2 mois, mais cette explication n'est pas suffisante car des séroconversions ont été mises en évidence chez des lapins plus âgés. Une autre hypothèse proposée est l'existence d'une seule souche de RHDV capable de se propager de 2 manières différentes, c'est à dire sous un mode pathogène ou non pathogène. La survenue de l'infection dépendrait alors de la taille de l'inoculum, de fortes doses entraînant une forme aiguë de maladie alors que de faibles doses causeraient des infections chroniques. Enfin, la dernière hypothèse consiste en l'existence d'une souche de RHDV non pathogène différente du RCV et présentant des modifications génomiques par rapport aux souches pathogènes du RHDV dans des régions du génome qui n'ont pas été encore analysées (White *et al*, 2004). Dans ce cas, les virus pathogènes et non pathogènes cohabiteraient en même temps, l'un dominant l'autre dans certaines populations et inversement. Selon ce point de vue, lorsque les souches non pathogènes dominent, les pathogènes causent une mortalité passagère et lorsque ce sont les souches pathogènes qui dominent, des épizooties répétées ont lieu (White *et al*, 2001).

Les études sérologiques suggèrent que les anticorps dirigés contre les virus non pathogènes sont présents de manière endémique dans les populations sauvages mais ne renseignent pas sur la persistance du virus. En Angleterre, une recherche d'ARN de *Lagovirus* a été effectuée sur une longue période à partir de sérum prélevés sur des lapins sains séropositifs (White *et al*, 2004). Les résultats ont suggéré que le virus non pathogène présent sur les sites d'études était capable de persister dans les hôtes infectés pendant une longue période en dépit de la présence d'une réaction immunitaire forte. Cependant, l'absence de virus dans certains sérum contenant des anticorps suggère que l'infection peut être finalement éliminée, à moins que l'ARN soit présent mais n'ait pas pu être détecté ou que le virus ne soit pas présent dans le sérum mais se trouve dans d'autres organes.

IV. Origine probable du RHDV

Les terribles épizooties de VHD qui ont frappé de nombreux pays européens entre 1985 et 1988 ont été causées par la soudaine émergence du RHDV. Cependant, comme nous l'avons vu, les analyses sérologiques rétrospectives ont montré que des anticorps anti-RHDV étaient présents dans des sérum collectées plusieurs années avant que les premiers cas de

VHD soient rapportés. Ainsi, un virus proche du RHDV était présent dans les populations de lapins avant 1984, sans que son existence n'ait été soupçonnée compte tenu de son manque de pathogénicité. Les analyses phylogéniques suggèrent même que ce virus circulait en Angleterre et en Europe depuis plusieurs siècles (Moss *et al*, 2002). Le RHDV aurait donc évolué à partir d'un virus non pathogène déjà présent dans la nature (Capucci *et al*, 1996). Les modes de cette évolution ne sont encore que des suppositions et restent à être démontrés.

TROISIEME PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE

TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Des résultats récents ont montré l'existence de virus apparentés au RHDV de pathogénicité plus faible, voire nulle. Les anticorps qu'ils induisent sont détectés par les tests sérologiques utilisés actuellement pour le diagnostic de la VHD, qui ne sont donc pas spécifiques au RHDV. Ainsi, des résultats sérologiques positifs ne traduisent pas forcément une circulation du RHDV dans la population. Ceci est un frein à la compréhension du fonctionnement de la VHD et notamment de son interaction avec la structure des populations.

Afin de faire progresser nos connaissances sur les virus apparentés au RHDV nous avons décidé de réaliser cette étude visant à isoler de nouvelles souches virales susceptibles de circuler dans des populations animales témoins, et de caractériser leurs différences antigéniques et génomiques avec le RHDV.

Pour cela, nous avons choisi de surveiller au niveau sérologique et virologique des lapins sentinelles mis au contact de populations sauvages. Le protocole choisi a été de placer des lapins sensibles séronégatifs sur deux territoires d'étude différents (Cerizay (79) et St Benoist (78)) dans des cages d'élevage en plein air, dans des secteurs abritant des populations de lapins sauvages, et de les déplacer régulièrement puis de réaliser une recherche virale lorsqu'une séroconversion a lieu. Les lapins ont été transportés depuis l'animalerie jusqu'à ces 2 sites d'étude où ils ont été placés en clapiers avant leur mise au contact des lapins sauvages. Le protocole de départ a finalement dû être modifié car dès le premier contrôle sérologique réalisé alors que les lapins étaient encore en clapiers, certains d'entre eux se sont révélés être séropositifs. Les lapins n'ont donc pas été placés dans les cages au contact des populations sauvages et le protocole a été poursuivi comme si les lapins avaient été contaminés dans la nature. Ils ont été sacrifiés et les prélèvements et manipulations en laboratoire ont été réalisés comme prévu dans le protocole de départ.

I. Matériels et méthodes

Les lapins ont été fournis par l'unité animale de l'AFSSA de Ploufragan. Il s'agit de lapins d'élevage (Néo-Zélandais) âgés de 10 à 12 semaines, donc a priori sensibles aux infections à calicivirus. Ils sont indemnes de RHDV et identifiés à l'aide de deux marques de type Présadom® numérotées et apposées à chaque oreille.

1. Réalisation des prélèvements qui seront analysés en laboratoire

a. Réalisation des prélèvements sanguins

L'ensemble des lapins subit deux prélèvements sanguins, un dans un tube afin de récupérer le sérum et l'autre sur buvard. Les prélèvements sont réalisés par des agents de l'ONCFS.

Prise de sang : 1 à 2 ml de sang sont prélevés dans un tube eppendorf de 2 ml en pratiquant une incision sur la veine marginale externe de l'oreille à l'aide d'une lame de rasoir propre et désinfectée. Ensuite, une extraction du sérum est réalisée en suivant un protocole précis. Le prélèvement est d'abord laissé 24 heures au réfrigérateur afin que le caillot se forme. Puis celui ci est décollé des parois du tube avec une pipette pasteur ou tout autre objet fin et propre. Le tube est alors refermé et retourné sans être secoué puis laissé une nuit au réfrigérateur afin que le caillot exsude. Le lendemain matin, le tube est placé ½ heure à température ambiante puis le sérum est transféré dans un tube eppendorf préalablement identifié et centrifugé 10 minutes à 2000 rpm. Le sérum clarifié est alors prélevé délicatement et transféré dans un nouveau tube eppendorf identifié puis congelé. Les sérum récoltés sont stockés au congélateur et pourront être envoyés pour des analyses complémentaires si nécessaire.

Prélèvement sur buvard : le buvard est imbibé totalement sur une zone de 2 cm environ puis il est immédiatement séché au sèche cheveux à basse température et envoyé en Chronopost au laboratoire de virologie de l'ENVT. Dès réceptions, les buvards sont analysés en sérologie vis à vis de la VHD et les résultats sont communiqués.

b. Réalisation des prélèvements d'organes

Les animaux séropositifs sont abattus puis le foie, la rate, l'intestin grêle et son contenu sont prélevés et congelés en indiquant sur chaque prélèvement le numéro de l'animal. Tous les prélèvements sont réalisés en double exemplaire et après congélation, ils sont envoyés sous couvert du froid à l'ENVT et à l'AFSSA de Ploufragan où a lieu la recherche de virus.

Nous traiterons par la suite des manipulations réalisées au laboratoire IHVV au sein de l'UMR 1225 INRA-ENVT. Nous commencerons par les études sérologiques, en décrivant le

principe de l'ELISA puis sa réalisation pratique. Nous nous intéresserons ensuite à la recherche de virus qui débute par une extraction des ARN totaux à partir des différents prélèvements d'organes et de sérum, suivie d'une RT-PCR avec des amorces spécifiques du gène codant pour la VP60. Enfin, nous décrirons la méthode utilisée pour accéder à la séquence du gène de la VP60.

2. Etudes sérologiques par ELISA

a . Principe de l'ELISA

La technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est une méthode de dosage immunoenzymatique. Elle consiste à mettre en évidence une réaction Antigène-anticorps au moyen d'une enzyme capable de modifier la coloration d'un substrat.

Les anticorps à doser réagissent dans un premier temps avec l'antigène immobilisé sur une microplaqué, et dans un deuxième temps, la quantité d'anticorps liés est mesurée à l'aide d'un deuxième anticorps (anti-immunoglobuline) marqué par une enzyme, l'activité enzymatique étant proportionnelle à la quantité d'anticorps à doser (voir figure 5). Le dosage est qualitatif par l'observation du virage du substrat chromogène ajouté à la réaction, et il peut être quantitatif par mesure de la densité optique du substrat coloré. Par exemple, dans notre manipulation, le para-nitro-phénylphosphate est hydrolysé par la phosphatase alcaline en para-nitro-phénol de coloration jaune.

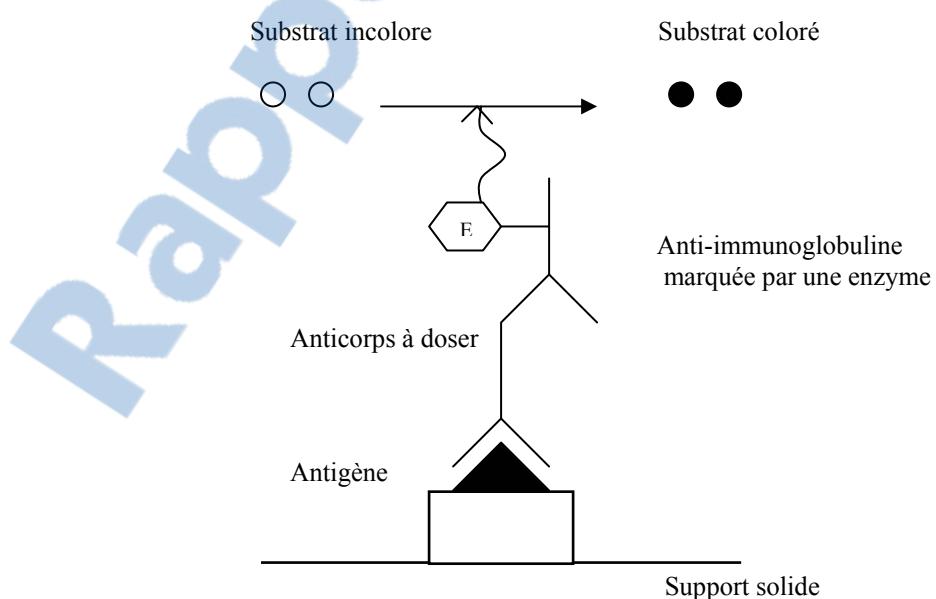


Figure 5 : Schéma de principe de l'ELISA.

b. Réalisation pratique

La détection des anticorps se fait en prélevant trois disques de 6 mm de diamètre, découpés à l'emporte pièce dans la zone imprégnée de sang desséché de chaque buvard. Ils sont placés trois par trois pour chaque prélèvement dans une cupule de plaque de 96 puits avec 150 μ l de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4) pour extraire le sérum. Après une nuit de réhydratation à +4°C, chaque éluat est dilué au 1/20^e avec du PBS.T (PBS additionné de 0,1% de Tween 20), ce qui correspond à une dilution au 1/100^e du sérum frais, puis cette dilution est utilisée dans une autre microplaqué (Probind Falcon®) pour analyse en réaction ELISA indirecte.

