



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints_ID) : 17456

To cite this version :

Boussignac, Maxime. *Émergence et évolutions des lagovirus*.
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 159 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

EMERGENCE ET EVOLUTION DES LAGOVIRUS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BOUSSIGNAC Maxime

Né, le 29 avril 1990 à Villeneuve Sur Lot (47)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
M. Stéphane BERTAGNOLI
M. Guillaume LE LOC'H

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES- MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICALET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE -PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTHALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

Remerciements

À Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER,

Professeurs des Universités,

Praticien hospitalier,

Virologie,

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

∞

À Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI,

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie infectieuse,

Qui m'a proposé ce travail,

Pour avoir accompagné la rédaction avec rigueur, disponibilité et gentillesse.

Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

∞

À Monsieur le Docteur Guillaume LE LOC'H

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Médecine zoologique et santé de la faune sauvage,

Qui a aimablement accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Sincères remerciements.

Table des matières :

Table des illustrations.....	12
Tableaux	12
Figures	12
Table des abréviations.....	14
Introduction.....	16
Partie 1 : La famille des Caliciviridae	18
1 Taxonomie.....	18
1.1 Historique	18
1.2 Phylogénie et classification	22
1.3 <i>Caliciviridae</i> , une famille aux 5 genres	23
1.3.1 Le genre <i>Vesivirus</i>	23
1.3.2 Le genre <i>Norovirus</i>	24
1.3.3 Le genre <i>Sapovirus</i>	25
1.3.4 Le genre <i>Nebovirus</i>	26
1.3.5 Le genre <i>Lagovirus</i>	26
2 Le virion.....	27
2.1 Morphologie et structure	27
2.1 Propriétés physico-chimiques	29
2.1.1 Sensibilité à la température.....	30
2.1.2 Sensibilité aux UV.....	30
2.1.3 Sensibilité aux pH extrêmes.....	30
2.1.4 Sensibilité aux agents désinfectants.....	30
2.1.5 Persistance dans l'environnement.....	31
2.2 Culture en laboratoire.....	31

3	Le génome viral.....	32
4	Le cycle viral.....	33
4.1	Attachement virions – cellules.....	34
4.2	Entrée du virus et décapsidation.....	35
4.3	Réplication de l'ARN viral.....	36
Partie 2 : Focus sur les Lagovirus		38
1	Généralités sur le genre <i>Lagovirus</i>	38
1.1	Historique et découverte.....	38
1.1.1	Le RHDV.....	38
1.1.2	L'EBHSV	39
1.2	Synonymie	39
2	Virologie	40
2.1	Données sur le RHDV	40
2.1.1	Morphologie.....	40
2.1.2	Structure et organisation génomique.....	43
2.1.3	Synthèse protéique et maturation.....	44
2.1.4	Assemblage des virions et sortie de la cellule	46
2.2	Données sur l'EBHSV	46
2.2.1	Morphologie.....	46
2.2.2	Structure, organisation génomique et synthèse des protéines	47
3	Epidémiologie	49
3.1	Epidémiologie de la RHD	49
3.1.1	Espèces cibles.....	49
3.1.2	Modes de transmission	50
3.1.3	Réceptivité – Sensibilité, Facteurs de risques.....	52
3.2	Epidémiologie de l'EBHS.....	55

3.2.1	Espèces cibles.....	55
3.2.2	Circulation du virus au sein d'une population	56
4	Signes cliniques et lésions.....	57
4.1	Des présentations cliniques communes entre RHD et EBHS	57
4.1.1	Forme suraiguë	57
4.1.2	Forme aiguë	57
4.1.3	Forme subaiguë.....	58
4.1.4	Forme subclinique.....	59
4.2	Lésions macroscopiques et histologie	59
4.2.1	Foie.....	60
4.2.2	Système vasculaire	63
4.2.3	Rate	64
4.2.4	Trachée et poumons	64
4.2.5	Reins.....	65
4.2.6	Thymus.....	66
4.2.7	Système nerveux central.....	66
4.2.8	Tractus digestif.....	66
4.3	Cas particulier des souches non pathogènes et peu pathogènes de RHDV... 67	67
5	Modifications des paramètres biologiques	68
5.1	Modifications des paramètres biochimiques sanguins	68
5.1.1	Paramètres hépatiques.....	68
5.1.2	Paramètres rénaux.....	68
5.1.3	Métabolisme lipidique et glucidique	68
5.1.4	Autres modifications.....	69
5.2	Modifications ioniques	70
5.3	Modification des paramètres de la coagulation.....	70

5.4	Modifications hématologiques.....	70
5.4.1	Lignée blanche	70
5.4.2	Lignée rouge.....	71
5.4.3	Lignée plaquettaire	71
6	Pathogénie	71
6.1	Voies d'entrée et dissémination.....	71
6.2	Tropisme viral	72
6.3	Effets cytopathiques	76
6.3.1	Apoptose et défaut de régénération cellulaire.....	76
6.3.2	Autophagie	77
7	Immunité.....	79
7.1	Immunité à médiation humorale suite à l'infection.....	79
7.2	Rôle de l'immunité passive.....	80
7.3	Immunité croisée.....	81
8	Diagnostic.....	82
8.1	Diagnostic clinique, épidémiologique et nécropsique	82
8.2	Diagnostic expérimental.....	83
8.2.1	Détection de l'agent pathogène	84
8.2.2	Sérologie.....	85
9	Démarche thérapeutique.....	86
10	Prophylaxie.....	88
10.1	Vaccination	88
10.1.1	Disponibilité des vaccins	88
10.1.2	Etudes précédentes et perspectives d'avenir	89
10.1.3	Protocoles : primovaccination et rappels	90
10.1.4	Immunité post-vaccinale.....	90

10.2	Prophylaxie sanitaire et conduite à tenir en cas d'épizootie	91
10.2.1	Notion d'élevage indemne	91
10.2.2	Prévention de l'introduction	91
10.2.3	Limitation de la propagation en cas d'épizootie.....	92
Partie 3 : Emergence et Evolution des Lagovirus		94
1	Contexte.....	94
2	Le modèle évolutif des <i>Lagovirus</i> australiens.....	95
2.1	Influence territoriale.....	96
2.2	Données sur l'évolution du RCV-A1.....	99
2.3	Epidémiologie moléculaire du RHDV en Australie	101
2.3.1	Analyse phylogénétique.....	102
2.3.2	Taux d'évolution virale.....	104
2.3.3	Diversité génétique	105
2.3.4	Pression de sélection sur les gènes de la VP60.....	106
2.4	Etude comparative Australie – Nouvelle-Zélande.....	106
2.4.1	Analyse phylogéographique des virus isolés en Australie et Nouvelle-Zélande.....	107
2.4.2	Analyse temporelle	109
2.5	Parallèle avec le virus de la myxomatose.....	110
2.5.1	Evolution de la virulence sur le terrain	110
2.5.2	Evolution virale dans un environnement naïf.....	112
2.5.3	Mise en place de résistances aux agents de biocontrôle	112
2.5.4	Evolutions comparées en Australie et en Europe.....	113
3	Dynamique évolutive	113
3.1	Un virus détecté après plusieurs années de circulation ?.....	113
3.2	Données issues des souches pathogènes introduites en Australie	114

3.3	Données issues de l'observation des souches non pathogènes	117
3.3.1	Phylogénie.....	117
3.3.2	Taux d'évolution.....	118
3.3.3	Pression de sélection positive.....	118
4	Emergence d'un nouveau variant pathogène : le RHDV2	120
4.1	La découverte	120
4.2	Le RHDV2 français	121
4.3	Evolution géographique	123
4.4	Nouveaux éléments épidémiologiques	125
4.4.1	Espèces sensibles	125
4.4.2	Age	126
4.4.3	Mortalité	126
4.5	Pathogénicité et Propriétés antigéniques	126
4.5.1	Fixation du RHDV2 aux antigènes tissulaires ABH et de reconnaissance sur les glycannes de duodénum de lapin.....	126
4.5.2	Profil antigénique.....	129
5	Hypothèses évolutives et évènements recombinants.....	130
5.1	Augmentation de la pathogénicité à partir de souches apathogènes par mutations ponctuelles.....	131
5.2	Augmentation de la pathogénicité à partir de souches apathogènes par recombinaisons homologues.....	132
5.3	Saut d'espèce cible	136
5.4	En réalité, que s'est-il passé ?	137
	Conclusion	139

Table des illustrations

Tableaux

Tableau 1 : Aperçu des espèces de la famille des Caliciviridae	21
Tableau 2 : Résultats de l'analyse des recombinaisons	134

Figures

Figure 1: Dendrogramme présentant les relations entre les différents genres dans la famille des Caliciviridae construit à partir de la séquence en acides aminés de leur protéine de capsid VP60.	23
Figure 2 : Classification des Norovirus en 7 génogroupes, basée sur la diversité des séquences complètes en acides aminés de leur protéine majeure de capsid (VP60) (d'après (Vinjé, 2015)).	25
Figure 3 : Le RHDV en microscopie électronique (Wang et al., 2013)	27
Figure 4 : Structures tridimensionnelles du FCV et de sa protéine de capsid majeure	28
Figure 5 : Structures cristallines des domaines P de quatre membres de la famille des Caliciviridae.	29
Figure 6 : Organisation du génome des Caliciviridae.	33
Figure 7 : Cycle de multiplication des calicivirus (Rohayem et al., 2010).	34
Figure 8 : Représentations des deux formes de RHDV.	42
Figure 9 : Organisation du génome du RHDV.	44
Figure 10 : Distribution cellulaire de la protéine non structurale p16 du RHDV.	45
Figure 11 : Organisation du génome de l'EBHSV.	48
Figure 12 : Cycle épidémiologique de la RHD d'après (Cloet, 2012 ; Merchán et al., 2011 ; Kerr, Donnelly, 2013)	51
Figure 13 : Photographie d'un lapin atteint de RHD.	58
Figure 14 : Lapin mort de la RHD suite à une crise convulsive.	58
Figure 15 : Epistaxis et hématomène chez un lapin mort de forme aiguë de RHD.	58
Figure 16 : Ictère et chémosis chez un lapin mort de forme subaiguë de RHD	59
Figure 17 : Lésions macroscopiques retrouvées lors de l'autopsie d'un lapin mort de RHD.	60
Figure 18 : Foie d'un lapin atteint de RHD.	61
Figure 19 : Coupes histologiques de foies de lapin sain (A) et de lapin infecté par le RHDV (B).	62
Figure 20 : Immunocytochimie évaluant l'apoptose dans le foie.	63
Figure 21 : Appareil respiratoire d'un lapin atteint de RHD.	65
Figure 22 : Lésions rénales microscopiques à différents temps post-infection par le RHDV.	66
Figure 23 : Foie de lapin adulte atteint de RHD euthanasié 24 heures post inoculation.	72
Figure 24 : Immunohistochimie des antigènes de RHDV dans le foie sur des coupes colorées à l'hématoxyline.	73
Figure 25 : Marquage de l'ARN positif du RHDV sur une coupe de rate de lapin atteint de la maladie.	74

Figure 26 : Marquage de l'ARN positif du RHDV sur une coupe de poumon de lapin atteint de la maladie.....	74
Figure 27 : Représentation schématique de la moyenne du nombre de copies d'ARN viral détectées par organe en QRT-PCR.	75
Figure 28 : Foies de lapins infectés par le RHDV vus en microscopie électronique.	79
Figure 29 : Courbe de survie lors d'une épreuve virulente de RHD, à des intervalles différents après exposition des lapins au RCV-A1 (Strive et al., 2013).....	82
Figure 30 : Efficacité de la Cardiotrophine-1 sur les lésions histologiques lors de RHD.	87
Figure 31 : Arbre phylogénétique construit suite à la caractérisation du RHDV2. (Le Gall-Recule et al., 2011)...	95
Figure 32 : Distribution et prévalence du RCV-A1 dans les populations de lapins sauvages en Australie.....	98
Figure 33 : Estimation de la prévalence du RCV-A1 en Australie associée à des périodes humides et sèches (Liu et al., 2014).....	99
Figure 34 : Arbre phylogénétique réalisé par la méthode « Bayesian Maximum Clade Credibility » à partir de séquences de VP60 de RCV-A1 et RHDV (Jahnke et al., 2010).....	100
Figure 35 : Carte des points de prélèvements de RHDV en Australie de 1995 à 2011	102
Figure 36 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences de RHDV australiens (MCC)	103
Figure 37 : Evolution de la diversité génétique relative du RHDV au cours du temps.....	105
Figure 38 : Arbre phylogénétique obtenu par l'analyse de 84 souches de RHDV d'Australie et Nouvelle-Zélande (Eden, Kovaliski, et al., 2015).....	108
Figure 39 : Structure temporelle du gène de la VP 60 du RHDV en fonction de sa localisation géographique (Eden, Kovaliski, et al., 2015).....	109
Figure 40 : Impact temporel du MYXV et du RHDV sur les populations australiennes de lapins.	110
Figure 41 : Relations possibles entre virulence et transmission chez les virus du lapin.	111
Figure 42 : SNP dans le génome des souches de RHDV initialement introduites en Australie.....	115
Figure 43 : Structure temporelle du gène de la VP60 des souches circulant mondialement.(Eden, Read, et al., 2015)	117
Figure 44 : Alignement des séquences consensus des acides aminés du gène de la VP60 du RHDV2 et des autres Lagovirus (Le Gall-Reculé et al., 2013).....	122
Figure 45 : Distribution spatiale des épizooties de RHDV dans les populations françaises de lapins sauvages en France en 2010 et 2011.(Le Gall-Reculé et al., 2013).....	124
Figure 46 : Distribution spatiale des épizooties de RHDV dans les populations françaises de lapins sauvages en France en 2012.(Le Gall-Recule et al., 2013)	124
Figure 47 : Profil de fixation du RHDV2 sur des sucres complexes de type HBGA.....	127
Figure 48 : Profil de reconnaissance du RHDV2 sur les glycanes de la surface du duodénum de lapins.....	128
Figure 49 : Réponse an anticorps chez des lapins vaccinés contre le RHDV et le RHDV2 (ELISA indirect)(Bárcena et al., 2015).....	130
Figure 50 : Similarity plot pour deux types de RHDV2 recombinants (Lopes et al., 2015)	135
Figure 51 : Origine possible des Lagovirus du lapin européen (<i>O.cuniculus</i>), d'après l'hypothèse d'un saut d'espèce (Esteves et al., 2015)	138

Table des abréviations

°C : *degrés Celcius*
ACT : *Australian Capital Territory*
ADN : *Acide désoxyribonucléique*
ALAT : *Alanine amino-transférase*
AOM : *Anticorps d'Origine Maternelle*
ARN : *Acide Ribo Nucléique*
ARNm : *ARN messagers*
ASAT : *Aspartate amino-transférase*
cELISA : *ELISA compétitif*
CIVD : *Coagulation intravasculaire disséminée*
CLP : *Core-Like Particle*
csv : *vacuolisation cellulaire*
CT-1 : *Cardiotrophine-1*
D-values : *Temps de réduction décimaux*
EBHSV : *European Brown Hare Syndrome Virus*
eIF4F : *Facteur d'initiation eucaryote 4F*
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FCV : *Feline Calicivirus*
FMDV : *Foot and Mouth Disease Virus*
GGT : *Gamma glutamyl-transférase*
HBGAs : *Histo-Blood Group Antigens*
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*
hn : *nécrose hépatique*
hpi : *heures post-infection*
HuCVs : *Human Calicivirus*
ICTV : *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IFN-β : *Interféron bêta*
IgA : *Immunoglobuline A*
IgG : *Immunoglobuline G*
IgM : *Immunoglobuline M*
IgY : *Immunoglobuline Y*
JAM-1 : *Junctional Adhesion Molecule 1*
JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*
kb : *kilobases*
KLH : *Keyhole Limpet Hematocyanin*
km² : *kilomètres carrés*
LU : *Souche Lausanne du MYXV*
Mabs : *Anticorps monoclonaux*
MNV : *Norovirus murins*
mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*
MYXV : *Myxoma Virus*
NSW : *New South Wales*

NT : Northern Territory
NV : *Norwalk virus*
OIE : *Office International des Epizooties*
ORF : *Open Reading Frame*
PAL : *Phosphatase alcaline*
PARP : *Poly (ADR-ribose) Polymérase*
PCR : *Polymérase Chain Reaction*
PEC : *Porcine Enteric Calicivirus*
QLD : Queensland
Q-PCR : *PCR quantitative*
RCV : *Rabbit Calicivirus (souches non pathogènes)*
RdRp : *RNA dependent RNA polymerase*
RHD : *Rabbit haemorrhagic disease*
RHDV : *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*
RT-PCR : *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
SA : South Australia
SAGIR : *Réseau de surveillance épidémiologique des oiseaux et des mammifères sauvages terrestres en France*
sgRNA : *ARN subgénomique*
SLS : *MYXV Standard Laboratory Strain*
SMSV : *San Miguel Sea Lion virus*
SNP : *Single Nucleotide Polymorphisms*
SRSVs : *Small Round Structured Viruses*
STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*
SV : *Sapporo virus*
TAS : Tasmania
TF : Turretfield
TGFβ1 : *Transforming Growth Factor β1*
TMRCA : *Time to the Most Common Ancestor*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TUNEL : *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*
TV : *Tulane Virus*
UTRs : *UnTranslated Regions*
UV : *rayons ultraviolets*
VES : *Vesicular Exanthema of Swine*
VESV : *Vesicular Exanthema of Swine Virus*
VF1 : *Facteur de virulence 1*
VIC : Victoria
VLP : *Virus-like Particles*
VNL : *Norwalk-like virus*
VP1 ou VP60 : *Protéine majeure de capside*
VP2 ou VP10 : *Protéine mineure de capside*
VP60-N : *Région N-terminale de la VP60*
VPg : *Protéine virale liée au génome*
WA : Western Australia

Introduction

L'émergence de virus pathogènes est une grande préoccupation de la communauté scientifique, bien que les mécanismes sous-jacents soient souvent mal compris.

De par leurs caractéristiques génétiques, les virus à ARN sont fréquemment impliqués dans des processus évoluant vers la pathogénicité ou l'élargissement du spectre de leurs espèces hôtes. Ce fut le cas récemment avec les virus *Influenza*, dont certains ont alarmé le monde entier suite à l'acquisition d'un potentiel zoonotique.

Dans la famille des *Caliciviridae*, le genre *Lagovirus* englobe des virus non pathogènes (RCVs) et deux virus très pathogènes pour les lagomorphes. Il s'agit du virus de la Maladie Hémorragique du Lapin (RHDV) affectant le lapin européen (*O. cuniculus*) et du virus du Syndrome du Lièvre Brun Européen (EBHSV) affectant trois espèces de lièvres (*Lepus europaeus*, *L. timidus* et *L. corsicanus*). Ces deux virus ayant émergé à la fin des années 1970, début des années 1980, présentent une structure similaire et environ 70% d'identité mais causaient jusqu'à récemment deux maladies bien distinctes. Compte tenu des fortes mortalités observées, ces virus impactent à la fois la filière de l'élevage du lapin et les populations de léporidés sauvages, bouleversant alors tout un écosystème.

Ce potentiel a pourtant été mis à profit par les autorités australiennes qui ont introduit volontairement le RHDV sur leur territoire comme agent de lutte biologique contre l'espèce envahissante *O. cuniculus*. Faisant suite à la diminution de virulence du virus de la myxomatose, introduit dans le même but dans les années 1950, le RHDV a permis le contrôle des populations de lapins sur une courte période et de façon variable suivant les régions.

Depuis 2010, l'apparition d'un nouveau variant pathogène, le RHDV2, capable de franchir la barrière d'espèce et de déclencher la maladie chez plusieurs types de lièvres accroît les questionnements autour des mécanismes évolutifs de ces virus. L'évolution vers la virulence à partir de souches non pathogènes ou suite à un saut d'espèce sont les deux hypothèses majeures qui animent les débats entre chercheurs.

Après des rappels sur les connaissances générales disponibles sur les *Lagovirus*, ce travail aura pour but d'explorer les différentes hypothèses évolutives proposées par la

communauté scientifique et d'en faire ressortir les éléments marquants pour proposer le modèle évolutif le plus probable ainsi que les facteurs pouvant l'influencer.

Partie 1 : La famille des *Caliciviridae*

1 Taxonomie

1.1 Historique

De nombreuses années d'observations et d'études des virus ont été nécessaires à la création et à la caractérisation de la famille des *Caliciviridae*.

La première description d'une infection à *Calicivirus* remonte à 1932 aux Etats-Unis, lors d'une épizootie d'exanthème vésiculaire du porc (en anglais VES pour Vesicular Exanthema of Swine) qui dura jusqu'en 1959. L'origine de cette épizootie a été reliée à l'alimentation des porcs à base de viande de mammifères marins. En effet, on retrouve chez ces derniers un virus appelé San Miguel Sea Lion virus (SMSV) qui cause des symptômes semblables à ceux retrouvés sur les porcs. Il provoque l'éruption de vésicules sur les nageoires chez les mammifères marins ou sur le groin et les ongles chez les porcs. Ces symptômes étant également proches de ceux de la fièvre aphteuse, les cas de VES furent suivis de près. Cela a permis de rapidement mener des études immunologiques qui ont exclu toute relation entre les épizooties de VES et de fièvre aphteuse.

C'est en 1968 que fut caractérisé un petit virus à ARN, icosaédrique, comme étant l'agent étiologique et qui a été dénommé VESV « Vesicular Exanthema of Swine Virus ». Cette découverte a ensuite fait du VESV le virus prototype de la famille des *Caliciviridae*. (Thiel, König, 1999 ; Green et al., 2000)

De par la petite taille de sa capsid, son ARN simple brin non segmenté et sa réplication cytoplasmique, le VESV a été rapproché des genres *Enterovirus* et *Rhinovirus*, et donc classé avec le calicivirus félin « Feline Calicivirus » (FCV) et le SMSV dans la famille des *Picornaviridae*. Cette hypothèse était alors étayée par les similitudes cliniques avec le picornavirus bien connu, responsable de la fièvre aphteuse, le « Foot and Mouth Disease Virus » (FMDV).

Dès 1957, en Nouvelle – Zélande, le FCV (classé a priori chez les *Picornaviridae* et qui appartient aujourd'hui aux *Caliciviridae*) est isolé par Fastier. Ce virus était connu à l'époque pour causer principalement des affections respiratoires chez les chats (Fastier, 1957).

L'importance accordée à ces virus dans les années suivantes a permis l'apport de nouvelles connaissances. Ainsi, de nombreuses différences mises en évidence concernant leur structure, leur stratégie de réplication et leurs propriétés physico-chimiques ont conduit à leur exclusion de la famille des *Picornaviridae*. Suite à cela, en 1979, le Comité International sur la Taxonomie des Virus (en anglais ICTV pour International Committee on Taxonomy of Viruses) créa une nouvelle famille pour ces virus à ARN positif, simple brin, dénommée *Caliciviridae*. Ce nom est issu de « calix », en rapport avec la forme en gobelet des dépressions observées en microscopie électronique à la surface des virions (King, 2012).

La création de cette nouvelle famille a donné l'impulsion à des études plus précises sur les relations entre ses membres. Ainsi, des virus découverts dans les années 1970, dont le *Norwalk virus* (NV) et les *Human Calicivirus* (HuCVs) associés à des gastro-entérites épidémiques humaines y ont été intégrés. Les NV sont alors devenus les virus prototypes d'un groupe de virus similaires appelés communément « Small Round Structured Viruses » (SRSVs), fréquemment rencontrés dans les épidémies de gastro-entérite. L'identité et le rôle des dits « HuCVs » restaient encore bien moins clairs. Morphologiquement différents, en ce sens qu'ils présentent des structures bien définies, en forme de coupe à leur surface observée en microscopie électronique en coloration négative, ils ont été séparés des « Norwalk-like virus » (VNL) dans un système de classification provisoire basé sur la morphologie des virus. Aussi, le virus de Sapporo (SV) est devenu la souche prototype de ce groupe de virus suite à des épidémies de gastro-entérite chez les nourrissons et les jeunes enfants en 1982 à Sapporo, au Japon. (Caul, Appleton, 1982).

Le premier *calicivirus* pathogène pour les lagomorphes, le « European Brown Hare Syndrome Virus » (EBHSV) a été identifié pour la première fois au Danemark en 1982. Il a été suivi de l'agent de la « Rabbit Haemorrhagic Disease », le RHDV en Chine en 1984. Ce dernier a d'abord été décrit comme appartenant alternativement aux *parvoviridae* et ou aux *picornaviridae* avant d'être classé dans la famille des *Caliciviridae* en 1990. Par la suite, de nombreux virus, isolés de divers mammifères, oiseaux ou reptiles seront classés dans la famille des *Caliciviridae*, comme l'indique le tableau 1 de manière non exhaustive.

Dans le 6^{ème} Rapport de l'ICTV publié en 1995, l'ensemble des virus appartenant aux *Caliciviridae* étaient regroupés dans un seul genre, *Calicivirus*. En effet, malgré une apparente variabilité génétique, antigénique et une large gamme d'hôtes atteints, il était difficile de les

différencier de par l'impossibilité à cultiver la majorité d'entre eux *in vitro*. Ainsi, les caractéristiques traditionnellement utilisées pour la classification des virus (propriétés physico-chimiques, synthèse des protéines en cellules infectées, relations antigéniques et tropisme cellulaire...) n'étaient pas disponibles. Depuis, les nouveaux outils disponibles comme le séquençage génomique et les analyses phylogénétiques ont permis à l'ICTV d'adopter un nouveau système de classification et de nomenclature en 1998 (Green et al., 2000). Dans son 9^{ème} rapport en 2012, l'ICTV considère 5 genres dans la famille des *Caliciviridae* (*Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus*, *Norovirus* et *Nebovirus*) présentées dans le tableau n°1.

Tableau 1 : Aperçu des espèces de la famille des *Caliciviridae* (King, 2012 ; Oehmig, 2003 ; Augustyniak, 2006)

Famille	Genre	Espèces	Hôtes principaux	Eléments cliniques majeurs
CALICIVIRIDAE	<i>Vesivirus</i>	FCV <i>Feline calicivirus</i>	Chat	Pneumonies Stomatites aiguës
		VESV <i>Vesicular exanthema of swine virus</i>	Porc	Exanthème vésiculaire
		CaCV <i>Canine calicivirus</i>	Chien	Diarrhée Vésicules cutanées
		2117 <i>2117 CHOcalicivirus</i>	Cellules CHO	Effets cytopathiques
		MCV <i>Mink calicivirus</i>	Vison	Asymptomatique
	<i>Lagovirus</i>	EBHSV <i>European brown hare syndrome virus</i>		Hépatites aiguës fulminantes associées à une coagulation intravasculaire disséminée.
		RHDV <i>Rabbit haemorrhagic disease virus</i>		
	<i>Norovirus</i>	NV <i>Norwalk virus</i>	Homme	Symptômes gastro-intestinaux
	<i>Sapovirus</i>	SV <i>Sapporo virus</i>	Homme	Symptômes gastro-intestinaux
	<i>Nebovirus</i>	Newbury1 <i>Newbury – 1 virus</i>	Veaux	Diarrhées
Virus apparentés qui peuvent être membres de la famille des <i>Caliciviridae</i> , mais qui n'ont pas été approuvée comme des espèces	TulaV <i>Tulane virus</i>	Primates	Symptômes gastro-intestinaux	
	Valo V <i>St Valérien virus</i>	Porc		
	ChCV <i>Chicken calicivirus</i>	Poulet	Rachitisme	

CHO = Chinese Hamster Ovary . Les noms grisés correspondent à des virus proches des *Vesivirus* mais qui ne sont pas reconnus comme une espèce.

1.2 Phylogénie et classification

Les espèces appartenant à la famille des *Caliciviridae* répondent à quatre critères communs (Green et al., 2000 ; King, 2012) :

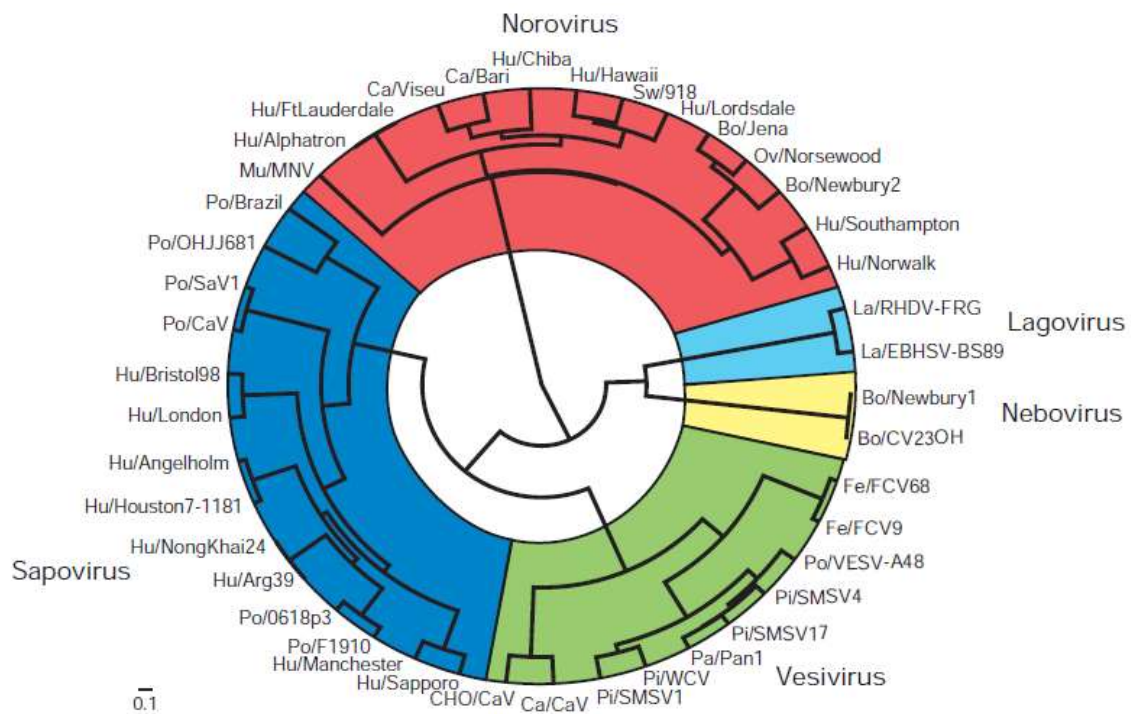
- Leur génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive et polyadénylé.
- L'extrémité de ce génome présente une petite protéine appelée VPg (pour Viral Protein linked to the genome), liée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin d'ARN. Celle-ci permet l'interaction du génome avec les facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction et donc son expression.
- Leur capsid présente une symétrie icosaédrique composée d'une seule protéine, la protéine structurale majeure ou VP60.
- Ils doivent, en analyse phylogénétique, former un groupe monophylétique ayant un ancêtre commun.

Ainsi, les cinq genres présentés ci-dessus répondent à ces critères.

Comme évoqué précédemment, la notion de genre au sein de la famille des *Caliciviridae* a connu des évolutions au cours des dernières décennies, permises en particulier grâce aux progrès en génétique. En outre, certains critères initialement utilisés pour subdiviser les familles en genre, notamment l'espèce hôte ne sont plus utilisés. Actuellement, la définition admise par l'ICTV est la suivante : « un genre dans la famille des *Caliciviridae* est défini comme un clade génétiquement distinct de virus ». C'est-à-dire que c'est l'utilisation d'arbres phylogénétiques qui va permettre de déterminer le statut taxonomique d'un calicivirus donné. Cela a conduit, suite à plusieurs études phylogénétiques, à l'élaboration de dendrogrammes qui subdivisent la famille des *Caliciviridae* en cinq genres à partir d'un ancêtre commun. Le dernier en date a été publié en 2012 par l'ICTV et est présenté en Figure 1.

Figure 1: Dendrogramme présentant les relations entre les différents genres dans la famille des *Caliciviridae* construit à partir de la séquence en acides aminés de leur protéine de capsid VP60.

Chaque genre est présenté sous une couleur différente. Dans un but de compréhension des relations entre les différents genres, certaines souches de virus ont été incluses alors qu'elles ne sont pas encore officiellement reconnues par l'ICTV. L'unité d'échelle représente le nombre de substitutions d'acides aminés par site (King, 2012).



1.3 *Caliciviridae*, une famille aux 5 genres (King, 2012)

1.3.1 Le genre *Vesivirus*

Le virus prototype du genre *Vesivirus* est le VESV A₄₈. Ce virus et ceux isolés à partir d'espèces marines sont phylogénétiquement regroupés et familièrement appelés « *Vesivirus marins* ». Le FCV est également reconnu comme une espèce distincte au sein du genre. Une collection d'isolats de *Vesivirus* a permis de construire le dendrogramme présenté par la Figure 1.

La plupart des membres de ce genre peuvent être facilement cultivés sur tapis cellulaire. Le FCV se multiplie plus efficacement dans des cellules d'origine féline et se retrouve préférentiellement *in vivo* au niveau des voies respiratoires supérieures. L'isolement de la majorité des *Vesivirus marins* est possible dans des cellules de rein de singe vert d'Afrique ou

de rein de porc. Testés *in vivo*, environ la moitié des Vesivirus marins ont provoqués des vésicules cutanées chez des porcs, des chevaux et des bovins, évoquant ainsi de possibles saut d'espèces. Ces vésicules se sont également naturellement manifestées chez des chiens, des pinnipèdes, des cétacés et des primates (y compris l'Homme) ayant été en contact avec le virus. (King, 2012)

1.3.2 Le genre *Norovirus*

Jusqu'en 2002, le genre *Norovirus* était dénommé « Norwalk-like viruses » car l'espèce type est le Norwalk virus (NV). Les virus de ce genre sont aujourd'hui très présents dans l'actualité scientifique car ils sont l'agent étiologique de gastro-entérites épidémiques humaines et animales.

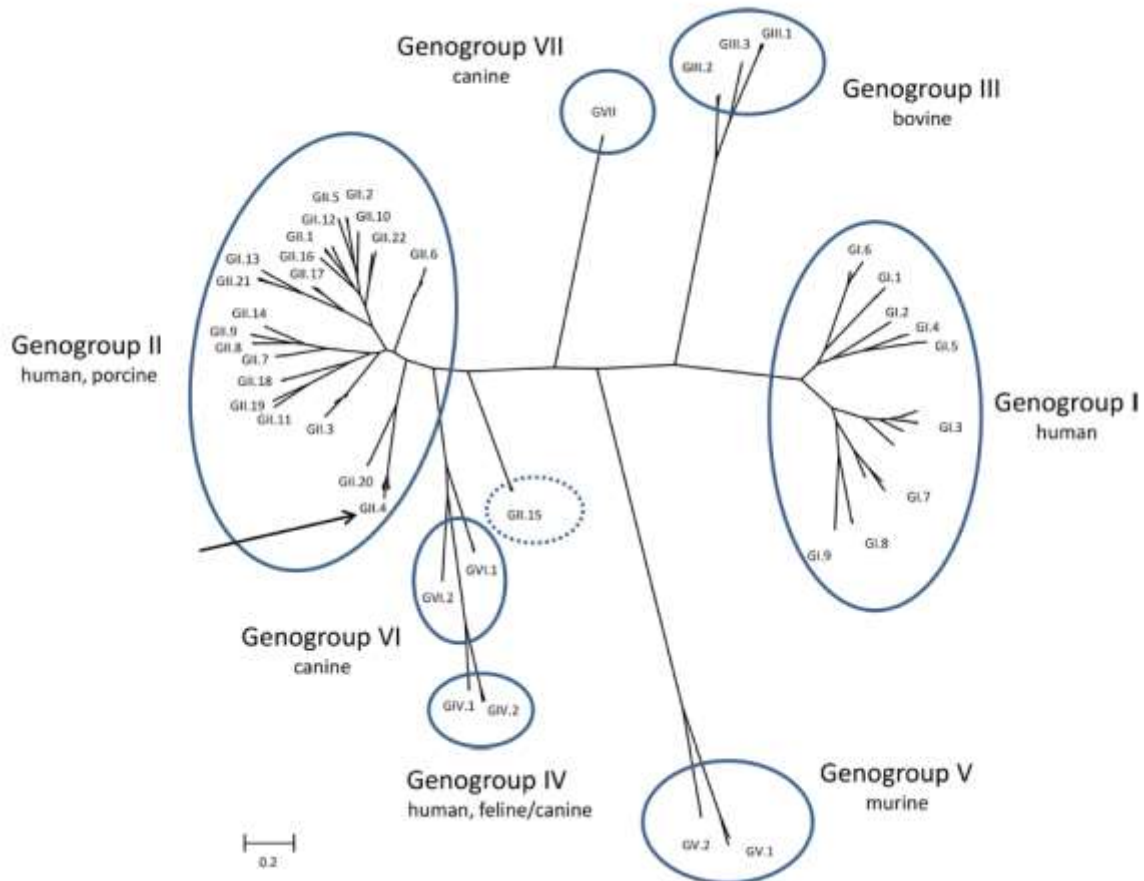
A l'exception des souches murines, les *Norovirus* ne peuvent pas être cultivés *in vitro*, ce qui empêche leur classification en différents sérotypes. C'est donc sur la base des relations phylogénétiques, analysées à partir des séquences d'acides aminés de la totalité de la VP1 (protéine de capsid majeure), que les *Norovirus* détectés chez plusieurs espèces de mammifères, ont été divisés en six génogroupes notés GI à GVI.

Les génogroupes GI, GII et GIV infectent les êtres humains (GII étant prépondérant). Les *Norovirus* détectés chez l'animal ont été classifiés en GII (chez le porc), GIII (chez les ruminants), GIV (chez le lion, le chat et le chien), GV chez la souris et GVI (chez le chien) (Di Felice et al., 2016).

Dans un mini revue (Vinjé, 2015), un troisième groupe de *Norovirus* canin identifié dans des échantillons fécaux de chiens à Hong Kong, apparaît comme candidat pour la formation d'un nouveau génogroupe (GVII). Cette étude présente également une proposition de classification phylogénétique de ces sept génogroupes (Figure 2).

Figure 2 : Classification des Norovirus en 7 génogroupes, basée sur la diversité des séquences complètes en acides aminés de leur protéine majeure de capsid (VP60) (d'après (Vinjé, 2015)).

La barre d'échelle représente le nombre de substitutions d'acides aminés par site étudié. La flèche indique le groupe GII.4, responsable de la majorité des cas d'infections à Norovirus au niveau mondial.



1.3.3 Le genre *Sapovirus*. (Oka et al., 2015)

Désigné jusqu'en 2002 sous le nom de « Sapporo-like viruses », ce genre a pour espèce type le *Sapporo virus* (SV). Seules les souches porcines ont actuellement pu être cultivées *in vitro*, ainsi qu'une souche isolée lors d'une épidémie de gastro-entérite humaine en 1977 (Kjeldsberg, 1977).

Ce genre est subdivisé en cinq génogroupes phylogénétiques, basés sur les séquences nucléotidiques complètes de la VP1. La majorité des *Sapovirus* ont été détectés chez l'Homme ou le porc. Cependant, lors de récentes études métagénomiques, le génome de certains

Sapovirus a été détecté dans des fèces d'otaries de Californie (Li, Shan, et al., 2011) et de chiens (Li, Pesavento, et al., 2011).

1.3.4 Le genre *Nebovirus*.

Le genre *Nebovirus* a été créé et adopté en 2009 par l'ICTV (Carstens, 2010). Les virus de ce genre sont connus depuis les années 1980 car ils causent des épisodes endémiques de diarrhée chez des veaux dont la sévérité peut être supérieure à celle rencontrée avec les *Norovirus GIII*. L'espèce type de ce genre est le *Newbury-1 virus*. Les *Nebovirus* ne pouvant pas être cultivés *in vitro*, peu d'informations sur leurs propriétés biologiques sont disponibles. Cependant, les souches *Newbury-1 virus* et *BEC NB virus* semblent posséder deux polymérases phylogénétiquement distinctes mais des séquences de VP1 communes. Cela suggère que, comme d'autres calicivirus entériques, les *Nebovirus* peuvent subir des recombinaisons (Di Martino et al., 2011).

1.3.5 Le genre *Lagovirus*.

Les virus appartenant au genre *Lagovirus* sont nommés ainsi de par leur tropisme quasi-exclusif pour les lagomorphes. Les deux représentants de ce genre sont le RHDV (*Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*) et l'EBHSV (*European Brown Hare Syndrom Virus*), responsables d'une contagiosité et de mortalités importantes chez les lagomorphes domestiques ou sauvages.

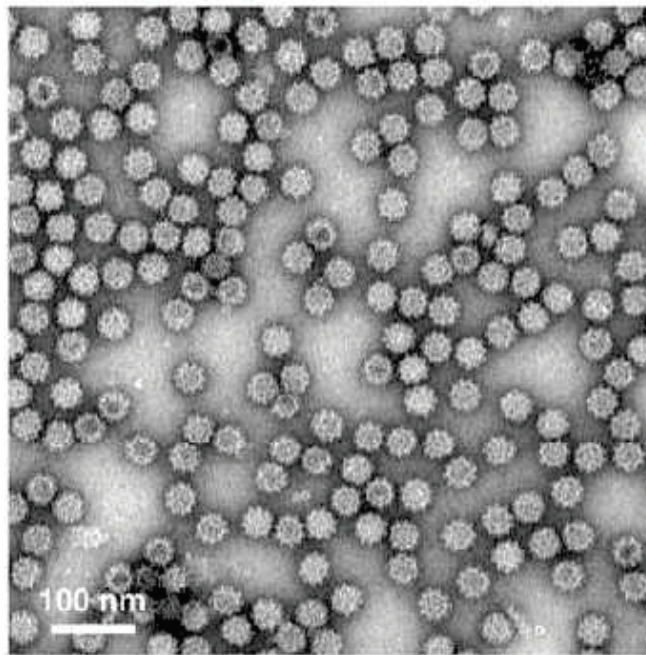
Une étude détaillée des virus de ce genre est réalisée dans la deuxième partie de ce travail.

2 Le virion

2.1 Morphologie et structure

Le nom de *Caliciviridae* a pour origine les dépressions caractéristiques en forme de calice que l'on peut observer à la surface des virions en microscopie électronique, comme l'on peut l'observer sur la Figure 3.

Figure 3 : Le RHDV en microscopie électronique (Wang et al., 2013)



Ce sont des virions non enveloppés de 32 à 44 nm de diamètre, à symétrie icosaédrique. Leur étude en cristallographie et en microscopie cryo-électronique a permis de montrer une architecture commune aux *Caliciviridae*. La capsid est composée de 90 dimères de la protéine virale majeure (appelée VP1 ou VP60) disposés en réseau icosaédrique T=3. Cette symétrie est illustrée chez le RHDV par la Figure 4A.

La VP1 / VP60 (VP60 uniquement sera utilisé dans la suite de ce document) est divisée en trois domaines :

- Le bras N-terminal (NTA pour N-Terminal Arm)
- Le domaine S (de l'anglais « shell », de par sa forme en coquille)
- Le domaine P (de l'anglais « protruding », qui fait protrusion)

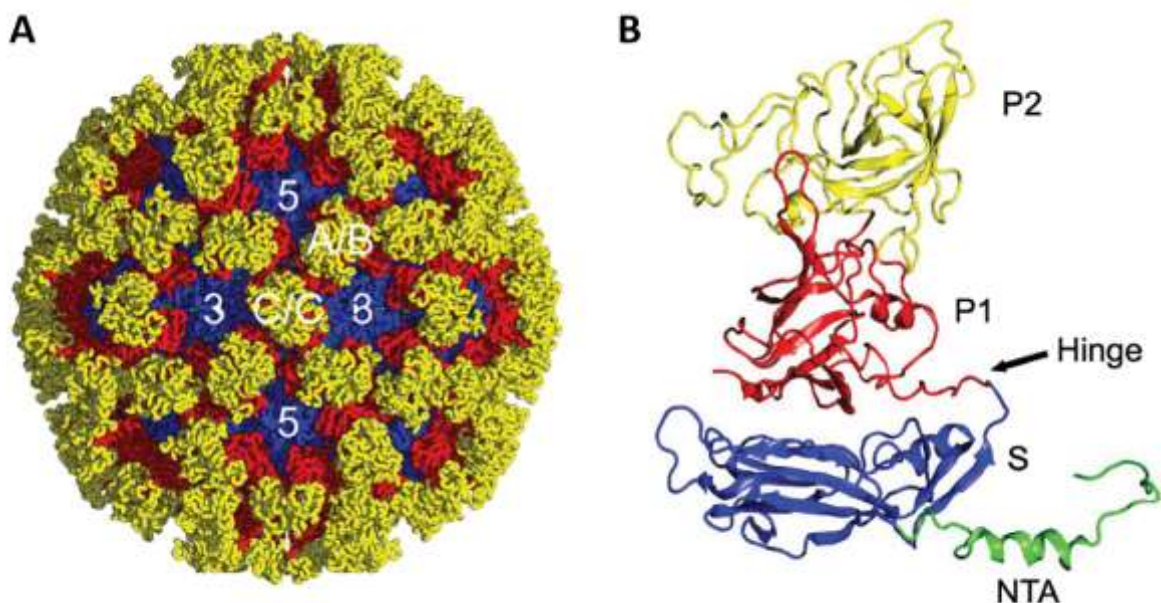
Le domaine S constitue le plancher contiguë de la capside et a une topologie en tonneau bêta, couramment observée dans les protéines structurales des virus d'animaux et de plantes. Une partie charnière le relie au domaine P qui forme les protubérances en forme d'arche caractéristiques à la surface des virions et est divisé en deux sous domaines (P1 qui est proximal et forme la tige de l'arche et P2, distal, forme le sommet). Le bras N-terminal va permettre l'assemblage du virion en s'entremêlant avec les sous-unités voisines pour former la capside. L'ensemble de ces éléments vont avoir une importance dans la reconnaissance virus-hôte, l'entrée du virus dans les cellules et la réponse immunitaire induite (Wang et al., 2013).

La symétrie icosaédrique $T=3$ donne naissance à trois environnements quasi équivalents, en lien avec des conformations tridimensionnelles de la VP60 différentes appelées A, B et C. Cela conduit à la formation de deux catégories de dimères : le dimère AB, disposé autour de l'axe de symétrie 5 et le dimère CC situé autour de l'axe de symétrie 2 (Bhella, Goodfellow, 2011). Cette organisation est représentée par la Figure 4 pour le FCV.

Figure 4 : Structures tridimensionnelles du FCV et de sa protéine de capside majeure

A : Structure tridimensionnelle du FCV-5 vu selon l'axe de symétrie 2 de l'icosaèdre. Les axes de symétrie 5 et 3 sont représentés ainsi que l'agencement des dimères AB et CC.

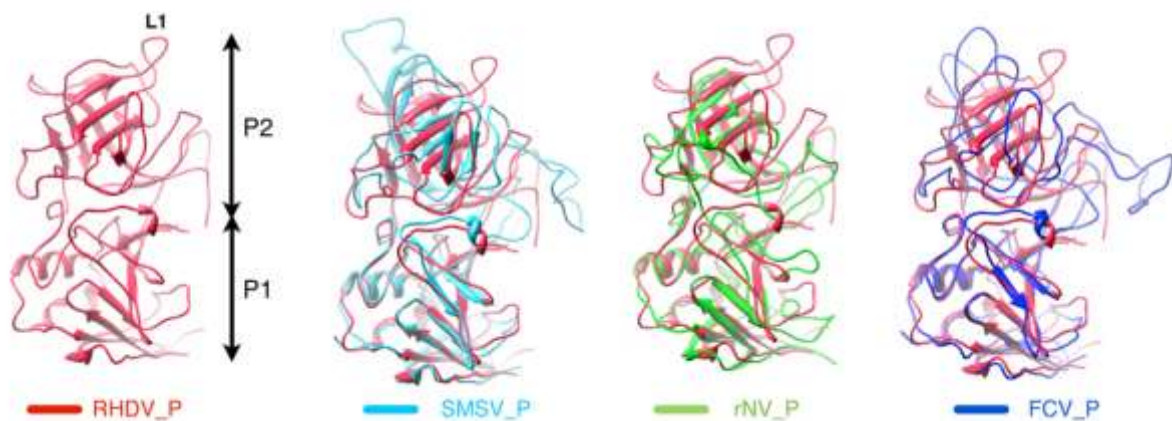
B : la partie NTA (vert), le domaine S (bleu), et les domaines P1 (rouge) et P2 (jaune) sont indiqués (Ossiboff et al., 2010)



En 2013, (Wang et al., 2013) ont mis en évidence l'homologie structurale des domaines S des différents genres de *Caliciviridae* en se basant sur la cristallographie de la VP60 du RHDV, comparée à celles obtenues pour le FCV, SMSV et NV. Cela suggère donc que la charpente interne des *Caliciviridae* est très conservée entre les genres. Les sous-domaines P1 de quatre virus de la famille ont également montré une structure proche entre elles. En revanche, les sous-domaines P2 présentent quant à eux une grande diversité de séquences, tout en conservant une structure en feuillets bêta. Ainsi, chaque virus possède à sa surface, des régions possédant des boucles qui diffèrent d'un genre à l'autre et qui seraient à l'origine de la spécificité d'hôte (Figure 5). Le RHDV présente en particulier, une boucle très exposée à la surface du virion (appelée L1), fortement variable d'un point de vue génétique entre les isolats, qui serait impliquée dans l'interaction virus-hôte et donc un potentiel site de neutralisation.

Figure 5 : Structures cristallines des domaines P de quatre membres de la famille des *Caliciviridae*.

Structure cristalline du domaine P de la VP60 du RHDV (rouge), superposée avec celles des rNV (vert), SMSV (cyan), et FCV (bleu). La boucle L1 de la VP60 du RHDV est légendée. (Wang et al., 2013)



2.1 Propriétés physico-chimiques

Les difficultés rencontrées pour la culture de nombreux *Calicivirus in vitro* constituent un obstacle majeur à la détermination de leur capacité à résister dans l'environnement. Comme pour les autres virus de petite taille, non enveloppés, les calicivirus sont capables de survivre sous des conditions qui habituellement inactivent les autres familles (surtout les virus enveloppés). De nombreuses données sont disponibles à propos de souches utilisées comme modèles pour l'inactivation des *Norovirus* humains.

2.1.1 Sensibilité à la température

Les *Calicivirus* sont inactivés à température ambiante sur les surfaces et en suspension en 7 jours. On observe des taux d'inactivation variables entre 50 et 56 °C, avec une inactivation massive si le temps d'exposition est supérieur à 30 minutes (Nims, Plavsic, 2013). Récemment, deux méthodes moléculaires permettant d'estimer l'intégrité des capsides virales comme facteur d'infectiosité ont permis de produire des profils d'inactivation thermique du *Snow Mountain Virus*. Ces virus, utilisés comme prototypes des NV humains se sont avérés plus résistants, avec des D-values (temps de réduction décimale ¹) de 25.6 ± 2.8 min, 3.1 ± 0.1 min, et 0.2 ± 0.07 min à respectivement 77°C, 80°C et 85°C. Certains *Caliciviridae* ne seraient donc pas inactivés par des procédés d'inactivation thermiques standards comme la pasteurisation (Escudero-Abarca et al., 2014).

2.1.2 Sensibilité aux UV

Les ultraviolets (UV) sont couramment utilisés pour la désinfection de l'eau, des aliments et des surfaces. La sensibilité du FCV aux UV a été étudiée afin d'évaluer celle des norovirus humains. Ainsi, les doses de 6, 26 et 36 mJ/cm² inactivent respectivement 90%, 99.9%, 99.99% des FCV dans l'eau (Thurston-Enriquez et al., 2003). Les *Calicivirus* bovins semblent plus sensibles aux UV que ceux affectants les espèces canines ou félines (Nims, Plavsic, 2013).

2.1.3 Sensibilité aux pH extrêmes

Les *Calicivirus* entériques présentent une résistance à l'inactivation par des pH bas, alors que les *Calicivirus* non entériques y sont plus sensibles. Ainsi, le FCV est sensible à des pH inférieurs à 3 et supérieurs à 8, alors qu'un *Norovirus* murin résiste à un pH inférieur à 2 (Nims, Plavsic, 2013).

2.1.4 Sensibilité aux agents désinfectants.

Le caractère non enveloppé des *Calicivirus* en fait des virus peu sensibles aux désinfectants lipophiles (Doultree et al., 1999). Au sein de la famille des *Caliciviridae*, on note de nombreuses disparités de sensibilité suite à l'action de l'alcool, de la chlorhexidine et des ammoniums quaternaires. L'utilisation de ces agents désinfectants est donc peu recommandée (Nims, Plavsic, 2013). L'efficacité des halogènes, des agents oxydants et d'un

¹ Temps requis pour inactiver 90% des virus à une température donnée

mélange alcool – aldéhyde a été démontrée dans une étude sur les *Norovirus* murins et FCV en modèles pour les *Norovirus* humains (Zonta et al., 2016).

2.1.5 Persistance dans l'environnement.

De nombreuses données sont disponibles sur la persistance des *Calicivirus* dans l'environnement. En l'absence de toute action de désinfection efficace, un HuNoV (*Norovirus* Humain) a été retrouvé intact après 1266 jours dans de l'eau souterraine, sans réduction significative de la charge virale au bout de 427 jours (à température ambiante et sans lumière) (Kotwal, Cannon, 2014). Le FCV et le RHDV ont une survie dans l'environnement à température ambiante, respectivement de 28 et 105 jours (Hurley, Sykes, 2003) et en suspension organique, à 4°C, la survie est d' au moins 60 et 225 jours (Doultree et al., 1999 ; Smíd et al., 1989).

Dans un environnement familial ou hospitalier, la survie du FCV a été étudiée pour évaluer celle des HuNoV. Ainsi, il peut survivre jusqu'à 3 jours sur les touches de téléphone, 1 à 2 jours sur les souris d'ordinateur, et 8 à 12h sur les claviers d'ordinateur, avec des D-values de 4 à 8 heures suivant les supports (Clay et al., 2006).

Le RHDV semble être plus résistant, en restant viable entre 10 et 44 jours sur un support en coton pour modéliser un environnement inerte sec. Sur des supports vivants comme des foies de bovins, utilisés pour modéliser des carcasses de lapins, sa viabilité a été établie après 91 jours (Henning et al., 2005).

2.2 Culture en laboratoire.

Comme évoqué précédemment, actuellement, un grand nombre de *Calicivirus* ne sont pas cultivables *in vitro*. C'est notamment le cas des espèces entériques humaines (HuNoV, le NV et le SV) et des virus affectants les lagomorphes (RHDV et EBHSV).

En revanche, le *Calicivirus* félin se multiplie facilement en culture, comme l'ensemble des membres du genre *Vesivirus*, ce qui en fait, pour l'instant un des modèles d'étude des virus précédents, avec les *Norovirus* murins (MNV) et le Tulane Virus (TV) (Xu et al., 2015).

3 Le génome viral.

Le génome des virus appartenant à la famille des *Caliciviridae* présente une structure globale hautement conservée. Il s'agit d'un ARN simple brin de 7.3 à 7.7 kb, de polarité positive, polyadénylé à l'extrémité 3' et lié de manière covalente à une petite protéine codée par le virus : la VPg. Il est organisé de manière caractéristique en plusieurs cadres ouverts de lecture ou ORF (Open Reading Frame). Ces ORF sont généralement présents au nombre de trois (deux pour les *Lagovirus* et *Sapovirus*, les ORF 1 et 2 étant fusionnés) :

- L'ORF1 code pour une grande polyprotéine, clivée pendant et post-transcription par la protéase virale (3C ou NS6) pour donner les protéines non structurales,
- L'ORF2 code pour la protéine de capsid majeure (VP1 ou VP60),
- L'ORF3 code pour la protéine de capsid mineure (VP2 ou VP10).

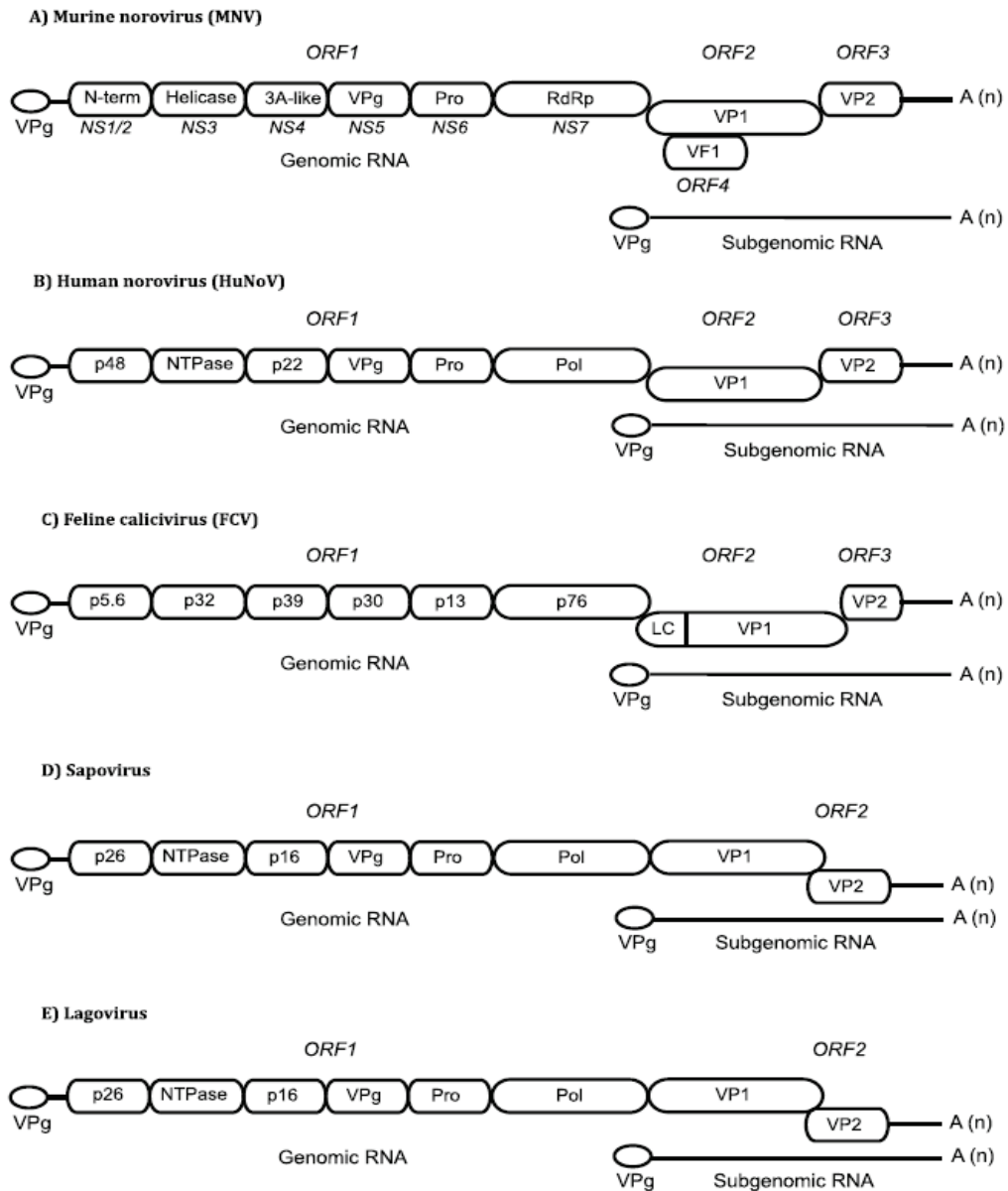
Une exception majeure à cette organisation est le MNV qui présente un quatrième ORF chevauchant la zone codant pour la VP60 et qui produit une protéine nouvellement identifiée : le facteur de virulence VF1. Cette protéine antagonise la réponse immunitaire innée liée à l'infection en retardant la régulation à la hausse d'un certain nombre de gènes cellulaires, y compris l'interféron bêta (IFN- β) (Alhatlani et al., 2015 ; McFadden et al., 2011). L'organisation du génome des différents genres de *Caliciviridae* est décrite par les schémas de la Figure 6.

Aussi, un ARN subgénomique (sgRNA), plus court que le précédent est produit durant la réplication du virus. Il présente la même extrémité 3' que l'ARN génomique mais est tronqué vers l'extrémité 5', ce qui lui donne une taille de 2.2 à 2.4 kb. Comme l'ARN génomique, il est lié de façon covalente à la VPg en 5' et l'extrémité 3' est polyadénylée et code pour VP60 et VP10 ainsi que pour VF1 chez le MNV. Le mécanisme de synthèse cet ARN subgénomique n'est toujours pas bien compris. Une étude biochimique préliminaire chez le RHDV suggère qu'une séquence en amont du premier nucléotide de l'ARN subgénomique est requise pour sa synthèse (Morales et al., 2004) ; il s'agit de régions non traduites ou UTRs (UnTranslated Regions). En 2008, (Simmonds et al., 2008), réalisent une analyse bioinformatique de ces UTRs et montrent qu'elles contiennent des ARN dont les structures secondaires ont été conservées au cours de l'évolution mais de taille et de positionnement variable. En outre, tous les *Caliciviridae* montraient des structures en « épingles à cheveux » et en « tige-boucles » en 3'

dans le brin anti-génomique invariablement six bases en amont du sgRNA transcrit, indiquant leur probable rôle de promoteurs.

Figure 6 : Organisation du génome des Caliciviridae.

Les schémas présentent la disposition des séquences codant pour les protéines virales pour A) MNV, B) HuNoV, C) FCV, D) Sapovirus, E) Lagovirus. (d'après (Alhatlani et al., 2015))

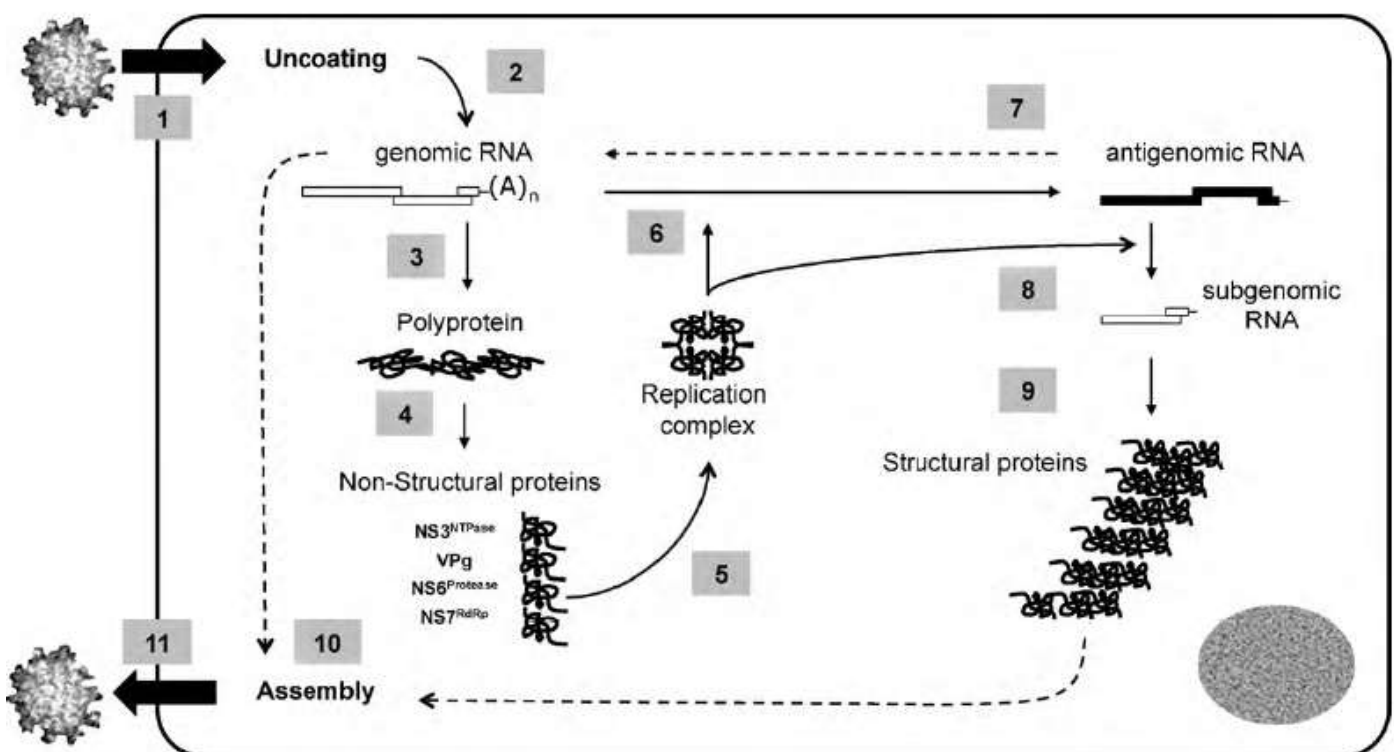


4 Le cycle viral.

La Figure 7 représente de façon schématique, en 11 étapes, le cycle de multiplication applicable aux virus de la famille des *Caliciviridae*. Après attachement au récepteur cellulaire, le virion est internalisé dans la cellule [1]. La décapsidation du génome viral [2] est suivie de

la traduction du précurseur de la polyprotéine [3] et d'un processus co-traductionnel qui forme les protéines non structurales [4]. Ces protéines s'assemblent dans un complexe de réplication [5] qui va synthétiser l'ARN antigénomique [6], qui servira lui-même de matrice à la synthèse de l'ARN génomique [7]. L'ARN génomique nouvellement formé est traduit en précurseur de polyprotéine [3] ou est utilisé dans l'assemblage d'une nouvelle particule virale [10]. L'ARN antigénomique est aussi la matrice de synthèse de l'ARN subgénomique [8]. Chez les *Norovirus*, les *Vesivirus +/- les Recovirus*, le sgRNA est traduit en protéines structurales VP60 et VP10 [9]. Chez les *Sapovirus, Lagovirus +/- Nebovirus*, la VP60 est formée après l'action de la protéase virale sur la polyprotéine précurseur. Dans un timing encore inconnu au cours de la multiplication, il y a assemblage des protéines structurales et l'incorporation du matériel génétique [10], suivi par la libération des virions matures à l'extérieur de la cellule.

Figure 7 : Cycle de multiplication des calicivirus (Rohayem et al., 2010)



4.1 Attachement virions – cellules.

Les premières étapes du cycle viral font classiquement intervenir l'attachement des virions à du (des) récepteur(s) des cellules hôtes, suivi par l'entrée de ceux-ci dans la cellule

au travers de la membrane cytoplasmique et enfin la libération du matériel génétique viral dans le cytoplasme pour permettre sa réplication. L'attachement des virions aux cellules hôtes est basé sur la reconnaissance spécifique de récepteurs cellulaires, alors que la pénétration des virions est le plus souvent médiée par une protéine de membrane qui va interagir avec les virions comme récepteur ou corécepteur.

Les interactions virus-hôtes de nombreux calicivirus ont été analysées, avec une majorité de données sur les *Norovirus* humains, FCV et RHDV. L'étude de ces virus a montré des interactions variables avec des glucides membranaires polymorphes. Ainsi, les *Norovirus* humains reconnaissent les antigènes des groupes sanguins (HBGAs pour Histo-Blood Group Antigens) du système ABO, Lewis et sécrétoire, certains HGBAs sialyl modifiés et des héparans sulfates. De la même manière, le RHDV se lie à l'antigène H type 2, le Tulane virus à l'antigène type B, le MNV et FCV se fixent à l'acide sialique des cellules permissives. De plus, les FCV est capable de reconnaître une protéine membranaire, JAM-1 (Junctional Adhesion Molecule 1) (Ming, Xi, 2010).

4.2 Entrée du virus et décapsidation

Les mécanismes d'entrée dans les cellules des *Calicivirus* ne sont toujours pas très bien élucidés. En 1995, (Kreutz, Seal, 1995) ont montré que la pénétration du FCV dans les cellules de rein de chat CrFK (Crandell Feline Kidney) nécessitait une étape à pH bas. En effet, si le pH endosomal est artificiellement élevé avec des agents acidotropes tels que la chloroquine, la décapsidation du virus n'a pas lieu, ce qui entraîne l'inhibition de la réplication virale. La chloroquine, sous sa forme non protonée traverse facilement les membranes et s'accumule dans les environnements acides où elle devient protonée. Elle contribue ainsi à augmenter le pH des organites intracellulaires et notamment des vésicules intracellulaires ou lysosomes.

Lorsqu'elle est ajoutée tardivement aux cellules infectées en culture, aucun effet n'est noté et la production de nouveaux virions a bien lieu, montrant que les événements tardifs de la réplication virale sont moins sensibles aux effets inhibiteurs de la chloroquine. L'effet inhibiteur est par contre maximal lorsque la chloroquine est présente avant l'infection, pendant l'adsorption virale, et dans les deux premières heures post infection, suggérant que les premiers événements de la réplication virale sont les plus sensibles à la chloroquine. C'est donc l'étape qui précède la réplication virale, c'est-à-dire la décapsidation, qui est altérée par la présence de l'agent acidotrope. Le FCV entrerait donc dans la cellule hôte par un mécanisme d'endocytose, et la

décapsidation nécessiterait quant à elle une acidification du pH de la vésicule d'endocytose formée.

Plus récemment, une étude a montré que l'infection par le FCV était inhibée par la chlorpromazine, molécule inhibitrice des mécanismes d'endocytose médiées par la clathrine. Ceci a permis de prouver que le FCV pénétrait dans les cellules grâce à un mécanisme d'endocytose médié par des molécules de clathrine, la vésicule d'endocytose se formant à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte suite à l'attachement du virus à son récepteur (Stuart, Brown, 2006).

Dernièrement, c'est le rôle de certaines protéases cellulaires qui a été étudié pour trois calicivirus : *Porcine Enteric Calicivirus* (PEC), MNV-1 et FCV. Le compartiment endosomal des cellules contient de nombreuses enzymes et notamment des cathepsines, qui sont connues pour être impliquées dans la décapsidation de certains virus (Grove, Marsh, 2011). Ainsi, le traitement avec des inhibiteurs des cathepsines L réduit significativement la réplication du PEC, MNV-1 et FCV. De plus, il a été montré par Western Blot que l'incubation de ces trois virus avec une cathepsine L recombinante conduisait au clivage de la VP10 du PEC ainsi que de la VP60 du MNV-1 et du FCV. Enfin, l'observation en microscopie confocale de MNV-1 et PEC a mis en évidence l'accumulation des protéines de capsides virales dans les endosomes en présence d'inhibiteur de cathepsine L pendant la phase d'entrée (Shivanna et al., 2014).

Ces études montrent bien la diversité des mécanismes impliqués dans l'entrée des calicivirus dans les cellules, dont la plupart sont encore mal compris.

4.3 Réplication de l'ARN viral

Les *Caliciviridae*, comme tous les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires, dépendant de la machinerie traductionnelle de la cellule infectée pour la production de leurs propres protéines. Les ARNm viraux possèdent des mécanismes évolués qui leur permettent d'entrer en compétition avec les ARNm cellulaires pour les ribosomes et les facteurs de la traduction cellulaires.

En général, le contrôle de la traduction est réalisé à l'étape d'initiation, au cours de laquelle les ribosomes sont recrutés sur l'extrémité 5' de l'ARNm cellulaire portant typiquement une coiffe. L'interaction entre le ribosome et l'ARN est facilitée par le facteur d'initiation eucaryote 4F (eIF4F). Il est composé d'un complexe formé de eIF4E (protéine de liaison de la coiffe), eIF4G (une protéine d'échafaudage vers les sous unités des ribosomes) et

eIF4A (qui fonctionne comme une ARN hélicase). eIF4A intervient pour détendre la structure de l'ARN lors de la lecture par le ribosome. Une fois eIF4F lié à la coiffe, il agit comme un point de fixation pour les ribosomes, qui vont ensuite scanner l'ARNm pour localiser le codon d'initiation AUG et initier la traduction (Hinnebusch, 2014).