Les antigènes utilisés sont des VLPs produites en système baculovirus recombinant sur cellules d'insectes. Les cupules de la microplaqué sont tapissées de VP60 par distribution de 100 μ l de VP60 diluée au 1/400^e dans du tampon pipès_NaCl pH 6,4 et incubation pendant une nuit à 37°C. La plaque est ensuite vidée et lavée 3 fois avec du PBS. Chaque cupule est alors saturée par 100 μ l d'une solution de gélatine à 15 mg/ml de PBS pendant 1 heure à 37 °C. La plaque est ensuite lavée 3 fois avec du PBS.T. Des « duplicate » d'éluat de 100 μ l chacun sont ensuite réalisés. Des sérum standards positif et négatif sont inclus dans chaque plaque et constituent les témoins. La plaque est incubée une heure à 37°C afin que les anticorps s'adsorbent sur les antigènes immobilisés sur la plaque.

Après 3 nouveaux lavages au PBS.T, un anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G de lapin conjugué à la phosphatase alcaline dilué au 1/3000^e dans du PBST est distribué à raison de 100 μ l par cupule et incubé à 37°C pendant 1 heure. La plaque est lavée 4 fois au PBS.T et 1 fois au PBS puis le substrat PNPP (disodium para-nitrophénol phosphate) à une concentration de 1mg/ml dans un tampon de diéthanolamine à 10 % (pH 9,7) est ajouté sous un volume de 100 μ l par cupule. La plaque est placée à température ambiante et à l'abri de la lumière durant 12 minutes puis la réaction est stoppée par addition de 50 μ l par cupule d'une solution de soude 2N. La lecture est alors effectuée par mesure de la densité optique sur un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 405 nm. La réaction est considérée positive lorsque la densité optique est supérieure ou égale au triple de la valeur obtenue pour le sérum négatif standard.

3. Recherche du virus par RT-PCR

La recherche de virus débute par une extraction des ARN totaux à partir des différents prélèvements d'organes et de sérum. L'extraction à partir des organes est réalisée au Trizol® et à l'aide d'un kit en ce qui concerne les sérum. Ensuite, une rétro-transcription est réalisée à partir des ARN extraits ce qui permet d'obtenir l'ADNc qui subit par la suite des PCR utilisant des amorces spécifiques du gène codant pour la VP60 .

a. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN concerne 2 types de prélèvements congelés : des organes et du sérum. Il s'agit de l'ensemble des organes ayant été prélevés après l'abattage des lapins (foie, rate, intestin grêle) et également du sérum de quelques lapins.

Extraction d'ARN à partir d'organes :

L'extraction d'ARN sur les organes est réalisée au Trizol® (Invitrogen), puis elle est complétée par une étape de nettoyage de l'ARN à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Clean-up (Macherey-Nagel).

Le Trizol® est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet l'isolement des ARN totaux contenus dans les tissus. Durant l'homogénéisation de l'échantillon, les cellules sont détruites et les composants cellulaires dissous alors que l'intégrité de l'ARN est conservée. L'ajout de chloroforme suivi d'une centrifugation entraîne la séparation de la solution en une phase aqueuse et une phase organique, l'ARN se trouvant exclusivement dans la phase aqueuse. Après le transfert de la phase aqueuse, l'ARN est récupéré par précipitation avec de l'isopropanol. L'ARN isolé avec cette technique est ainsi dépourvu de contamination par des protéines ou de l'ADN.

L'extraction est réalisée sous une hotte aspirante, en utilisant des tubes stériles et des pipettes réservées au travail sur ARN et en portant des gants afin d'éviter des contaminations par des RNases.

Les échantillons sont traités 6 par 6, en suivant le protocole suivant :

- Homogénéisation : Prélever un fragment d'organe encore congelé d'environ 6mm x 6mm de coté et le dilacérer dans une boite de Pétri jusqu'à obtention d'une pâte liquide à l'aide d'une lame de scalpel. Transférer dans un tube à centrifugation, ajouter 1 ml de Trizol® et

homogénéiser le tout en vortexant (10 à 15 minutes). Centrifuger 10 minutes à 4°C à 12000 g afin d'enlever le matériel insoluble (membranes extracellulaires, polysaccharides, ADN de haut poids moléculaire) qui se retrouve alors dans le culot. Transférer le surnageant contenant les ARN dans un nouveau tube à centrifugation.

- Séparation des phases : Incuber les échantillons 5 minutes à température ambiante afin de permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Ajouter 200µl de chloroforme, fermer les capuchons des tubes et les secouer vigoureusement à la main durant 15 secondes puis les incuber à température ambiante durant 3 minutes. Ensuite, centrifuger les échantillons 15 minutes à 4°C à 12000 g, le mélange se sépare alors en une phase inférieure phénol-chloroforme rouge, une phase intermédiaire et une phase aqueuse supérieure incolore contenant l'ARN.

- Précipitation de l'ARN : Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube, et précipiter l'ARN en mélangeant avec 500µl d'isopropanol. Incuber 10 minutes à température ambiante et centrifuger 10 minutes à 4°C à 12000 g, le précipité d'ARN toujours invisible avant la centrifugation forme alors un culot gélatineux au fond du tube.

- Lavage de l'ARN : Retirer le surnageant, laver le culot d'ARN avec 1ml d'éthanol 75% puis centrifuger 5 minutes à 4°C à 7500 g.

- Dissolution de l'ARN : Retirer le maximum de surnageant (faire remonter les gouttes sur le bord du tube) et sécher le culot d'ARN en laissant le tube ouvert à l'air ambiant durant 15 minutes environ. Enfin, dissoudre l'ARN dans 200µl d'eau stérile RNase free.

Après l'isolement de l'ARN, une étape de nettoyage de l'ARN est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Clean-up afin d'obtenir un maximum de stabilité et d'éliminer les inhibiteurs de RT-PCR, toujours présents après un isolement de l'ARN avec des méthodes fondées sur le phénol-chloroforme. Avec ce kit, les échantillons contenant l'ARN sont mélangés à une solution inactivant immédiatement les RNases et créant des conditions favorisant l'adsorption de l'ARN à la membrane de silice des colonnes. Des étapes de lavages permettent ensuite de retirer les sels, métabolites et composés organiques, puis l'ARN est finalement élué avec de l'eau dépourvue de RNase.

De même que pour l'extraction, les étapes de nettoyage sont réalisées en portant des gants, en utilisant des tubes stériles et des pipettes réservées au travail sur ARN afin d'éviter des contaminations par des RNases. Le kit est utilisé en respectant les recommandations du fabricant, le protocole est décrit dans la figure 6.

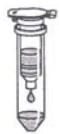
1. Préparation de l'échantillon  Pré-mélange : 300µl RA1 300µl éthanol +100µl d'ARN, mélanger	3. Lavages de la membrane  1 ^{er} lavage : 700µl RA2 2 nd lavage : 350µl RA3  1 ^{er} : 30 sec à 8000g 2 nd : 2 min à 8000g 3 min à température ambiante
2. Fixation de l'ARN à la membrane  Charger les 700µl  Centrifuger 30s à 8000g	4. Elution de l'ARN  60µl H ₂ O  1 min à 8000g

Figure 6 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA Clean-Up.

Extraction d'ARN à partir de sérum :

La recherche du virus par RT-PCR dans le sérum ne concerne pas tous les lapins et a été réalisée dans un deuxième temps, après le traitement des organes. Les lapins testés ont été ciblés, il s'agit de lapins séropositifs pour lesquels du virus a été détecté par RT-PCR dans les organes. Il s'agit de 4 lapins provenant du site de St Benoist (AR 12, 28, 42, 50) et 3 lapins provenant du site de Cerizay (JA 1611, 1665, 1669).

L'extraction d'ARN à partir du sérum est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel). De même que pour le kit NucleoSpin® RNA Clean-up, la solution utilisée inactive les RNases et favorise l'adsorption de l'ARN sur la membrane de silice. L'ADN contaminant qui se fixe lui aussi à la membrane est éliminé par une solution de DNase I qui est directement appliquée sur la membrane. Des lavages avec deux tampons différents permettent l'élimination des sels, métabolites et composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN est finalement élué avec de l'eau.

L'extraction est réalisée en portant des gants, en utilisant des tubes stériles et des pipettes réservées au travail sur ARN afin d'éviter des contaminations par des RNases. Les échantillons de sérum sont décongelés à température ambiante puis 100µl sont prélevés.

Le kit est utilisé en respectant les recommandations du fabricant, le protocole est décrit dans la figure 7.

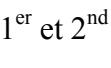
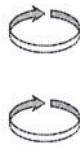
1. Lyse cellulaire	4. Digestion de l'ADN
 100µl sérum 350µl RA1, mélanger 350µl éthanol 70%, mélanger	 95µl mélange DNase 15 min température ambiante
2. Fixation de l'ARN à la membrane	5. Lavages de la membrane
 Charger les 800µl  30 sec à 8000g	 1 ^{er} lavage : 200µl RA2 2 nd lavage : 600µl RA3 3 ^{ème} lavage : 250µl RA3  30 sec à 8000g  2 min à 11000g
3. Dessalage de la membrane	6. Elution de l'ARN
 350µl MDB  1 min à 11000g	 60µl H ₂ O  1 min à 11000g

Figure 7 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA II.

b. Réalisation de la RT

Suite à l'extraction, la quantité d'ARN présent dans l'éluat est évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm. Ensuite, la réaction de rétro-transcription (RT) est réalisée avec la SuperScript® II RT (Invitrogen), sans congélation intermédiaire afin de ne pas altérer les ARN. Les amorces employées sont des amorces aléatoires (Random primers, Invitrogen), ainsi l'ensemble des ARN subit la RT ; ce n'est qu'au moment de la PCR que des amorces spécifiques de la VP60 sont utilisées.