L'ARN des calicivirus ne possède pas de coiffe classiquement reconnue par eIF4F. Cependant, des études menées chez les *Norovirus* ont montré que la protéine VPg agissait comme un « substitut de coiffe », en interagissant avec les facteurs d'initiation pour permettre la traduction (Goodfellow et al., 2005 ; Chaudhry et al., 2006). Il a récemment été montré que la protéine VPg du MNV1 se fixait directement sur le complexe eIF4F, par une interaction de haute affinité entre eIF4F et le domaine C-terminal de la VPg (Chung et al., 2014).

Après synthèse du polypeptide précurseur, celui-ci est clivé par la protéase virale et conduit notamment à la formation de l'hélicase et de l'ARN polymérase ARN dépendante qui vont entrer dans la composition du complexe de réplication (Abrantes et al., 2012). Il semblerait, d'après une étude récente sur le FCV, que cette traduction conduise également à la formation de trois protéines non structurales, P32, P39 et P30, qui joueraient un rôle important dans la formation du complexe de réplication en se localisant dans le réticulum endoplasmique (Bailey et al., 2010).

La réplication se déroule en association avec les membranes intracellulaires, et conduit tout d'abord à la formation d'un ARN négatif intermédiaire, qui va servir de base à la synthèse des ARN génomiques et subgénomiques positifs, ou ARNs fils (Figure 7). Tout comme les autres virus à ARN positif, la réplication virale s'accompagne d'une inhibition de la synthèse protéique cellulaire (Pesavento et al., 2008 ; Maurice, 2015).

Partie 2 : Focus sur les Lagovirus

1 Généralités sur le genre *Lagovirus*

1.1 Historique et découverte

1.1.1 Le RHDV

Décrite pour la première fois en 1984 dans la province du Jiangsu en République populaire de Chine, la maladie hémorragique virale du lapin (RHD : Rabbit haemorrhagic disease) est une maladie très contagieuse et hautement pathogène pour les lapins domestiques et sauvages (*Oryctolagus cuniculus*). Issue d'un groupe de lapins angora importés d'Allemagne, la maladie a décimé plus de 140 millions de lapins domestiques et s'est propagée sur plus de 50 000 km² en moins d'un an (Liu et al., 1984).

Les échanges commerciaux d'animaux et de fourrure notamment ont permis une extension rapide de la maladie jusqu'en Europe. La RHD a été décrite pour la première fois sur le continent européen en 1986 en Italie (Cancellotti, Renzi, 1991). La maladie fut ensuite rapidement retrouvée en Tchécoslovaquie puis en Pologne en 1987, avant d'arriver en France en 1988, année où la péninsule ibérique a également connu ses premiers cas.

Par la suite, ce sont les continents africain (Tunisie, Egypte, en 1989) et américain qui ont connu l'arrivée du virus. Ainsi, les premières épidémies américaines ont été enregistrées au Mexique en 1989, probablement suite à l'importation de viande de lapin chinoise contaminée. La mise en place de mesures drastiques, a permis l'éradication de la maladie après propagation autour du foyer d'infection (Gregg et al., 1991). Le Mexique est actuellement le seul pays à avoir réussi l'éradication complète de la RHD, le dernier foyer datant de 1992. Cette réussite aurait été permise grâce à l'absence de populations naturelles de lapins européens sauvages sur le territoire mexicain (Abrantes et al., 2012). Aussi, plusieurs épizooties ont également été déclarées aux Etats-Unis entre 2000 et 2001, puis en 2005 (Lavazza, Capucci, 2009). Cependant, celles-ci furent facilement contenues, les lagomorphes présents à l'état sauvage n'étant pas sensibles au virus.

Concernant l'Océanie, c'est en octobre 1995 que le virus s'y est retrouvé sur Wardang island (sud de l'Australie) ; échappé lors d'essais terrain pour l'utilisation du virus en tant qu'agent biologique de contrôle des populations de lapins. En effet, importés dans les années

1860, les lapins de garenne (*O. cuniculus*) ont rapidement envahi l'ensemble du territoire et sont devenus la principale espèce animale nuisible du pays (Fenner, 2010). Ainsi, (Mutze et al., 1998)estiment qu'en 8 semaines le virus avait décimé plus de 30 millions de lapins dans la zone du Flinders Ranges National Park.

De nos jours, le virus considéré comme endémique sur tous les continents, cause toujours de fortes mortalités dans les populations de lapins d'élevages et sauvages. Il apparait aussi que celui-ci est d'autant plus présent que le nombre de lapins sauvages est important sur un territoire (Abrantes et al., 2012).

Enfin, depuis août 2010, une nouvelle épizootie de RHD a été écrite dans le nord-ouest de la France (Le Gall-Recule et al., 2011) et depuis en Europe de l'ouest (Portugal, Italie, Espagne)(Esteves et al., 2014 ; Camarda et al., 2014 ; Dalton et al., 2012). Impliquant un nouveau variant du virus, capable d'induire des signes cliniques chez des sujets vaccinés, et soulevant des interrogations quant à son évolution, une étude détaillée en sera réalisée dans la suite de ce travail.

1.1.2 L'EBHSV

Le syndrome du lièvre brun européen (European Brown Hare Syndrome : EBHS) a été décrit la première fois en Suède en 1980, puis dans d'autres pays européens dans les années qui suivirent. De plus, les études phylogénétiques suggèrent que la propagation du virus s'est effectuée de la Suède vers l'ouest, l'est et le sud de l'Europe (Frölich et al., 2007).

Cependant, le virus responsable de cette maladie, l'EBHSV a probablement émergé au début des années 1970, comme l'indiquent des lésions compatibles avec l'EBHS retrouvées sur les lièvres anglais en 1976 (Duff et al., 1994). Aussi, des anticorps contre le virus ont été retrouvés et le virus a été mis en évidence par RT-PCR dans des sérums de lièvres collectés en Suède avant 1980 (Lopes et al., 2014). Depuis, la maladie est considérée comme endémique en Europe mais reste relativement cantonnée à ce continent.

1.2 Synonymie

Devant l'importance des conséquences sanitaires et économiques liées à la maladie hémorragique virale du lapin, chaque auteur a cherché à la nommer. Ainsi, plus de quinze synonymes sont recensés concernant la maladie. Les premières appellations furent « fièvre hémorragique virale » ou « pneumonie hémorragique virale » en Chine, puis « mort subite

virale » en Corée et même « Maladie X » lors de son apparition en Italie. D'autres appellations faisant référence aux signes cliniques observés ont parfois été utilisées et répertoriées par (Mitro, Krauss, 1993) telles que « septicémie hémorragique », « peste du lapin », « hépatite nécrosante » ...

En ce qui concerne l'EBHS, les appellations de la maladie sont beaucoup moins variées compte tenu de sa localisation plus restreinte. On retrouve ainsi dans la littérature le nom d'hépatite virale du lièvre.

2 Virologie

2.1 Données sur le RHDV

Le RHDV a été isolé pour la première fois en 1990 à partir de foies de lapins morts de la RHD en Espagne et Allemagne. Compte tenu de son appartenance à la famille des *Caliciviridae*, il en possède les caractéristiques principales.

2.1.1 Morphologie

Le RHDV est donc un virus non enveloppé dont la particularité est d'exister sous deux formes illustrées par la Figure 8 :

La forme intacte mesurant de 32 à 41 nm de diamètre selon les différentes études. Cette forme répond aux grandes lignes d'organisation connues chez les *Caliciviridae*, avec un virion composé des 180 exemplaires de la protéine de capsid VP60 organisées en 90 dimères (les capsomères). Ils composent classiquement un maillage de symétrie icosaédrique T=3 (décrit au 2.1 de la première partie)

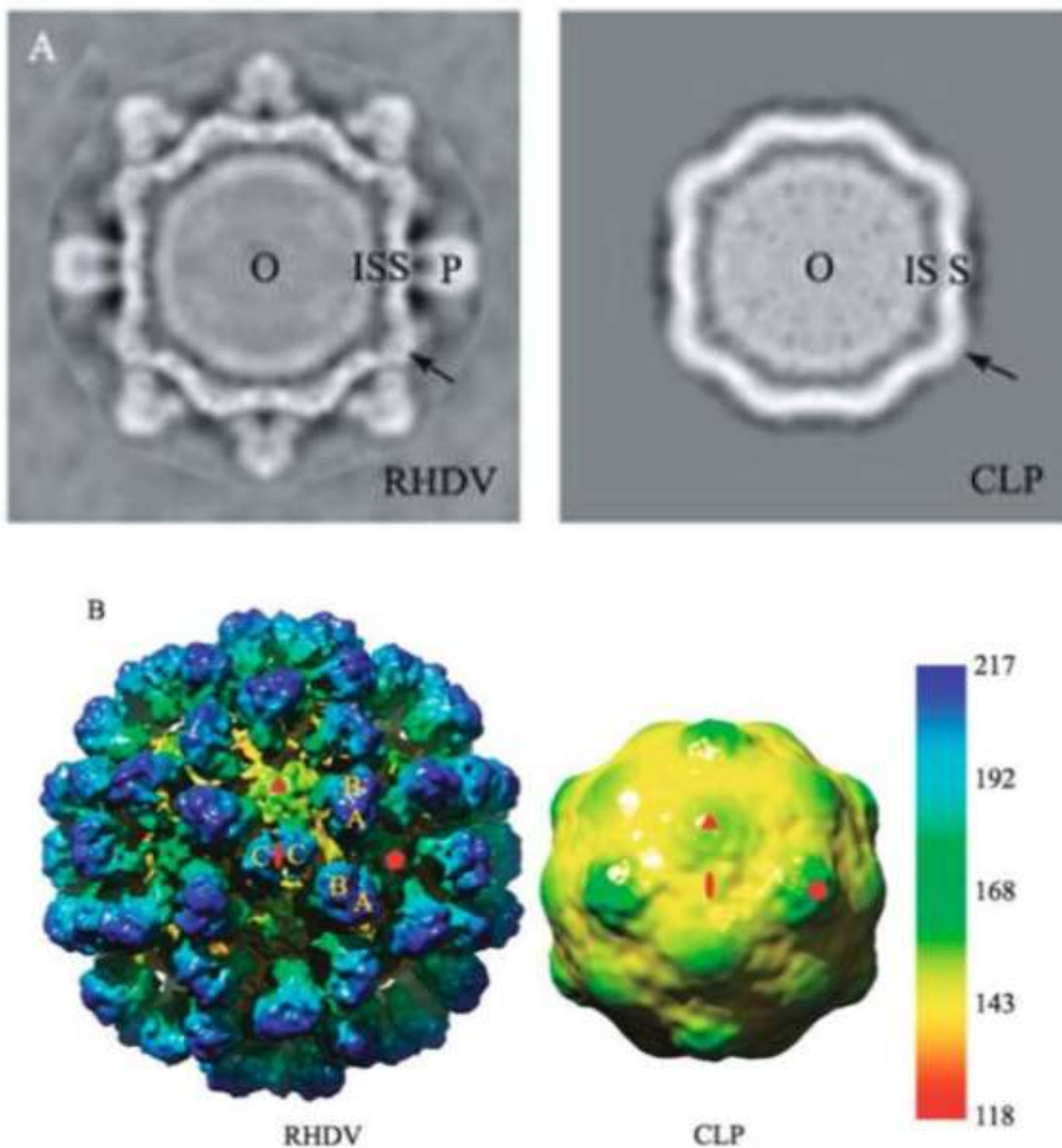
La forme appelée CLP (Core-Like Particle) qui correspond à une forme dégradée. C'est un virion de plus petite taille (entre 25 et 29 nm de diamètre), dont l'organisation des protéines de VP60 diffère par l'absence de formation de capsomères habituels. Ainsi, malgré une symétrie icosaédrique conservée, le virion a un aspect lisse. Ces CLP également appelées « particules lisses » ou s-RHDV (pour « smooth-RHDV ») sont abondamment retrouvées dans le foie et la rate des animaux présentant une forme subaiguë ou chronique de la maladie. Le faible poids moléculaire des protéines qui les composent a permis de les identifier comme étant en fait la partie N-terminale de la protéine de capsid VP60. Des expérimentations à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la partie N-terminale de la protéine de capsid

du RHDV ont permis de confirmer cette hypothèse. De plus, ces particules sont associées à l'apparition d'IgM spécifiques anti-RHD. Une hypothèse quant à leur origine repose sur la dégradation des immuns complexes formés au cours de la réponse humorale. Bien que d'autres auteurs aient évoqué une origine liée à un défaut d'expression génétique, les dernières données indiquent que les CLP dériveraient de formes intactes de virus ayant subi un défaut de protrusion (Abrantes et al., 2012 ; Doultree et al., 1999 ; Granzow et al., 1996).

Figure 8 : Représentations des deux formes de RHDV.

A) Cryo-microscopie électronique de RHDV purifié dans sa forme intacte (à gauche) et dans sa forme dégradée (CLP). Les différents domaines sont légendés (IS = partie interne du domaine S, S = domaine S, P = domaine P). Les flèches indiquent les structures conservées pour les deux formes

B) Reconstruction tridimensionnelle d'une image obtenue en cryo-électromicroscopie du RHDV intact et de sa forme CLP. L'échelle de couleur représente les différents rayons du centre à la surface. Les lettres A, B et C représentent les monomères de protéine de capsid A, B et C assemblés en capsomères. Les symboles en rouge représentent les axes 2, 3 et 5 (Hu et al., 2010).



2.1.2 Structure et organisation génomique

Le génome du RHDV a été entièrement séquencé pour la première fois en 1991 (Meyers, Wirblich, Thiel 1991). L'ARN génomique est composé de 7437 nucléotides et est organisé en deux ORFs (Figure 9).

L'ORF 1 (nucléotide 10 à 7044) code pour une polyprotéine géante de 2344 acides aminés qui est clivée par une protéase virale en sept protéines non structurales et une protéine structurale, la protéine majeure de capsid VP60.

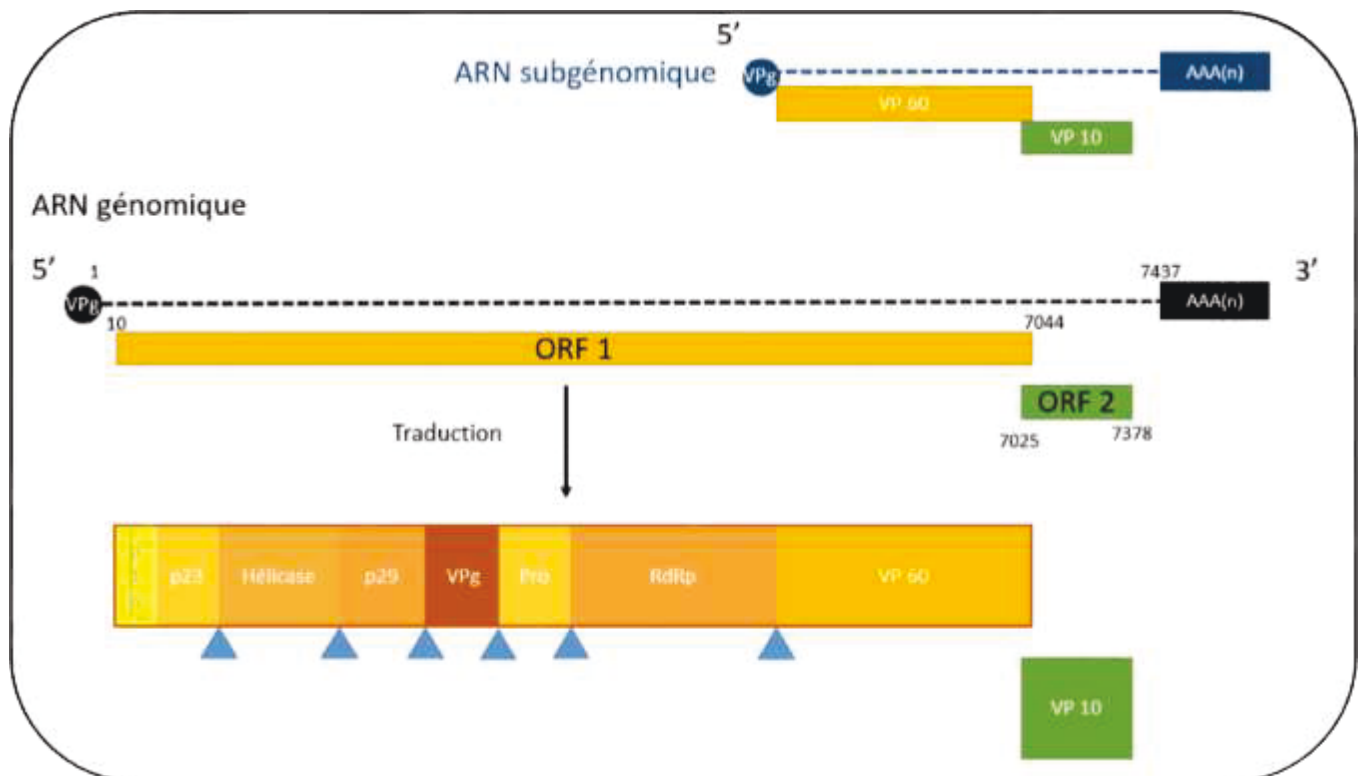
L'ORF 2 (nucléotide 7025 à 7378) recouvre partiellement la région de l'ORF1 et code pour une protéine mineure de capsid, nommée VP10.

Comme chez l'ensemble des membres de la famille des *Caliciviridae*, on trouve au sein des particules virales un ARN subgénomique de 2.2kb. Il correspond à la portion 3' terminale de l'ARN génomique codant pour les protéines structurales VP60 et VP10, et contribue ainsi à la production d'un taux important de protéines structurales au cours des étapes intermédiaires et tardives de l'infection.

Les deux ARN, génomique et subgénomique, sont simples brins, de polarité positive, polyadénylés en 3' et liés de façon covalente à la VPg en 5' par un résidu Tyr-21. Ils possèdent chacun deux UTR de 9 et 59 nucléotides respectivement en 5' et 3' (Abrantes et al., 2012 ; Clarke, Lambden, 1997).

Figure 9 : Organisation du génome du RHDV

Les pointillés indiquent la longueur du génome (en noir) et l'ARN subgénomique (en bleu). Le cercle représente la protéine VPg liée de manière covalente à l'extrémité 5' du génome et du subgénome. Les ORFs sont représentés en dessous de la portion d'ARN à partir de laquelle ils sont traduits. Les numéros indiquent le premier nucléotide de chaque codon initiateur (AUG) et le début et la fin du génome. Les protéines structurales codées par l'ARN subgénomique et génomique sont indiquées. Les têtes de flèches représentent les sites de clivage de la polyprotéine, par la Trypsine-like Cystéine Protéase lors de la maturation des protéines (Abrantes et al., 2012 ; Wirblich et al., 1996).



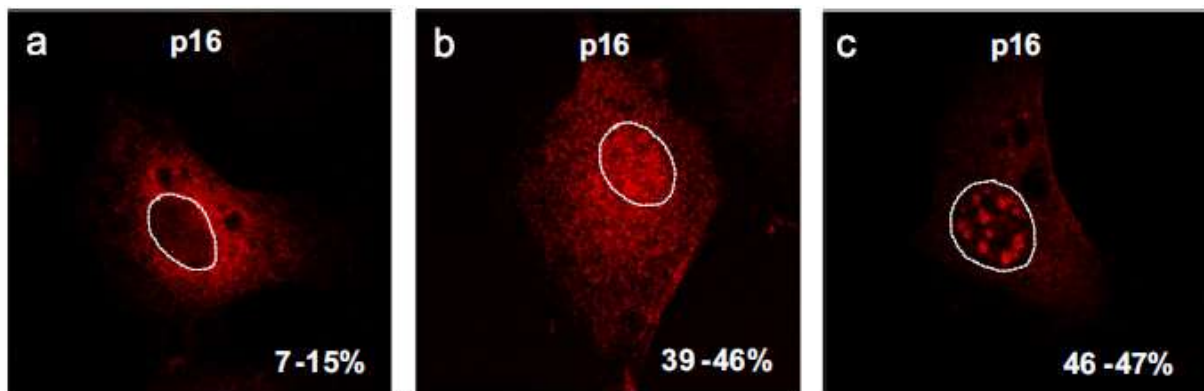
2.1.3 Synthèse protéique et maturation

Le polypeptide synthétisé à partir de l'ORF1 est un précurseur qui sera clivé par une protéase virale (la protéase cystéine trypsine-like) pour donner à la fois la protéine majeure de capsid, VP60, mais également les sept protéines non structurales. Parmi ces dernières, on trouve deux protéines impliquées dans la réplication de l'ARN viral, une hélicase et une ARN polymérase ARN dépendante (« RdRp » pour « RNA dependent RNA polymerase »), ainsi que la protéase responsable du clivage du polypeptide précurseur. On trouve également la protéine VPg, impliquée dans l'initiation de la traduction. En revanche, la fonction des protéines non structurales p16, p23 et p29 reste toujours mal connue (Figure 9).

Suite à l'observation des sites d'accumulation de ces protéines au niveau cellulaire, et par leur homologie avec d'autres protéines virales, des rôles ont pu être proposés. Ainsi, p16 a pu être retrouvée de manière diffuse au sein de la cellule, avec une distribution à la fois nucléaire et/ou cytoplasmique (Figure 10). Or, la réplication des virus à ARN positifs se produit de manière prédominante dans le cytoplasme et en temps normal, les protéines non structurales ne s'accumulent pas dans le noyau sauf si elles y trouvent un partenaire pour interagir. L'agrégation de p16 dans des compartiments nucléaires laisse penser qu'il existe une interaction spécifique entre cette protéine et les acides nucléiques et/ou des protéines cellulaires. Une distribution similaire a été observée pour la protéine 2A d'un picornavirus (le virus de l'encéphalomyocardite). Il a été proposé que cette protéine 2A provoque une augmentation de la formation de ribosomes modifiés ayant une préférence pour les ARN viraux (Urakova et al., 2015).

Figure 10 : Distribution cellulaire de la protéine non structurale p16 du RHDV.

Des cellules de rein de lapin (RK-13) ont été transfectées avec des plasmides recombinant permettant l'expression de protéines p16 marquées par myc. Après 24 heures de cultures, les cellules ont été fixées et les protéines ont été révélées par immunomarquage à l'aide d'anticorps spécifiques de myc. La ligne pointillée surligne le contour du noyau des cellules et les pourcentages correspondent aux fréquences auxquelles les différentes localisations ont été observées (Urakova et al., 2015).



Comme lors d'études précédentes chez d'autres calicivirus, la protéine p23 a montré un pattern de localisation qui semble lié au réticulum endoplasmique, incluant l'enveloppe nucléaire. Etant donné que les virus à ARN positifs utilisent des membranes dérivées du réticulum endoplasmique lors de leur réplication, cette localisation pourrait être le témoin de l'implication de p23 dans l'induction de réarrangements des membranes intracellulaires qui a lieu lors de la réplication virale (Urakova et al., 2015).

L'ORF2 code pour une petite protéine structurale, la VP10, il s'agit de la protéine mineure de capsid. Il a été récemment démontré que cette protéine augmentait le taux de réplication viral et induisait l'apoptose. Sa capacité à inhiber l'expression de VP60 a également été mise en évidence. Ces constats suggèrent que VP10 serait impliquée dans la réplication virale et la libération des virions depuis la cellule hôte infectée.

L'ARN subgénomique ne code pas pour les protéines non structurales, il est à l'origine de la synthèse des protéines structurales VP60 et VP10 uniquement (Figure 9) (Maurice, 2015 ; Abrantes et al., 2012 ; Chen et al., 2009).

2.1.4 Assemblage des virions et sortie de la cellule

Compte tenu de l'impossibilité de cultiver le virus *in vitro*, les mécanismes d'assemblage des protéines et des acides nucléiques au sein du virion sont peu connus. Cependant, lors de l'expression de la protéine majeure de capsid (VP60) dans un vecteur recombinant tels que les *Baculovirus*, on observe la formation spontanée de capsides virales dénuées de matériel génétique par auto-assemblage des protéines de 60 kDa : ce sont les virus-like particles (VLP). Ces VLP se sont montrées morphologiquement et antigéniquement identiques au virus natif. Ainsi, administrées à des lapins sains, ces particules sont capables de déclencher une réponse immunitaire protectrice sans provoquer de signe clinique et ont le même pouvoir hémagglutinant que le virus « complet » (Nagesha et al., 1995).

Par ailleurs, le mécanisme de libération des virions par les cellules est lui aussi assez flou. L'application de contraintes sélectives négatives sur le génome montre que la VP10 semble jouer un rôle important dans le cycle viral en ayant un rôle positif dans la libération et/ou la réplication du virus par le déclenchement de l'apoptose cellulaire (Tian et al., 2011).

2.2 Données sur l'EBHSV

2.2.1 Morphologie

Peu de données sont disponibles concernant la morphologie de la capsid virale de l'EBHSV. Par contre, en microscopie électronique, les particules virales de RHDV et d'EBHSV semblent ne pas pouvoir être distinguées (Wirblich et al., 1994).

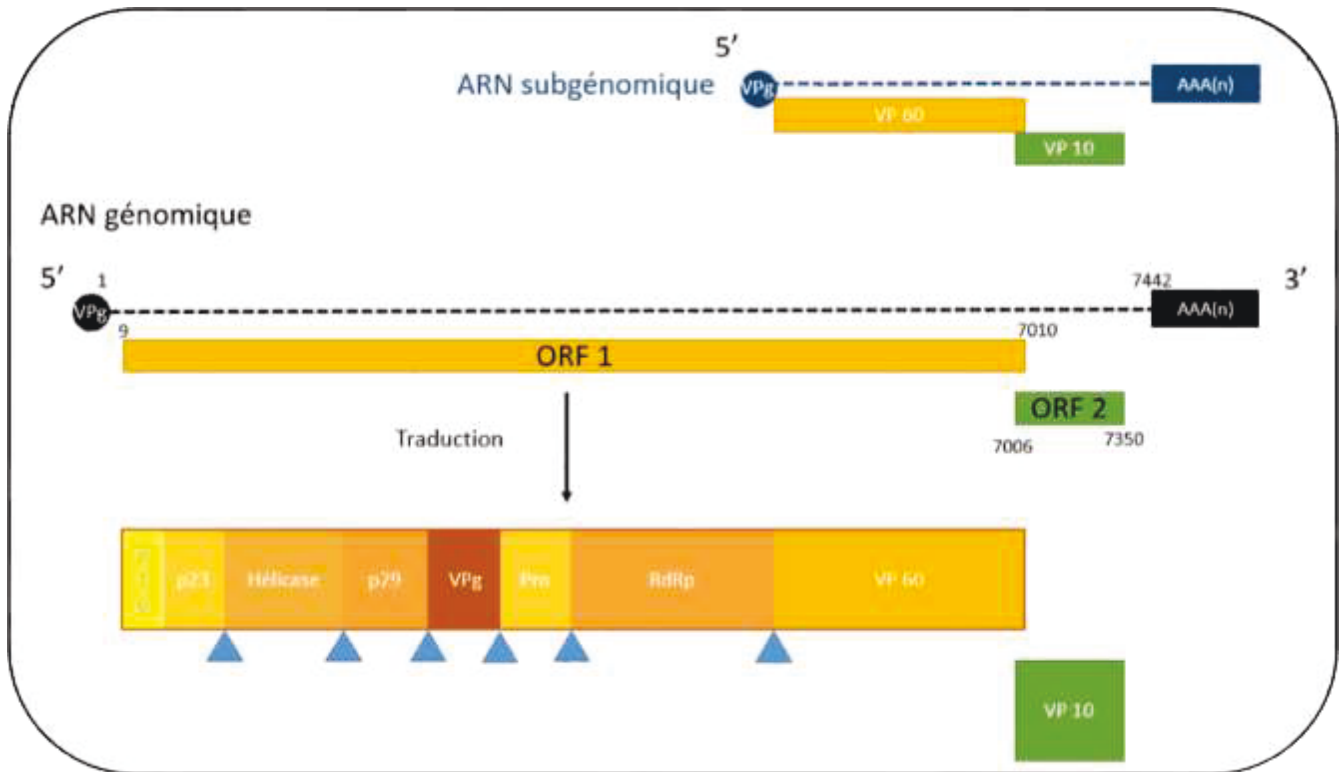
2.2.2 Structure, organisation génomique et synthèse des protéines

La première séquence du génome de l'EBHSV a été obtenue en 1996 à partir d'une souche française isolée en 1989 (Le Gall et al., 1996) et son organisation semble très proche de celle du RHDV. L'ARN génomique se compose de 7442 bases, organisées en deux ORF. Un deuxième ARN de 2,2 kb, apparenté à l'ARN subgénomique du RHDV a également pu être mis en évidence. L'ORF1 (nucléotides 9 à 7010) code pour les protéines non-structurale (dont les protéines nécessaires à la multiplication virale) et la protéine de capsid majeure (la VP60). L'ORF2 (nucléotides 7006 à 7351) code pour la VP10 (Figure 11).

Plus récemment, une séquence complète, obtenue à partir de deux souches d'EBHSV suédoises isolées en 1982 a montré une organisation très proche de celle de la première étude. La comparaison des séquences totales obtenues entre ces deux études a montré quelques substitutions nucléotidiques correspondant à 6 % de divergence. Rapportée à la séquence d'acides aminés, les souches française et suédoises montrent 2% de différences. La plupart des substitutions observées étaient situées au sein de la séquence de la VP60, mais on considère la variabilité rapportée à la longueur de la séquence en acides aminés, c'est la VP10 qui montre un pourcentage de différences plus élevé. Ce pattern évolutif constitue une nouvelle approche qui n'avait jamais été observé chez les lagovirus jusqu'alors (Lopes et al., 2013).

Figure 11 : Organisation du génome de l'EBHSV

Les pointillés indiquent la longueur du génome (en noir) et l'ARN subgénomique (en bleu). Le cercle représente la protéine VPg liée de manière covalente à l'extrémité 5' du génome et du subgénomique. Les ORFs sont représentés en dessous de la portion d'ARN à partir de laquelle ils sont traduits. Les numéros indiquent le premier nucléotide de chaque codon initiateur (AUG) et le début et la fin du génome. Les protéines structurales codées par l'ARN subgénomique et génomique sont indiquées. Les têtes de flèches représentent les sites de clivage de la polyprotéine, par la Trypsine-like Cystéine Protéase lors de la maturation des protéines (Lopes



et al., 2013)

En ce qui concerne les protéines issues de la traduction du génome, on retrouve des protéines semblables à celles du RHDV. Ainsi, le clivage de la polyprotéine de 2334 acides aminés issue de l'ORF1, donnera p16, p23/p26, 2C-like hélicase, p29, VPg, 3C-like protéase et la RdRp. On retrouve alors le même schéma que pour le RHDV (Figure 11).

3 Epidémiologie

3.1 Epidémiologie de la RHD

La RHD est caractérisée par sa forte morbidité et mortalité (70-90 %), et sa dissémination rapide au sein des populations. La période d'incubation est comprise entre 1 et 3 jours et la mort survient 12 à 36 heures après un épisode de fièvre (Lavazza, Capucci, 2009).

3.1.1 Espèces cibles

Le lapin européen (ou lapin de garenne) est le seul hôte du RHDV chez lequel des signes cliniques s'expriment, et les deux sous espèces *Oryctolagus cuniculi cuniculus* et *Oryctolagus cuniculi algirus* semblent posséder la même sensibilité envers lui (Muller et al., 2009). Par ailleurs, aucune répllication virale n'a été détectée chez 28 espèces différentes issues de la faune australienne, domestique et sauvage, chez qui on avait inoculé le RHDV et qui comprenaient entre autres le cheval, les bovins, le mouton, le cerf, la chèvre, le porc, le chien, le chat, la volaille, le renard, le lièvre, le furet, le rat, la souris, plusieurs sous espèces d'oiseaux et de reptiles (Gould et al., 1997). Des études expérimentales ont montré que même les autres léporidés n'étaient pas sensibles au RHDV.

Cependant, cette stricte spécificité d'hôtes semble de plus en plus remise en cause. En effet, des anticorps anti-RHDV ont été retrouvés chez des animaux vivant aux côtés de populations de lapins affectés, et, récemment, le génome du RHDV a pu être isolé chez des rongeurs vivant dans la même niche écologique que celle des lapins : *Apodemus sylvaticus* et *Mus spretus* (Merchán et al., 2011). Dans cette étude espagnole, 51 rongeurs vivant au contact de lapins ont été capturés, tous apparemment sains. Après euthanasie, des RT-PCR réalisées sur leurs foies se sont révélées positives pour deux *A. sylvaticus*, un *M. spretus* et sept lapins. Suite à l'analyse de six séquences de la VP60 des virus isolés, trois souches virales ont pu être identifiées, et une s'est montrée commune aux trois espèces d'hôtes prélevées. En outre, aucun signe clinique en lien avec ce portage viral n'a pu être mis en évidence chez les deux espèces de rongeurs.

Cela ouvre la possibilité de l'implication d'autres espèces dans l'épidémiologie de la maladie (Merchán et al., 2011 ; Abrantes et al., 2012). Plus récemment, un nouveau variant de RHDV a été identifié chez un lièvre italien (*Lepus corsicanus*) au cours d'une épizootie de RHD qui a sévit dans le province de Syracuse en Sicile (Camarda et al., 2014).

3.1.2 Modes de transmission

3.1.2.1 Par contact direct

La transmission du RHDV peut se faire par contact direct et prolongé entre un animal sensible et un animal infecté étant donné que les lapins infectés excrètent des particules virales dans toutes leurs sécrétions et excréments (Ohlinger et al., 1993). L'hypothèse d'un portage asymptomatique pourrait expliquer la persistance du virus d'une année sur l'autre et la transmission par contact direct avec un porteur asymptomatique semble possible. Une étude récente a montré que les lapereaux, d'autant plus résistants au RHDV qu'ils sont jeunes, étaient réceptifs à l'infection par le RHDV à de très faibles doses, et pouvaient transmettre le virus avant même leur séroconversion. Les jeunes joueraient de ce fait un rôle important dans la propagation du virus par contact direct au sein des groupes sociaux lors d'épizooties (Matthaei et al., 2014 ; Maurice, 2015).

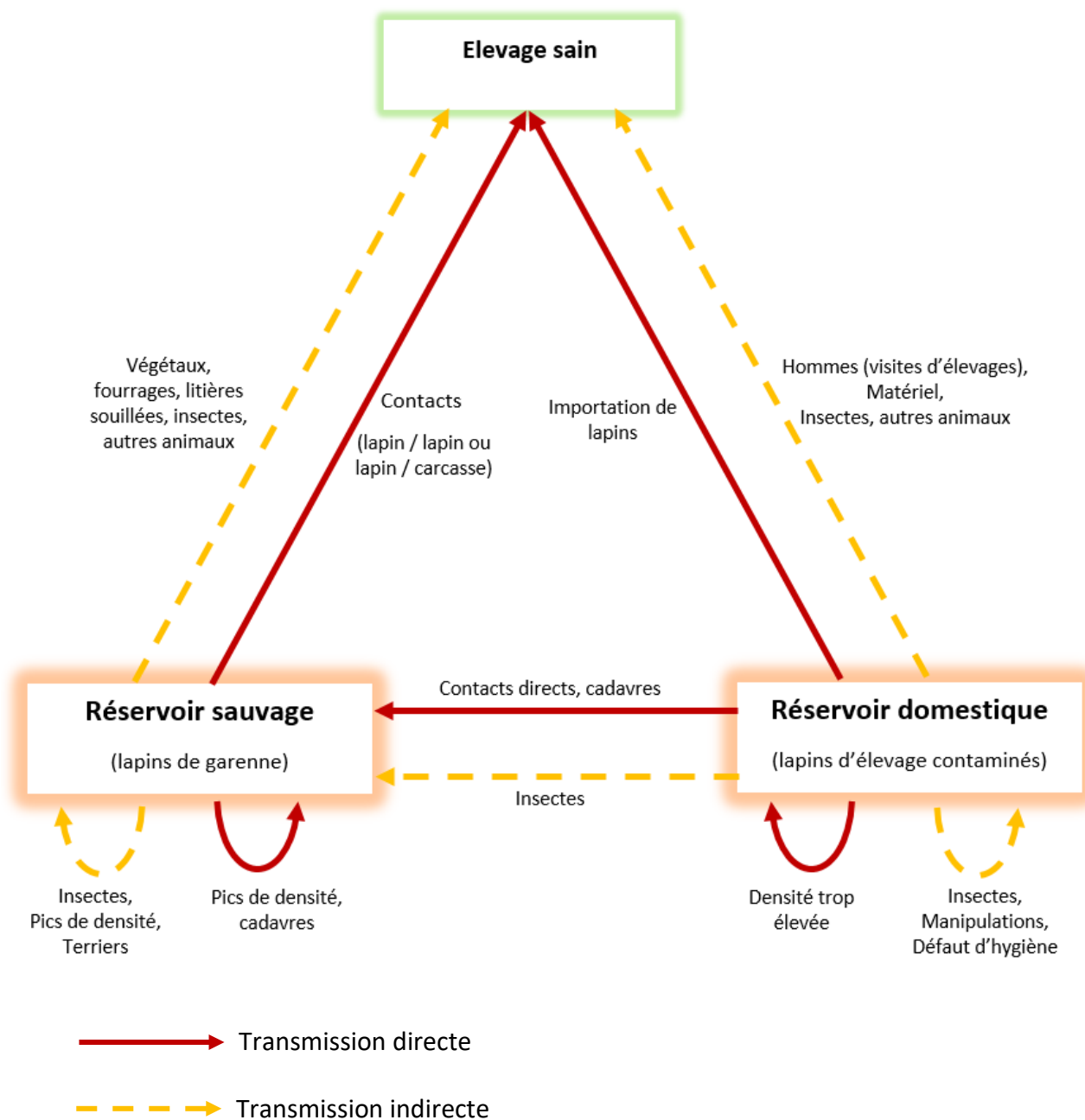
3.1.2.2 Par contact indirect

Du fait de la résistance précédemment évoquée des calicivirus dans l'environnement, une transmission indirecte est possible et a été décrite comme jouant un rôle important dans la propagation du RHDV. Il peut en effet se transmettre via un transport passif par des objets inertes tels que de la nourriture contaminée (ce fut d'ailleurs en utilisant des carottes contaminées que les agriculteurs répandirent le virus en Nouvelle Zélande), les litières ou terriers, l'eau, les vêtements, les cages, les équipements ou encore les carcasses de lapins infectés, ou par un vecteur animé comme les mammifères charognards, les oiseaux et les insectes. En effet, des études se sont intéressées à la transmission vectorielle par les insectes suite à la propagation du virus depuis l'île de Wardang jusqu'au continent australien malgré des mesures strictes de quarantaine. Ces études suggérèrent que les mouches pourraient avoir joué un rôle dans la transmission du virus, et notamment la mouche *Musca vetustissima*, dont la prolifération fut concomitante à l'expansion du virus en Australie. Sur ces dernières, ont été isolés des ARN de RHDV peu après la propagation du virus à partir d'échantillons récoltés sur l'île et sur le continent. Des études de transmission expérimentales ont confirmé cette hypothèse en montrant que ces mouches, après avoir été exposées à des lapins infectés, pouvaient effectivement transmettre le virus à des lapins sains. Une transmission via d'autres insectes n'est pas exclue et pourrait également expliquer la propagation du virus depuis l'île de Wardang jusqu'au continent australien (Cooke, 2002 ; McColl, Merchant, et al., 2002). Les carcasses d'animaux infectés joueraient par ailleurs un rôle prépondérant dans l'épidémiologie du

RHDV, du fait que le virus peut y persister jusqu'à trois mois (McColl, Morrissy, et al., 2002 ; Henning et al., 2005). Celles-ci deviennent alors des réservoirs et pourraient être à l'origine de nouvelles épizooties, plus éloignées dans le temps. Cependant, dans les infections naturelles, la voie oro-fécale semble être le mode de transmission majoritaire (Gregg et al., 1991 ; Maurice, 2015).

La combinaison des modes de transmission permet de comprendre les voies de contamination de la faune sauvage et des élevages (Figure 12).

Figure 12 : Cycle épidémiologique de la RHD d'après (Cloet, 2012 ; Merchán et al., 2011 ; Kerr, Donnelly, 2013)



3.1.3 Réceptivité – Sensibilité, Facteurs de risques

De nombreux paramètres liés à l'individu ou aux conditions environnementales semblent avoir une action sur la réceptivité et la sensibilité des lapins à la maladie.

3.1.3.1 L'âge

C'est le facteur qui apparaît être le plus important dans la sensibilité à l'infection par le RHDV. En effet, dès les premiers cas de RHD, il a été montré que les lapins âgés de moins de un mois ne sont pas ou très peu sensibles au virus, par l'absence de signes cliniques et de séroconversion des lapereaux de cet âge (Xu, 1991). Cependant, en cas d'épidémie de RHD sur un territoire, ces lapereaux sauvages se trouvent le plus souvent confrontés à un sevrage précoce lié à la très forte mortalité des adultes et ont donc une survie limitée (Marchandeau et al., 1998 ; Mutze et al., 1998).

Entre un et trois mois d'âge, on observe une augmentation progressive de la sensibilité, qui devient maximale chez les sujets de plus de trois mois. Plusieurs hypothèses ont alors été avancées pour expliquer cette résistance juvénile. La première hypothèse évoquée fut la présence d'anticorps d'origine maternelle (AOM) chez les lapereaux issus de mères ayant survécu à la RHD. En 2000, (Cooke et al., 2000) ont montré que ces lapereaux recevaient un pool d'IgG de leur mère à la naissance qui subit une diminution progressive jusqu'à huit semaines d'âge (corrélé avec un poids compris entre 1 et 2 kg). Ces AOM permettraient une protection passive contre le virus dans la majorité des cas. Cela dit, ces observations ne vont pas dans le sens de celles de (Rodak et al., 1991), concluant que la résistance des jeunes n'était pas liée à une protection passive maternelle, des lapereaux sans AOM infectés expérimentalement ayant survécu à l'infection.

Depuis, les connaissances sur le virus ont évolué et d'autres facteurs ont été mis en évidence. Comme tous les calicivirus, les lagovirus utilisent des récepteurs cellulaires pour entrer dans les cellules. Le RHDV est capable de se fixer sur les antigènes de groupe sanguin. Une étude portant sur l'importance des antigènes de groupe sanguin ABO dans la fixation du RHDV aux muqueuses de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif révèle ainsi que le nombre de récepteurs où se fixe le RHDV augmente progressivement entre 1 mois et 3 mois. Les antigènes A et O de type 2 sont présents au niveau des cellules épithéliales du tractus digestif et des voies aériennes supérieures des lapins. Au niveau des cellules épithéliales buccales, l'antigène O de type 2 apparaît à partir de la troisième semaine de vie et atteint son

niveau maximal d'expression à dix semaines. L'antigène A apparaît plus tard, à partir de la huitième semaine et atteint son expression maximale à douze semaines (Ruvoën-Clouet et al., 2000). L'apparition de ces antigènes est donc concomitante avec celle de la sensibilité au virus, ce qui laisse supposer un lien étroit entre antigènes ABO et permissivité au virus.

Néanmoins, le tableau des facteurs de sensibilité au virus semble plus complexe. En effet, et en dépit des preuves convaincantes du rôle important des glucides membranaires pour faciliter l'infection par le RHDV au niveau des voies aériennes supérieures et digestives, seule une protection partielle contre l'infection a été obtenue chez des individus n'ayant qu'une faible expression épithéliale de ces récepteurs (Nyström et al., 2011). De plus, il s'avère que les hépatocytes, cible principale de la réplication virale, n'expriment pas les antigènes du système ABO. Cela impliquerait l'existence d'au moins un récepteur hépatique supplémentaire, associé au mécanisme de résistance génétique lié au facteur d'attachement du virus aux cellules constitué par les antigènes du groupe sanguin (Abrantes et al., 2012).

Egalement en relation avec l'âge de l'animal, c'est le type de réponse immunitaire qui semble être impliqué dans les différentes réponses à l'infection. Des coupes de foie de lapin ont été observées en microscopie électronique 48 heures post-inoculation virale chez des lapins adultes ou chez des lapereaux de 6 à 8 semaines. Chez les adultes, ce sont majoritairement des hétérophiles qui sont retrouvés en contact étroit avec les hépatocytes dégénérés (suggérant une activité de phagocytose) alors que chez les jeunes lapins, la phase hétérophiles est déjà terminée et on retrouve de nombreux lymphocytes. Ces lymphocytes montrent de nombreux contacts avec les hépatocytes intègres, ce qui suggère que des changements moléculaires sont survenus à la surface des hépatocytes et qu'ils jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Ferreira et al., 2005).

En 2014, une autre étude a mis en évidence l'importance de l'immunité dans la résistance des jeunes à l'infection. Des lapereaux de quatre semaines ont été soumis à une immunosuppression réalisée par une injection d'acétate de méthylprednisolone, puis infectés par injection intramusculaire avec une souche de RHDV. Tous les lapereaux immunodéprimés ont présenté des symptômes de RHD et sont morts dans les 3 jours. L'étude de la population de cellules inflammatoires révèle, comme pour des lapins adultes un contingent majoritaire d'hétérophiles associé à une apoptose massive des hépatocytes et une coagulation

intravasculaire disséminée (Marques et al., 2014). Ces dernières observations affaiblissent donc l'hypothèse d'intervention de récepteurs hépatiques précédemment évoquée.

3.1.3.2 Baisse d'immunité

Evoquée précédemment, l'immunité semble avoir un rôle important dans la gestion de l'infection par l'organisme. Ainsi, toute baisse d'immunité liée au stress dû aux conditions d'élevage, le parasitisme et une baisse d'état général favorise l'apparition et la diffusion de la maladie.

Une étude visant à établir une potentielle interaction entre le virus de la myxomatose et RHDV suggère que l'immunosuppression induite par le premier pourrait faciliter des infections intercurrentes qu'elles soient bactériennes ou virales comme la RHD (Marchandeu et al., 2004).

3.1.3.3 Sexe et race

Aucune prédisposition de sexe ou de race n'a été notée pour le RHDV (Ohlinger et al., 1993 ; Marchandeu et al., 1998)

3.1.3.4 Mode de vie

Le RHDV touche aussi bien les lapins sauvages que les lapins domestiques ou d'élevage. Cependant, au cours des épizooties de RHDV, toutes les populations sauvages de lapins exposées au virus n'ont pas été atteintes de la même manière, avec notamment une incidence basse dans certaines régions d'Australie et en Bretagne. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces variations est la mise en place d'une protection croisée induite par la circulation de souches non pathogènes de RHDV. En 2009, une étude a confirmé cette hypothèse en montrant que l'infection avec la souche non pathogène RCV-A1 induit la mise en place d'une protection par des anticorps sériques capable de réactions croisées avec le RHDV, ce qui protège l'animal de la RHD mais de façon incomplète et pas contre l'infection. En effet, lors de l'épreuve virulente, les animaux ont présenté des signes cliniques évocateurs à des intensités variables (fièvre, léthargie, ...) mais la majorité n'est pas morte de la maladie (Cooke, 2002 ; Strive et al., 2010 ; Abrantes et al., 2012).

3.1.3.5 Statut vaccinal

La vaccination et les mesures de biosécurité constituent les principales actions de protection en élevage. La vaccination s'avère être efficace dans la majorité des cas et est également utilisée en urgence dans les élevages faisant face à une épizootie afin de contrôler

l'expansion de la maladie. Cependant, ces dernières années, de nouveaux variants antigéniques ce sont montrés capables d'induire la maladie et de provoquer une forte mortalité malgré une protection vaccinale à priori correcte (Le Gall-Recule et al., 2011 ; Kerr, Donnelly, 2013 ; Dalton et al., 2012).

3.1.3.6 Saisonnalité

Les variations de température et d'humidité semblent avoir un impact sur la transmission de la RHD dans les populations de lapins. En Australie, les taux de mortalité les plus élevés ont été retrouvés dans les régions arides et semi-arides à l'intérieur des terres, tandis que des taux de mortalité plus bas ont été observés dans les régions côtières humides à climat tempéré. Ces variables affectent certainement l'épidémiologie de la RHD du fait qu'elles influent également sur l'abondance et l'activité des vecteurs impliqués dans la transmission du virus. Aussi, les épizooties du sud de l'Australie ont eu lieu en automne ou au début de l'hiver (soit en mai-juin), au moment où les lapins commencent à se reproduire. En effet, ces jeunes adultes ont perdu leur immunité protectrice durant l'été et constituent donc des cibles privilégiées pour le RHDV (Cooke, 2002 ; Kerr, Donnelly, 2013).

3.2 Epidémiologie de l'EBHS

3.2.1 Espèces cibles

Comme la RHD chez le lapins, l'EBHS apparait comme très spécifique de deux espèces de lièvres. Des études basées à la fois sur des essais expérimentaux et sur des données épidémiologiques ont montré que seuls les lièvres bruns (*Lepus europaeus*) et les lièvres de montagne (*Lepus timidus*) étaient sensibles au virus (Lavazza et al., 1996). Cependant, une récente étude, a montré que le virus était capable de circuler dans des populations de lapins à queue blanche (*Sylvilagus floridanus*). En effet, l'analyse de 471 sera et 108 individus de lapins à queue blanche italiens prélevés entre 1999 et 2012 a montré que 15 à 20 % d'entre eux étaient séropositifs pour l'EBHS. Malgré une majorité de titres en anticorps bas, certains furent significativement élevés (1/1280). En revanche, tous les individus ayant fait l'objet d'une recherche virale furent négatifs à l'exception d'un lapin à queue blanche mort durant un épidémie d'EBHS, pour lequel la souche virale identifiée présentait 99,9 % d'homologie avec les souches retrouvées sur les lièvres (Lavazza et al., 2015).

3.2.2 Circulation du virus au sein d'une population

Depuis sa première apparition, EBHSV a évolué vers différents génotypes et sous-types, mais à l'heure actuelle, ils appartiennent tous à un sérotype unique. Lorsqu'il est introduit dans la population de lièvre brun indigène, la morbidité atteint près de 100% et la mortalité est d'environ 50% dans la classe d'âge adulte, mais absente chez les jeunes individus âgés de moins de 40-50 jours. Ces jeunes s'infectent et développent une immunité de longue durée avec des titres d'anticorps faibles à moyens sans présenter de signes cliniques (Scicluna et al., 1994 ; Zanni et al., 1993). Lorsque l'infection est endémique et circule constamment dans une population de lièvres, les individus rencontrent le virus en début de vie et vont s'immuniser avant de devenir sensibles à la maladie. L'effet de la mortalité due à l'EBHS sur la dynamique de l'hôte semble alors devenir presque négligeable (Zanni et al., 1993). Les conditions de circulation endémique du virus nécessitent le recrutement constant d'un nombre suffisant de nouveaux individus réceptifs, et, si ceux-ci sont majoritairement des jeunes, le virus est maintenu endémique avec une mortalité faible. La plupart des individus adultes seront donc séropositifs avec de faibles titres en anticorps. Une étude de 1997 a permis d'estimer que cette condition pourrait être satisfaite lorsque la population de lièvre atteint des densités supérieures à 15 lièvres / km². Au contraire, si le virus n'est pas endémique dans la population de lièvres, la dynamique de l'infection sera caractérisée par des flambées récurrentes avec des mortalités élevées. Ces épizooties commencent lorsque l'immunité de la population est faible (nombre élevé d'individus séronégatifs) et que les lièvres sont exposés à un virus nouvellement réintroduit. Les lièvres survivants à cette épidémie développeront une immunité protectrice contre le virus et montreront des titres élevés en anticorps. Ainsi, jusqu'à ce que la séroprévalence et la proportion de la population ayant des titres en anticorps moyens à élevés diminuent en dessous du seuil de densité de transmission (soit environ 15 lièvres / km²), la population sera résistante à une nouvelle flambée d'EBHS (Chiari et al., 2014).

Le cycle épidémiologique de l'EBHS semble être sensiblement le même que celui de la RHD (Figure 12) (Frölich, Lavazza, 2008).

4 Signes cliniques et lésions

4.1 Des présentations cliniques communes entre RHD et EBHS

Les animaux souffrant de RHD ou d'EBHS présentent des tableaux cliniques et des modifications histopathologiques semblables (Wirblich et al., 1994). C'est pourquoi cette partie est présentée à partir de l'exemple de la RHD.

La période d'incubation dure entre 1 et 3 jours puis les animaux succombent entre 12 et 36 heures après un pic de fièvre (hyperthermie > 40°C). En fonction de l'évolution de la maladie, on distingue plusieurs formes cliniques.

4.1.1 Forme suraiguë

C'est la forme observée en début d'épizootie. Les animaux meurent de façon brutale sans avoir montré de signes cliniques annonciateurs. Les lapins peuvent même être observés en train de manger normalement juste avant de mourir (Figure 14). La mort se produit 30 à 36 heures après inoculation par voie orale et environ 24 heures après injection du virus (Kerr, Donnelly, 2013).

4.1.2 Forme aiguë

C'est la forme classiquement observée en zone d'épizootie. Les lapins deviennent non ambulatoires, présentent une anorexie et un abattement (Figure 13), une tachypnée et une hyperthermie pouvant régresser quelques heures avant la mort. Des signes neurologiques sont fréquemment observés tels qu'un opisthotonos, une excitabilité, une paralysie et une ataxie. Les animaux peuvent parfois mourir lors de crises convulsives (Figure 14). Des signes respiratoires sont occasionnellement rapportés (trachéite, dyspnée, cyanose), avec un jetage nasal séro-hémorragique parfois mousseux ou un épistaxis (Figure 15). Un écoulement oculaire séreux à hémorragique avec un chémosis peut également être présent. Des pétéchies sont parfois rapportées. La mort se produit en général en 48 à 72 heures, mais peut avoir lieu jusqu'à 8 jours après l'infection (Abrantes et al., 2012 ; Kerr, Donnelly, 2013 ; Xu, Chen, 1989 ; Ohlinger et al., 1990)

Figure 13 : Photographie d'un lapin atteint de RHD.

Il présente une hypovigilance et une hyperthermie. Dans la forme aiguë, ces symptômes durent moins d'une journée et se terminent par la mort de l'animal (Belz, 2004).



Figure 14 : Lapin mort de la RHD suite à une crise convulsive.

La présence de nourriture dans la bouche est indiquée par la flèche (Kerr, Donnelly, 2013).



Figure 15 : Epistaxis et hématurie chez un lapin mort de forme aiguë de RHD.

La présence de sang au niveau nasal et buccal est indiquée par la flèche (Kerr, Donnelly, 2013).



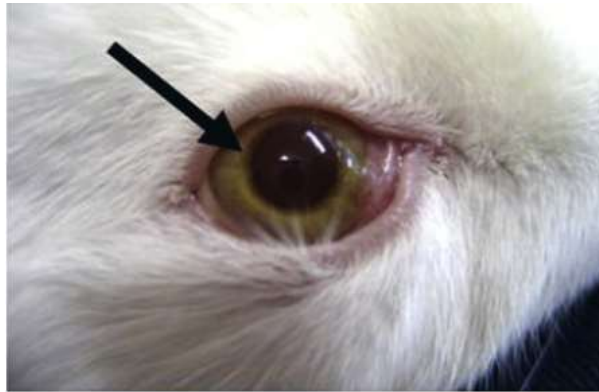
4.1.3 Forme subaiguë

Cette forme est présente dans les étapes les plus avancées d'une épizootie. On retrouve un abattement, une anorexie et une hyperthermie ainsi que les mêmes symptômes observés dans les formes aiguës, dont un ictère, mais d'expression plus modérée (Figure 16). Certains animaux atteints meurent au bout de quelques semaines mais la plupart survivent et développent des anticorps contre le RHDV, leur conférant une protection face à une réinfection ultérieure ; c'est

dans cette forme clinique que l'on retrouve la présence de CPL de RHDV (voir le 2.1.1 de la Partie 2) (Abrantes et al., 2012 ; Xu, Chen, 1989).

Figure 16 : Ictère et chémosis chez un lapin mort de forme subaiguë de RHD

L'ictère est oculaire est indiqué par la flèche (Kerr, Donnelly, 2013)



4.1.4 Forme subclinique

Une faible proportion de lapins adultes infectés élimine le virus et séroconvertissent avec peu ou pas de signes cliniques. Les jeunes lapins de moins de 4 à 5 semaines d'âge développent très rarement la maladie après une infection, bien qu'ils puissent transmettre le virus, présenter une température élevée voire dans de rare cas décéder (Kerr, Donnelly, 2013).

4.2 Lésions macroscopiques et histologie

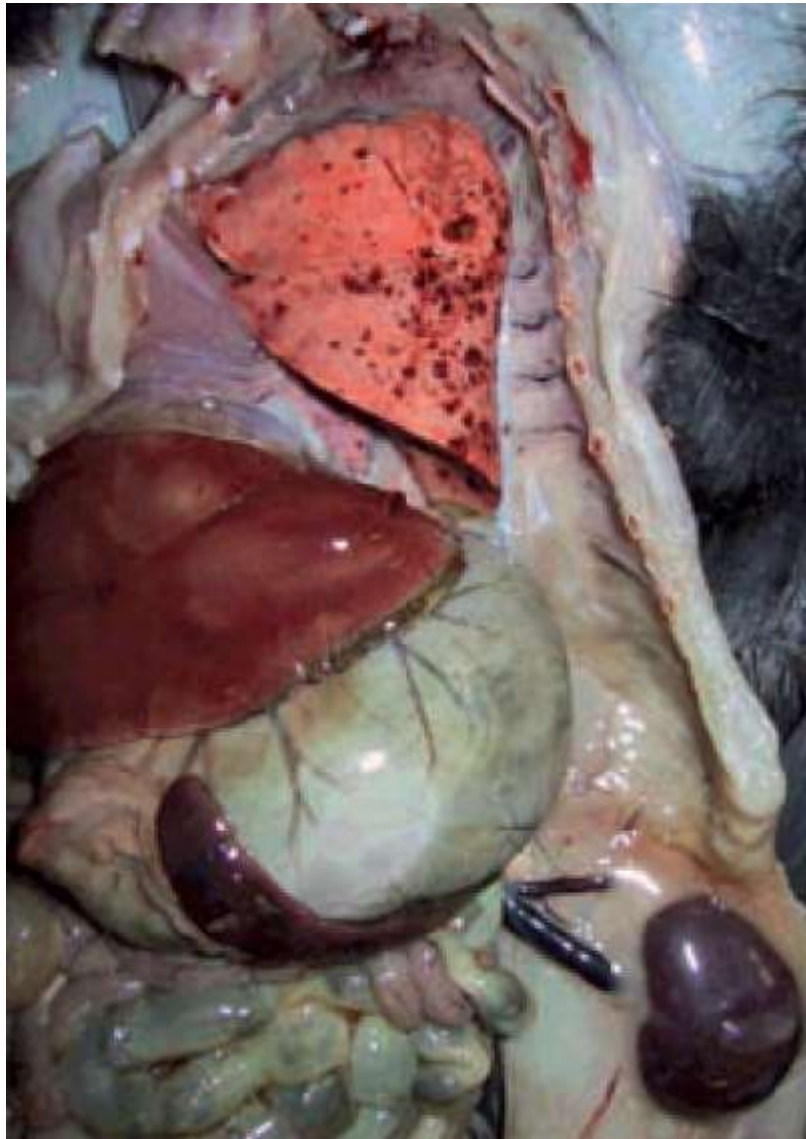
Lors de l'autopsie, le pattern lésionnel est majoritairement congestivo-hémorragique sur l'ensemble des organes cibles : foie, rate, reins, poumons, thymus et trachée.

Le plus souvent, avant l'ouverture du cadavre, celui-ci a le nez souillé par un écoulement sanguin et un ictère des pavillons auriculaires est visible (Figure 15).

A l'ouverture du cadavre, on peut constater une coloration jaune de l'ensemble du tissu sous-cutané, en lien avec l'ictère. On observe également de nombreux éléments indiquant un défaut de coagulation important. En effet, la cavité abdominale peut présenter des vaisseaux sanguins dilatés et des pétéchies sont présentes sur l'ensemble des organes (Figure 17). Un hydrothorax peut également être associé aux lésions abdominales. Chez les femelles gravides, la présence d'hémorragies multi-organiques focales a été objectivée chez certains fœtus (Marcato et al., 1991 ; Ohlinger et al., 1993).

Figure 17 : Lésions macroscopiques retrouvées lors de l'autopsie d'un lapin mort de RHD.

Noter la présence de foyers hémorragiques dans le poumon, le cœur, et les reins. Le foie est pâle et friable, et la rate congestionnée et de taille augmentée (Le Gall-Recule et al., 2011)



Dans la suite de ce travail, les lésions macroscopiques et l'histologie seront présentées organe par organe.

4.2.1 Foie

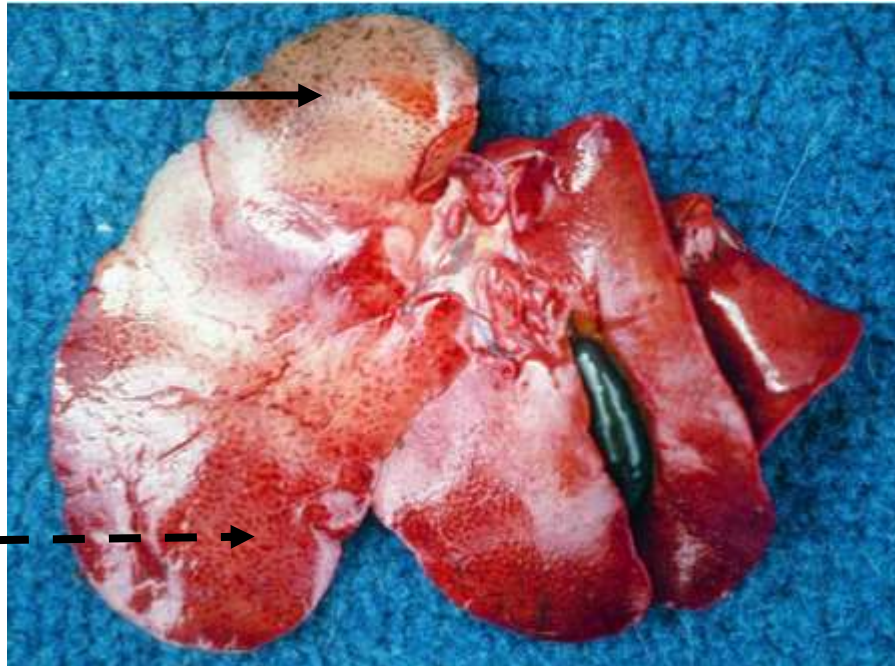
Lésions macroscopiques

Les principales lésions macroscopiques observées pour le RHDV le sont au niveau hépatique, avec un foie de taille augmentée, de couleur pâle parfois jaune-grisâtre, de consistance friable et d'aspect lobulaire (Figure 18). La présence d'hémorragies focales a parfois été notée

(Abrantes et al., 2012 ; Kerr, Donnelly, 2013). Ces lésions sont observables dès 30 heures post-infection.

Figure 18 : Foie d'un lapin atteint de RHD.

On note des zones de nécrose hépatique (flèche pleine) et un aspect nodulaire prononcé (flèche en tirets) (Belz, 2004)

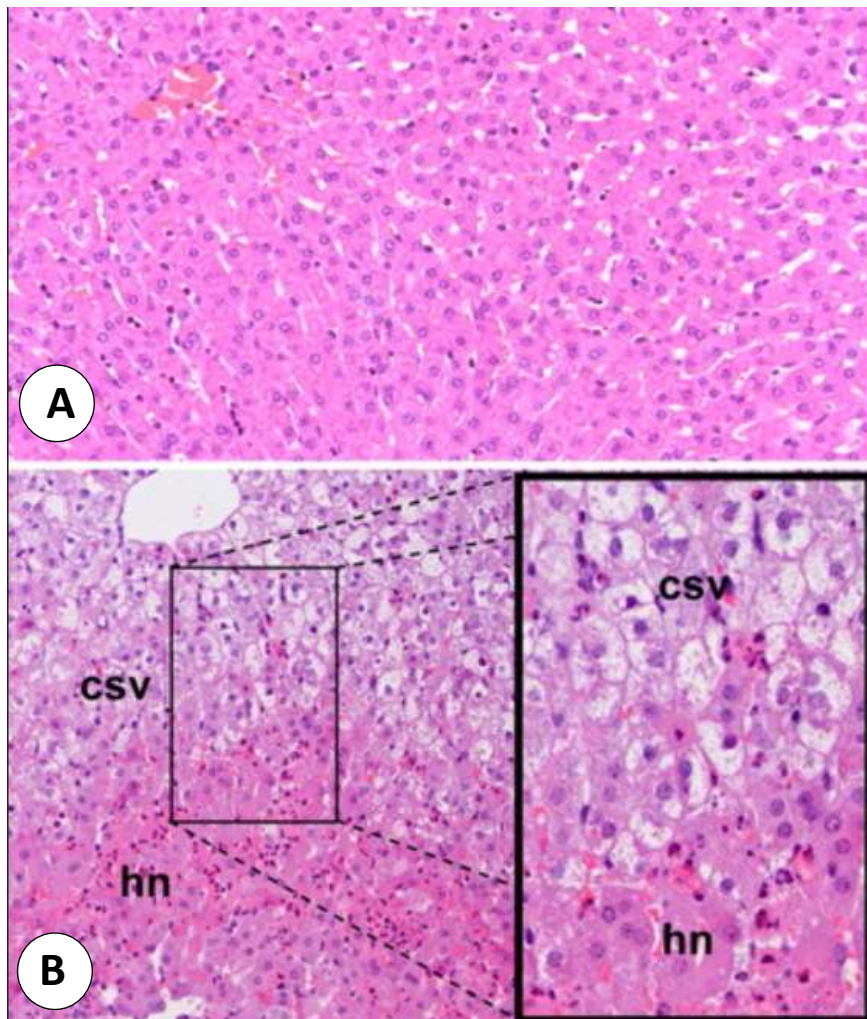


Histologie

Les hépatocytes subissent une nécrose de coagulation en région périlobulaire, ainsi qu'une dégénérescence avec des images d'apoptose (vacuolisation, altérations mitochondriales, caryopycnose, caryolyse) plus marquée en région centrolobulaire (Figure 19). Ces lésions cellulaires sont à l'origine d'une dissociation hépatocellulaire désorganisant les travées hépatiques. Des neutrophiles sont associés aux cellules lésées. Les espaces interlobulaires sont parfois œdématiés et infiltrés par des lymphocytes. Une régénération hépatocellulaire est visible dans les cas d'atteinte subaiguë (Abrantes et al., 2012 ; Fuchs, Weissenböck, 1992 ; Kerr, Donnelly, 2013).

Figure 19 : Coupes histologiques de foies de lapin sain (A) et de lapin infecté par le RHDV (B).

Chez le sujet infecté, on remarque un gonflement et une vacuolisation cellulaire (csv) et une nécrose hépatique (hn). (Tunon et al., 2011)

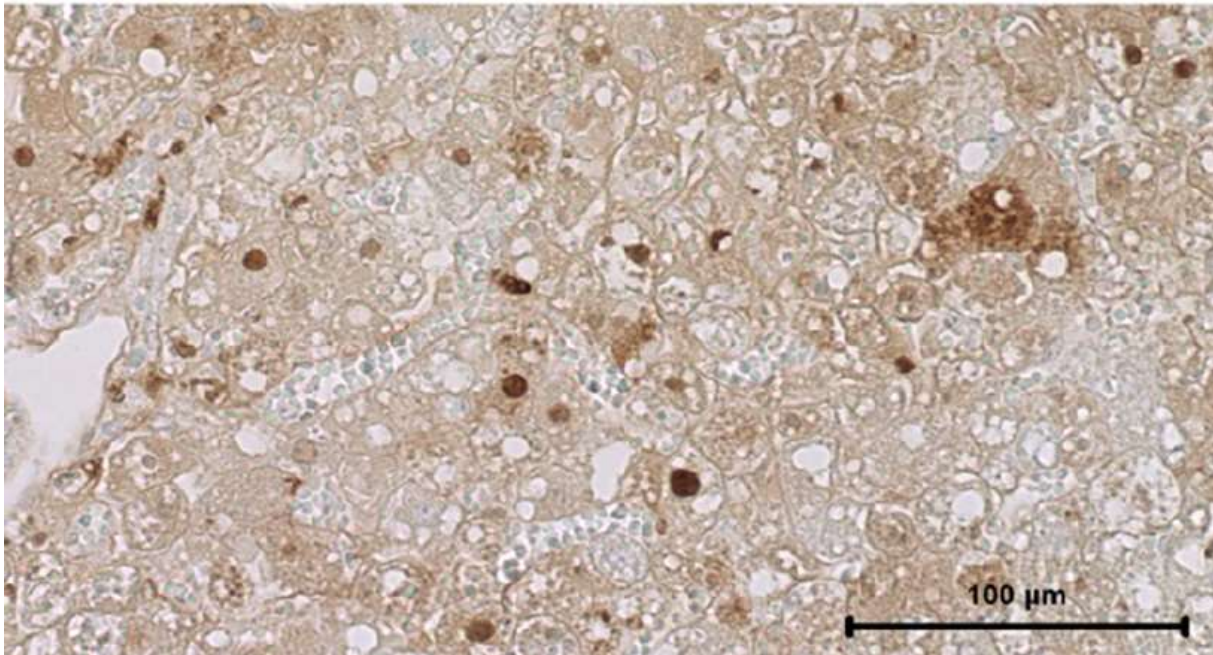


De plus, l'utilisation de l'immunohistochimie a permis de comprendre un peu mieux l'origine de ces lésions. Ainsi, une étude a montré que ces lésions sont liées à une dissémination marquée du RHDV dans le parenchyme hépatique grâce à l'utilisation d'anticorps anti-VP60 marqués (Figure 24A). Chez les jeunes qui survivent à l'infection, on retrouve rapidement (environ 7 jours) un tissu de régénération du parenchyme hépatique, qui se traduit par de larges cellules souvent binucléées qui ne sont pas organisées en travées (Figure 24C). On retrouve parfois des espaces occupés par des petites cellules basophiles ovales qui seraient des précurseurs d'hépatocytes. Cette étude a également utilisé la méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) pour confirmer que les cellules subissaient une apoptose (Figure 20). La technique consiste à révéler la présence de cassures

dans l'ADN (présentes dans les cellules en apoptose) par une réaction de polymérisation mettant de jeu des nucléotides modifiés qui sont par la suite mis en évidence via une réaction de coloration (Marques et al., 2014).

Figure 20 : Immunocytochimie évaluant l'apoptose dans le foie.

Section d'un foie de lapin mort de RHD où l'immunodétection a été obtenue par TUNEL ; contre-coloration à l'hématoxyline. Les noyaux des cellules ayant subi une apoptose sont colorés en marron.(Marques et al., 2014)



4.2.2 Système vasculaire

Outre les lésions du foie, les lésions vasculaires sont les plus fréquemment retrouvées et caractéristiques de la maladie.

Un ictère marqué peut être observé chez des animaux morts au bout de plusieurs jours d'infection (Kerr, Donnelly, 2013). Des hémorragies et une congestion résultant d'une CIVD sont très fréquemment présentes dans de nombreux organes et en particulier dans les poumons, le cœur et les reins (Abrantes *et al.*, 2012). La présence de thrombi est rapportée dans les vaisseaux pulmonaires et rénaux principalement, mais également dans le cerveau et la rate. Il en résulte une congestion et des hémorragies pulmonaires, un infarctissement rénal, des dépôts de fibrine au niveau de la pulpe rouge de la rate parfois à l'origine de nécrose splénique (Kerr, Donnelly, 2013 ; Gregg et al., 1991).