Le protocole de la RT est le suivant :

- Ajouter dans un tube à centrifugation 250ng de random primers, 1µl de mélange de dNTP à 10 mM chacun, 1µg environ d'ARN (en fonction de la densité optique mettre un volume rond

se rapprochant de 1 μ g, d'après le fabricant on peut mettre entre 1ng et 5 μ g) et compléter avec de l'eau stérile jusqu'à 12 μ l.

- Chauffer le mélange 5 minutes à 65°C et refroidir dans la glace rapidement. Récupérer le contenu du tube par une centrifugation courte et ajouter 4 μ l de tampon 5X First-Strand, 2 μ l de 0,1 M DTT et 1 μ l de RnaseOUT (40 unités/ μ l).
- Mélanger doucement et incuber 2 minutes à 25°C.
- Ajouter 1 μ l (200 unités) de SuperScript II RT, mélanger en pipetant doucement et incuber 10 minutes à 25°C, puis 50 minutes à 42°C.
- Inactiver la réaction en chauffant 15 minutes à 70°C.

c. Réalisation des PCR nichées et semi-nichées

La dernière étape de la recherche de virus consiste en la réalisation de réactions de PCR sur les ADNc obtenus par la réaction de RT. Pour cela, des amorces spécifiques de la VP60 sont utilisées afin de détecter la présence de séquence codant pour la VP60 au sein de l'ensemble des ADNc. Si une amplification a lieu, cela signifie que du virus apparenté au RHDV était présent dans les échantillons d'organes ou de sérum testés.

Amorces

Les amorces utilisées ont été choisies à partir de la séquence connue du gène de la VP60 du RHDV pathogène, leur séquence et leur position sont données dans le tableau 1.

Tableau 1 : Séquence et position des amorces utilisées pour la détection du virus.

Amorce	Sens	Séquence (5'-3')	Position (nt)*
VP60 aS	sens	TGGGCTGGTGGCATGCAGTT	337-357
VP60 bS	sens	AGGCCAAGTGAGGACTTGAGT	647-668
VP60 aAS	antisens	ATGTCAGGAAAGCCATCTGGTG	996-1018
VP60 bAS	antisens	GAACATGATGGGTGTGTTCTT	1370-1391

* Les positions font référence à la séquence de la VP60 du RHDV pathogène.

Afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité du test, nous avons réalisé des PCR nichées et semi-nichées, donnant des amplicons de petite taille. Pour réaliser la détection du virus, nous nous sommes limités à 3 PCR différentes, nommées PCR 2A, 2B, et 2C que nous

avons réalisées sur l'ensemble des échantillons. La PCR 2A est une PCR nichée, la première PCR utilise les amorces externes et la deuxième, les amorces internes. Pour les PCR semi-nichées 2B et 2C, l'amorce sens est la même pour les 2 étapes, la 1^{ère} utilise l'amorce anti-sens externe et la 2^{ème}, l'interne (voir tableau 2). Dans tous les cas, c'est le produit de la 2^{ème} PCR que nous recherchons afin de déterminer la présence de virus.

Tableau 2 : Utilisation des amorces et description des amplicons produits.

PCR	Amorces utilisées			Amplicon		
	1 ^{ère} PCR	T _H (°C)	2 ^{ème} PCR	T _H (°C)	Position (nt)	Taille (pb)
2A	VP60 aS VP60 bAS	57	VP60 bS VP60 aAS	60	647-1018	371
2B	VP60 bS VP60 bAS	57	VP60 bS VP60 aAS	60	647-1018	371
2C	VP60 aS VP60 bAS	57	VP60 aS VP60 aAS	55	337-1018	681

T_H : Température d'hybridation.

Mélange réactionnel et répartition

Pour l'amplification, nous avons utilisé la Taq Polymérase (Qbiogene, 5U/μl). Le tampon (trisCl 100mM pH 8,3, KCl 500mM, MgCl₂ 15mM) et le mélange de dNTP (10mM chacun) utilisés proviennent du même fabricant, quant aux amorces, elles sont utilisées à la concentration de 10μM. Nous avons d'abord réalisé un mélange réactionnel que nous avons ensuite réparti dans des microtubes. Les réactions sont réalisées dans un volume final de 50μl/tube. Les réactifs sont utilisés selon les recommandations du fabricant, ainsi les amorces sont à 20X par rapport à la concentration finale, le tampon à 10X, les dNTP à 50X, la Taq est utilisée à raison de 1U/tube et de l'eau pure est ajoutée jusqu'à obtention du volume adéquat.

Pour la 1^{ère} PCR (PCR 1), le mélange réactionnel est réparti à raison de 48μl par tube auxquels sont ajoutés 2μl d'ADNc. Pour la 2^{ème} PCR, il est réparti à raison de 49μl auxquels sont ajoutés 1μl de PCR 1 pour la PCR 2A et 1μl de PCR 1 diluée au 1/10^e pour les PCR 2B et 2C. Des contrôles positifs et négatifs sont inclus à chaque étape des réactions, le plasmide pBG3 (contenant le gène codant pour la VP60) nous servant de témoin positif et le mélange réactionnel étant réparti seul pour le témoin négatif.

Cycles de PCR

Un total de 35 cycles est effectué, chacun débutant par une étape de dénaturation de 40 secondes à 94°C suivie par une étape d'hybridation de 40 sec à une température variant en fonction du couple d'amorce utilisé (voir tableau 2), et pour terminer, une étape d'elongation de 1 minute à 72°C.

Electrophorèse

Les produits d'amplification sont analysés par une électrophorèse en gel d'agarose réalisé avec un tampon TBE (Tris Borate d'EDTA) contenant 1,5% d'agarose. 8μl de produit de PCR mélangés à 2μl de tampon de charge (bleu de bromophénol) sont déposés ainsi que 3μl de marqueur de poids moléculaire (1 kb Gibco BRL) puis le gel est immergé dans du TBE. La migration de l'ADN est effectuée sous une tension de 100 volts. Pour la révélation, le gel est immergé dans une solution de BET (Bromure d'éthydium) à 10 μg/ml pendant 10 minutes puis rincé et examiné sous rayonnement UV ($\lambda = 312$ nm).

4. Séquençage du gène de la VP60

a. Obtention des amplicons

Les amores décrites plus haut permettent d'accéder à la partie interne de la séquence codant pour la VP60. Afin d'obtenir le maximum de cette séquence, d'autres amores choisies à partir de la séquence du gène de la VP60 du RHDV pathogène ont été utilisées (voir tableau 3). Plusieurs couples d'amores ont été testés avec plusieurs combinaisons en PCR nichées, par exemple, la fin de la séquence est obtenue en utilisant en PCR 1 les amores VP60 aS et VP2 AS (T_h : 52°C) et en PCR 2 VP60 bS et VP2 AS (T_h : 52°C).

Tableau 3 : Séquence et position des amores utilisées pour obtenir la séquence du gène codant pour la VP60.

Amorce	Sens	Séquence (5'-3')	Position (nt)*
VP60 deb	sens	ATGGAGGGCACACACA	1- 16
VP2 S	sens	TGCAACCAGTACCTGGGGGG	792-811
1611 AS	antisens	GGCACTAGCGTACCAAGAACT	942-961
VP2 AS	antisens	ATTAGCTACACCCCCCAGGTT	1702-1723

* Les positions font référence à la séquence de la VP60 du RHDV pathogène.

b. Séquençage des amplicons

Le séquençage est réalisé sur les produits de PCR après une purification par extraction sur gel à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel). Le principe est que l'ADN se fixe sur une membrane de silice et les contaminants tels que les sels et les composants macromoléculaires solubles sont éliminés par un lavage avec un tampon contenant de l'éthanol. Le kit permet l'élimination complète des amorces des réactions de PCR alors que les petits fragments d'ADN restent fixés à la membrane.

On réalise d'abord une électrophorèse des produits de PCR (même protocole que dans la partie 3c, excepté que l'on fait migrer à 60 V). Le kit est utilisé selon les recommandations du fabricant, le protocole est décrit dans la figure 8. Le produit de PCR ainsi purifié est séquencé par le laboratoire Millegen.

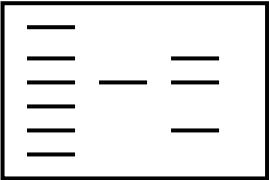
1. Excision du fragment d'ADN 	4. Lavage de la membrane  600µl NT3  1 min à 11000g
2. Lyse du gel  200µl NT/ 100 mg de gel 50°C 5-10 min	5. Séchage de la membrane  2 min à 11000g
3. Fixation de l'ADN à la membrane  Charger la colonne  1 min à 11000g	6. Elution de l'ADN  50µl NE 1 min à température ambiante  1 min à 11000g

Figure 8 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® Extract II.

c. Analyse des séquences

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences connues de calicivirus de lagomorphes (RHDV, RCV, EBHSV) à l'aide du logiciel DNA Strider qui permet de réaliser un alignement de séquences. Les pourcentages d'identité sont évalués afin de déterminer si le virus identifié est génétiquement proche de souches ou virus déjà identifiés.

II. Résultats

1. Résultats sérologiques

L'ensemble des échantillons sur buvard a été analysé en sérologie ELISA ; les résultats sont donnés dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Résultats sérologiques des lapins du site de Cerizay.

Lapin	31.01.06	06.02.06	13.02.06	20.02.06
JA 1611	-	-	-	sacrifié
JA 1613	-	+	sacrifié	
JA 1615	-	+	sacrifié	
JA 1617	-	-	+	
JA 1619	+	+	mort le 19.02	
JA 1621	-	-	+	
JA 1623	-	-	+	
JA 1625	-	-	+	
JA 1627	+	+	mort le 19.02	
JA 1629	+	+		mort le 20.02
JA 1631	-	-	+	
JA 1633	+	+		mort le 20.02
JA 1635	-	-	+/-	
JA 1637	-	-	-	
JA 1639	+	+		mort le 21.02
JA 1641	-	-	-	sacrifié
JA 1651	-	+	sacrifié	
JA 1653	-	+	sacrifié	
JA 1655	+	+		
JA 1657	-	+	sacrifié	
JA 1659	+	+	mort le 19.02	
JA 1663	+	+	mort le 18.02	
JA 1665	-	+	sacrifié	
JA 1667	-	+	sacrifié	
JA 1669	-	+	sacrifié	
JA 1671	-	-	-	sacrifié
JA 1684	+	+		mort le 21.02
JA 1686	-	+		mort le 20.02
JA 1688	-	+	sacrifié	
JA 1690	-	+	sacrifié	

- : séronégatif

+/- : limite du seuil de positivité

+ : séropositif

Tableau 5 : Résultats sérologiques des lapins du site de St Benoist.