4.2.3 Rate

Les lésions observées sur la rate surviennent à partir de 36 heures post-infection par le RHDV.

Lésions macroscopiques

Une splénomégalie est fréquemment observée, ainsi que des plages de coloration rouge sombre et une hyperhémie.

Histologie

On observe parfois une hémosidérose splénique. Une déplétion lymphocytaire est présente dans la pulpe blanche, avec une diminution des nodules spléniques. Les follicules lymphoïdes montrent parfois des images de caryorrhexie concernant les lymphoblastes de la zone marginale et certains lymphocytes (Abrantes et al., 2012 ; Teifke et al., 2002).

4.2.4 Trachée et poumons

Lésions macroscopiques

On peut observer une hyperhémie et un œdème pulmonaire accompagnés d'hémorragies. La trachée contient souvent un liquide séro-hémorragique mousseux et la muqueuse trachéale est hyperémiée, elle présente des hémorragies et des pétéchies (Figure 21).

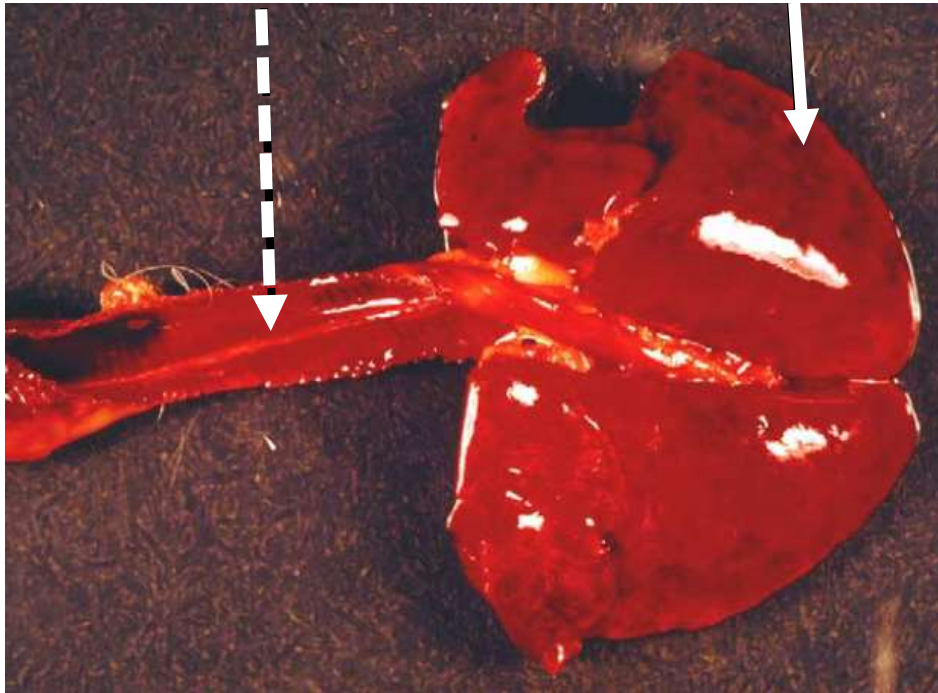
Histologie

La trachée peut être le siège d'une infiltration leucocytaire.

Au niveau pulmonaire, on retrouve majoritairement des hémorragies intra-alvéolaires et périvasculaires, avec parfois une discrète bronchiolite, ainsi qu'une prolifération lymphocytaire (Abrantes et al., 2012). Des thrombi oblitérant les plus gros vaisseaux, une desquamation des macrophages alvéolaires et des cellules de l'épithélium bronchique sont également rapportés. On peut observer une caryorrhexie au niveau des cellules du tissu lymphoïde associé à l'appareil respiratoire (BALT) (Marcato et al., 1991).

Figure 21 : Appareil respiratoire d'un lapin atteint de RHD.

Le poumon est hyperhémie et présente des plages hémorragiques (flèche pleine). La trachée est remplie d'un liquide hémorragique (flèche en tirets)



4.2.5 Reins

Lésions macroscopiques

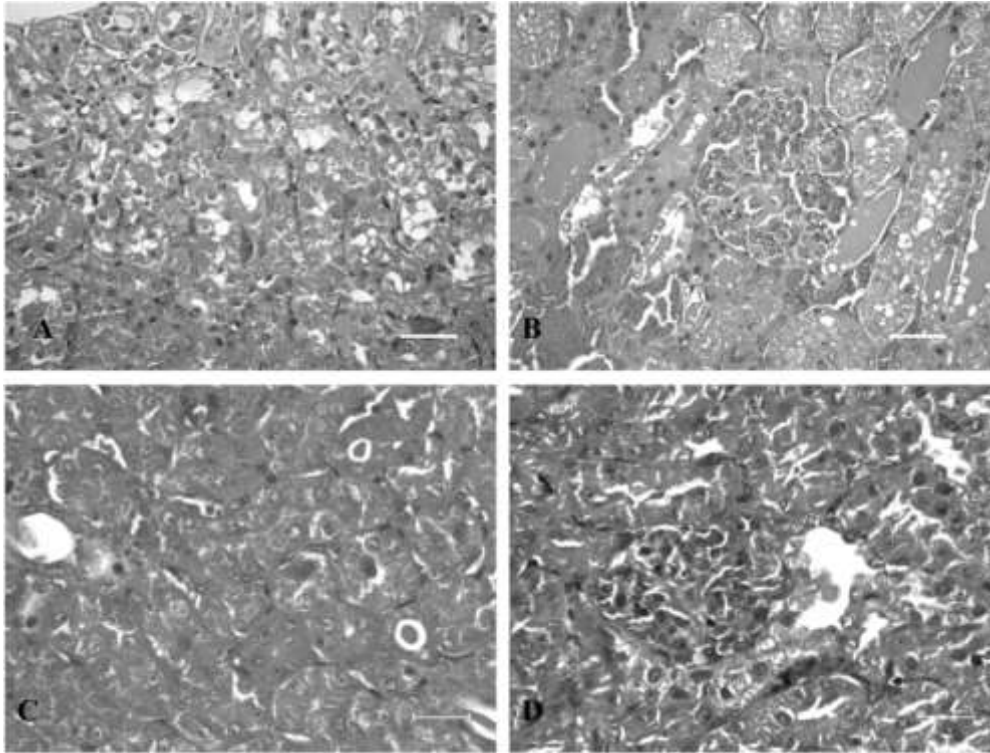
Les reins sont souvent de taille augmentée, avec une coloration rouge sombre et des pétéchies ou des hémorragies sous-capsulaires (Abrantes et al., 2012).

Histologie

Des hémorragies sont présentes au niveau des glomérules rénaux, de la médulla et dans l'interstitium cortical, associées à de multiples thrombi hyalins (Figure 22). Les tubules sont dilatés, l'épithélium tubulaire est dégénéré et une infiltration lymphocytaire est présente (Abrantes et al., 2012 ; Maurice, 2015).

Figure 22 : Lésions rénales microscopiques à différents temps post-infection par le RHDV.

(A) : Dégénérescence vacuolaire modérée à 32 heures post-infection (hpi), (B) Coagulation intravasculaire disséminée à 37 hpi, (C) : accumulation de cylindres à 45 hpi, (D) : Gonflement tubulaire marqué à 66 hpi. La barre blanche représente 25 μm (Chen, Chou, et al., 2008)



4.2.6 Thymus

Il peut parfois être hypertrophié. On note une nécrose des cellules lymphocytaires dans la corticale des lobules thymiques (Teifke et al., 2002).

4.2.7 Système nerveux central

Des hémorragies corticales peuvent être observées ainsi qu'une congestion des vaisseaux corticaux. Des thrombi hyalins, des petites hémorragies et une hyperhémie sont présents avec parfois une encéphalomyélite non suppurée avec infiltration lymphocytaire (Abrantes et al., 2012 ; Maurice, 2015).

4.2.8 Tractus digestif

Le contenu digestif est le plus souvent normal. On peut observer une gastrite voire une entérite catarrhale parfois avec des érosions de la muqueuse ainsi que des hémorragies au niveau de la séreuse. Dans la cavité abdominale, on observe une hyperplasie des nœuds lymphatiques mésentérique, parfois un hémopéritoine (Abrantes et al., 2012 ; Marcato et al., 1991).

4.3 Cas particulier des souches non pathogènes et peu pathogènes de RHDV

En Italie, la mise en évidence de lapins séropositifs pour le RHDV mais n'ayant jamais présenté les symptômes de la maladie a permis en 1996 d'identifier le premier lagovirus non pathogène. Cette souche dénommée alors RCV pour *Rabbit Calicivirus* s'est montrée plus proche du RHDV que de l'EBHSV. En effet, l'infection par celle-ci confère une protection croisée contre le RHDV, avec des anticorps sériques se montrant plus spécifiques pour la reconnaissance des antigènes du RHDV par rapport à l'EBHSV ; elle est capable de se transmettre aux lapins mais pas aux lièvres et la séquence primaire de la protéine de capsid se rapproche plus de celle du RHDV que de celle de l'EBHS. Cependant, si de nombreuses similitudes avec le RHDV sont notées, le RCV se distingue par l'absence de signes cliniques et de lésion histologique liés à l'infection, le site d'accumulation du virus semble être l'intestin et non le foie (Capucci et al., 1996). Par la suite, c'est en Australie, en 2009 qu'une autre souche non pathogène de *Lagovirus* appelée RCV-A1 a été isolée à partir de jeunes lapins sauvages ne présentant aucun signe clinique (Strive et al., 2009). Ces souches de *Lagovirus* non pathogènes isolées forment un gradient de protection croisée vis-à-vis du RHDV classique, ce qui souligne l'importante diversité du genre : la protection est totale pour le RCV italien, partielle pour RCV-A1 et nulle pour la souche française 06-11 (Le Gall-Reculé et al., 2011).

Plus récemment, c'est une nouvelle souche non pathogène intermédiaire qui a été caractérisée dans le Michigan aux Etats-Unis, significativement différente des précédentes par une mortalité induite d'environ 30%. Les signes cliniques se rapprochent de ceux observés avec les souches classiques de RHDV, avec mort subite, hémorragies et nécrose hépatique (Bergin et al., 2009). Compte tenu de l'échec observé lors de la reproduction expérimentale de l'infection, ces résultats doivent être considérés avec prudence mais laissent suggérer la possibilité pour les *Lagovirus* de franchir les barrières épithéliales. Cette faculté permettrait l'émergence de souches pathogènes à partir de souches peu ou pas pathogènes en permettant l'atteinte d'autres organes (comme le foie) en contrecarrant l'effet des barrières épithéliales, notamment respiratoires et digestives (Abrantes et al., 2012).

5 Modifications des paramètres biologiques

5.1 Modifications des paramètres biochimiques sanguins

Chez les lapins souffrant de RHD, les analyses biochimiques révèlent une élévation des marqueurs de la fonction et de la cytolyse hépatique, une hypoglycémie, une hyperlipidémie, et une élévation significative des paramètres rénaux (urémie et créatininémie).

5.1.1 Paramètres hépatiques

Une étude expérimentale a montré que dès 18 heures après inoculation (hpi) par le RHDV, on observait une augmentation significative de l'activité des enzymes hépatiques. Les ASAT (aspartate amino-transférase) semblent être le marqueur le plus impacté avec une augmentation drastique 6 à 12 heures avant la mort de l'animal. Cela témoigne certes d'une cytolysse hépatique sévère mais impliquerait également des lésions membranaires des mitochondries au sein des hépatocytes. En effet, des valeurs passant de 10 UI/L à 4 000-14 000 UI/L en quelques heures ont été relevées sur des lapins infectés. Les autres enzymes hépatiques : ALAT (alanine amino-transférase), PAL (phosphatase alcaline) et GGT (gamma glutamyl-transférase) augmentent également de manière significative dès 24 heures post-inoculation mais dans des proportions moindres. Une hyperbilirubinémie est également rapportée dans les 6-12h précédant la mort, signant la présence d'une cholestase (P. G. Ferreira et al., 2006).

5.1.2 Paramètres rénaux

Les paramètres rénaux montrent une augmentation significative dès 36 heures post-inoculation pour l'urée et 42 heures post-inoculation pour la créatinine. D'après l'étude menée par Chen et al. en 2008, l'augmentation du rapport urée/créatinine au cours de l'infection évoque une insuffisance rénale aiguë d'origine pré-rénale (la fonction de filtration étant atteinte plus sévèrement que la fonction de réabsorption), qui apparaît conjointement avec les signes de CIVD au niveau des reins (Chen et al. 2008).

5.1.3 Métabolisme lipidique et glucidique

Une augmentation significative des taux de cholestérol et de triglycérides est rapportée dès 30 heures post inoculation, reflétant une altération du métabolisme lipidique hépatique (Chen, Shien, Ooi 2008).

Une hypoglycémie marquée est notée dans les heures qui précèdent la mort de l'animal avec une valeur de glycémie avoisinant souvent le tiers de la valeur usuelle. Cette hypoglycémie devient significative dès 24 heures post inoculation, et évolue parallèlement à une déplétion de granules de glycogène hépatiques observées en microscopie électronique. Ainsi, les lésions hépatiques mettraient en péril le stockage du glycogène et la néoglucogenèse, ce qui, associé à une anorexie prolongée, entrainerait l'hypoglycémie. Le glucose étant la source d'énergie principale du cerveau, l'hypoglycémie peut être à l'origine des signes cliniques neurologiques observés avant la mort (Chen et al. 2008 ; Ferreira et al. 2006).

5.1.4 Autres modifications

Une augmentation du taux de taurine a également été détectée dans le sérum de lapins atteints. Une perte de taurine par les cellules du cerveau vers l'espace extracellulaire et l'augmentation de la teneur sanguine en taurine a précédemment été décrite chez des rats après rupture de la vascularisation hépatique ou hyper-ammoniémie expérimentale. Compte tenu du rôle de la taurine dans l'osmorégulation et la neuromodulation au niveau cérébral, ce phénomène a été relié avec la mise en place d'une encéphalopathie hépatique et d'un œdème cérébral (Tuñón et al., 2003 ; Hilgier et al., 1996).

On observe également une augmentation des taux plasmatiques en acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine). Associée avec des concentrations normales à augmentées en acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine), elle est fortement évocatrice d'une insuffisance hépatique aiguë (diminution de l'index de Fischer²). En outre, l'infection provoque une diminution du taux plasmatique en arginine, qui devient indétectable 48 hpi. Cet épuisement en arginine pourrait être expliqué par une dysfonction du cycle de l'urée ou une consommation excessive pour la production d'oxyde nitrique ou la synthèse de la purine et la pyrimidine (Tuñón et al., 2003).

Une étude de 2010 a montré la modification quantitative des marqueurs d'apoptose et de mort cellulaire contribuant aux dommages hépatiques et à l'absence de sa régénération. On observe précocement une augmentation de l'expression de TNF (Tumor Necrosis Factor)

² Index de Fischer : ration entre le taux d'acides aminés à chaîne ramifiée et le taux d'acides aminés aromatiques.

à 12 hpi. Dès 36 hpi., l'activité de la caspase-3, impliquée dans le clivage de l'ADN lors du processus apoptotique, augmente de façon marquée. Parallèlement, on observe une faible augmentation de l'Interleukine 6, une activation transitoire de la protéine STAT-1, et faible de la protéine STAT-3. Ces protéines du groupe STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), normalement impliquées dans les processus de régénération lors d'hépatite aiguë ne sont pas ou peu activés lors de RHD, ce qui pourrait expliquer l'absence de régénération (García-Lastra et al., 2010).

5.2 Modifications ioniques

L'infection par le RHDV provoque des déséquilibres ioniques importants pouvant conduire à une défaillance multi-organique. En effet, on observe une augmentation significative de la natrémie dont la cause la plus probable est la diminution de l'abreuvement des animaux par affaiblissement. Cette hypernatrémie engendre une augmentation de la pression osmotique du liquide extracellulaire pouvant résulter en une déshydratation cellulaire. De plus, la nécrose hépatique massive observée lors de la maladie, impliquant une perte de l'intégrité membranaire conduit à un efflux de potassium de l'espace intracellulaire vers l'espace extracellulaire et donc une hyperkaliémie. En temps normal, cette situation entraîne une kaliurèse permettant le retour à la normale. Néanmoins, l'insuffisance rénale entraînée par la RHD empêche ce rééquilibrage. Une hyperkaliémie sévère est susceptible d'entraîner la mort par défaut de dépolarisation des cellules cardiaques (bradycardie) et peut également aggraver la CIVD (Chen, Chou, et al., 2008).

5.3 Modification des paramètres de la coagulation

Un temps de prothrombine augmenté et une concentration en facteur V et VII diminuée sont notés 36 à 48 hpi. par le RHDV (Kerr, Donnelly, 2013).

5.4 Modifications hématologiques

5.4.1 Lignée blanche

En 2006, (P.G. Ferreira et al., 2006) ont mis en évidence une sévère diminution du pool de leucocytes circulant chez le lapin adulte infecté. Cette diminution touche à la fois les granulocytes et les lymphocytes, et est en lien avec plusieurs événements consécutifs à l'infection par le RHDV. Ainsi, le virus a une cytotoxicité directe sur les cellules de la lignée blanche, associée à la séquestration des leucocytes hors de la circulation sanguine (par

exemple, on observe de nombreuses cellules inflammatoires au niveau du foie). En outre, il a été montré que le virus avait une action cytopathique sur les précurseurs de la lignée blanche directement dans la moelle osseuse. Chez les jeunes lapins, on observe une diminution des leucocytes totaux liée uniquement à la perte d'hétérophiles mais de façon transitoire dans une moindre mesure. La leucopénie est sévère chez les lapins adultes qui ont pour la plupart perdu environ 90 % de leurs leucocytes circulants au moment de la mort (P.G. Ferreira et al., 2006).

Par la suite, on a pu mettre en évidence que la lymphopénie impliquait à la fois les lymphocytes B et T. Dans le foie et la rate, ils subissent une apoptose, avant même la mise en place de l'insuffisance hépatique fulminante qui tuera l'animal. Or, dans une précédente étude, le virus n'avait pas pu être mis en évidence au sein des lymphocytes circulants (Ramiro-Ibáñez et al., 1999). Ce constat fit suggérer aux auteurs que l'apoptose des lymphocytes B et T observée dans le foie et la rate était un effet de voisinage de l'infection virale. Cependant, en 2000, l'antigène de la VP60 a pu être détecté dans des macrophages et de lymphocytes spléniques à partir de 36 hpi chez des lapins adultes (Prieto et al., 2000).

La déficience immunitaire induite pourrait contribuer à la progression rapide de la maladie, comme cela a pu être observé pour le virus Ebola (Marques et al., 2010).

5.4.2 Lignée rouge

Le nombre et la taille des érythrocytes ainsi que le taux d'hémoglobine sont restés inchangés au décours de la maladie et dans les valeurs usuelles (P.G. Ferreira et al., 2006).

5.4.3 Lignée plaquettaire

On observe une thrombocytopénie modérée à sévère dans les 6 dernières heures avant la mort des lapins atteints (P.G. Ferreira et al., 2006).

6 Pathogénie

6.1 Voies d'entrée et dissémination

Les voies d'entrée naturelles du virus sont l'appareil respiratoire supérieur, l'appareil digestif, par ingestion de fèces de lapins infectés par exemple, la voie conjonctivale ainsi que la voie transcutanée, au niveau de lésions de la peau.

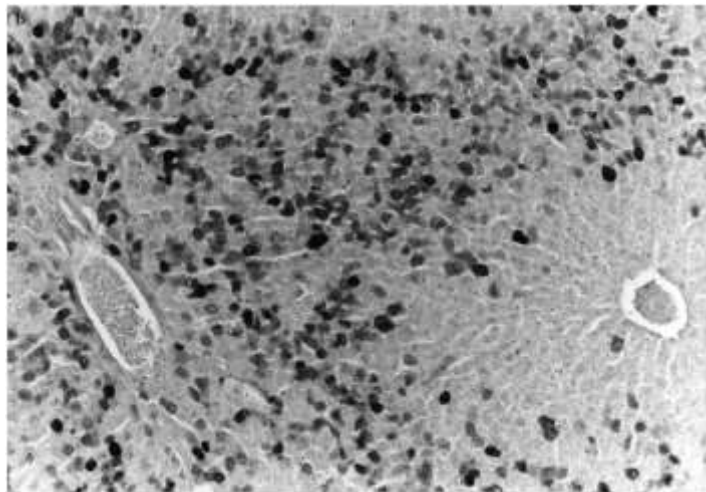
Il a été suggéré que les particules virales en suspension dans l'air inhalé pourraient se répliquer dans les macrophages alvéolaires qui sont en contact étroit avec la circulation sanguine, et seraient impliqués dès lors dans la dissémination initiale du virus. Il a également été proposé que les cellules de Kupffer pourraient être impliquées dans la propagation de l'infection au parenchyme hépatique et aux autres organes (Kimura et al., 2001).

6.2 Tropisme viral

Chez les lapins adultes, les antigènes viraux sont détectés dans le foie dès les premières heures qui suivent une inoculation avec le RHDV. En effet, la protéine de capsid est détectable dans 0.3 % des hépatocytes, dès 12 hpi, pour atteindre 60 % des hépatocytes au bout de 48 hpi. La réplication virale se déroule au sein du cytoplasme des hépatocytes, en région centroacineuse dans un premier temps, puis en région périlobulaire dans un second temps (Figure 23) (Prieto et al., 2000 ; Jung et al., 2000).

Figure 23 : Foie de lapin adulte atteint de RHD euthanasié 24 heures post inoculation.

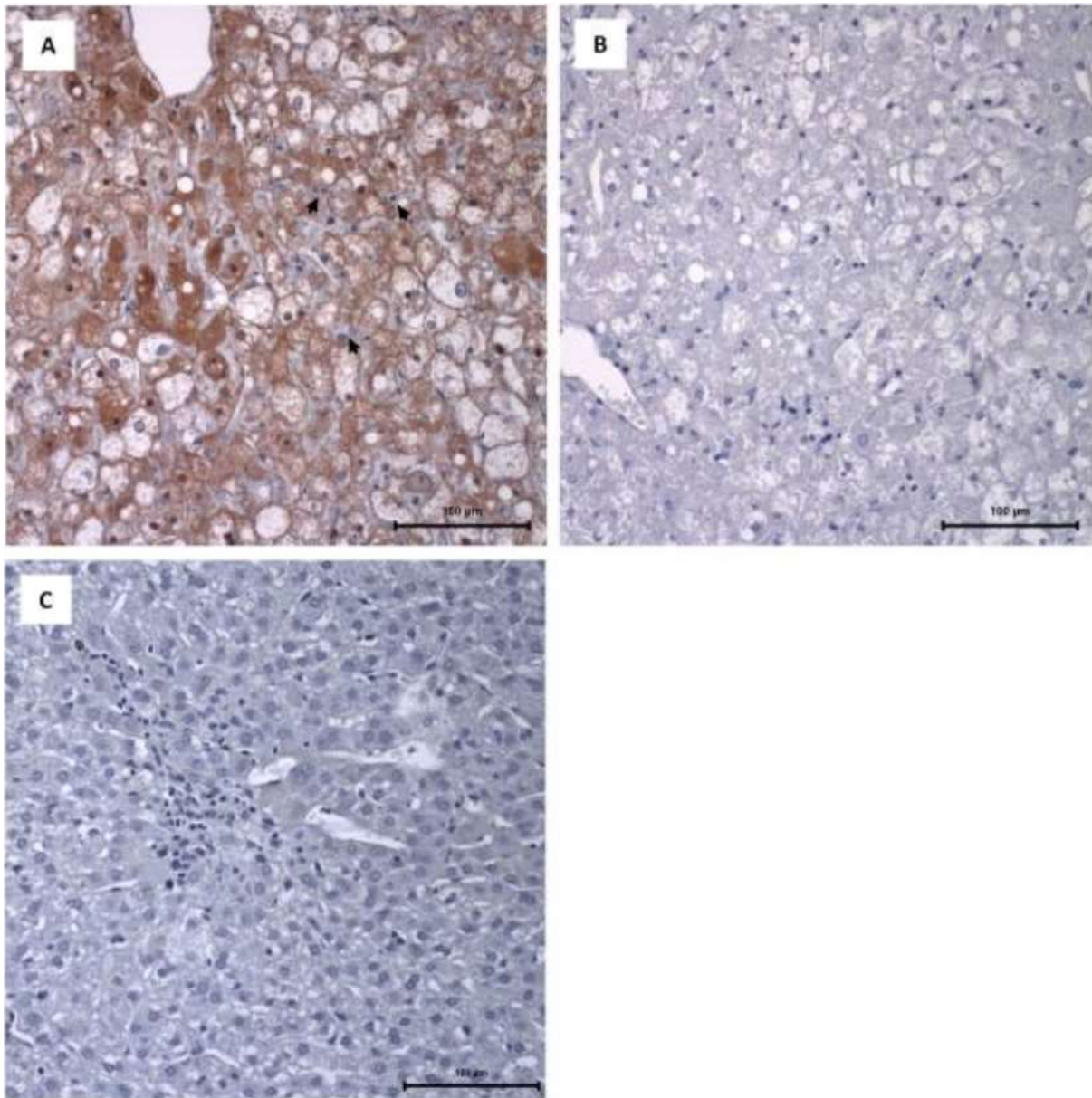
Immunomarquage (péroxydase) périlobulaire de la protéine VP60 (X200) (Prieto et al., 2000).



La présence du virus dans le foie semble perdurer tout au long de la maladie et jusqu'à la mort puisque le virus est retrouvé de façon massive au moment de la mort (Figure 24A). Par contre on remarque que lorsque les animaux survivent à l'infection, le virus devient rapidement indétectable dans le foie (Figure 24C), ce qui permet sa régénération (Marques et al., 2014)

Figure 24 : Immunohistochimie des antigènes de RHDV dans le foie sur des coupes colorées à l'hématoxyline.

A : foie d'un lapereau immunodéprimé et mort de RHD montrant une immunodétection (péroxydase) massive de l'antigène par les anticorps anti VP60 (couleur marron). De nombreux hétérophiles sont observés autour des hépatocytes endommagés et dans les sinusoides (petites flèches). B : Témoin : coupe de foie de lapin contaminé colorée avec le l'antisérum non marqué. C : Coupe de foie d'un jeune lapin ayant survécu à l'infection mais euthanasié 7 jours plus tard, on remarque le tissu de régénération non organisé en travées (Marques et al., 2014).



Par ailleurs, des études immunohistochimiques ont montré que les particules virales étaient détectables dans le cytoplasme des cellules épithéliales de la muqueuse nasale, du nasopharynx et des glandes salivaires 12 heures post-inoculation par voie oro-nasale. À 3-4 jours post-inoculation, les particules sont détectées dans les cellules mononucléées du sang

et de l'ensemble des autres tissus (Marcato et al., 1991). Une autre étude a identifié, en utilisant notamment des sondes permettant de détecter les ARN positifs (viraux) et négatifs (servant de matrice pour la synthèse d'ARN génomique) de RHDV, les cellules dans lesquelles l'infection et la réplication du virus avaient lieu. Les résultats montrent que les deux types d'ARN sont présents dans les cytoplasmes des hépatocytes, des cellules de Kupffer mais aussi dans les macrophages de la pulpe rouge de la rate (Figure 25) et les macrophages pulmonaires (Figure 26), confirmant que les macrophages contribuent à la dissémination du virus (Kimura et al., 2001).

Figure 25 : Marquage de l'ARN positif du RHDV sur une coupe de rate de lapin atteint de la maladie.

On observe que le signal n'est détecté que dans les macrophages de la pulpe rouge. L'étoile indique la pulpe blanche. X376

(Kimura et al., 2001)

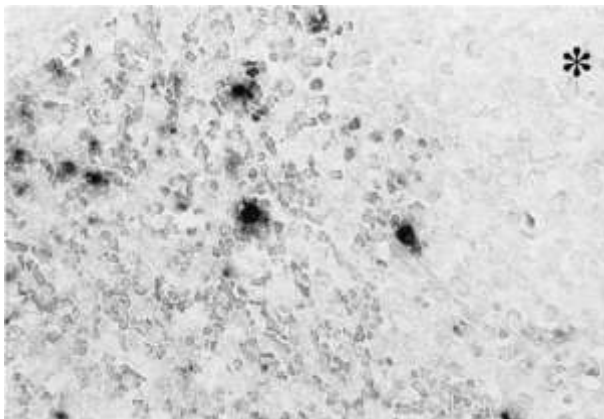
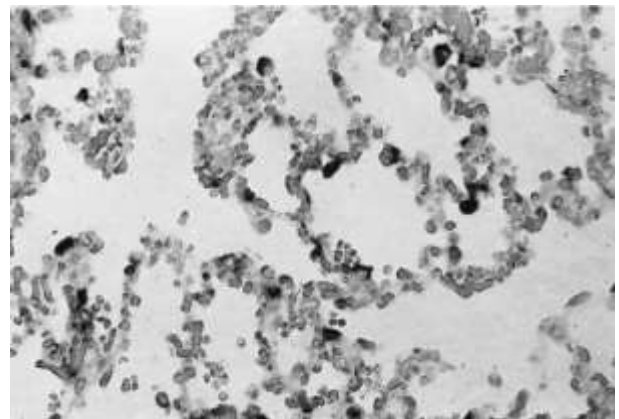


Figure 26 : Marquage de l'ARN positif du RHDV sur une coupe de poumon de lapin atteint de la maladie.

On observe que le signal est localisé aux macrophages de la lumière et des septa alvéolaires. X300

(Kimura et al., 2001)

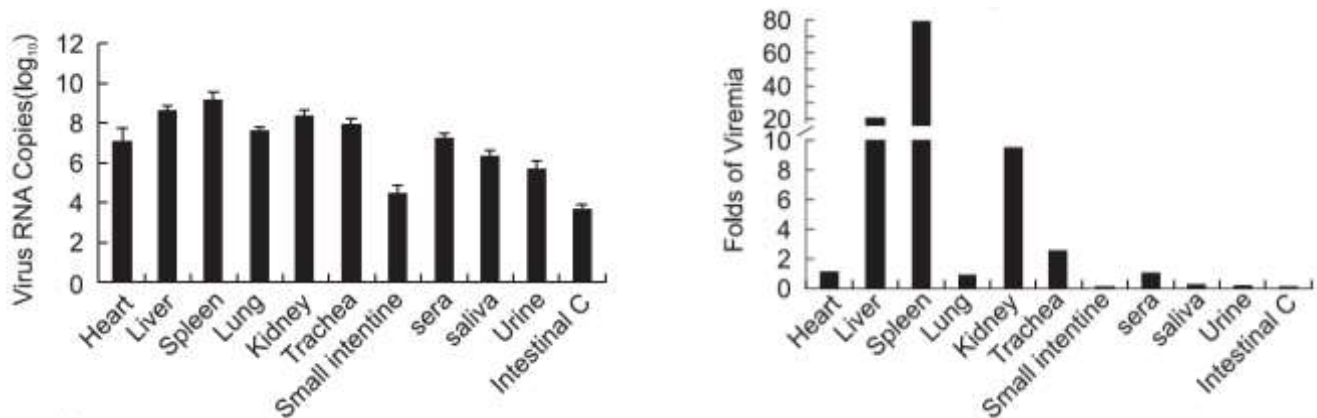


Une récente étude, basée sur la mise au point d'une technique de diagnostic par RT-PCR en temps réel (SYBR green), a mis en évidence la présence de l'ARN viral dans de nombreux tissus. Ainsi, on observe une distribution systémique du virus (dans le sérum, le foie, la rate, les reins, la trachée, le cœur, les poumons et l'intestin) et dans les sécrétions / excréments (salive, urine et contenu intestinal). Le plus grand nombre de copies de l'ARN viral a été obtenu sur la rate, avec une moyenne de 1.59×10^9 copies/100mg de tissu (sur trois échantillons). Un grand nombre de copies d'ARN a également été obtenu sur le foie et les reins, avec respectivement 4.11×10^8 et 1.90×10^8 copies/100mg (Figure 27 A).

Afin d'investiguer la distribution du virus et ses lieux de multiplication, le nombre de copies d'ARN viral dans les échantillons de tissus et de liquides ont été comparés avec la charge virale sérique. Ainsi, on observe que le virus se multiplie rapidement dans la rate, le foie, les reins et la trachée car on a retrouvé plus de copies d'ARN dans ces tissus que dans le sang. Dans les autres organes, où l'on retrouve une charge virale égale ou inférieure au sérum, on peut penser que le virus a été apporté par le sang ou des fluides tissulaires (Figure 27 B). Cela confirme l'hypothèse que le virus est transporté par des cellules circulantes (Liu et al., 2015).

Figure 27 : Représentation schématique de la moyenne du nombre de copies d'ARN viral détectées par organe en QRT-PCR.

Chez des lapins infectés (A) et comparaison de cette valeur à celle obtenue pour le sérum (B) (Liu et al., 2015).



Aucune étude n'a permis de mettre en évidence le virus et donc sa multiplication dans les cellules endothéliales malgré le tableau congestivo-hémorragique de la maladie. Ainsi, on peut penser que les lésions vasculaires sont induites indirectement par le virus. Une hypothèse prend en compte la présence de monocytes infectés adsorbés à la paroi vasculaire ou agrégés au niveau d'une brèche vasculaire. Or, les monocytes activés ont la capacité de relarguer des médiateurs de l'inflammation tels que le TNF (« Tumor Necrosis Factor ») ayant pour action d'attirer les leucocytes et d'induire leur agrégation, d'augmenter la perméabilité vasculaire mais également d'induire la formation de molécules procoagulantes qui seraient alors en partie responsables de la CIVD (Ramiro-Ibáñez et al., 1999).

6.3 Effets cytopathiques

6.3.1 Apoptose et défaut de régénération cellulaire

L'insuffisance hépatique aiguë entraînée par l'apoptose massive des hépatocytes semble être la principale lésion entraînant la mort des lapins infectés. Aussi, il a été montré que l'apoptose de ces cellules était liée à des mécanismes complexes de dérégulations de signaux cellulaires induit par le virus.

Ainsi, lors de l'infection par le RHDV, on observe une augmentation significative de l'activité de la capsase-3 dès 36 hpi. Cette enzyme entraîne le clivage et donc l'inactivité d'une autre enzyme qui permet l'initiation de la réparation de l'ADN : la PARP (Poly (ADP-ribose) Polymérase). Il y a alors accumulation de lésions de l'ADN des cellules infectées, ce qui va entraîner leur apoptose. Ce processus semble être complété par l'augmentation de l'expression du TNF dès 12 hpi. (Tumor Necrosis Factor) et de ses récepteurs (TNF-R) mis en évidence dans les foies de lapins malades (García-Lastra et al., 2010 ; Streetz et al., 2000). En effet, l'expression accrue de TNF et TNF-R a pu être corrélée avec le nombre de cellules apoptotiques et le taux de mortalité chez la souris. Il y a augmentation de l'activation de JNK (c-Jun N-terminal Kinase), connue pour l'induction de l'apoptose cellulaire en réponse à un stress environnemental entraîné par des cytokines inflammatoires telles que le TNF ((Ip, Davis, 1998).

En outre, la régénération des cellules hépatiques est essentielle lors d'hépatite aiguë pour permettre une récupération fonctionnelle du foie compatible avec la survie du patient. Celle-ci repose sur l'équilibre facteurs stimulateurs libérés dans le cadre de la réponse régénérative et substances inhibitrices. Les membres de la famille des STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) sont connus pour leur implication dans le processus de régénération et semble jouer un rôle clé dans la défense antivirale. En effet, lorsque STAT-1 est phosphorylée, il y a formation d'hétérodimères qui, transloqués dans le noyau activent la transcription de nombreux gènes cibles dont plusieurs protéines antivirales. Plusieurs autres gènes, également mis en jeu lors de l'activation de STAT-3, se sont montrés impliqués dans la protection et la régénération du foie.