Lapin	31.01.06	06.02.06	13.02.06
AR 02	+	+	
AR 04	+	+	
AR 06	-	+	sacrifié
AR 08	+	+	sacrifié
AR 10	+	+	
AR 12	-	+	sacrifié
AR 14	+	+	
AR 16	+	+	
AR 18	+	+	
AR 20	+	+	
AR 26	-	+	
AR 28	-	+/-	sacrifié
AR 30	+	+	sacrifié
AR 32	-	+	
AR 34	-	+	sacrifié
AR 36	-	+	
AR 38	-	+	sacrifié
AR 40	-	+	sacrifié
AR 42	-	+	sacrifié
AR 44	+	+	sacrifié
AR 46	-	+	
AR 48	-	+	
AR 50	-	+/-	sacrifié
AR 52	+	+	sacrifié
AR 54	-	+	
AR 56	-	+	sacrifié
AR 58	-	+	
AR 60	-	+	sacrifié
AR 62	-	+	
AR 64	-	+	sacrifié

- : séronégatif

+/- : limite du seuil de positivité

+: séropositif titre faible

La première série d'analyse correspond à des prélèvements réalisés le 31.01.06, les lapins se trouvaient alors en clapiers. Les sérologies révèlent que certains lapins sont déjà séropositifs avant qu'ils soient mis en contact avec les populations sauvages : en effet, 1/3 des lapins des 2 sites est séropositif le 31.01.06.

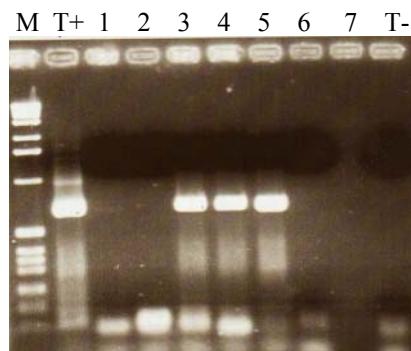
Les 2 autres séries d'analyses ont été effectuées à 7 jours d'intervalle alors que les lapins se trouvaient toujours en clapiers. Le 06.02.06, on note que de nouveaux lapins sont séropositifs : les 2/3 d'entre eux le sont désormais à Cerizay et la totalité des lapins à St Benoist. On assiste donc à une dynamique d'infection, de nouveaux lapins se contaminent dans les clapiers.

La troisième série d'analyse du 13.02.06 n'a été réalisée qu'à Cerizay, elle concerne peu de lapins. Ils sont alors quasiment tous séropositifs, seuls les lapins JA 1611, JA 1637, JA

1641 et JA 1671 sont restés séronégatifs et ont été sacrifiés le 20.02. Les autres lapins qui étaient déjà séropositifs le 06.02.06 ont été sacrifiés le 13.02 ou sont morts. En effet, une vague de mortalité a eu lieu sur le site de Cerizay où 9 lapins sont morts en montrant des signes de VHD entre le 18.02 et le 21.02, c'est à dire une vingtaine de jours après l'arrivée en clapier.

2. Résultats de la recherche de virus

L'amplification de fragments du gène de la VP60 est révélée par une électrophorèse. Les bandes obtenues sont comparées au marqueur de poids moléculaire afin de vérifier qu'elles correspondent à la taille attendue. Le témoin positif nous permet de vérifier que la PCR a bien fonctionné et le témoin négatif qu'il n'y a pas eu de contamination (voir illustration 2).



M : Marqueur de poids moléculaire

T+ : Témoin positif

1 : sérum du 31.01

T- : Témoin négatif

2 : sérum du 06.02 | JA 1611

5 : sérum du 31.01

3 : sérum du 13.02

6 : sérum du 06.02 | JA 1669

4 : sérum du 20.02

7 : sérum 13.02

Les séums 3, 4 et 5 sont positifs pour cette PCR.

Illustration 2 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR 2C des séums des lapins JA 1611 et JA1669.

a. Résultats de la recherche de virus sur les organes

Afin de rechercher le virus, 3 PCR nichées ou semi-nichées ont été réalisées pour chaque échantillon. Lorsqu'une des PCR est positive, on peut conclure à la présence du gène de la VP60 parmi les ADNc et donc de virus apparenté au RHDV dans l'organe correspondant. L'ensemble des résultats des PCR réalisées sur les organes prélevés après abattage, c'est à dire l'intestin, le foie et la rate sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des PCR 2A, 2B et 2C sur les organes intestin, foie et rate des lapins de Cerizay et St Benoist.

Lapins	PCR 2A			PCR 2B			PCR 2C		
	int.	foie	rate	int.	foie	rate	int.	foie	rate
JA 1611	+	+	-	+	+	+	-	+	-
JA 1613	-	-	-	+	+	+	-	-	+
JA 1615	+	-	-	-	+	+	+	-	-
JA 1635	+	-	-	+	-	-	+	-	-
JA 1637	-	-	+	+	-	+	-	-	+
JA 1641	+	-	-	+	-	+	-	-	-
JA 1651	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JA 1653	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JA 1657	-	-	+	-	-	+	-	-	-
JA 1665	+	-	+	-	-	+	-	-	+
JA 1667	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JA 1669	-	-	+	+	-	+	-	-	+
JA 1671	+	-	-	+	-	+	-	-	-
JA 1688	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JA 1690	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR 08	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AR 12	+	+	-	-	-	-	+	+	-
AR 28	+	+	+	+	-	+	-	+	-
AR 32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR 36	+	-	-	+	+	+	+	-	-
AR 38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR 42	-	+	-	+	+	+	-	-	+
AR 48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR 50	-	+	+	+	+	+	-	-	-
AR 54	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AR 58	-	-	-	-	+	+	-	-	-
AR 62	-	-	-	-	-	-	-	-	-

int. : intestin

- : PCR négative

+: PCR positive

Les résultats apparaissent assez différents en fonction des lapins, des organes et des PCR. Ce que l'on peut d'abord remarquer c'est que la plupart des animaux (2/3) a au moins une PCR positive, ce qui signifie que du virus est détecté chez 2/3 d'entre eux. Il n'y a pas de différence entre les lapins provenant de Cerizay ou de St Benoist, le nombre de positifs est identique. Si l'on s'intéresse ensuite aux variations entre les résultats des 3 PCR, on remarque que la PCR 2B est celle qui semble la plus sensible puisque 67% des animaux positifs le sont pour au moins un organe en PCR 2B, puis vient la PCR 2A (43%) et enfin la PCR 2C (40%).

Souvent, plusieurs PCR sont positives pour le même lapin mais on note des différences au niveau des organes. En étudiant les lapins qui sont positifs au moins une fois, on peut déterminer quel est l'organe qui, d'après notre méthode de détection, abrite le plus

souvent le virus. Si l'on ne fait pas de distinction entre les PCR et que l'on comptabilise le nombre d'organes positifs par rapport au nombre total du même organe étudié on obtient les résultats suivants : la rate est positive dans 48% des cas, l'intestin 43% et le foie 30%.

Si l'on compare ces résultats aux résultats sérologiques, on se rend compte que ceux-ci ne concordent pas forcément. En effet, du virus a été détecté par PCR chez des lapins qui sont restés séronégatifs comme le JA 1611 par exemple. Inversement, certains lapins séropositifs tel que le JA 1653 se sont révélés négatifs en PCR.

b. Résultats de la recherche de virus dans le sérum

La recherche de virus dans le sérum n'a pas été effectuée pour tous les lapins, seuls quelques uns ont été testés. Ce n'est qu'après avoir eu les résultats de PCR sur les organes que les sérum ont été analysés. Ils correspondent à des lapins ayant donné des résultats positifs en PCR, plus précisément ayant eu au moins un organe positif pour chaque PCR et provenant des 2 sites d'étude. Les sérum des lapins sélectionnés ont donc été envoyés dans un deuxième temps pour que des examens complémentaires soient réalisés, comme cela avait été prévu dans le protocole. Les résultats de ces PCR sont présentés dans le tableau 7 ; ils sont comparés aux résultats sérologiques.

Tableau 7 : Résultats des PCR 2A, 2B et 2C sur le sérum et comparaison aux résultats sérologiques.

Lapins	31.01.06				06.02.06				13.02.06				20.02.06			
	S	2A	2B	2C												
JA 1611	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	?	+	+	+
JA 1669	-	+	-	+	+	-	-	-	?	-	-	-				
JA 1665	-	-	-	-	+	-	-	-	?	-	-	-				
AR 12	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-				
AR 28	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
AR 42	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
AR 50	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				

S : sérologie

? ou vide : analyse non réalisée

- : sérologie ou PCR négative

+: sérologie ou PCR positive

Pour certains échantillons, la détection de virus dans le sérum s'est révélée négative. Seuls 5 échantillons sur 22 sont positifs pour au moins 1 PCR ce qui représente 22% d'entre eux.

On remarque qu'il ne semble pas y avoir de concordance entre les résultats sérologiques et ceux de détection de virus dans le sérum puisque de nombreux sérum séropositifs se révèlent négatifs en PCR et inversement, la plupart des sérum positifs en PCR sont séronégatifs (tous sauf AR 12 du 13.02).

Si l'on regarde les résultats obtenus pour le lapin JA 1611, on peut supposer que l'on a détecté du virus le 13.02 avant que l'animal se séropositive et que le virus est encore présent 7 jours plus tard puisque le 20.02 on en détecte encore. Par contre ceci ne semble plus être vrai pour les lapins JA 1669 et AR 28 pour lesquels on n'a plus détecté de virus après le 31.01 alors qu'à cette date ils étaient séronégatifs et se sont positivés par la suite.

3. Résultats de séquençage des amplicons

a. Séquençage

Les amplicons séquencés ont été obtenus à partir d'organes ou de sérum de différents lapins et en majorité du lapin JA1611. Les amores utilisées ont permis d'obtenir des amplicons chevauchants et ainsi plus de la moitié du gène de la VP60 du calicivirus apparenté au RHDV que nous avons isolé a pu être séquencé (il manque les 700 premiers et les 170 derniers nucléotides).

Cependant, la séquence complète du gène de la VP60 de ce virus a été obtenue en même temps à l'AFSSA de Ploufragan, les manipulations ayant été réalisées en double (en utilisant des amores différentes). Cette séquence, ainsi que la séquence en acides aminés correspondante sont données dans la figure 9. La séquence obtenue à l'ENVT est strictement identique à celle obtenue à Ploufragan comme le montre l'alignement de la figure 10, c'est donc le même virus qui a été isolé dans les 2 laboratoires.

Séquence nucléotidique :

ATGGAGGGCAAAGCCCGCACAGCGCCGAAGCGAAGCAGCAGGCAGTGCACCACAGCATCAGTCCCTGGAACC
ACAACCGATGGCATGGATCCTGGCGTTGTGCCACTACCAGCGTGGTCACTGCAGAGAACTCATCCGCATCGATT
GCAACGGCAGGGATTGGCGGACCACCCAAACAGGTGGACCAACAAGAGACATGGAGAACGAACCTTTATTATAAT
GATGTTTCACTTGGTCAGTCGCGGATGCCCTGGCAGCATACTTACACCAGTTAACATTCTCACAGAACAC
CCATTACAGCCGTGCTGAGCCAGATGTATGCTGGCTGGCTGGCATGCAGTTCGCTTACAGTTGCCGGATAGTTGCCGG
TCGGGTGTGTTGGTGGCGGTTGGTGCGGCGTGAATACCACCGGGCATCGAGATTGGGCCAGGGCTGGAGGTC
AGGCAATTCCCCATGTTGTCATCGACGCTCGTTACCTGAACCTGTTACCATCACAATGCCGGACTTGCCTCCC
AACATGTATCACCCAACGGTACCCCTGGCCTGTCCTACATTGGTTTGAGTGTATACAAACCTTATCAAT
CCATTGGTGGATCTACTAGTCAATCCAAGTCACAGTAGAAACAAGGCCAAGTGAAGACTTGAGTTGTGATG
ATTCGTGCCCTCCAGCAAAACTGTTGATTCACTGCAGTCTGCCGCAGGCCTACTCACGACCCCCAGTCCTCACTGGG
GTTGGCACTGACAACAGATGGAATGGCAGTACGTACGGTTGGCAAGCCCTCGTTACCGACATTGACCACCGCAGGGGT
GTCGCAACCCGCCCTGGCACCACGGACGTGCTTCAGTCTGGTACGCTAGTGCCTGGTCCGCAACCGAGAACCCCC
ATTTCAGTCGCGCCAGATGGTTCCGGACATGTCGTTACCCCTTCAACGGTCCCAGTGTCCCCGCTGCA
GGGTGGGTGGGTTGGTCAATTGGATAGCGACAGTGGGCCAAACGTTACGACTGTTCAAGCATAACCAA
TTGGGTTTGCCACTAATGCGCAAACAACAGTGCAGGCCACTACCAACACCTCAGGCCTCAGGTTGCAAG
TCTATTATGCCGTTCAACAGGTTCAGCCAAAACCCGGCGGGTTGTTGATGGCCTCTGGTATCATATCC
ACCCCAAATGCCACCGCTATCAGTACACACCCCAACCGGACAGGATTGTCAATGCACCCGGACTCCGCC
GCCCTGTAGGCAGGAATGTGCCATCATGTCGCTCCATCATCAGGCGACCGGCACATCAACGCCGCG
GGTCATCCAATGGACTCAATATGGCACAGGCTCTCAGCATTGCCAGTAACAATTGGACTTCACTCAACAAAT
TACTCATCAGCACTCATGCCTGGACAGTTTCTGGCAGTTGACCTTGCCTCTGGCTCATGGAAATTGG
TTGAGCGTTGACGGGTACTTCTATGCAGGAACAGGGCTCAACCACCCCTATTGACTGACTGAACATTGAT
ATACGCCCTGTGGACCCAGGCCATCCACAAGCACACTCGTGTAAACCTGGGGGCACAACCAGTGGTTTCC
TATGTCGA

Séquence protidique :

MEGKARTAPQGEAAGTATTASVPGTTDGMDPGVVATTSVTAENSSASIATAGIGGPPQQVQDQQETWRTNFYYN
DVFTWSVADAPGSILYTVQHSPQNNPFTAVLSQMYAGWAGGMQFRFIVAGSGVFGGRIVAAVIPPGIEIGPGLEV
RQFPHVVIDARSLEPVITMPDLRPNMYHPTGDPGLVPTLVSYNNLINPFGGSTSAIQVTVETRPSEDFEFVM
IRAPSSKTVDSVSPAGLLTTPVLTGVDNWRNGQIVGLQPVPGGFSTCNRHWNLNGSTYGWSSPSFTIDHRRG
VATRPGTTDVLQFWYASAGSATENPISQVAPDGFPMDSFIPFNGPSVPAAGWVFGAIWNSDGSAPNVTWQAYQ
LGFATNAPNNVQPTTNTSGAQVVAKSIVAVSTGSAQNPAGLFVMASGIISTPNATAITYTPQPDRIVNAPGTPAA
APVGRNVPIMFASIIRRTGDINAAAGSSNGTQYGTGSQPLPVТИGLSLNNYSSALMPQFFVWQLTFASGFMEIG
LSVDGYFYAGTGASTTLIDLTELIDIRPVGPRPSTSTLVFNLLGGTSGFSYV*

Figure 9 : Séquence complète du gène de la protéine de capsidé du calicivirus apparenté au RHDV isolé dans cette étude et séquence correspondante en acides aminés.

26 ----- TG 27
601 CCATTTGGGATCTAGTCAATCCAAGTCACAGTAGAAACAAGGCCAAGTGAAGACTTGTGATGATTCGTGCCCTCCAGCAAAACTG 700
620 640 660 680 700
40 60 80 100 120
28 TTGATTCACTCGCCCGCAGGCCACTCACGACCCCAAGTCCTCACTGGGTTGGCACTGACACAGATGGAATGGTCAGATAGTGGGCTGCAACCGGT 127
701 TTGATTCACTCGCCCGCAGGCCACTCACGACCCCAAGTCCTCACTGGGTTGGCACTGACACAGATGGAATGGTCAGATAGTGGGCTGCAACCGGT 800
720 740 760 780 800
140 160 180 200 220
128 CCCTGGTGGTTCTACATGTAACAGGCACGGAAATTGAATGGCAGTACGTACGGTTGGCAAGCCCTCGTCACCGACATTGACACCCAGGGGT 227
801 CCCTGGTGGTTCTACATGTAACAGGCACGGAAATTGAATGGCAGTACGTACGGTTGGCAAGCCCTCGTCACCGACATTGACACCCAGGGGT 900
820 840 860 880 900
240 260 280 300 320
228 GTCGCAACCCGCCCTGGCACCGACGTGCTTCAGTTCTGGTAGCTGCGGTTGGCAACCGAGAACCCATTCCAAATCGGCCAGATGGTT 327
901 GTCGCAACCCGCCCTGGCACCGACGTGCTTCAGTTCTGGTAGCTGCGGTTGGCAACCGAGAACCCATTCCAAAGTCGCCAGATGGTT 1000
920 940 960 980 1000
340 360 380 400 420
328 TCCCGGACATGTCGTTCATCCCTTCAACGGTCCCAGTGTCCCCGTCAGGGTGGGTTGGTCAATTGGAAATAGCGACAGTGGCGCCCCCAA 427
1001 TCCCGGACATGTCGTTCATCCCTTCAACGGTCCCAGTGTCCCCGTCAGGGTGGGTTGGTCAATTGGAAATAGCGACAGTGGCGCCCCCAA 1100
1020 1040 1060 1080 1100
440 460 480 500 520
428 CGTTACGACTGTTCAAGCATACCAATTGGGTTTGCACATAATGCGCAAACACAGTGCAGCCACTACCAACACCTCAGCGCTCAGGGTTGGCCAAG 527
1101 CGTTACGACTGTTCAAGCATACCAATTGGGTTTGCACATAATGCGCAAACACAGTGCAGCCACTACCAACACCTCAGCGCTCAGGGTTGGCCAAG 1200
1120 1140 1160 1180 1200
540 560 580 600 620
528 TCTATTATGCCGTTCAACAGGTTCACGCCAAACCCGCCGGGTTGGTAGTGGCTCTGGTATCATATCCACCCAAATGCCACCGCTATCACGT 627
1201 TCTATTATGCCGTTCAACAGGTTCACGCCAAACCCGCCGGGTTGGTAGTGGCTCTGGTATCATATCCACCCAAATGCCACCGCTATCACGT 1300
1220 1240 1260 1280 1300
640 660 680 700 720
628 ACACACCCCAACGGCAGGGATTGCAATGCAACCGGCACCTCCGCCGCCCTGTAGGCAGGAATGTGCCCATCATGTCGCGTCATCAGGGG 727
1301 ACACACCCCAACGGCAGGGATTGCAATGCAACCGGCACCTCCGCCGCCCTGTAGGCAGGAATGTGCCCATCATGTCGCGTCATCAGGGG 1400
1320 1340 1360 1380 1400
740 760 780 800 820
728 CACCGGGGACATCAACGCCGCGGCTGGGTATCCAATGGGACTCAATATGGCACAGGCCTCAGCCATGCCAGTAACAAATTGG*CTTCACTCA-AAT 826
1401 CACCGGGGACATCAACGCCGCGGCTGGGTATCCAATGGGACTCAATATGGCACAGGCCTCAGCCATGCCAGTAACAAATTGGACTTCAACAAAT 1500
1420 1440 1460 1480 1500
840 860 880
827 TACTCATCAGCACTCATGCCCTGGACAGTTTTC*TTGG*AGTTGA*CTTG*C*CT----- 883
1501 TACTCATCAGCACTCATGCCCTGGACAGTTTTC*TTGGACAGTTGCAGCTTGCCTCTGGCTCATGGAAATTGGTTGAGCGTTGACGGTACTTCTATG 1600
1520 1540 1560 1580 1600

1601 CAGGAACAGGGCTTCACCAACCCCTCATGACTGACTGAATTATGATATACGCCCTGTGGGACCCAGGCCATCCACAGCACACTCGTGTAAACCT 1700
1620 1640 1660 1680 1700

1701 GGGGGCACACCAAGTGGCTTCTATGTCTGA 1734
1720

La séquence obtenue à l'ENVT est placée au dessus de celle obtenue à Ploufragan.