Or, le blocage de la fonction des protéines STAT semble être un moyen commun à de nombreux agents pathogènes pour échapper au système immunitaire. L'un de ces

mécanismes de blocage implique un suppresseur de signalisation des cytokines (protéines SOCS), qui sont des inhibiteurs puissants de la signalisation endogène STAT. Ainsi l'observation d'une surexpression de SOCS-3 chez les lapins infectés cause très probablement une inhibition des STAT-1 et 3, d'où un défaut de défense et de régénération du foie (García-Lastra et al., 2010). De plus, les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire connaissent une augmentation significative, respectivement à 36 hpi et 12 hpi.

D'autres études ont montré une augmentation de l'expression du TGF β 1 dans les stades avancés de l'infection, le TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1) inhibant l'expression du HGF (Hepatocyte Growth Factor), un puissant mitogène hépatocytaire, ce qui vient confirmer l'hypothèse d'une inhibition de la régénération cellulaire dans la pathogénie du RHDV (Sánchez-Campos et al., 2004).

Néanmoins, cette apoptose ne se réduit pas seulement aux cellules hépatiques puisqu'une étude récente a montré que ce processus de mort cellulaire se retrouvait aussi dans les leucocytes du sang périphérique. Des analyses par cytométrie de flux ont montré un nombre de leucocytes apoptotiques en augmentation à partir de 4 à 8 hpi jusqu'à un maximum à 24-36 hpi, avec une atteinte plus prononcée des lymphocytes par rapport aux granulocytes, suggérant leur rôle plus important dans la pathogénèse du RHDV (Niedźwiedzka-Rystwej et al., 2013).

6.3.2 Autophagie

Récemment, une équipe de chercheurs espagnols a montré qu'il existait dans le foie de lapins infectés, un phénomène intimement lié et de manière complexe avec l'apoptose : la macroautophagie ou autophagie. En conditions normales, l'autophagie est essentielle pour l'homéostasie cellulaire. Elle permet l'élimination de matériel toxique pour la cellule et fournit un apport de constituants de base pour la synthèse protéique ou lipidique. C'est pour autant un processus complexe qui peut aussi dans certaines conditions participer à la mort cellulaire et est impliqué dans de nombreuses maladies (Muller, 2011).

L'autophagie fait partie de l'immunité innée via sa capacité à dégrader les pathogènes intracellulaires. Cependant, de nombreux virus, y compris le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de la dengue ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), possèdent des mécanismes évolués leur permettant d'échapper à l'autophagie et dans certains cas, parviennent à être

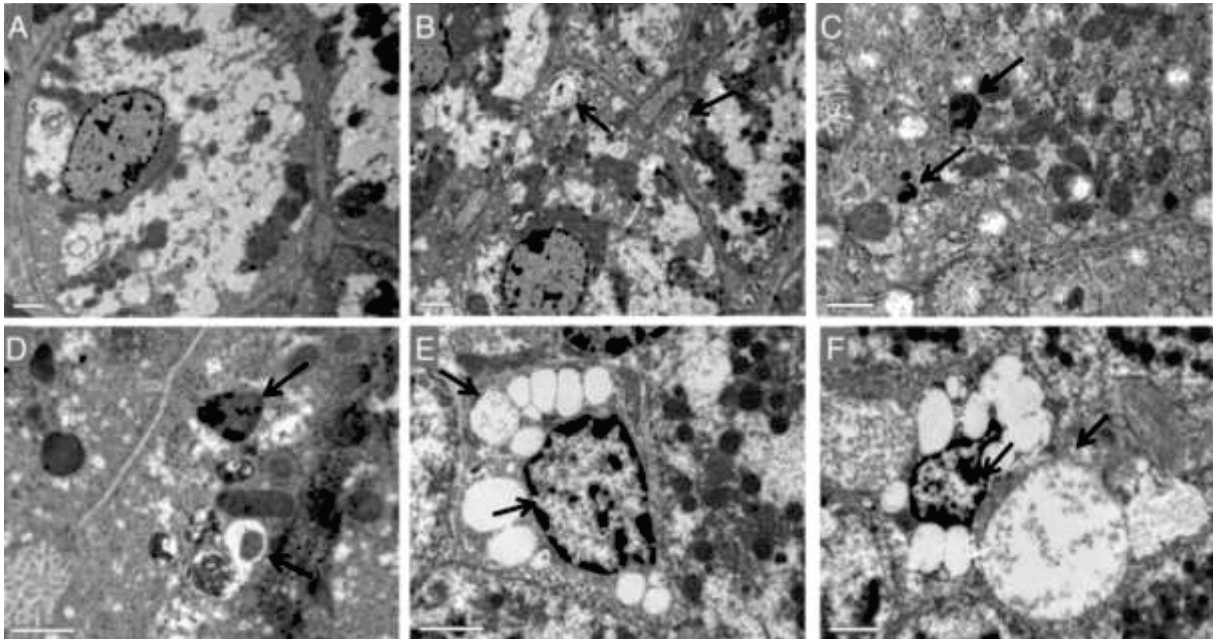
encore plus subversifs, en utilisant la réponse autophagique pour améliorer la réplication et la libération virale.

Ainsi, Vallejo et al., (2014) ont pu mettre en évidence *in vivo* que l'infection par le RHDV induit une réponse autophagique rapide, associée au développement d'un stress du réticulum endoplasmique. En effet, LC3, une protéine ubiquitin-like dont la quantité est corrélée au nombre d'autophagosomes, a été détectée dès 12 hpi dans les hépatocytes de lapins infectés, avec un retour à la valeur des témoins à 30 hpi. Cette détection a été similaire pour d'autres marqueurs d'autophagie. Aussi, il a été observé que, conjointement à cette augmentation du nombre de cellules subissant l'autophagie, il y avait une augmentation précoce du signal mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), qui en temps normal entraîne une inhibition de cette dernière (Vallejo et al., 2014). On peut alors émettre l'hypothèse de la mise en place d'un mécanisme d'échappement à la régulation de l'autophagie suite à l'infection par le RHDV, qui pourrait être utilisé pour la dissémination du virus.

L'autophagie a également été objectivée par l'observation en microscopie électronique à transmission de sections de foies de lapins infectés traitées par immunohistochimie permettant la localisation de LC3 (Figure 28). La visualisation des structures autophagiques a débuté dès 12 hpi (Figure 28B) mais on peut penser que leur mise en place fut plus précoce car aucune analyse n'a été faite plus avant. A 30 hpi, on retrouve les signes d'apoptose.

Figure 28 : Foies de lapins infectés par le RHDV vus en microscopie électronique.

A : Contrôle. B : à 12 hpi. C : à 18 hpi. D : à 24 hpi. E : à 30 hpi. F : à 36 hpi. L'apparence d'un foie normal est visualisée chez les lapins du groupe contrôle (A). Dans les premières étapes de l'infection (B à D), on observe une augmentation du nombre et de la densité des lysosomes et des mitochondries. Les flèches noires indiquent la présence d'un grand nombre de vacuoles d'autophagie. Dans les étapes plus avancées (E à F), la chromatine se condense à la périphérie de la membrane nucléaire. Le cytoplasme des hépatocytes se vacuolise (flèches noires) (Vallejo et al., 2014)



A partir de 36 hpi, alors que la multiplication du virus se poursuit (détection de la VP60 en augmentation), il y a retour à la normale des marqueurs de l'autophagie et la mise en place de l'apoptose (augmentation de l'activité de la caspase-3).

7 Immunité

7.1 Immunité à médiation humorale suite à l'infection

L'importance de l'immunité à médiation humorale a été mise en évidence lors du développement des moyens diagnostiques par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En effet, des animaux ayant survécu à la maladie se sont révélés hautement séropositifs et protégés contre la réinfection par le RHDV. Une corrélation entre le taux d'anticorps spécifiques du RHDV obtenu par cELISA (ELISA compétitif) et la protection contre la maladie a pu être établie (Zheng, Parkes, 2011), ce qui permet d'évaluer l'efficacité de la vaccination ainsi que le statut des populations face à la maladie.

Suite à une infection non létale, on observe le développement de titres élevés en IgM (puis en IgA et en IgG) dès 3 jours post infection, fournissant une réponse immunitaire humorale efficace (Abrantes et al., 2012). Ces titres en IgM atteignent un maximum au bout de deux semaines puis commencent à diminuer. Les IgA sont présents de manière plus prolongée dans le temps, mais ils finissent également par disparaître, suggérant au passage l'existence d'une réponse muqueuse. En revanche, les titres en IgG diminuent très lentement, et sont capables de persister pendant des mois. En cas de réexposition au virus, on observe une augmentation significativement supérieure des taux d'IgG et IgA. La mise en place d'une réplication limitée du virus dans la muqueuse lors de la réinfection pourrait être une explication de ces taux d'IgA et IgG augmentés et connaît un parallèle avec les virus entériques humains *Norwalk virus* pour lesquels la protection de longue durée, liée à des expositions répétées, a été prouvée cliniquement (Cooke et al., 2000).

Chez des jeunes lapins âgés de 4 semaines, l'inoculation intramusculaire du virus provoque l'apparition de titres élevés en anticorps spécifiques au 7^{ème} jour post-infection qui se maintiennent ou augmentent pendant plusieurs semaines. Une réinfection par le RHDV vers 8 semaines n'engendre aucun signe clinique chez ces lapins, et provoque une augmentation des titres en anticorps qui sont doublés voire quadruplés. Les jeunes lapins sont donc non seulement naturellement résistants à une infection par le RHDV, mais leur système immunitaire est en plus capable de reconnaître et d'engendrer une réponse spécifique contre le virus en produisant des anticorps dirigés contre lui (Ferreira et al., 2008).

On peut donc conclure que lors de l'infection, il y a la mise en place d'une immunité spécifique au RHDV, avec présence de cellules « mémoires » capables de renforcer la réponse du système immunitaire face à une réinfection.

7.2 Rôle de l'immunité passive

La présence d'anticorps d'origine maternelle (AOM) chez les jeunes lapins contribuerait à leur résistance au virus. Les lapereaux reçoivent de leur mère un pool d'IgG par transport actif dans les derniers jours de gestation, si elle-même a été en contact avec le virus. On retrouve ainsi chez les fœtus âgés un taux d'IgG semblable à celui de leur mère. Il est à noter que des IgM sont capables de passer la barrière placentaire mais n'ont jamais été mis en évidence pour le RHDV. Compte tenu du caractère plurifactoriel de la résistance des jeunes au virus (voir paragraphe 3.1.3.1 page 52), il est difficile de juger de la réelle implication dans

celle-ci des AOM mais certains auteurs s'accordent à dire qu'ils y contribuent (Abrantes et al., 2012 ; Cooke et al., 2000).

Par ailleurs, une étude a montré que le transfert de sérum issu de jeunes lapins ayant été exposés au RHDV à des lapins adultes naïfs et susceptibles au RHDV leur confère une résistance au RHDV sans développement de signes cliniques (Ferreira et al., 2008). En effet, le transfert d'immunité passive protège les animaux présentant une forme subclinique et a déjà permis de stopper des épizooties dans certaines fermes. Cependant, il s'avère inefficace chez les lapins en phase clinique (Abrantes et al., 2012). Ces constats soulignent un peu plus l'importance de l'immunité humorale dans la protection contre le RHDV.

7.3 Immunité croisée

Les différents *Lagovirus* du lapin possèdent un degré variable d'immunité croisée, allant d'une absence totale de protection croisée à une protection partielle ou complète. Ainsi, dès 1996, Capucci et al. découvraient le premier *Lagovirus* non pathogène (RCV) qui confère une très bonne protection face à la RHD. Cette découverte a fait suite à la découverte de lapins séropositifs non malade et à des mortalités anormalement basses lors d'épizooties de RHD. Il s'est avéré que le RCV présentait une antigénicité et une séquence de la protéine de capsid très proches de celles du RHD mais sans entraîner de signe clinique (Capucci et al., 1996).

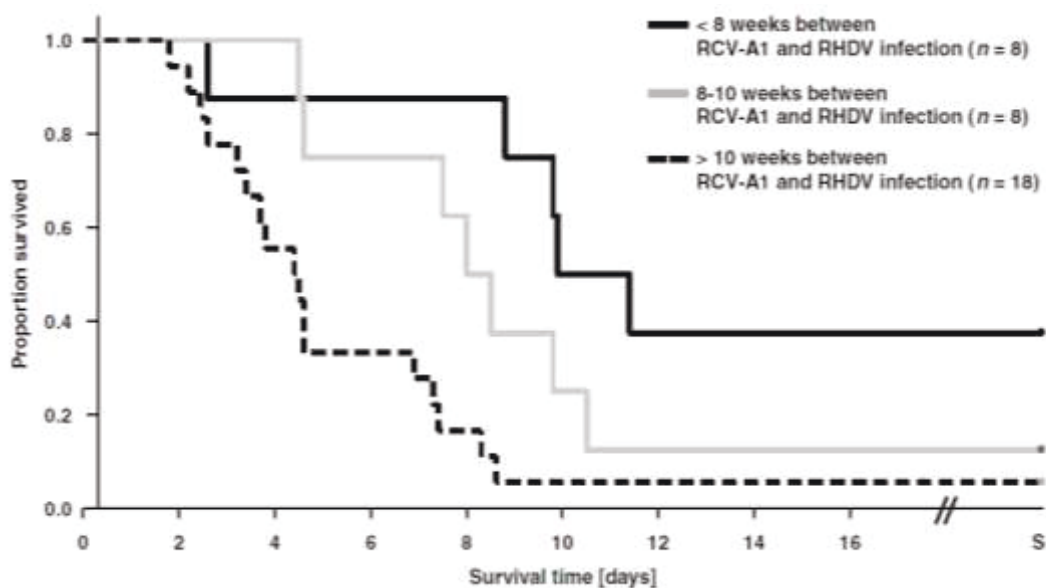
Dans les années 2000, (Nagesha et al., 2000) mirent en évidence la présence d'anticorps capables de reconnaître la VP60 exprimée par des VLP du RHDV dans le sérum de lapins prélevés en Australie, avant que le virus ne s'échappe de Wandarg Island. Onze individus sur 23 de ces mêmes lapins, soumis à une épreuve virulente avec une dose létale de RHDV ont survécu. Cela suggère que des souches non pathogènes, proches du RHDV permettent la mise en place d'une immunité humorale partiellement efficace lors d'une infection par le RHDV (Nagesha et al., 2000). Dans cet exemple, le calicivirus australien non pathogène RCV-A1 confère aux lapins exposés une protection partielle contre le RHDV classique, ce qui porta préjudice aux autorités australiennes qui comptaient sur le RHDV pour réduire la population de lapins sauvages, considérés comme nuisibles. Des études ont cependant montré que ce degré de protection dépendait du temps écoulé entre les deux infections, indépendamment du titre en anticorps spécifiques contre RCV-A1 présent dans le sérum des lapins (Figure 29). Par ailleurs, le degré de protection croisée conféré par les

souches australiennes de RCV-A1 est très variable de l'une à l'autre, des pourcentages allant de 33 à 52 % sont rapportés selon les souches et les études (Strive et al., 2013).

Plus récemment, a été découvert un nouveau *Lagovirus* appelé souche 06-11, génétiquement plus proche du RHDV que RCV-A1, mais ne conférant aucune protection contre le RHDV classique (Le Gall-Reculé et al., 2011).

Par ailleurs, il n'existe pas de protection croisée entre l'EBHSV et le RHDV. En effet l'infection de lapins par l'EBHSV entraîne une production en anticorps beaucoup plus faibles que chez les lièvres (entraînée par la stimulation elle-même et non par la multiplication virale) et ne protège pas de l'infection par le RHDV. Le constat est le même pour des lièvres mis en contact du RHDV puis de l'EBHSV (Lavazza et al., 1996).

Figure 29 : Courbe de survie lors d'une épreuve virulente de RHD, à des intervalles différents après exposition des lapins au RCV-A1 (Strive et al., 2013).



8 Diagnostic

8.1 Diagnostic clinique, épidémiologique et nécropsique

Le diagnostic clinique est basé sur la présence d'un abattement et d'une hyperthermie pouvant atteindre 42°C, associés à une tachypnée, à des signes neurologiques (coma, convulsions, ataxie, parésie postérieure) et à des signes d'hémorragie (hématurie, diarrhée hémorragique, épistaxis et hématomèse). Un ictère franc peut être observé sur des animaux qui ont survécu plus de quelques jours après l'infection.

D'un point de vue épidémiologique, une suspicion d'épizootie à RHDV sera émise lors de l'observation d'une mortalité subite chez des lapins adultes ou jeunes adultes potentiellement précédées de signes cliniques évocateurs. Les très jeunes lapins de moins de 4 semaines sont plus ou moins épargnés. Des taux de mortalité très élevés sont caractéristiques, pouvant atteindre 90-100 % chez les lapins adultes. La transmission est rapide et efficace, par le biais de contacts directs et indirects.

A l'autopsie, les signes peuvent être soit très évocateurs avec un pattern très caractéristique de la RHD (hépatite sévère, congestion massive, signes d'hémorragies, ...), soit beaucoup plus discrets. Ainsi l'observation d'un ou plusieurs des éléments suivants sur la carcasse peut être évocatrice de RHD :

- Foie de taille augmentée et d'aspect pâle et lobulaire
- Splénomégalie et coloration sombre de la rate
- Reins de couleur sombre
- Congestion et hémorragies pulmonaires, liquide spumeux dans les voies aériennes supérieures
- Ecchymoses et pétéchies sur les parois intestinale et vésicale, ainsi que dans les tissus sous-cutanés

L'examen histologique montrera une nécrose hépatocellulaire en périphérie des lobules, des signes de coagulation intra-vasculaire disséminée avec la présence de thrombi dans les vaisseaux sanguins pulmonaires et rénaux, des lésions de néphrose, et une déplétion lymphocytaire de la rate. Les animaux atteints d'une forme chronique ou subaiguë peuvent montrer des signes de régénération hépatique (Kerr, Donnelly, 2013).

8.2 Diagnostic expérimental

Le RHDV n'étant pas cultivable *in vitro* actuellement, le diagnostic de laboratoire ne se base jamais sur la multiplication du virus. Le foie est l'organe contenant le plus de particules virales lors de RHD, il s'agit donc de l'organe de choix pour l'identification à la fois du RHDV et de l'EBHSV.

8.2.1 Détection de l'agent pathogène

8.2.1.1 Microscopie électronique

Cette méthode est surtout utilisée à des fins expérimentales et permet d'identifier morphologiquement les particules virales au sein de divers tissus. Cependant, elle ne permet pas de faire la différence entre deux calicivirus de genres différents.

8.2.1.2 Immunohistochimie

Il s'agit d'une méthode basée sur la détection des antigènes viraux au sein de tissus ou de cellules. On parle aussi d'immunomarquage ou immunocoloration selon le réactif utilisé pour le marquage. Les coupes de tissus (foie, rate, rein, etc.) doivent être préalablement fixées, lavées puis perméabilisées. Elles sont disposées sur des lames et vont ensuite être incubées avec du sérum anti-RHDV spécifique ou des anticorps monoclonaux (Mabs) biotinylés. La révélation se fait par exemple par incubation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

On observe alors une coloration intense du noyau et plus diffuse du cytoplasme des hépatocytes nécrotiques, principalement localisée en région périportale. Une coloration est aussi observée au niveau des cellules de Kuppfer, ainsi qu'au niveau des macrophages alvéolaires, spléniques et au sein des nœuds lymphatiques (Cloet, 2012).

8.2.1.3 Hémagglutination

Il s'agit de l'un des premiers tests diagnostiques de laboratoire utilisés en routine pour le RHDV. Il est basé sur la particularité du RHDV à pouvoir hémagglutiner les érythrocytes humains du groupe O en particulier. Ce test est cependant moins sensible que la RT-PCR et il n'est plus pratiqué de nos jours.

8.2.1.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

La détection du virus par ELISA est basée sur une méthode dite « sandwich » pour laquelle de nombreuses variations existent. Elle consiste en la mise en évidence de la reconnaissance de particules virales, issues de l'échantillon, par des Mabs grâce à une réaction colorimétrique. L'utilisation complémentaire de Mabs différents permet la reconnaissance d'épitopes spécifiques à certaines souches de RHDV ou d'EBHSV et donc un début d'identification (Lavazza, Capucci, 2009).

8.2.1.5 RT-PCR

Il s'agit de l'outil diagnostique le plus utilisé de nos jours pour le RHDV et l'EBHSV. L'ARN viral peut être détecté dans la plupart des tissus y compris le sang, mais les plus grandes concentrations en ARN viral sont retrouvées dans le foie. De faibles taux d'ARN viral sont cependant retrouvés chez les animaux qui survivent à une infection, sur des périodes prolongées, et selon la spécificité du test utilisé, des RHDV non pathogènes peuvent être à l'origine de réactions croisées. L'interprétation d'un résultat de RT-PCR appelle donc à une certaine prudence si la recherche d'agent étiologique est menée en l'absence d'atteinte hépatique (Kerr, Donnelly, 2013). Cette méthode peut être combinée à des outils de quantification en temps réel afin d'obtenir un diagnostic rapide. On compte aujourd'hui pour la détection du RHDV des tests utilisant les méthodes TaqMan® (basée sur l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq polymérase qui clive une sonde marquée lors de son hybridation à la séquence complémentaire permettant l'émission d'une fluorescence (Duarte et al., 2015)) ou issues du SYBR green (marquage des acides nucléiques par fluorescence (Liu et al., 2015)) qui permettent d'obtenir une spécificité proche des 100% et une sensibilité analytique respectivement de 10 et 6.09 copies par puits.

8.2.2 Sérologie

Les jeunes lapins infectés et les adultes ayant survécu à une infection développent des titres importants en anticorps anti-RHDV ou anti-EBHSV dirigés contre la protéine de capsid. Plusieurs types de tests ELISA sont disponibles mais ils ne possèdent pas tous la même spécificité :

- Le test C-ELISA (« Competitive-ELISA ») est le plus spécifique.
- Le test I-ELISA (« Indirect-ELISA ») est plus sensible que le C-ELISA.
- Le test Sandwich ELISA permet de détecter les IgG et les IgM, il est particulièrement intéressant dans les cas chroniques où la détection du virus peut s'avérer difficile. Il sera considéré comme positif si des titres élevés en IgM spécifiques du RHDV associé à des titres bas ou quasi-nuls d'IgG sont retrouvés.

Des tests d'inhibition de l'hémagglutination ont été pratiqués, mais ils ont de nos jours été largement remplacés par les tests ELISA, plus spécifiques et plus simples d'utilisation lorsque les analyses portent sur de nombreux animaux (Kerr, Donnelly, 2013 ; Lavazza, Capucci, 2009).

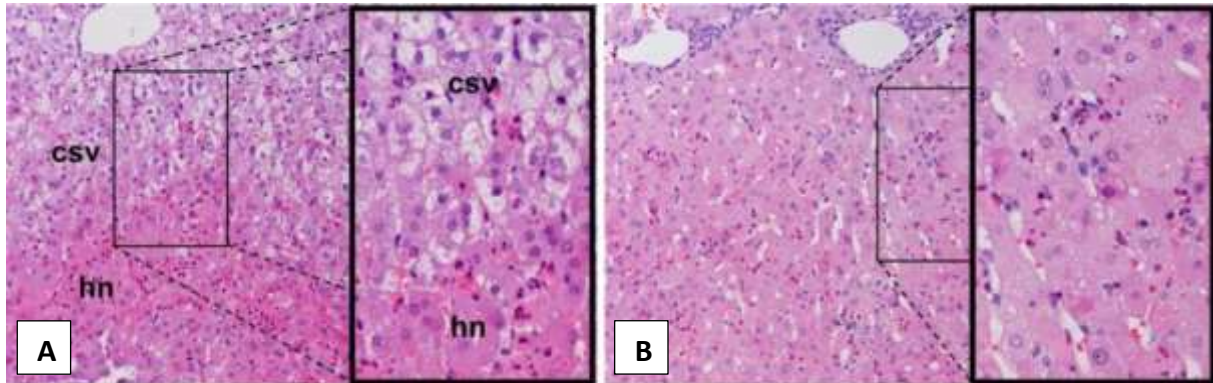
9 Démarche thérapeutique

A ce jour, il n'existe aucun traitement spécifique contre la RHD ou l'EBHS, mais une prise en charge symptomatique peut être proposée. Cependant, la plupart du temps, la mort survient très rapidement et sans signes préalables, ne laissant pas la possibilité aux vétérinaires d'instaurer un traitement. Néanmoins, des études récentes rapportent l'efficacité de quelques molécules dans la mise en place d'un traitement de support dans le cadre de la prise en charge précoce de la RHD.

Certaines molécules visent à diminuer les effets du virus sur les organes cibles et notamment le foie. Ainsi, en 2011, l'utilisation de la cardiotrophine-1 (CT-1), une cytokine de la famille des interleukines 6 dotée d'une action cytoprotectrice puissante a montré son efficacité. En effet, suite à une infection expérimentale par injection sous cutanée, le groupe de lapins traités (n=12) avec 100 µg/kg de CT-1 dès 12 hpi a connu un taux de survie de 67% contre 0% dans le groupe témoin (n=12) traité avec une solution saline. De plus, les auteurs ont pu mettre en évidence dans les foies des lapins traités, une diminution du stress oxydatif, une diminution de l'activation des PARP1/2 et des JNK ainsi qu'une réaction inflammatoire moindre (voir chapitre 6.3.1 page 76). Une nette diminution du gonflement et de la vacuolisation cellulaire (csv) ainsi que de la nécrose hépatique (hn) a été noté chez le groupe traité (Figure 30) (Tunon et al., 2011).

Figure 30 : Efficacité de la Cardiotrophine-1 sur les lésions histologiques lors de RHD.

Coupes histologiques de foies de lapins infectés par le RHDV traités avec une solution saline (A) ou avec 100µg/kg tous les 6 heures dès 12 hpi (B). Coloration hématoxyline – éosine à 30 hpi.(Tunon et al., 2011)



Par la suite, c'est l'action bénéfique de la mélatonine sur l'inflammation et la régénération hépatique qui a été montrée lors d'une étude prenant la RHD comme modèle de l'hépatite fulminante humaine (Laliena et al., 2012). Une seconde étude a montré la capacité de la mélatonine à réduire la réponse autophagique des cellules hépatiques en modulant la mise en place de nombreux signaux cellulaires (San-Miguel et al., 2014).

Par ailleurs, une thérapie d'un nouveau genre et qui a le vent en poupe ces dernières années a été testée avec succès pour la RHD. Il s'agit de l'injection aux lapins d'IgY anti-VP60 polyclonaux produits à partir d'œufs de poules immunisées contre le RHDV. Le principe consiste à faire produire à des poules des IgY capables de neutraliser le RHDV en les immunisant contre la région N-terminale de la VP60 (VP60-N) par l'injection intramusculaire de cette protéine recombinante obtenue à partir d'une souche d'*E.coli* transfectée. Il a été montré que l'injection quotidienne pendant cinq jours de 10 mg/kg de ces IgY en pré – traitement ou post – traitement permettait d'obtenir un taux de survie de 100 % des lapins (n=10) alors qu'il était de 0% pour le groupe témoin (n=10). Ces données suggèrent que la technique d'immunité passive basée sur les IgY anti – VP60 – N est efficace en prévention et en traitement de la RHD. Cependant, connaissant l'immunogénicité des IgY, leur efficacité pourrait être rapidement diminuée par l'action d'anticorps neutralisants (Li et al., 2014).

10 Prophylaxie

10.1 Vaccination

La principale action de prophylaxie médicale est la vaccination. Elle a pour but de stimuler le système immunitaire d'un individu afin de l'immuniser de façon durable et spécifique contre l'agent pathogène.

10.1.1 Disponibilité des vaccins

RHDV : Aujourd'hui, en France, 6 des 7 vaccins disponibles permettant une protection contre le RHDV sont constitués de virus inactivés. Compte-tenu de l'impossibilité de mettre en culture le virus *in vitro*, ces vaccins requièrent une étape de multiplication *in vivo* qui, à l'heure actuelle pose plusieurs problèmes. La première problématique repose sur la dimension éthique de l'infection expérimentale de lapins, conduisant à leur mort et dont les foies seront récupérés pour en extraire le virus. Celui-ci est ensuite inactivé par l'action de composés chimiques qui lui font perdre sa capacité à se multiplier tout en conservant son pouvoir immunogène.

D'autre part, la manipulation de particules hautement infectieuses requiert d'importantes mesures de sécurité pour éviter leur propagation dans l'environnement (Abrantes et al., 2012 ; Largeau, 2015). C'est pourquoi, de nombreuses études se sont penchées sur la mise en place de vaccins recombinants, en utilisant le haut pouvoir immunogène de la VP60 du RHDV.

Ainsi, le premier vaccin recombinant à avoir été commercialisé fut le vaccin bivalent Nobivac®Myxo-RHD, qui en intégrant le gène codant pour la VP60 du RHDV dans le génome d'un virus myxomateux vivant modifié procure une protection efficace et durable contre ces deux agents pathogènes (Spibey et al., 2012).

EBHS : Il n'existe pas de vaccin commercial pour la protection des lièvres contre l'EBHS. Cependant, lors d'une étude récente, réalisée lors d'une épizootie en Allemagne en 2011, la vaccination d'une colonie de lièvres élevés en captivité a permis d'obtenir de bons résultats. Le vaccin a été préparé avec du virus inactivé obtenu à partir d'organes (foie et rate) de lièvres contaminés. Les titres en anticorps relevés un mois après injection sous cutanée de la préparation vaccinale, permettent une protection efficace contre l'infection (compris entre

1:10 et 1:640, avec une majorité de lièvres ayant des titres de 1 :80). Ainsi, les auteurs prévoient la mise en place de la vaccination des lièvres d'élevage vers deux mois d'âge, période où ils deviennent réceptifs au virus et où ils perdent leur immunité passive (Drews et al., 2011).

10.1.2 Etudes précédentes et perspectives d'avenir

De nombreux essais ont été réalisés pour produire la VP60 sans avoir à multiplier le virus dans sa forme globale. Plusieurs types de cellules telles que des souches d'*Escherichia coli*, des cellules d'insectes, des levures, plantes, dont le génome a été modifié ont été utilisées dans ce but. Certains organismes entiers, comme des larves d'insectes ont également montré de bons résultats pour la production d'une quantité important de VP60 entraînant une immunité efficace (Abrantes et al., 2012 ; Pérez-Filgueira et al., 2007). Cependant, les coûts nécessaires à la production de tels vaccins étant prohibitifs, ils demeurent expérimentaux.

Dans les pays affectés de manière enzootique, les lapins de la faune sauvage jouent un rôle important dans la pérennité du virus. Malheureusement, les campagnes de vaccination de la faune sauvage sont économiquement et logistiquement difficiles à mettre en place. En effet, l'inoculation par voie sous-cutanée implique de capturer chaque animal et de lui infliger une contention qui engendrerait un stress considérable pouvant augmenter le taux de mortalité. Par ailleurs, quel que soit le vaccin utilisé, l'immunité conférée ne dure qu'environ un an, ce qui impliquerait de recommencer la campagne tous les ans. De ce fait, des approches alternatives ont été explorées, telles que la création de vaccins ayant la capacité de se transmettre horizontalement ou de vaccins à administration orale ou intra-nasale (Abrantes et al., 2012).

En ce qui concerne la vaccination par voie orale, une étude récente a par exemple montré l'efficacité d'un vaccin vectorisé par une souche atténuée de *Salmonella typhimurium* transformée et capable d'exprimer la protéine de capsid VP60. Cette bactérie recombinante a ainsi été administrée par voie orale à un lot de six lapins, chez lesquels la présence de la protéine VP60 a été mise en évidence par RT-PCR, attestant de la délivrance et de la transcription effective de cet ADN viral. Cependant, la protection s'est avérée peu efficace puisque un tiers des lapins vaccinés sont morts lors de l'épreuve virulente, alors que la protection du lot témoin (vacciné avec un vaccin inactivé classique) a été totale (Qiu et al., 2013).

Compte tenu des difficultés rencontrées dans la production de nouveaux types de vaccins efficaces et à des couts compatibles avec la commercialisation, aucun essai de ce type n'a abouti à une forme commerciale.

10.1.3 Protocoles : primovaccination et rappels

Malgré l'existence de deux types de vaccins sur le marché (le vaccin bivalent recombinant et les vaccins inactivés adjuvés), les protocoles vaccinaux sont globalement identiques. La primovaccination se fait à l'âge de 2-3 mois, par une injection sous cutanée en général (des variations sont possibles en fonction des recommandations du fabricant). Les rappels sont annuels. L'OIE (Office International des Epizooties) recommande de procéder à des rappels tous les 6 mois en élevage pour les animaux reproducteurs, indépendamment de leur âge et de l'existence d'épizooties précédentes.

Etant donné la courte durée de vie des lapins d'engraissement (80 jours environ) et leur résistance naturelle à la maladie jusqu'à 35-40 jours d'âge, il n'est pas nécessaire de les vacciner si l'élevage ou les élevages voisins n'ont jamais connu d'épizootie de RHD et si les mesures sanitaires de biosécurité sont correctement appliquées. En revanche, après une épizootie de RHD, même si les mesures sanitaires ont été adoptées (voir 10.2.3 page 92), il convient de vacciner les animaux de boucherie à l'âge de 40 jours car il existe un risque accru de résurgence de l'infection. La vaccination des lapins à l'engraissement peut être stoppée seulement plusieurs cycles de reproduction suivant les dernières manifestations de la maladie.

La constitution de groupes de lapins « sentinelles » (non vaccinés) permet de mettre en évidence la persistance ou non de la circulation du virus dans l'élevage (Lavazza, Capucci, 2010).

10.1.4 Immunité post-vaccinale

Suite à l'utilisation d'un vaccin inactivé adjuvé, il y a apparition des premiers anticorps après 7 à 10 jours, qui sont représentés par des IgM uniquement. Les IgG apparaissent environ 15 à 20 jours après l'injection vaccinale. On observe donc une bonne immunité systémique mais contrairement à ce que l'on observe lors d'une infection naturelle, peu ou pas d'IgA sont produites après la vaccination, ce qui ne permet pas de conférer une immunité muqueuse immédiate. Or, comme la muqueuse intestinale est la principale porte d'entrée du virus, le vaccin ne protège pas contre l'infection, mais il est très efficace au niveau systémique pour empêcher la survenue des signes cliniques. Cette distinction permettrait d'utiliser les IgA comme marqueurs d'une éventuelle infection naturelle dans les élevages de lapins vaccinés. Cependant, même en

l'absence d'IgA, le système immunitaire muqueux entre en jeu dans la protection conférée par les vaccins injectables contre la maladie. Ainsi, lors d'une épreuve virulente orale chez des lapins vaccinés, on observe une apparition très rapide des IgA mais pas d'IgM, ce qui suggère que des lymphocytes B mémoire, capables de produire ces IgA sont déjà présents au niveau muqueux. L'immunité conférée par ce type de vaccin est longue et dure environ 15 mois, avec des titres en anticorps décroissants au fil du temps mais restant au-dessus de la limite de protection placée à des titres de 1:10 par la méthode ELISA compétition (Lavazza, Capucci, 2010).

La vaccination avec le vaccin bivalent recombinant entraîne une réponse immunitaire efficace environ 3 semaines post-vaccination, avec des taux d'anticorps observés entre 1/256 et 1/4096 lors de l'étude de (Spibey et al., 2012). Aussi, lors de l'épreuve virulente, la totalité des lapins vaccinés (n=11) n'ont pas présenté de symptômes liés à la maladie alors que le lot témoin (n=5) est mort dans les 3 jours. Par ailleurs, l'absence ou le très faible taux d'antigènes de RHDV retrouvé en post-infection dans le foie des lapins vaccinés à la fin de l'étude révélait une réponse immunitaire robuste capable soit de prévenir toute réplication virale significative soit de neutraliser rapidement l'agent pathogène. Des résultats non publiés indiquaient que la durée de protection conférée par le vaccin était supérieure à 12 mois (Meredith, 2012 ; Spibey et al., 2012).