Figure 10 : Alignement de la séquence du gène de la VP60 obtenue à Ploufragan avec celle obtenue à l'ENVT.

b. Analyse des séquences

En réalité, la comparaison des séquences obtenues avec celles d'isolats de RHDV pathogènes a révélé que 2 populations virales avaient été identifiées. En effet, certains amplicons présentent des différences notables avec les souches pathogènes de RHDV au sein du gène de la VP60, alors que d'autres sont quasiment identiques. Le séquençage n'a d'ailleurs pas pu être réalisable pour certains amplicons compte tenu de la superposition de plusieurs séquences sur l'électrophorégramme.

Plus précisément, les amplicons ayant une séquence « atypique » ont été obtenus à partir de l'intestin grêle alors que ceux ayant une séquence « classique » provenaient de tous les types de prélèvements (sérum, foie, rate, intestin).

Les séquences « classiques » ne présentent que quelques mutations ponctuelles par rapport au gène de la VP60 des souches pathogènes mais sont différentes du plasmide utilisé comme témoin positif des PCR, leur isolement n'est donc pas dû à une contamination. Les séquences « atypiques », présentent, elles, des différences plus marquées avec le gène de la VP60 des souches pathogènes comme le montre la figure 11. On remarque la présence de nombreuses mutations, concernant un ou 2 nucléotides le plus souvent, sur l'ensemble du gène, même si elles sont plus rares en début de séquence. On note également une délétion de 6 nucléotides en position 927 et un remaniement important entre les positions 1070-1090. Le pourcentage d'identité entre les deux virus a été estimée à 78,6% ce qui est beaucoup plus faible que les valeurs trouvées habituellement au sein des RHDV.

Afin de mieux caractériser le virus atypique isolé, la séquence du gène de la VP60 a été comparée à celle de nombreux *Lagovirus* répertoriés dans des banques de données. L'analyse phylogénique a ainsi révélé qu'il s'apparente à un virus découvert en Angleterre lors d'une étude d'épidémiologie moléculaire : la souche Ashington (Moss *et al*, 2002). Cette souche a été obtenue à partir d'un lapin de garenne supposé mort des suites d'une infection par un RHDV pathogène ayant également décimé plus de 90% de la population locale.

Si ces deux virus appartiennent au même génogroupe, ils présentent par contre une différence majeure au niveau de leur pouvoir pathogène puisque les virus que nous avons isolé sont totalement non pathogènes ; en effet, aucun des lapins du site de St Benoist n'est mort de VHD, ni n'a présenté de signes cliniques ou de lésions macroscopiques évocatrices au niveau des différents organes.

Enfin, ces virus appartiennent à un génogroupe différent de celui comprenant le seul RHDV non pathogène isolé à ce jour, le RCV.

La séquence obtenue à Ploufragan est placée au dessus de la souche pathogène.

Figure 11 : Alignement de la séquence du gène de la VP60 obtenue à Ploufragan avec la séquence d'une souche pathogène de RHDV.

III. Discussion

L'objectif de cette étude est d'isoler des souches non pathogènes du RHDV afin de les comparer aux souches pathogènes classiques. En effet, un *Lagovirus* apparenté au RHDV, non pathogène et protecteur contre le RHDV a été isolé dans un élevage en Italie en 1996. De même, de nombreuses études sérologiques ont mis en évidence l'existence de calicivirus non pathogènes apparentés au RHDV dans les populations sauvages de lapins de différents pays sans qu'aucun n'ait pu être isolé à ce jour. Leur pouvoir protecteur vis à vis du RHDV et ainsi leur influence sur l'épidémiologie de la VHD sont parfois discutés. Cette étude a donc pour objectif de préciser les caractéristiques de tels virus.

Pour réaliser cela, nous avons initialement choisi d'utiliser des lapins sentinelles séronégatifs placés au contact des populations sauvages et de suivre leur statut sérologique vis à vis du RHDV par ELISA. Pour limiter les risques de mortalité par d'autres pathologies fréquemment rencontrées dans la nature, nous avions prévu de vacciner ces lapins contre la myxomatose et de les traiter contre la coccidiose. L'autre risque que nous ne pouvions éviter était une contamination par le RHDV pathogène ; par contre, une séroconversion sans mortalité aurait pu être attribuée à une infection par un RHDV non pathogène. Le protocole d'expérimentation sur le terrain défini au départ a finalement dû être modifié compte tenu de la séroconversion des lapins avant qu'ils soient placés dans la nature ; le virus non pathogène est donc apparu plus tôt. Compte tenu du parcours des lapins, et le fait que les lapins des 2 sites d'étude ont été touchés de la même manière, il est très probable que la contamination ait eu lieu lorsqu'ils se trouvaient dans l'animalerie. Le virus isolé est donc un virus circulant dans les animaleries, en tout cas, celle de l'AFSSA Ploufragan.

Après la réalisation des analyses sérologiques, notre travail a consisté en la recherche du virus dans les échantillons prélevés après l'abattage des lapins. Pour cela des RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN totaux extraits des différents prélèvements d'organes (intestin, foie et rate) et de sérum. Chaque prélèvement a subi 3 PCR nichées ou semi-nichées utilisant des amores spécifiques du gène de la VP60 du RHDV pathogène. Nous avons utilisés de telles amores en supposant que la séquence du virus identifié était proche du virus pathogène. En effet, l'ELISA permettant classiquement le diagnostic sérologique de la VHD, qui utilise la VP60 comme antigène, a donné des résultats positifs avec ce virus. De plus, les études d'épidémiologie moléculaire déjà réalisées ont montré que ce genre de virus avait une

séquence nucléotidique assez conservée par rapport au virus pathogène (Moss *et al*, 2002). Les résultats des PCR ont finalement permis d'identifier les lapins et plus précisément les organes hébergeant le virus. Il apparaît, aux vues des résultats de PCR, que le virus se trouve majoritairement dans la rate puis l'intestin et enfin le foie ; selon des résultats obtenus à partir de sérum, il ne semble pas que la virémie soit importante du moins sous la forme de virions libres. Nous n'avons pas vérifié la présence de virus dans les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell).

En réalité, ces résultats ne peuvent être interprétés de la sorte car le séquençage des fragments amplifiés par PCR a montré que 2 virus différents avaient été isolés. Le premier virus a une séquence très proche du virus pathogène et a été isolé à partir de l'ensemble des échantillons (intestin, foie, rate, sérum). Le second virus présente des modifications assez importantes de la séquence du gène de la VP60, avec plusieurs mutations sur l'ensemble du gène et également 2 remaniements en milieu de séquence. Le virus dont la séquence est « classique » a été isolé majoritairement dans le laboratoire de l'ENVT, alors que le virus présentant une séquence atypique a été principalement isolé à l'AFSSA. Le virus dont la séquence est classique est un virus non pathogène également, dont la séquence du gène de la VP60 est très proche de celle des souches pathogènes. Cette observation avait déjà été faite par d'autres auteurs (Moss *et al*, 2002). Nous nous intéresserons plus particulièrement au virus dont la séquence est atypique. Il a été isolé principalement à partir de l'intestin (à l'ENVT, il n'a été détecté que dans l'intestin du lapin JA 1611) et il semble s'y trouver en faible quantité puisque des PCR nichées augmentant la sensibilité de la méthode de détection ont été nécessaires pour avoir un signal positif. Il s'agit d'un virus non pathogène puisqu'il n'a provoqué aucune mortalité ou signe clinique chez les lapins du site de St Benoist, de même, aucune lésion macroscopique n'a été notée lors du prélèvement des organes.

L'étude phylogénique a révélé qu'il appartenait au génogroupe d'une souche Anglaise (souche Ashington) identifiée à partir du foie d'un lapin probablement mort de VHD, donc une souche pathogène. Nous avons ainsi isolé un virus dont la séquence est proche d'une souche qui n'a été décrite qu'une seule fois lors d'une étude épidémiologique en Angleterre fondée sur le séquençage de portions du gène de la VP60. Dans notre cas, les caractéristiques du virus ont pu être précisées, en particulier sa capacité à induire des anticorps protecteurs contre le RHDV.

Tout d'abord, comme le montre le tableau 4, neuf lapins du site d'étude de Cerizay sont morts à partir du 13^{ème} jour en clapier. Ils ont tous présenté des signes cliniques de VHD et des RT-PCR réalisées à partir du foie à l'AFSSA de Ploufragan ont confirmé le diagnostic.

Ils étaient tous séropositifs lors du premier contrôle (excepté le JA 1686), ils étaient donc infectés par le (ou les) virus non pathogène(s), puisque si cette séropositivité avait été due à une souche pathogène, une pathologie y aurait été associée. Ces observations nous permettent donc de conclure que les virus non pathogènes que nous avons isolé ne sont pas protecteurs vis à vis du RHDV. Simultanément à cet épisode de VHD, des lapins ont été retrouvés morts avec des signes de VHD dans la population sauvage du même site. L'origine de cette infection par une souche pathogène de RHDV a d'ailleurs pu être rattachée à la distribution de choux frais qui avaient été stockés en extérieur et ainsi souillés par des lapins de garenne.

Enfin, à l'AFSSA, 5 lapins séropositifs provenant du site de St Benoist ont subi une épreuve virulente. Pour cela, 3 lapins (AR 16, 52 et 56) ont été inoculés par la voie sous cutanée avec une souche pathogène de RHDV et 2 lapins (AR 34 et 64) ont été placés au contact de lapins infectés. L'ensemble des lapins est mort entre le 2^{ème} et le 6^{ème} jour, ce qui confirme que les anticorps induits par les virus que nous avons isolés ne sont pas protecteurs vis à vis d'une infection par le RHDV. C'est, à notre connaissance, la première fois qu'un tel constat est réalisé pour ce type de virus.

Les résultats sérologiques obtenus lors du premier contrôle, le 31.01.06 étaient assez surprenants. Nous nous sommes donc interrogés sur l'origine des anticorps détectés, en particulier s'il ne s'agissait pas d'anticorps colostraux. Cependant, la séroconversion de plusieurs animaux entre les deux premières séries d'analyses montre que certains lapins se sont infectés dans les clapiers, certainement contaminés par les autres lapins déjà infectés. Afin de réaliser un état des lieux de l'animalerie de l'AFSSA, des contrôles sérologiques ont été réalisés sur les reproductrices. Ils ont révélé que la quasi-totalité d'entre elles était séropositive avec de forts titres en anticorps. De même, les titres en anticorps de jeunes lapins de moins de 8 semaines issus de ces mères ont également été suivis. Il apparaît qu'ils augmentent au cours du temps, il ne s'agit donc pas seulement d'anticorps colostraux, cette augmentation traduit une infection des jeunes lapins qui se contaminent au contact de leurs mères.

CONCLUSION

L'objectif de notre étude a été atteint puisque nous sommes parvenus à isoler et caractériser un virus apparenté au RHDV qui soit non pathogène et dont la signature génétique est originale.

Ce virus a été principalement isolé à partir de l'intestin de lapins sains et il semble s'y trouver en faible quantité puisque des PCR nichées augmentant la sensibilité du test, ont été nécessaires pour sa détection. Il s'agit d'un virus non pathogène et les anticorps qu'il induit chez les lapins ne sont pas protecteurs vis à vis d'une souche pathogène de RHDV. Au sein des virus de type RHDV, il appartient à un génogroupe caractérisé par la souche Ashington qui a été découverte en Angleterre à partir du foie d'un lapin mort de VHD dans les années 1990. Aucun virus de ce groupe n'avait été isolé en France jusqu'à présent, et il est différent des souches virales pathogènes circulant en France. Il s'agit d'un virus qui circule probablement dans les animaleries, en tous cas celle de l'AFSSA de Ploufragan puisque c'est là qu'a dû avoir lieu la contamination des lapins utilisés dans notre expérimentation.

Enfin s'il partage certaines caractéristiques communes avec le RCV telles que sa non pathogénicité et sa localisation intestinale où il se trouve en faible quantité, il présente également des différences marquées avec celui-ci. Tout d'abord, les séquences du gène de la VP60 de ces deux virus sont assez éloignées, ils n'appartiennent pas au même génogroupe et contrairement au virus que nous avons isolé, les anticorps induit par le RCV protègent contre les souches pathogènes de RHDV.

Une première étape dans la caractérisation de ce virus a été franchie. Afin de mieux définir ses différences génétiques et antigéniques avec le RHDV, le séquençage complet de son génome pourrait être envisagé car il est probable que la virulence ne soit pas définie par le seul gène de la VP60.

D'autres recherches restent à mener dans le domaine des calicivirus apparentés au RHDV. Ceci, dans le but par exemple de progresser dans la compréhension de leur interaction avec les formes pathogènes du RHDV, dans la mise au point de tests sérologiques capables de différencier les infections à calicivirus chez les lapins de garenne, ou dans le but de préciser les modes d'évolution des virus de type RHDV.



Direction de l'Enseignement et de la Vie Universitaire

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mlle FAGES Marie-Philippe, Gabrielle, Pierrette
a été admis(e) sur concours en : 2001
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 06/07/06
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, S. BERTAGNOLI, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :
Mlle FAGES Marie-Philippe, Gabrielle, Pierrette
intitulée :
« Identification d'un nouveau variant apathogène du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV)..»

Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Christophe PASQUIER

Vu le : 12 JAN. 2007
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU



23, chemin des capelles - 31076 Toulouse Cedex 3 - France - E-mail : direction@envt.fr

TABLE DES ILLUSTRATIONS

ILLUSTRATIONS

Illustration 1 : Microscopie électronique de virions de RHDV purifiés après coloration négative. (p.12)

Illustration 2 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR 2C des sérum des lapins JA 1611 et JA1669. (p.69)

FIGURES

Figure 1 : Organisation génomique du RHDV. (p.13)

Figure 2 : Représentation schématique du processus de maturation de la polyprotéine du RHDV. (p.15)

Figure 3 : Pathogénie hypothétique de la nécrose hépatique lors de VHD. (p.26)

Figure 4 : Cycle épidémiologique de la VHD. (p.31)

Figure 5 : Schéma de principe de l'ELISA. (p.57)

Figure 6 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA Clean-Up. (p.61)

Figure 7 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA II. (p.62)

Figure 8 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® Extract II. (p.66)

Figure 9 : Séquence complète du gène de la protéine de capsid du calicivirus apparenté au RHDV isolé dans cette étude et séquence correspondante en acides aminés. (p.73)

Figure 10 : Alignement de la séquence du gène de la VP60 obtenue à Ploufragan avec celle obtenue à l'ENVT. (p.74)

Figure 11 : Alignement de la séquence du gène de la VP60 obtenue à Ploufragan avec la séquence d'une souche pathogène de RHDV. (p.76)

TABLEAUX

Tableau 1 : Séquence et position des amorces utilisées pour la détection du virus. (p.63)

Tableau 2 : Utilisation des amorces et description des amplicons produits. (p.64)

Tableau 3 : Séquence et position des amorces utilisées pour obtenir la séquence du gène codant pour la VP60. (p.65)

Tableau 4 : Résultats sérologiques des lapins du site de Cerizay. (p.67)

Tableau 5 : Résultats sérologiques des lapins du site de St Benoist. (p.68)

Tableau 6 : Résultats des PCR 2A, 2B et 2C sur les organes intestin, foie et rate des lapins de Cerizay et St Benoist. (p.70)

Tableau 7 : Résultats des PCR 2A, 2B et 2C sur le sérum et comparaison aux résultats sérologiques. (p.71)

TABLE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique
- ADNc** : Acide Désoxyribo-Nucléique complémentaire
- AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- ALT** : Alanine Transaminase
- ARN** : Acide Ribo-Nucléique
- AST** : Aspartate Transaminase
- BET** : Bromure d'Ethydium
- BCV** : Bovine Calicivirus
- BEC-NB** : Bovine Enteric Calicivirus strain NB
- CaCV** : Canine Calicivirus
- CIVD** : Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
- °C : degré Celsius
- dNTP** : désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphate
- EBHS** : European Brown Hare Syndrome
- EBHSV** : European Brown Hare Syndrome Virus
- ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- ENVT** : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
- FCV** : Feline Calicivirus
- h** : heure
- HA** : Hémagglutination
- HGF** : Hepatocyte Growth Factor
- IEM** : Immuno-Electromicroscopie
- Ig** : Immunoglobuline
- IHVV** : Interaction Hôtes-Virus et Vaccinologie
- INRA** : Institut National de Recherche Agronomique
- INSERM** : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
- kb** : kilobase
- kDa** : kilo Dalton
- LDH** : Lactate Déshydrogénase
- ME** : Microscopie Electronique
- min** : minutes
- ml** : millilitre

mM : millimolaire

µg : microgramme

µl : microlitre

µM : micromolaire

ng : nanogrammes

nm : nanomètre

OIE : Office International des Epizooties

ONCFS : Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage

ORF : Open Reading Frame

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS : Phosphate Buffer Saline

PBST : Phosphate Buffer Saline Tween

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCV : Primate Calicivirus

PNPP : disodium Para-Nitrophényl Phosphate

RCV : Rabbit calicivirus

RHDV : Rabbit Haemorrhagic Disease Virus

RT : Reverse Transcriptase

RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

S : Svedberg

sec : seconde

SMSV : San Miguel Sea lion Virus

s-RHDV : Smooth RHDV

TBE : Tris Borate d'EDTA

T_H : Température d'Hybridation

U : unité

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : Ultra Violet

V : Volts

VHD : Viral Haemorrhagic Disease

VESV : Vesicular Exanthema of Swine Virus

VLP_S : Virus Like Particules

VPg : Viral Protein linked to the genome

VP60 : Viral Protein of 60 kDa

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barcena, J., M. Morales, B. Vazquez, JA. Boga, F. Parra, J. Lucientes, A. Pages-Mante, JM. Sanchez-Vizcaino, R. Blasco, JM. Torres. 2000. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J Virol*, **74** (3):1114:23.
- Bertagnoli S, J. Gelfi, G. Le Gall, E. Boilletot, JF. Vautherot, D. Rasschaert, S. Laurent, F. Petit, C. Boucraut-Baralon, A. Milon. 1996. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol*, **70**(8):5061-6.
- Bertagnoli S, J. Gelfi, F. Petit, JF. Vautherot, D. Rasschaert, S. Laurent, G. Le Gall, E. Boilletot, J. Chantal, C. Boucraut-Baralon. 1996b. Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine*, **14**(6):506-10.
- Boniotti, B., C. Wirblich, M. Sibilia, G. Meyers, H. J. Thiel, and C. Rossi. 1994. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol*, **68**:6487-95.
- Calvete, C., R. Estrada, R. Villafuerte, J. J. Osacar, and J. Lucientes. 2002. Epidemiology of viral haemorrhagic disease and myxomatosis in a free-living population of wild rabbits. *Vet Rec*, **150**:776-82.
- Capucci, L., M. T. Scicluna, and A. Lavazza. 1991. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech*, **10**:347-70.
- Capucci, L., P. Fusi, A. Lavazza, M. L. Pacciarini, and C. Rossi. 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol*, **70**:8614-23.
- Capucci, L., A. Nardin, and A. Lavazza. 1997. Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet Rec*, **140**:647-50.
- Capucci, L., F. Fallacara, S. Grazioli, A. Lavazza, M. L. Pacciarini, and E. Brocchi. 1998. A further step in the evolution of rabbit haemorrhagic disease virus : the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res*, **58**:115-126.
- Castanon, S., M. S. Marin, J. M. Martin-Alonso, J. A. Boga, R. Casais, J. M. Humara, R. J. Ordas, and F. Parra. 1999. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, **73**:4452-5.
- Chasey, D., M. H. Lucas, D. G. Westcott, G. Sharp, A. Kitching, and S. K. Hughes. 1995. Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. *Vet Rec*, **137**:158-60.
- Clarke, I. N., and P. R. Lambden. 1997. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* **78** (Pt 2):291-301.

Cooke, B., S. McPhee, A. J. Robinson, and L. Capucci. 2002. Rabbit haemorrhagic disease : does a pre-existing RHDV-like virus reduce the effectiveness of RHD as a biological control in Australia? *Wildlife Research* **29**:673-682.

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. Virus Taxonomy. 8th edition. London : Elsevier Academic Press, 2005, 1259 p.

Forrester, N. L., B. Boag, S. R. Moss, S. L. Turner, R. C. Trout, P. J. White, P. J. Hudson, and E. A. Gould. 2003. Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis. *J Gen Virol*, **84**:3079-86.

Gelmetti, D., V. Grieco, C. Rossi, L. Capucci, and A. Lavazza. 1998. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. *J Virol Methods*, **72**:219-26.

Henning, J., J. Meers, P. R. Davies, and R. S. Morris. 2005. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiol Infect*, **133**:719-30.

Ji, C. Y., N. X. Du, and W. Y. Xu. 1991. Adaptation of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits to the DJRK cell strain. *Rev Sci Tech*, **10**:337-45.