10.2 Prophylaxie sanitaire et conduite à tenir en cas d'épizootie

10.2.1 Notion d'élevage indemne

D'après la définition de l'OIE, un établissement est considéré comme indemne de RHD s'il peut prouver, par des tests sérologiques que la maladie n'y a pas été présente depuis plus de 1 an et qu'aucune vaccination n'y a été pratiquée dans les 12 derniers mois. Un élevage précédemment infecté peut être considéré comme indemne après un délai de 6 mois après le dernier cas éliminé si une politique d'abattage sanitaire a été adoptée et les carcasses ont été éliminées par incinération. De plus, l'élevage doit avoir été soigneusement désinfecté et observer un vide sanitaire d'au moins six semaines et être correctement clôturé pour empêcher l'entrée de lagomorphes sauvages (OIE - World Organisation for Animal Health, 2015).

10.2.2 Prévention de l'introduction

Dans les zones non infectées, la prévention de l'introduction de la maladie est primordiale. Des restrictions doivent être mises en place sur l'importation de lapins, de viande et de fourrure depuis les zones endémiques.

En effet, de tels lapins doivent être séronégatifs pour le RHDV (donc non vaccinés, les anticorps vaccinaux ne pouvant être différenciés des anticorps produits suite à une infection) et subir une période de quarantaine de deux semaines environ. Des lapins sentinelles peuvent être utilisés. Il ne faut évidemment pas introduire de lapin dont l'origine n'est pas connue.

Il convient d'éviter les contacts avec les lapins ou lièvres de la faune sauvage, ou avec des lapins non issus d'élevages.

Il est également conseillé de proscrire les fourrages verts provenant de zones où la présence de lapins sauvages est signalée.

Enfin, il est essentiel d'appliquer les règles générales d'hygiène telles que l'utilisation de vêtements et surbottes spécifiques jetables ou réservés à l'élevage, le respect des sas sanitaires, l'hygiène stricte du bâtiment, du matériel et des personnes, la lutte contre les vecteurs animaux, etc.(Lavazza, Capucci, 2010).

10.2.3 Limitation de la propagation en cas d'épizootie

Si une épizootie survient, la mise en quarantaine est nécessaire. Le RHDV pouvant être transmis par des objets inertes, des insectes, des oiseaux, ou des petits mammifères, l'éradication doit comprendre une dépopulation, une désinfection, une surveillance et une mise en quarantaine. Les lapins malades ou suspects doivent être euthanasiés, et leurs carcasses isolées. Pour le nettoyage et la désinfection des locaux, il convient d'utiliser des produits efficaces contre les virus non enveloppés, tels que le l'hydroxyde de sodium à 2 %. Rappelons qu'en l'absence de désinfection efficace, le RHDV peut persister 105 jours à température ambiante.

Des lapins sentinelles peuvent être utilisés pour attester de la persistance du virus au sein d'un élevage ayant été infecté.

Dans les régions où le RHDV circule dans la faune sauvage, l'éradication n'est pas envisageable. De ce fait, des mesures de biosécurité comprenant des barrières sanitaires et une désinfection régulière sont nécessaires au contrôle de la maladie, ainsi que le maintien d'un élevage clos et la réalisation d'une vaccination régulière.

La vaccination peut être restreinte aux animaux reproducteurs si le RHDV n'a jamais atteint l'élevage, mais tous les animaux doivent être vaccinés si une épizootie a eu lieu. Même face à l'application de mesures sanitaires strictes, le risque de réinfection est important du fait de la

persistance du virus dans l'environnement. Il convient également de vacciner tous les lapins des élevages voisins (Lavazza, Capucci, 2010 ; Ohlinger et al., 1993 ; Maurice, 2015).

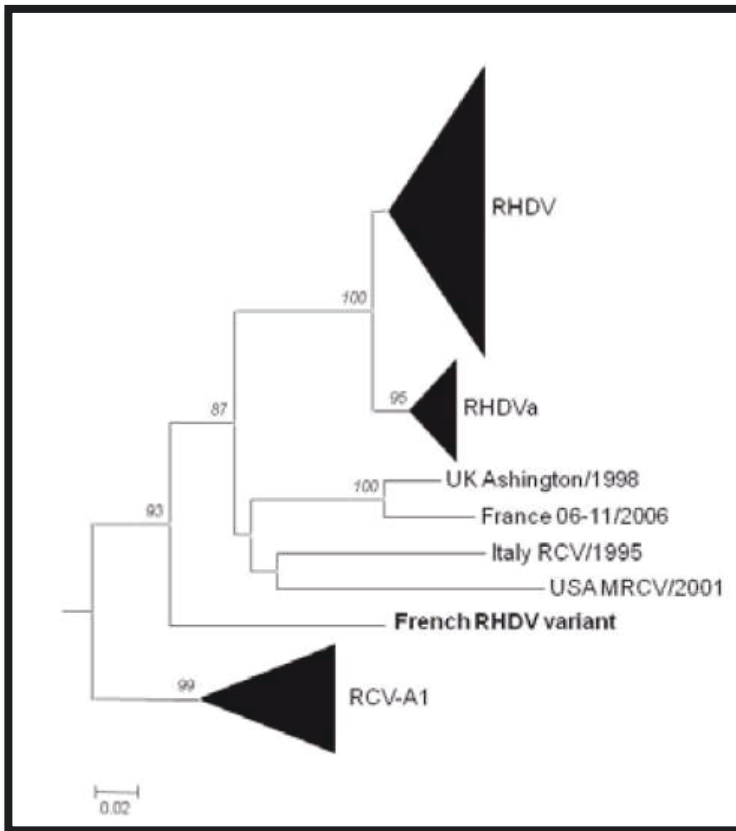
Partie 3 : Emergence et Evolution des *Lagovirus*

1 Contexte

Le RHDV a été identifié pour la première fois en 1984, comme un agent extrêmement contagieux entraînant une maladie aiguë et mortelle chez les lapins. La maladie s'est ensuite rapidement propagée au niveau mondial. Depuis, les chercheurs ont montré que le genre *Lagovirus* comprenait à la fois des virus pathogènes (RHDV et EBHSV) et des virus non pathogènes (RCVs). Ces virus sont proches mais il existe une divergence génétique entre eux. Les analyses phylogénétiques de souches pathogènes de RHDV montrent l'existence de 3 groupes distincts (Figure 31) :

- Le RHDV « classique », qui comprend les génogroupes G1 à G5 isolés à partir de 1984 en Chine, décrit depuis dans plus de 40 pays des 5 continents et qui est considéré comme endémique dans les régions du monde où les lapins européens (*O. cuniculus*) sont présents.
- Le variant antigénique RHDVa/G6 identifié en 1996 en Europe et actuellement présent sur les autres continents.
- Le RHDV2 identifié en 2010 (détaillé dans la suite de ce travail).

Figure 31 : Arbre phylogénétique construit suite à la caractérisation du RHDV2. (Le Gall-Recule et al., 2011)



Arbre phylogénétique utilisant la méthode de l'évolution minimale, à partir de séquences nucléotidiques partielles de la VP60 (nucléotides 1188 à 1541) de 93 RHDV et 32 RHDVa (pathogènes), des souches Ashington, MRCV (peu pathogènes) et les souches 06-11 et 36 RCV-A1 (non pathogènes). Les valeurs de bootstrap supérieures à 75 % (pour 1000 répliques) sont données en italique devant chaque nœud. La souche EBHSV-GD a été utilisée comme souche externe pour enraciner l'arbre. Les branches RHDV, RHDVa and RCV-A1 ont été regroupées pour mettre en évidence les génogroupes.

Ainsi, le virus de la RHD a connu de nombreuses séquences évolutives au fil des années, sans que l'on connaisse avec précision les mécanismes d'émergence et d'évolution de celui-ci. La suite de ce travail est donc dédiée à une étude bibliographique visant à mettre en regards les différentes hypothèses évoquées dans les publications scientifiques, et en faire ressortir les plus plausibles.

2 Le modèle évolutif des *Lagovirus* australiens.

Le RHDV a été introduit volontairement par l'homme en Australie comme agent biologique de contrôle des populations de lapins européens (*Oryctolagus cuniculus*) considérés comme nuisibles sur ce territoire en 1995.

C'est en 1859 que *O. cuniculus* est introduit en Australie avec succès. Au début des années 1900, après de nombreux lâchés, la population de lapins est envahissante et franchit toutes les frontières, à une vitesse d'environ 70 kilomètres par an. Le lapin est alors considéré

comme l'espèce de mammifères colonisatrice la plus rapide au monde. Les espèces animales indigènes, en fournissant des habitats et des systèmes de terriers existants ont facilité cette progression rapide mais ont dans le même temps connu une très forte concurrence pour la nourriture et le logement, ce qui a conduit à une diminution considérable de leurs effectifs.

L'introduction du lapin a donc irrévocablement changé le paysage australien. De nombreuses études montrent que cette espèce envahissante affecte de façon significative la faune et la flore indigènes, ainsi que les productions agricoles (Cooke, 2013 ; Gong, Invasive Animals Cooperative Research Centre, 2009). Dans ce contexte, de nombreux moyens ont été mis en œuvre pour endiguer la progression du nombre de lapins, dont la libération d'agents de lutte biologique : le virus de la myxomatose (MYXV) avec deux espèces de puces pour facilitant sa dissémination (*Spilopsyllus cuniculi* et *Xenopsylla cunicularis*) et le RHDV.

Une seule souche de RHDV (CAPM V-351) a été importée en Australie en 1990 et gardée en quarantaine pour des essais de lutte biologique. Cette souche a permis la « fabrication » de la souche RHDV351-INOC, qui sera par la suite utilisée comme arme contre les lapins. Ce virus, échappé en 1995 des essais de terrain réalisés sur Wardang island a été autorisé à l'introduction volontaire sur le territoire par l'autorité australienne des pesticides et médicaments vétérinaires en 1996. Depuis, le RHDV est devenu endémique dans de nombreuses populations de lapins et on observe régulièrement des épizooties naturelles de RHD, ce qui permet de maintenir un nombre de lapins bas dans les régions arides et semi-arides d'Australie (Mutze et al., 2010). Le virus a cependant un impact beaucoup plus modéré dans les régions pluvieuses et côtières du sud-est (Henzell et al., 2002), ce qui laisse donc à penser qu'il existe une interaction entre le virus, l'hôte et le climat.

Aussi, la plupart des études sur l'émergence des virus manquent de connaissances détaillées sur les souches originelles et sur la temporalité des événements. L'introduction du virus par l'Homme, à partir de souches bien identifiées et sur un territoire limité par les eaux, est donc une opportunité unique de pouvoir étudier son évolution et les mécanismes d'émergence de nouvelles souches.

2.1 Influence territoriale

Lors des différentes introductions du RHDV sur le territoire australien, des différences de survie et de propagation de celui-ci ont clairement été notées. Le virus semble plus adapté

aux régions arides, alors qu'il se maintient beaucoup plus difficilement dans un environnement humide. Par exemple, à Cattai, en Nouvelle-Galles du Sud (région côtière du sud-est), il a été libéré à plusieurs reprises dans les populations de lapins mais s'est propagé seulement sur quelques centaines de mètres avant la fin de l'épizootie (Richardson et al., 2007).

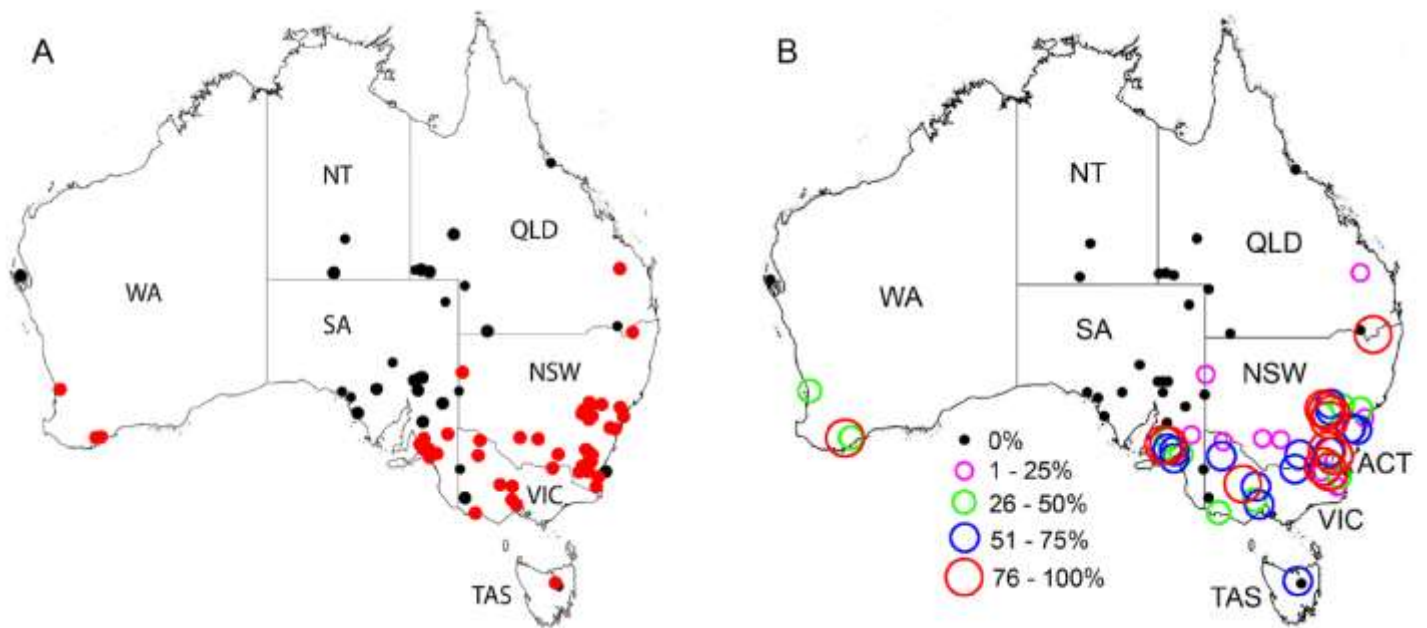
Aussi, l'étude d'échantillons de sérum de lapins prélevés avant 1995 sur Wardang island a révélé la présence d'anticorps dirigés contre la VP60 pour 196 échantillons sur 392, alors qu'aucun signe clinique de RHD n'était présent. Par la suite, 23 lapins issus de zones indemne de RHD mais présentant des anticorps anti-VP60 ont subi une épreuve virulente avec une dose létale de RHDV ; 11 lapins survécurent. Cette présence d'anticorps protecteurs contre le RHDV chez certains lapins suggéra alors qu'ils avaient été exposés à un *Calicivirus* non virulent, déjà présent sur leur territoire et proche du RHDV (Nagesha et al., 2000). C'est en 2009 que (Strive et al., 2009) découvrent un nouveau *Lagovirus* dans le tissu intestinal de trois lapereaux apparemment sains, ils le nomment RCV-A1 (Rabbit Calicivirus Australie 1). Rapidement, l'étude de ce virus fraîchement découvert a montré qu'il pouvait être considéré comme endémique en Australie et qu'il procurait une protection croisée contre le RHDV (Strive et al., 2013).

Lors de leur enquête sérologique parue en 2002, (Cooke et al., 2002) avaient mis en évidence que de hauts titres en anticorps anti-RHDV étaient plus fréquemment retrouvés chez les lapins issus de régions humides, sans pour autant avoir identifié le virus provoquant cette réaction immunitaire chez les lapins. Rétrospectivement, on peut penser qu'il s'agissait du RCV-A1. La compilation de ces données expliquerait la baisse du taux de mortalité lorsque les épizooties de RHDV se déplacent vers les régions humides.

Enfin, lors de l'étude des données collectées sur 78 sites géographiques, les anticorps anti-RCV-A1 ont été principalement détectés dans les populations de lapins vivant dans les zones fraîches et à fortes précipitations du sud-est et sud-ouest du continent australien (Figure 32). A partir de ces observations, une modélisation de la prévalence du RCV-A1 en fonction de la moyenne des précipitations annuelles et de la température minimale a été proposée. Celle-ci montre que la distribution et la prévalence du RCV-A1 est fortement corrélée positivement avec des périodes de précipitations supérieures à la moyenne et négativement avec les périodes de sécheresse (Figure 33) (Liu et al., 2014). On peut donc conclure que la propagation

du RHDV est indirectement liée aux conditions climatiques, par l'intermédiaire de la protection croisée induite par l'infection des lapins par le RCV-A1.

Figure 32 : Distribution et prévalence du RCV-A1 dans les populations de lapins sauvages en Australie.

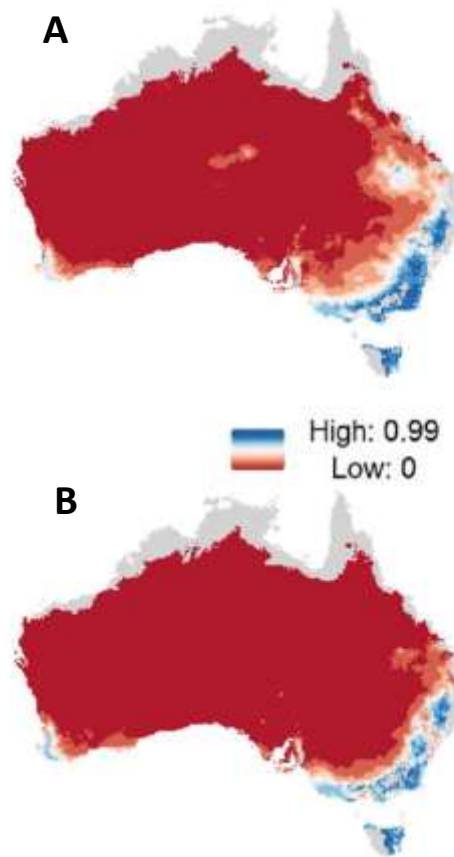


Carte A : présence (points rouges) et absence (points noirs) de RCV-A1 sur les différents sites de prélèvements. Les points noirs de plus petit diamètre indiquent que l'échantillon est inférieur à 20 lapins.

Carte B : Prévalence du RCV-A1 sur les 78 sites de prélèvements. Les points noirs indiquent une prévalence égale à 0% sur les échantillons testés. Les cercles de diamètre et couleurs variés indiquent les différentes prévalences sur chaque site. Abréviations : WA: Western Australia, NT: Northern Territory, SA: South Australia, QLD: Queensland, NSW: New South Wales, ACT: Australian Capital Territory, VIC: Victoria, TAS: Tasmania.

(Liu et al., 2014)

Figure 33 : Estimation de la prévalence du RCV-A1 en Australie associée à des périodes humides et sèches (Liu et al., 2014)



Carte A : prévalence du RCV-A1 lorsque les précipitations sont supérieures à la moyenne de 2010 à 2012 (période humide).

Carte B : prévalence du RCV-A1 lorsque les précipitations sont inférieures à la moyenne de 2002 à 2004 (période sèche).

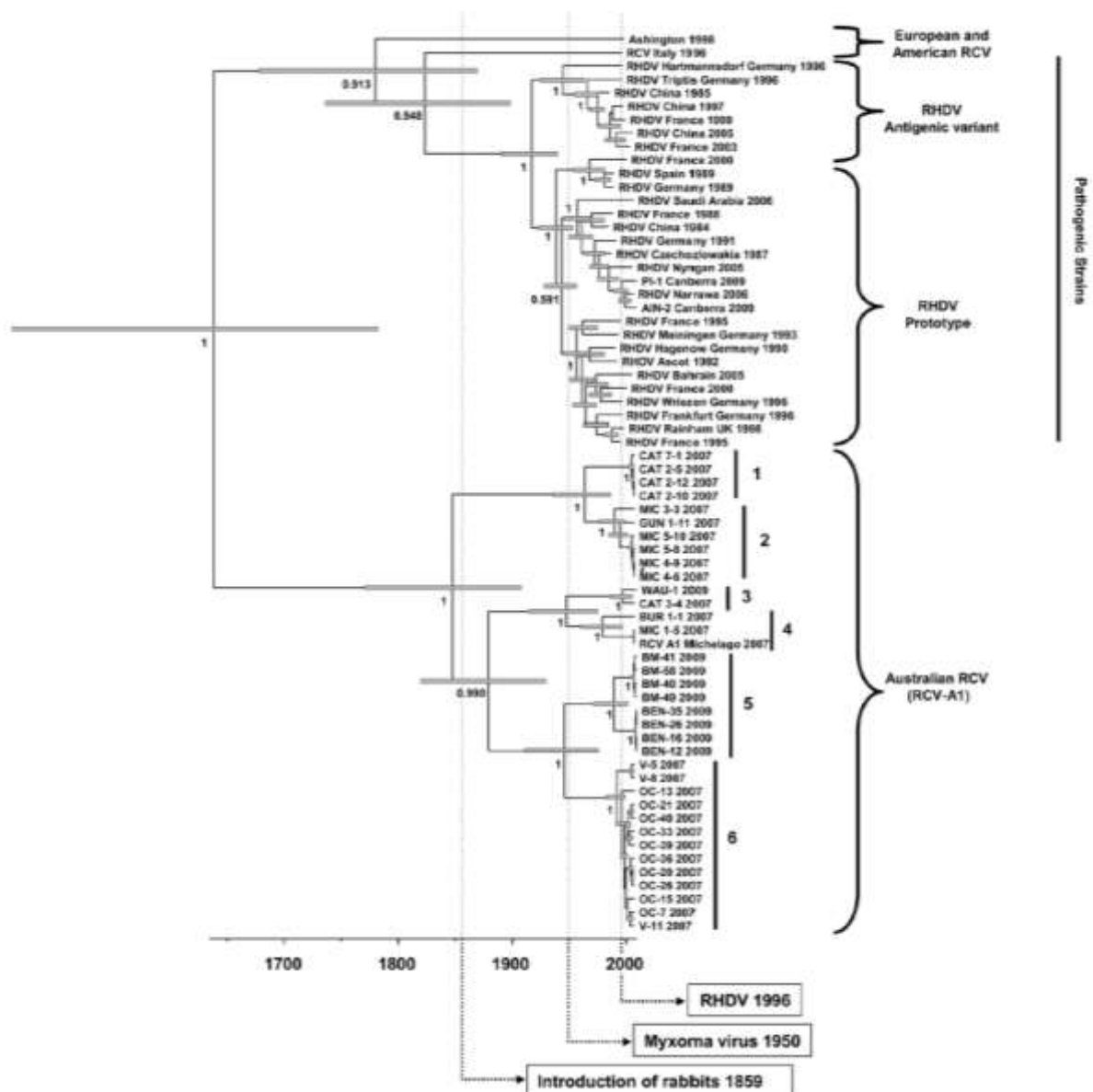
Les zones en gris sont celles où les prévisions n'ont pas pu être réalisées. (Liu et al., 2014)

2.2 Données sur l'évolution du RCV-A1

Malgré son importance potentielle dans la lutte contre les lapins et ses conséquences sur l'évolution du RHDV pathogène, peu de données concernant l'évolution propre au RCV-A1 sont connues avant 2010. Dans leur étude, (Jahnke et al., 2010), font un lien évident entre les événements démographiques connus dans l'histoire des lapins australiens et le pattern épidémiologique et évolutif du RCV-A1. Ainsi, d'un point de vue temporel, l'apparition du RCV-A1 sur le territoire australien coïncide clairement avec l'introduction du lapin il y a 150 ans environ. Dans les 20 années suivantes, on observe une diversification d'origine géographique du RCV-A1, en lien avec la propagation initiale très rapide des lapins dans le sud de l'Australie.

A la lecture de l'arbre phylogénétique proposé par (Jahnke et al., 2010) (Figure 34), deux évènements démographiques majeurs pourraient avoir eu un impact significatif sur la structure génétique du RCV-A1 : les introductions successives des virus de la myxomatose et du RHDV. On estime que ces virus auraient réduit la population de lapins de 95 % dans certaines zones, ce qui a créé un goulot d'étranglement dans les populations de RCV-A1, facilitant alors la différenciation génétique par une dérive génétique élevée.

Figure 34 : Arbre phylogénétique réalisé par la méthode « Bayesian Maximum Clade Credibility » à partir de séquences de VP60 de RCV-A1 et RHDV (Jahnke et al., 2010).



L'échelle de temps est donnée en abscisse, avec l'indication des faits marquants impliquant la démographie des lapins. Les souches de RCV-A1 se regroupent en 6 sous groupes.

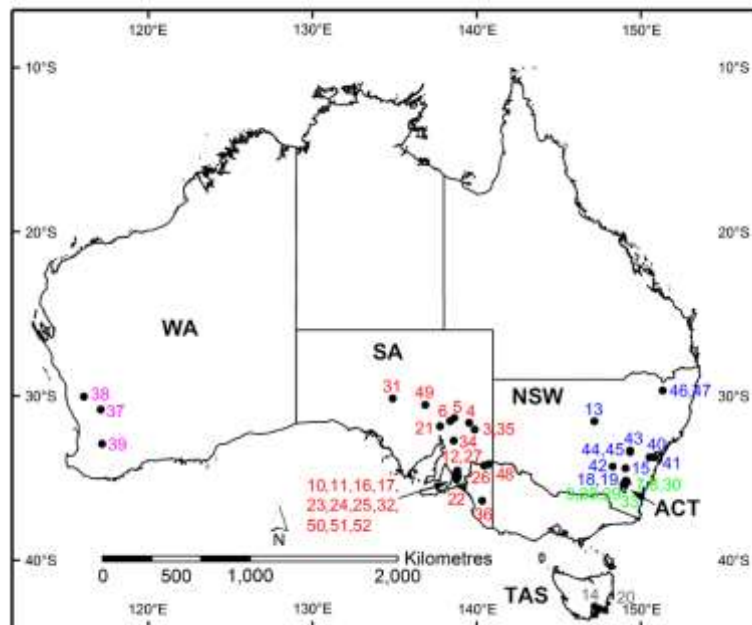
Aussi, on note que toutes les souches australiennes de RCV forment un groupe monophylétique, qui se subdivise en 6 clades mais forment une lignée clairement séparée au sein des *Calicivirus* connus chez le lapin. En effet, les espèces non pathogènes, affiliées au groupe des « RCV » ne forment pas un groupe monophylétique puisque les RCV européens sont plus proches du RHDV que du RCV-A1. On remarque donc que dans les années à venir, une révision taxonomique accompagnant les nouvelles connaissances sera nécessaire.

Enfin, l'étude phylogéographique basée sur l'analyse de séquences échantillonnées dans des populations séparées de moins de 20 km entre 2007 et 2009 montre une subdivision de population significative maintenue pendant environ 15 ans. Ces données sont en accord avec les études précédentes qui estimaient une structuration sur 3 à 10 km des populations de lapins en Australie tempérée. Bien que les aspects épidémiologiques concernant le RCV-A1 restent flous, il est donc probable que le virus ait la capacité de persister au sein de populations à haute densité de lapins par réinfection continue d'une proportion de celle-ci (comme cela a pu être démontré pour le calicivirus félin). Quel que soit le mécanisme de persistance, en termes de transmission, le RCV-A1 se distingue donc du RHDV pour lequel la dissémination à longue distance via les insectes est épidémiologiquement importante en fournissant de nombreuses opportunités de recombinaisons (Jahnke et al., 2010).

2.3 Epidémiologie moléculaire du RHDV en Australie

Cette partie est essentiellement basée sur la récente étude détaillée de la propagation du RHDV dans l'environnement australien (Kovaliski et al., 2014). Pour cela, les séquences de VP60 de 50 échantillons prélevés sur le territoire australien sur une période de 16 ans (1995-2011) ont été analysées (Figure 35). Ce travail a permis d'obtenir des informations solides sur les profils, la dynamique et le taux d'évolution du pathogène dans un environnement étendu et naïf. Cela en fait un modèle pour la compréhension de la dynamique évolutive des *Lagovirus* après émergence par saut d'espèce.

Figure 35 : Carte des points de prélèvements de RHDV en Australie de 1995 à 2011



Les nombres correspondent à la référence des échantillons. Les couleurs, correspondent à un territoire donné et sont reprises dans la Figure 36 (Kovaliski et al., 2014)

2.3.1 Analyse phylogénétique

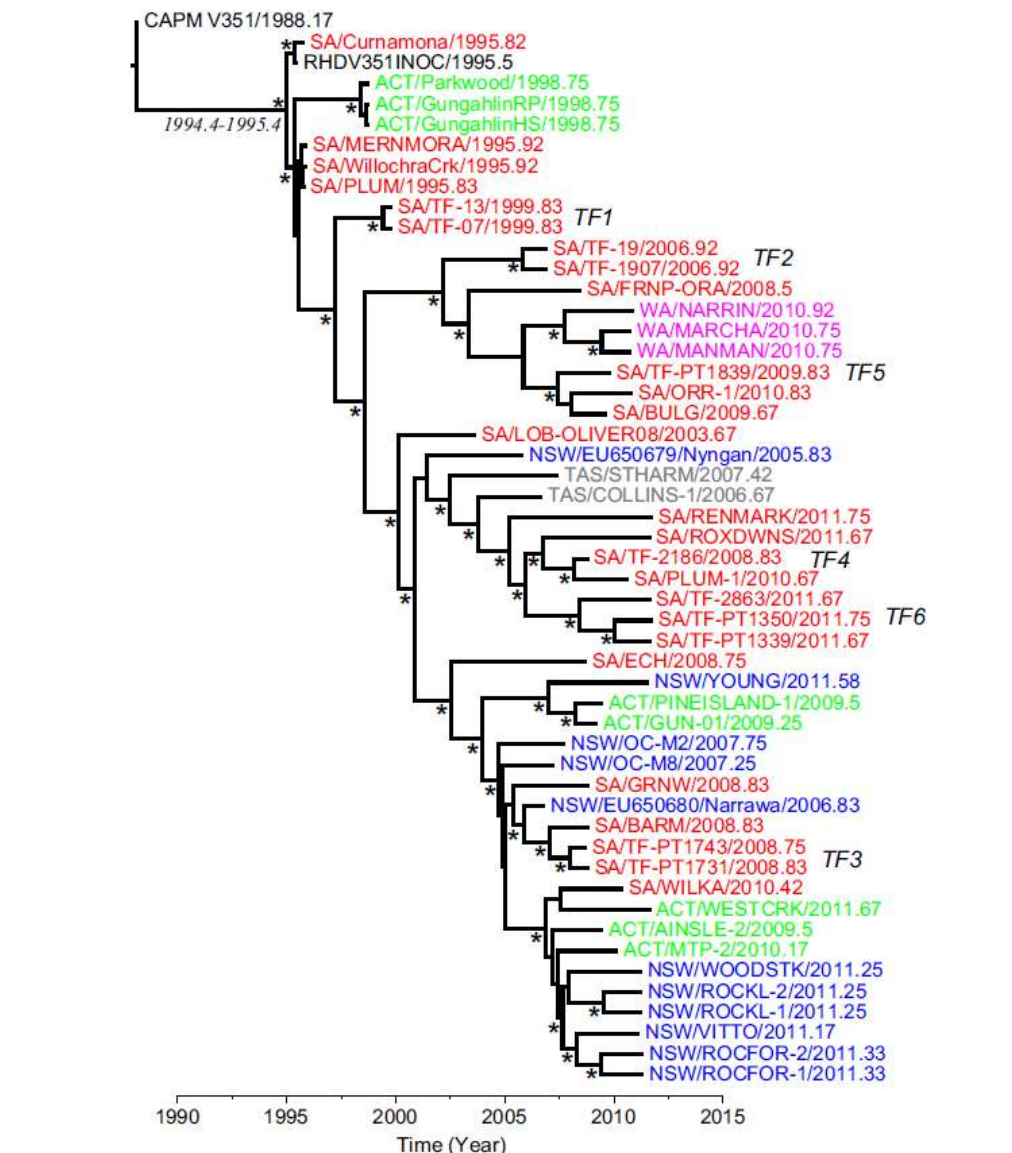
De façon peu surprenante, l'analyse phylogénétique des séquences de 50 souches de terrain de RHDV montre que les virus australiens forment un groupe monophylétique, ayant pour ancêtre commun CAPM V-351, qui a été utilisée pour obtenir RHDV351-INOC (Figure 36). Cette caractéristique est cohérente avec l'introduction d'une unique souche en Australie, suivie de 16 années d'évolution *in situ*.

Aussi, l'arbre révèle une sorte de groupage géographique des souches virales, même si plusieurs souches semblent composer la population virale de ACT, NSW et SA. Aussi, la structure de la diversité génétique du RHDV a changé au cours du temps, avec apparemment de moins en moins de contraintes à la propagation virale. Cet arbre est également la preuve des flux génétiques viraux, parfois entre des lieux très éloignés : les souches de Tasmanie se regroupent avec celles isolées en Australie du sud à plus de 500 km de distance dont 200 km d'eau.

Le résultat le plus frappant est la forte structure temporelle de cette analyse, puisque les différents points de temps sont caractérisés par la présence de lignées virales différentes.

Une telle structure phylogénétique implique que malgré de multiples occasions où la souche RHDV351-INOC a pu être introduites, il n’y a qu’une seule lignée (c’est-à-dire celle de la première introduction) qui a réussi à mettre en place une transmission à long terme. La rencontre avec une grande population de lapins sensibles aurait donc pu constituer un avantage compétitif pour celle-ci.

Figure 36 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences de RHDV australiens (MCC)



L'échelle de temps est donnée en abscisse. La couleur des séquences est codée en fonction de la zone de prélèvement : vert = Australian Capital Territory (ACT), bleu = New South Wales (NSW), rouge = South Australia (SA), gris = Tasmania (TAS), rose = Western Australia (WA). Les séquences non colorées sont extérieures à l'Australie.

Les nombres placés après le point dans le nom des souches virales correspondent à la fraction annuelle (ex. 2008.75 = Septembre 2008). Les virus prélevés à Turretfield (TF) sont numérotés

*en fonction de la date de leur prélèvement. Toutes les branches supportées par une probabilité supérieure à 0.95 sont indiquées par une astérisque *. (Kovaliski et al., 2014)*

Cependant, cette lignée principale a connu un renouvellement majeur au cours du temps puisque les lignées virales se remplacent les unes les autres sur une localité donnée. Cela est illustré par l'exemple de Turretfield en Australie du sud, où les lignées virales se répartissent dans 6 groupes phylogénétiques et où les virus des différentes années ne partagent jamais d'ascendance commune. Ce modèle de filiation laisse penser que le virus ne persiste pas entre les épizooties sur une localité donnée. Il est donc possible que les insectes vecteurs importent de nouvelles souches virales chaque année.

2.3.2 Taux d'évolution virale

Pour mieux comprendre les facteurs intervenant dans la propagation et l'évolution du virus, le taux d'évolution virale a été estimé par le taux de substitution nucléotidique par site et par an à partir des séquences issues de 50 souches étudiées. Cette donnée permet par la suite de déterminer la date du plus récent ancêtre commun. D'après le modèle du « Bayesian skyride », le taux pour le RHDV australien est de $4.0 \pm 0.7 \times 10^{-3}$ substitution/site/an, soit une valeur beaucoup plus élevée que lors des estimations précédentes (1.9×10^{-3} substitution/site/an). Une telle valeur du taux de substitution, comparable à celle du gène HA du virus de l'*influenza* humain, est l'une des plus élevées observées pour les virus à ARN. La validité de cette valeur est donnée par l'estimation du TMRCA (Time to the Most Common Ancestor) évaluée à 1994.4 à 1995.4, qui coïncide avec la date de la libération initiale du virus en Australie.