Joubert, P., C. Pautigny, M. F. Madelaine, and D. Rasschaert. 2000. Identification of a new cleavage site of the 3C-like protease of rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, **81**:481-8.

Konig, M., H. J. Thiel, and G. Meyers. 1998. Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, **72**:4492-7.

Laurent, S., J. F. Vautherot, M. F. Madelaine, G. Le Gall and D. Rasschaert. 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into virus like particles and induces protection. *J Virol*, **68**(10):6794-8.

Laurent, S., J. F. Vautherot, G. Le Gall, M. F. Madelaine, and D. Rasschaert. 1997. Structural, antigenic and immunogenic relationships between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, **78** (Pt 11):2803-11.

Lavazza, A. and Capucci, L. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th edition. OIE, 2004. 2 volumes, 1178p.

Le Gall-Recule, G., F. Zwingelstein, Y. Portejoie, and G. Le Gall. 2001. Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic Disease and European Brown Hare Syndrome viruses. *J Virol Methods*, **97**:49-57.

Liu, G., Y. Zhang, Z. Ni, T. Yun, Z. Sheng, H. Liang, J. Hua, S. Li, Q. Du, and J. Chen. 2006. Recovery of infectious Rabbit Hemorrhagic Disease Virus from Rabbits after Direct Inoculation with In Vitro-Transcribed RNA. *J Virol*, **80**:6597-6602.

Marcato, P. S., C. Benazzi, G. Vecchi, M. Galeotti, L. Della Salda, G. Sarli, and P. Lucidi. 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech*, **10**:371-92.

Marchandeau, S., J. Chantal, Y. Portejoie, S. Barraud, and Y. Chaval. 1998. Impact of viral hemorrhagic disease on a wild population of European rabbits in France. *J Wildl Dis*, **34**:429-35.

Marchandeau, S., J. C. Ricci, and J. Chantal. 1998. Taux de prévalence sérologique du virus de la maladie virale hémorragique (VHD) du lapin de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) et de ses formes apparentées au sein de différentes populations sauvages en France. *Mammalia*, **62**:95-103.

Marchandeau, S., G. Le Gall-Recule, S. Bertagnoli, J. Aubineau, G. Botti, and A. Lavazza. 2005. Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet Res*, **36**:53-62.

Marcus S. Vaccination contre la maladie hémorragique virale du lapin : utilisation d'un virus recombinant vaccine-RHDV. Th. : med.vet. : Toulouse : 1996-TOU-4008.

Martin Alonso, J. M., R. Casais, J. A. Boga, and F. Parra. 1996. Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J Virol*, **70**:1261-5.

Martin-Alonso, J. M., S. Castanon, P. Alonso, F. Parra, and R. Ordas. 2003. Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res*, **12**:127-30.

Meyers, G., C. Wirblich, and H. J. Thiel. 1991. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology*, **184**:677-86.

Meyers, G., C. Wirblich, and H. J. Thiel. 1991b. Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, **184**:664-76.

Mitro, S., and H. Krauss. 1993. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol*, **9**:70-8.

Moss, S. R., S. L. Turner, R. C. Trout, P. J. White, P. J. Hudson, A. Desai, M. Armesto, N. L. Forrester, and E. A. Gould. 2002. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, **83**:2461-7.

Moussa, A., D. Chasey, A. Lavazza, L. Capucci, B. Smid, G. Meyers, C. Rossi, H. J. Thiel, R. Vlasak, L. Ronsholt, and et al. 1992. Haemorrhagic disease of lagomorphs: evidence for a calicivirus. *Vet Microbiol*, **33**:375-81.

Mutze, G., B. Cooke, and P. Alexander. 1998. The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia. *J Wildl Dis*, **34**:221-7.

Nagesha, H. S., L. F. Wang, A. D. Hyatt, C. J. Morrissey, C. Lenghaus, and H. A. Westbury. 1995. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease

virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol*, **140**:1095-1108.

Nagesha, H. S., K. A. McColl, B. J. Collins, C. J. Morrissy, L. F. Wang, and H. A. Westbury. 2000. The presence of cross-reactive antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in Australian wild rabbits prior to the escape of the virus from quarantine. *Arch Virol*, **145**:749-757.

Ohlinger, V. F., B. Haas, G. Meyers, F. Weiland, and H. J. Thiel. 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol*, **64**:3331-6.

Ohlinger, V. F., B. Haas, and H. J. Thiel. 1993. Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet Res*, **24**:103-16.

OIE. Code sanitaire pour les animaux terrestres. 15^{ème} édition. 2006

O'Keefe, J. S., J. E. Tempero, M. X. Motha, M. F. Hansen, and P. H. Atkinsona. 1999. Serology of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits before and after release of the virus in New Zealand. *Vet Microbiol*, **66**:29-40.

Parra, F., and M. Prieto. 1990. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*, **64**:4013-5.

Plassiart, G., J. F. Guelfi, J. P. Ganiere, B. Wang, G. Andre-Fontaine, and M. Wyers. 1992. Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic disease. *J. Vet. Med.B*, **39**:443-53.

Ramiro-Ibanez, F., J. M. Martin-Alonso, P. Garcia Palencia, F. Parra, and C. Alonso. 1999. Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res*, **60**:21-8.

Rasschaert, D., S. Huguet, M. F. Madelaine, and J. F. Vautherot. 1995. Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit. *Virus Genes*, **9**:121-32.

Robinson, A. J., P. D. Kirkland, R. Forrester, I, L. Cappuci, B. Cooke, and A. W. Philbey. 2002. Serological evidence for the presence of a calicivirus in Australian wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, before the introduction of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) : its potential influence on the specificity of a competitive ELISA for RHDV. *Wildlife Research*, **29**:655-662.

Ruvoen-Clouet, N., D. Blanchard, G. Andre-Fontaine, and J. P. Ganiere. 1995. Partial characterization of the human erythrocyte receptor for rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Virol*, **146**:33-41.

Ruvoen-Clouet, N., J. P. Ganiere, G. Andre-Fontaine, D. Blanchard, and J. Le Pendu. 2000. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol*, **74**:11950-4.

Teifke, J. P., I. Reimann, and H. Schirrmeier. 2002. Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J Comp Pathol*, **126**:231-4.

Tunon, M. J., S. Sanchez-Campos, J. Garcia-Ferreras, M. Alvarez, F. Jorquera, and J. Gonzalez-Gallego. 2003. Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med*, **141**:272-8.

Villafuerte, R., C. Calvete, J. C. Blanco, and J. Lucientes. 1995. Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain. *Mammalia*, **59**:651-659.

White, P. J., R. A. Norman, R. C. Trout, E. A. Gould, and P. J. Hudson. 2001. The emergence of rabbit haemorrhagic disease virus: will a non-pathogenic strain protect the UK? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**:1087-95.

White, P. J., R. C. Trout, S. R. Moss, A. Desai, M. Armesto, N. L. Forrester, E. A. Gould, and P. J. Hudson. 2004. Epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the United Kingdom: evidence for seasonal transmission by both virulent and avirulent modes of infection. *Epidemiol Infect*, **132**:555-67.

Wirblich, C., G. Meyers, V. F. Ohlinger, L. Capucci, U. Eskens, B. Haas, and H. J. Thiel. 1994. European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J Virol*, **68**:5164-73.

Wirblich, C., H. J. Thiel, and G. Meyers. 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol*, **70**:7974-83.

Xu, W. Y. 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech*, **10**:393-408.

Toulouse, 2007

NOM : FAGES

PRENOM : Marie-Philippe

TITRE :

IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU VARIANT APATHOGENE DU VIRUS DE LA MALADIE HEMORRAGIQUE VIRALE DU LAPIN (RHDV)

RESUME :

La maladie hémorragique du lapin est une maladie infectieuse aiguë et souvent mortelle qui touche les lapins européens sauvages et domestiques adultes. Elle est causée par un *Caliciviridae* entraînant une nécrose hépatique sévère et des troubles de la coagulation. Le RHDV est ainsi hautement pathogène ; pourtant, un *Lagovirus* apparenté au RHDV, non pathogène et protecteur contre le RHDV a été identifié dans un élevage en Italie. De même, de nombreuses études sérologiques ont mis en évidence l'existence de calicivirus non pathogènes apparentés au RHDV dans les populations sauvages dont le pouvoir protecteur vis à vis du RHDV est parfois discuté. Aucun de ces virus n'ayant été isolé à ce jour, l'objectif de cette étude est d'isoler une souche non pathogène du RHDV afin de la comparer aux souches pathogènes classiques. Pour cela, le statut sérologique de lapins sentinelles séronégatifs a été évalué au cours du temps par ELISA. Une recherche de virus par RT-PCR sur les ARN totaux extraits à partir d'organes et de sérum d'animaux séroconvertis a alors été réalisée en utilisant des amorces spécifiques de la protéine de capsid du RHDV (VP60). Un virus non pathogène apparenté au RHDV et induisant des anticorps non protecteurs a, de la sorte, été isolé. Les analyses phylogéniques ont révélé qu'il appartenait au génogroupe comprenant un virus identifié en Angleterre à partir d'une banque de sérum (souche Ashington).

MOTS-CLES :

CALICIVIRIDAE, LAGOVIRUS, RHDV, LAPINS EUROPEENS, POUVOIR PATHOGENE, VP 60

ENGLISH TITLE :

IDENTIFICATION OF A NEW NON PATHOGENIC STRAIN OF RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS

ABSTRACT :

Rabbit haemorrhagic disease is an acute, usually fatal disease of the domestic and wild adult European rabbit caused by a calicivirus. It leads to necrosis of the liver and disturbances in coagulation. Even if RHDV is highly pathogenic, a non-pathogenic and protective RHDV-like virus was identified in a rabbit farm in Italy. Several serological studies also showed the existence of non pathogenic and more or less protective RHDV-like viruses in wild populations. The objective of the study was to isolate a non pathogenic strain of RHDV. To that aim, the serologic status of sentinel rabbits for RHDV was evaluated and seropositive animals were used for viral research. RT-PCR of RNA obtained from organs and serum were carried out using primers from RHDV capsid protein gene. A non pathogenic RHDV-like virus inducing non-protective antibodies was isolated and phylogenetic analysis revealed that it belonged to the genogroup including a RHDV strain identified in England (Ashington strain).

KEY WORDS :

CALICIVIRIDAE, LAGOVIRUS, RHDV, EUROPEAN RABBITS, PATHOLOGY, VP 60

Imp. S.A.R.L. NOTREL – 31300 TOULOUSE