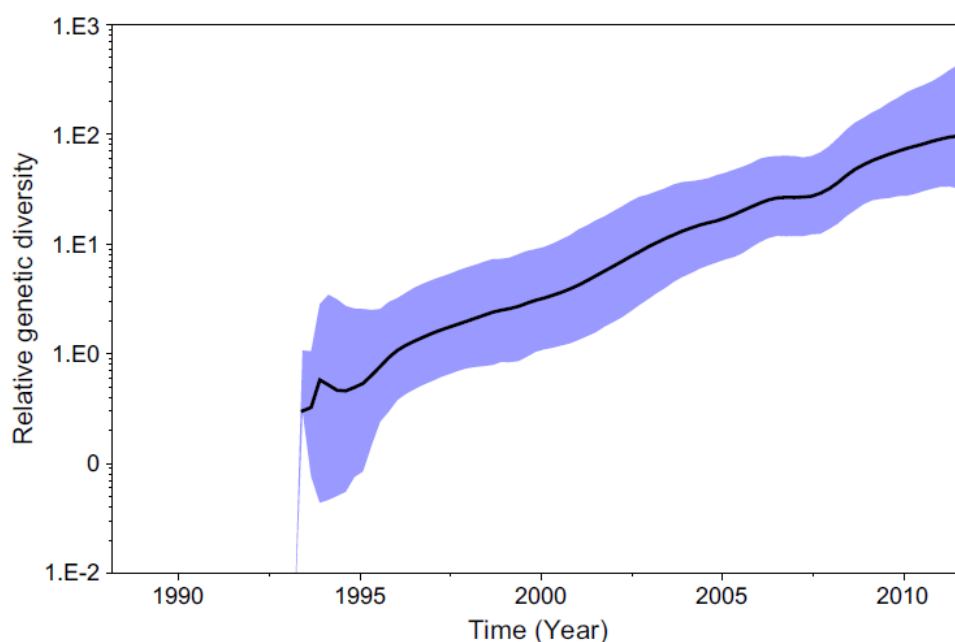
En outre, une association claire entre la distance génétique et la date d'échantillonnage a été notée (coefficient de corrélation = 0.85), ce qui indique l'existence d'une forte structure temporelle des données (horloge moléculaire).

Le RHDV a donc évolué avec une rapidité remarquable en Australie, ce qui pourrait être provoqué par un processus évolutif basé sur la sélection et / ou l'augmentation des taux de réplication virale au cours de l'expansion épidémique.

2.3.3 Diversité génétique

Pour comprendre la dynamique de population du RHDV, l'évolution de la structure de la diversité génétique virale dans le temps a été construite en utilisant une analyse bayésienne en nuage (Figure 37).

Figure 37 : Evolution de la diversité génétique relative du RHDV au cours du temps.



Analyse Bayésienne illustrant l'évolution des estimations de la diversité génétique relative (axe y) en fonction du temps (axe x). La ligne noire représente la valeur médiane, tandis que la région ombragée représente la zone de probabilité 0.95 (Kovaliski et al., 2014)

Ce graphique révèle une augmentation exponentielle de la diversité génétique du RHDV en Australie ; elle peut être considérée comme une augmentation effective de la taille de la population virale sous un modèle évolutif neutre. Une telle augmentation (au moins dans la population étudiée) suggère que les contraintes écologiques, génétiques et immunologiques, y compris la co-circulation du RCV-A1 et la résistance génétique des lapins n'ont pas imposé un défi sélectif majeur au RHDV. En effet, les contraintes sur une population se manifestent par un balayage sélectif périodique permettant une purge de la diversité génétique.

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence du RCV-A1, en interférant avec la propagation du RHDV, pourrait exercer une pression de sélection sur celui-ci ; cela ne se vérifie

pas ici. Cela pourrait s'expliquer par une baisse du développement de la résistance génétique des lapins (et donc de la pression de sélection) induite par la protection partielle contre le RHDV, limitant l'impact clinique de celui-ci.

2.3.4 Pression de sélection sur les gènes de la VP60

2.3.4.1 *Un site clé : le résidu 307*

Comme cela avait déjà été évoqué lors d'études sur la population mondiale de RHDV, le résidu de capsid 307 semble aussi être un site évoluant sous une pression de sélection positive en Australie. La combinaison de ces observations locales et mondiales favorise l'hypothèse que cette zone du génome correspond à un site de sélection authentique. Or, le modèle atomique de la VP60 indique que ce résidu 307 est localisé dans la boucle L1 (acides aminés 300 à 318), qui est la plus exposée du capsomère (Wang et al., 2013). Il s'agit d'une région d'interaction avec les antigènes du groupe sanguin, qui pourrait agir comme un corécepteur à la surface des muqueuses de l'hôte (voir 2.1 de la partie 1).

Aussi, cette boucle L1, conjuguée à la protéine KLH (Keyhole Limpet Hematocyanin) a montré sa capacité à déclencher l'immunité cellulaire et humorale, ce qui en ferait un site de neutralisation majeur. Ce résidu pourrait donc être impliqué à la fois dans l'échappement du virus à la reconnaissance immunitaire de l'hôte et dans la mise en place d'une résistance génétique chez le lapin, basée sur des différences d'expression des antigènes du groupe sanguin.

2.3.4.2 *Un autre site moins connu : le résidu 572*

Déjà cité par la littérature, le résidu 572 a aussi été identifié comme un site de sélection pour le RHDV australien. Localisé dans une partie beaucoup moins accessible du capsomère, dans le domaine P1, il n'est pas directement exposé au système immunitaire et son implication dans l'évolution du RHDV est pour l'instant inconnue (Kovaliski et al., 2014).

2.4 Etude comparative Australie – Nouvelle-Zélande

Bien que les autorités Néo-Zélandaises se soient opposées à l'autorisation de l'utilisation du RHDV comme agent de contrôle de la population de lapins, les premiers cas cliniques de RHD sont observés en Août 1997 chez des lapins sauvages. L'importation et l'utilisation illégale de la souche RHDV351-INOC, autorisée en Australie ne fait plus aucun

doute. Comme en Australie, le virus s'est propagé de façon naturelle et à également été réintroduit à plusieurs reprises par les agriculteurs.

Ainsi, l'étude de ces deux populations virales issues d'une souche commune permet de comprendre les mécanismes et les facteurs influençant l'évolution de ces virus.

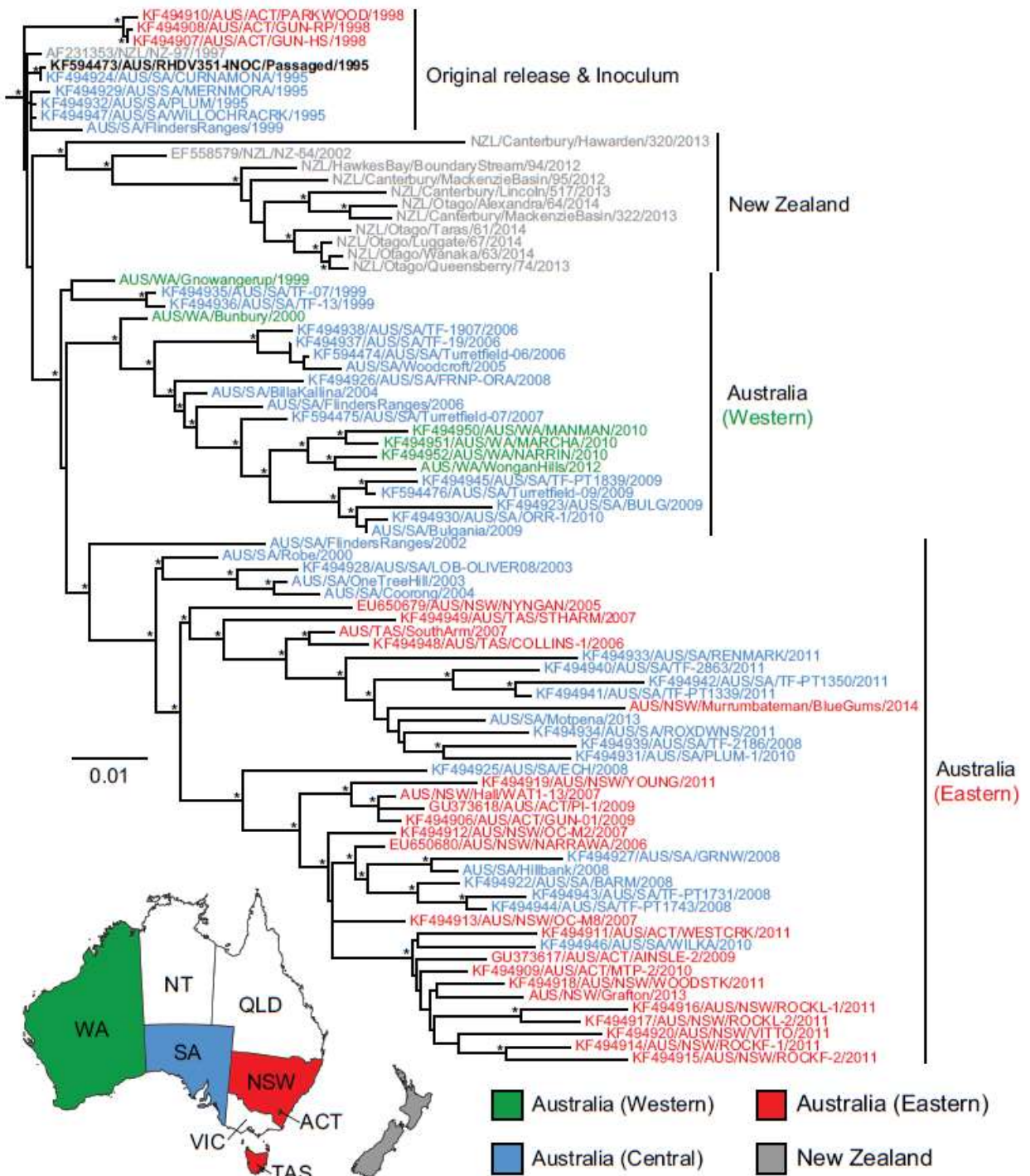
2.4.1 Analyse phylogéographique des virus isolés en Australie et Nouvelle-Zélande (Eden, Kovaliski, et al., 2015).

L'analyse de 34 séquences complètes de RHDV suggère que les virus forment deux lignées distinctes en Australie et Nouvelle-Zélande. Ce résultat a été confirmé par l'analyse de 84 séquences de VP60 (dont 27 obtenues dernièrement à partir d'échantillons de terrain récents).

Ainsi, compte tenu de l'histoire du virus, la souche RHDV351-INOC se retrouve logiquement en position basale de l'arbre. Ensuite, il est intéressant de noter que toutes les souches obtenues à partir d'échantillons de Nouvelle-Zélande sauf l'isolat de 1997 forment un groupe monophylétique, ce qui laisse penser qu'il s'agit de la descendance d'un seul virus, qu'il n'y a eu qu'une seule importation (ou que les autres tentatives d'introduction n'ont pas produit d'infection pérenne) et qu'aucun mélange ne s'est effectué avec les souches australiennes par la suite (Figure 38). En outre, cet arbre phylogénétique montre une distribution locale des souches, malgré la présence de souches d'Australie du sud dans la plupart des groupes.

Si l'on y regarde de plus près, toutes les souches de RHDV isolées en Australie après 2000 forment deux lignées majeures définies par le lieu de prélèvement (est ou ouest). Aussi, ce classement en souches d'Australie de l'est et Australie de l'ouest a montré un résultat significatif ($P < 0.001$) en utilisant le test d'association entre phylogénie et caractère. En revanche, aucun résultat significatif a été obtenu pour le classement des souches du sud. Cela suggère que les souches de RHDV d'Australie du sud sont à l'origine des souches distinctes entre l'est et l'ouest.

Figure 38 : Arbre phylogénétique obtenu par l'analyse de 84 souches de RHDV d'Australie et Nouvelle-Zélande (Eden, Kovaliski, et al., 2015).

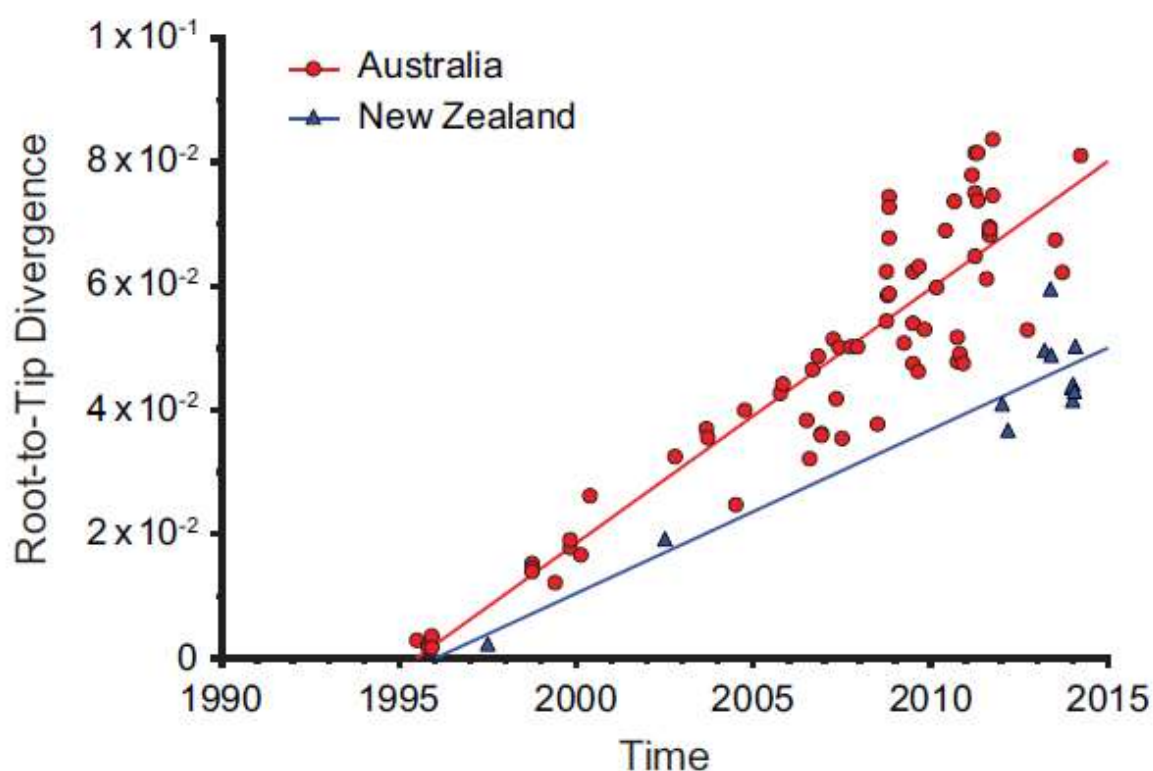


Les légendes des taxons sont colorées selon le code couleur donné par la carte, sauf la souche RHDV351-INOC qui est indiquée en gras. La phylogénie a été enracinée avec une souche de RHDV européen (non indiquée sur la figure). La barre d'échelle est proportionnelle au nombre de substitution nucléotidique par site. Le support statistique a été évalué sur 1000 répliques pour chaque nœud ; l'astérisque indique un bootstrap $\geq 70\%$.

2.4.2 Analyse temporelle

La phylogénie de la VP60 des souches australiennes et néo-zélandaises montre un signal temporel fort indiquant une évolution de type horloge moléculaire. Une régression linéaire simple montre une forte corrélation entre la distance génétique entre la racine et la pointe de l'arbre en fonction de l'année de prélèvement de la souche sur le terrain, avec des coefficients de corrélation égaux respectivement à 0.92 et 0.93. On observe cependant un taux d'évolution significativement plus élevé ($P=0.0058$) pour les souches australiennes, évalué à $4.1 \times 10^{-3} \pm 2.1 \times 10^{-4}$ subs/site/an, ce qui est en accord avec (Kovaliski et al., 2014).

Figure 39 : Structure temporelle du gène de la VP 60 du RHDV en fonction de sa localisation géographique (Eden, Kovaliski, et al., 2015).



Best-fit values	Australia	New Zealand
Slope (rate)	$4.1 \times 10^{-3} \pm 2.1 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-3} \pm 3.3 \times 10^{-4}$
X-intercept (TMRCA)	1995.49	1996.04
Correlation coefficient	0.92	0.93

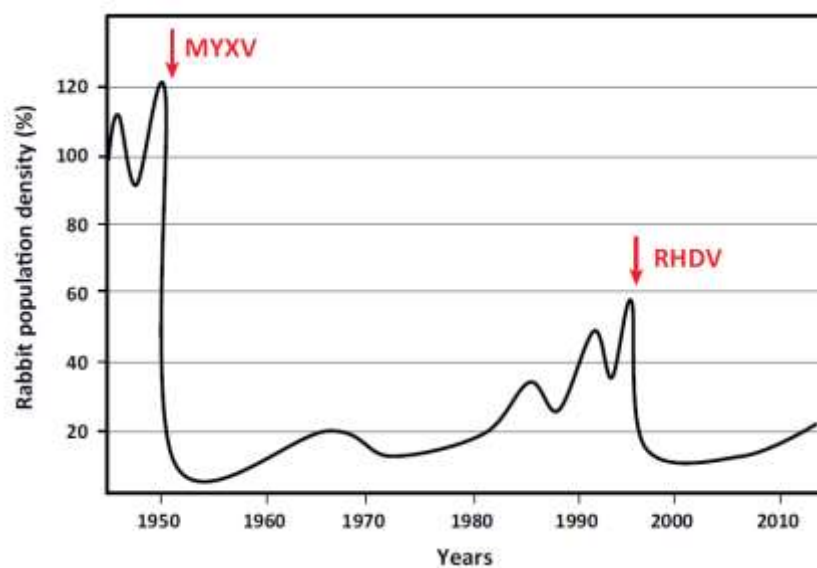
Les distances génétiques de la racine à la pointe de la phylogénie ML de la VP60 ont été pointées en fonction de la date d'échantillonnage. Une régression linéaire a été réalisée pour comparer la structure temporelle entre les souches de RHDV australiennes (rouge) et néo-zélandaises (bleu).

2.5 Parallèle avec le virus de la myxomatose (Di Giallonardo, Holmes, 2015)

2.5.1 Evolution de la virulence sur le terrain

Bien avant le RHDV, c'est le virus de la myxomatose (MYXV) qui a été utilisé en Australie pour contrôler le nombre de lapins européens (dans les années 1950). Au final, ces deux virus constituent le plus grand succès dans le contrôle biologique de populations de vertébrés et, ensemble, ils ont permis une réduction d'environ 85% de la population de lapins envahissants en Australie (Figure 40).

Figure 40 : Impact temporel du MYXV et du RHDV sur les populations australiennes de lapins.



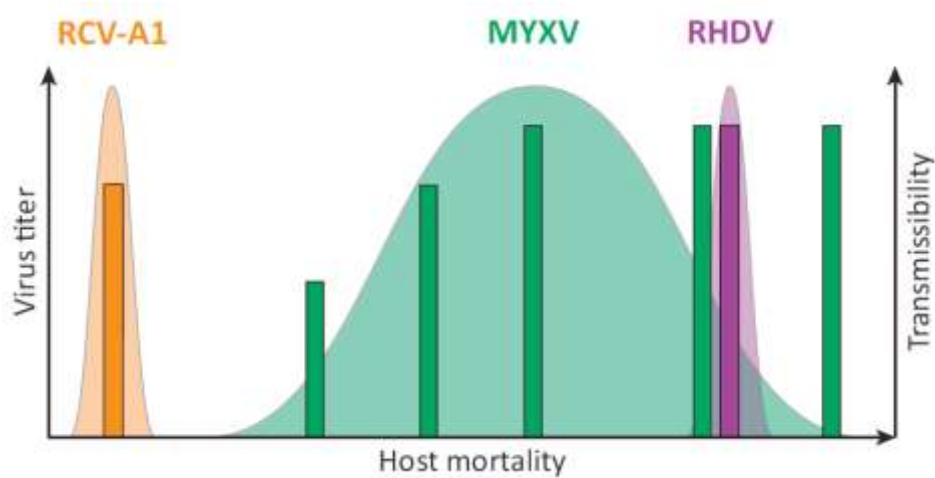
La densité de population de lapins a été fixée à 100% en 1945. Les flèches indiquent les dates auxquelles ont été introduits les deux virus. (Di Giallonardo, Holmes, 2015)

Le MYXV est un virus à ADN double brin de la famille des *Poxviridae*, dont le saut d'espèce depuis son hôte naturel (*Sylvilagus brasiliensis*) vers *O. cuniculus* a résulté en une augmentation marquée de sa virulence. C'est donc une de ces souches hautement pathogènes qui a été introduite en Australie en 1950, causant une réduction immédiate de la taille de la population de lapins. Cependant, quelques années après cette introduction, des souches atténuées ont été observées sur le terrain et peu de temps après, la population de lapins a commencé à augmenter à nouveau. Étonnamment, cette atténuation de virulence a également été observée en Europe suite à l'introduction illégale du virus en France.

La dominance apparente de virus à virulence moyenne (suite à l'évolution de quelques années sur le terrain) peut être interprétée comme une sélection de ceux-ci par rapport aux

virus hautement pathogène, qui tuant l'animal trop rapidement, ne produisent pas une charge virale assez conséquente pour assurer leur transmission. En conséquence, l'exemple du MYXV donne du poids à la théorie basé sur le fait que le niveau de virulence est le reflet d'un compromis évolutif avec les moyens de transmission du virus (Figure 41). Cette théorie est à nuancer par l'observation de virus à virulence augmentée dans certaines régions australiennes, indiquant que les caractéristiques écologiques locales ont aussi leur importance dans l'évolution de la virulence virale.

Figure 41 : Relations possibles entre virulence et transmission chez les virus du lapin.



L'axe des abscisses représente le taux de mortalité approximatif chez l'hôte (estimation de la virulence) pour les trois virus du lapin de 0% (virus bénins) à 100% (léthalité maximale), les différents taux de virulence du MYXV inclus. Les probables relations entre mortalité et les valeurs hypothétiques en titre viral (barres) et la transmission (distribution en forme de cloche) sont présentées.

L'introduction du RHDV en Australie dans le milieu des années 1990 dépeint un tableau évolutif de la virulence bien différent de celui observé pour le MYXV. En effet, malgré des taux de mortalité très disparates localement (en lien avec le RCV-A1, le climat et la ressource en vecteurs (voir ci-dessus)), il n'y a actuellement aucune preuve d'atténuation de virulence chez le RHDV, puisque celle-ci apparaît constamment haute sur le terrain. Si l'on se base sur l'hypothèse principale, qui considère que la virulence est apparue à partir d'un ancêtre commun ayant connu une évolution sans changement d'espèce, l'augmentation de la mortalité des lapins constitue alors un avantage sélectif pour le RHDV.

On note toutefois que l'efficacité du RHDV en tant qu'agent de biocontrôle a été diminuée par l'augmentation de la résistance chez le lapin et par la protection croisée conférée par le RCV-A1.

2.5.2 Evolution virale dans un environnement naïf

En dépit d'un nombre conséquent d'introduction du RHDV en Australie, il est remarquable que tous les échantillons prélevés sur le terrain présentent des souches qui dérivent du variant initial, échappé de quarantaine en 1995. Ainsi, dans un environnement complètement naïf, les souches virales qui ont rapidement réussi à s'adapter à la population de lapins hôte ont peut-être été en mesure de supplanter les souches re-libérés (ayant le génotype de l'inoculum original), par coévolution avec les lapins pour maintenir une virulence haute.

Le même type de résultat a été observé pour le MYXV. La souche SLS, initialement introduite en Australie constitue un ancêtre commun à toutes les souches échantillonnées sur le terrain malgré les multiples introductions de ce virus et notamment de la souche de Lausanne (LU). En Europe, où la souche LU a été introduite initialement, celle-ci est également restée dominante malgré les multiples introductions.

2.5.3 Mise en place de résistances aux agents de biocontrôle

Même si les mécanismes de développement de résistances aux virus sont encore très peu connus, l'introduction volontaire du MYXV et du RHDV a permis l'obtention d'informations importantes sur l'apparition et l'évolution des résistances chez les hôtes.

En effet, l'impact du MYXV en Australie a été sévèrement affaibli par la mise en place rapide de résistances chez les lapins. Par exemple, il a été montré que la mortalité des lapins est passée de 54% à 26 % en un an dans la région du lac Urana (NSW). Il semblerait que les lapins résistants aient des réponses en cellules Natural Killer et cytokine de type 1 renforcées, ce qui leur permet de mieux contrôler l'infection virale.

La résistance au RHDV, probablement liée aux antigènes du groupe sanguin (HGBA) présentés au niveau de la muqueuse du tube digestif permettrait majoritairement la prévention de l'infection, alors que la résistance au MYXV est liée à un meilleur contrôle de la réplication et de la dissémination virale.

2.5.4 Evolutions comparées en Australie et en Europe

L'émergence de ces deux virus simultanément en Europe et en Australie permet de comparer de façon précise leurs évolutions.

Concernant le MYXV, l'observation la plus frappante est que sur les deux continents, sa virulence a rapidement diminué, certainement suite à la même sélection consécutive à une transmission vectorielle supérieure lorsque les lapins survivent plus longtemps et que la charge virale est accrue. Cette convergence phénotypique apparente ne provient cependant pas d'une convergence à l'échelle génétique. Une telle caractéristique est compatible avec le fait qu'un virus à ADN double brin comme le MYXV possède une flexibilité génomique suffisante pour permettre de trouver de multiples solutions au même problème adaptatif.

Pour le RHDV, aucune atténuation n'a été observée ni en Europe, ni en Australie. Cela s'explique par le fait que, contrairement au MYXV qui se transmet à partir d'animaux malades vivants, le RHDV est transmis de façon optimale par les insectes et l'environnement à partir d'animaux morts de RHD.

On ne peut malgré tout pas exclure que l'évolution de ces deux virus ait été impacté par la baisse significative du nombre de lapins en Australie (environ – 50%) lors de l'introduction du RHDV, provoquant des variations locales de la pression de sélection.

3 Dynamique évolutive

3.1 Un virus détecté après plusieurs années de circulation ?

La plupart des études disponibles se basant sur l'horloge moléculaire suggèrent que le RHDV a émergé plusieurs décennies avant sa description initiale en Chine (Kinnear, Linde, 2010 ; Moss et al., 2002 ; Kerr et al., 2009). Compte tenu de la pathogénicité de ce virus, ces estimations semblent déroutantes mais les auteurs croient, pour la majorité, que celui-ci a pu circuler à bas bruit durant plusieurs décennies voire des siècles sous sa forme non virulente avant d'acquérir son pouvoir pathogène.

L'émergence spontanée du RHDV hautement pathogène a également été utilisée dans des modèles généraux de l'évolution de la virulence (Boots et al., 2004).

Le mécanisme de passage à une forme virulente n'a cependant toujours pas été complètement élucidé.

3.2 Données issues des souches pathogènes introduites en Australie (Eden, Read, et al., 2015)

En dépit d'une histoire bien documentée sur la libération australienne du virus, on n'a que peu de connaissances sur la façon dont le virus a évolué au cours des quatre années séparant son importation et sa libération sur le territoire et, au cours desquelles les stocks expérimentaux ont été préparés et repiqués chez les lapins. Plus largement, l'intégrité et la précision de ces séquences précoces peut avoir des conséquences majeures dans l'estimation du moment où le RHDV a émergé au niveau mondial.

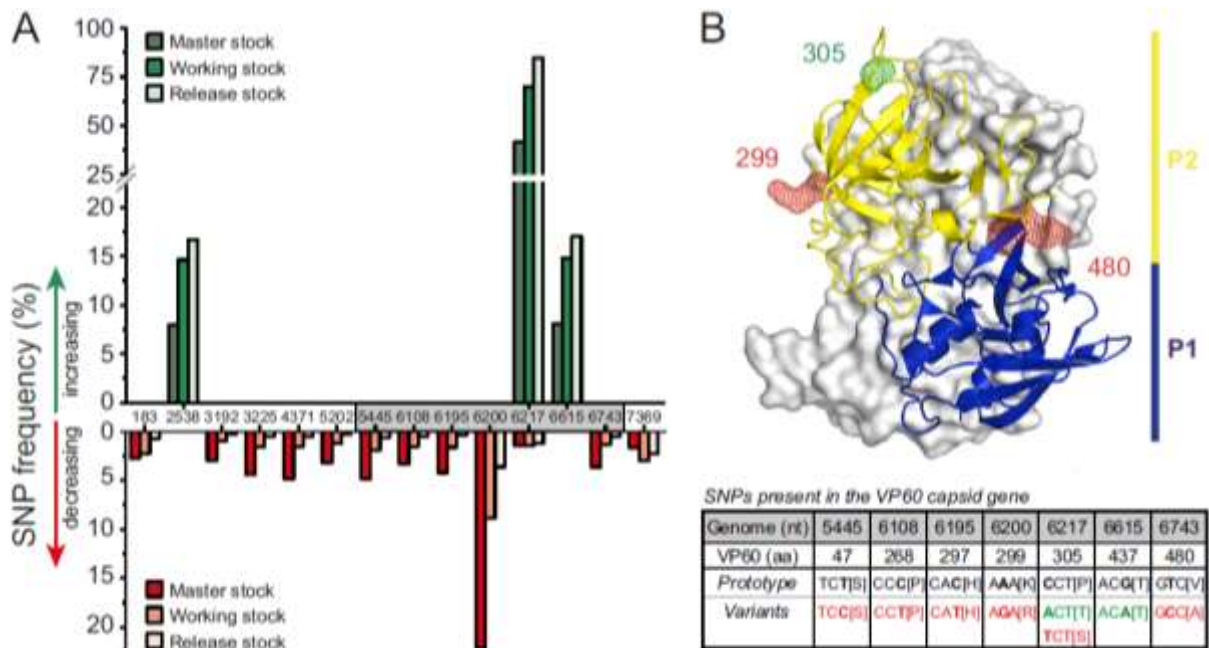
Ainsi, pour nourrir le débat sur l'histoire de l'évolution du RHDV et tenter d'y apporter une réponse fiable, (Eden, Read, et al., 2015) ont réalisé une analyse génomique des souches virales importées et introduites en Australie comme agent de lutte biologique contre les lapins. Cette étude est complétée par une analyse phylogénétique globale.

D'importantes différences ont été mises en évidence entre les séquences obtenues ici et celles publiées précédemment. En se focalisant sur les SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), cette analyse en a révélé 15 chez la souche originale importée en Australie (Figure 42), dont plus de la moitié étaient situés dans le gène de la VP60 et incluaient quatre mutations non synonymes. Cette souche a ensuite été multipliée chez des lapins pour obtenir un stock de travail intermédiaire (1^{er} repiquage), puis un stock final (2^{ème} repiquage) qui a été utilisé pour toutes les introductions virales suivantes. Bien que la diversité ait été purgée durant les repiquages (80% des SNP ayant diminué en fréquence), le SNP non synonyme C6217A est devenu le variant dominant en passant de 41.4% chez la souche initiale à 84.7% dans la souche finale. La cartographie structurelle de la VP60 révèle que ce SNP est localisé dans une importante boucle externe, adjacente aux sites antigéniques et de fixation aux récepteurs (Figure 42), ce qui est compatible avec une adaptation virale au cours des repiquages.

Figure 42 : SNP dans le génome des souches de RHDV initialement introduites en Australie.

A) Positions (nucléotides) et fréquences (%) des SNP dans la souche originale australienne

B) Cartographie des trois SNP non synonymes dans le gène de capside. Le tableau indique les codons de tous les SNP présents dans le gène de capside. La séquence prototype correspond à la séquence consensus majoritaire de la souche originale « master stock ». En dessous, les séquences vertes et rouges indiquent la tendance à l'augmentation ou à la diminution de la fréquence des SNP, respectivement. (Eden, Read, et al., 2015)



A partir de ces séquences représentant le plus probablement celles des virus fondateurs de l'épizootie australienne de RHDV, l'arbre phylogénétique du génome entier de souches dérivées du CAPM V351 est construit. Cela confirme que, à l'exception du SNP C6217A dans le stock initial, les séquences consensus de tous les stocks de virus se regroupent, ce qui n'est pas le cas de la séquence précédemment publiée du virus importé en Australie, connu sous le nom RHDV V351 (GenBank no. U54983). Le génome du RHDV V351 contient 40 différences nucléotidiques (0,54%) par rapport à ceux générés ici, comme s'il avait été séquencé par erreur ou qu'un variant minoritaire avait été séquencé de façon sélective à partir la population virale au cours du clonage. La dernière hypothèse est favorisée par l'observation de populations virales mineures dans une petite région (positions 3375-3732) dans la publication originale du RHDV V351.

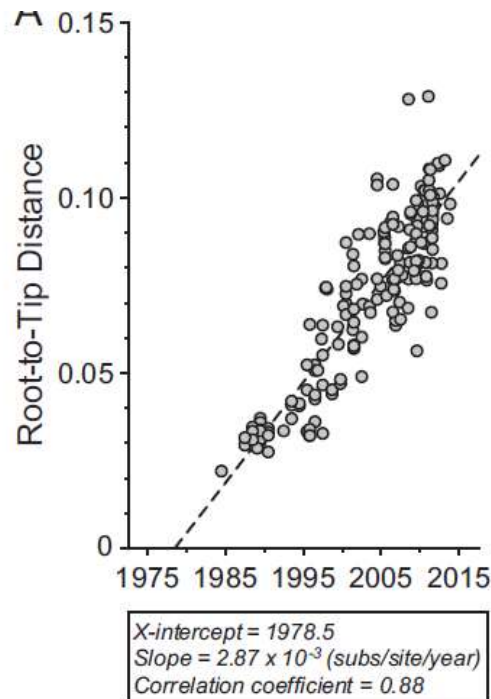
Indépendamment et de façon évidente, la séquence du RHDV V351 ne reflète pas la séquence du virus responsable de l'épizootie australienne et doit être retirée des analyses comparatives.

A partir de ces constatations, on comprend pourquoi les premières estimations du taux d'évolution du gène de la VP60 de l'ensemble des souches de RHDV sont comprises entre 7.2×10^{-4} et 1.9×10^{-3} substitutions / site /an. D'un point de vue critique, la prise en compte de tels taux d'évolution place l'émergence du RHDV au moins 67 ans avant sa première description en 1984. Cela voudrait dire que des morts massives de lapins seraient passées inaperçues durant tout ce temps. Il est donc probable que les premières études d'horloge moléculaire contiennent des séquences erronées (erreurs techniques, hétérogénéité virale, erreurs de datation, ...). Ainsi, comme une seule séquence incorrecte peut avoir un impact majeur sur les résultats d'estimation des taux d'évolution, et comme la plupart des études précédentes incluent la séquence originale RHDV V351, leurs résultats doivent être prudemment interprétés.

C'est pourquoi, (Eden, Read, et al., 2015) ont repris uniquement les données précises des séquences de VP60 à partir de la base de données GenBank pour ré estimer le taux et l'échelle de temps de l'évolution du RHDV. Toutes les séquences contenant des recombinaisons, des délétions larges, ou provenant de sources ambiguës ont été retirées.

Les résultats montrent une structure évolutive réglée comme une horloge, avec un taux d'évolution estimé à 2.87×10^{-3} substitutions / site /an (Figure 43). Ce taux est supérieur aux estimations précédentes obtenues d'un point de vue mondial mais en accord avec les études récentes sur l'évolution du RHDV en Australie (Eden, Kovaliski, et al., 2015). Ces données placent l'origine du RHDV entre 1970 et 1981, soit quelques années avant sa première description de 1984.

Figure 43 : Structure temporelle du gène de la VP60 des souches circulant mondialement.(Eden, Read, et al., 2015)



3.3 Données issues de l'observation des souches non pathogènes

La comparaison de virus semblables mais différents dans leur capacité à causer une maladie chez leurs hôtes offre l'opportunité d'explorer les causes de changement de virulence et d'étudier comment de tels changements influent la dynamique évolutive de ces pathogènes.

3.3.1 Phylogénie

Ainsi, (Mahar et al., 2016) ont dernièrement mis en œuvre une nouvelle comparaison entre le virus hautement pathogène RHDV et le virus non pathogène australien RCV-A1. Deux analyses phylogénétiques ont été réalisées sur la base des séquences de gènes non structuraux et sur les séquences des gènes de VP60 de RCV-A1, afin d'avoir une vision globale du génome. Les arbres phylogénétiques obtenus suggèrent que les séquences de RCV-A1 forment un groupe monophylétique, mais que, la séparation phylogéographique évoquée précédemment pour ces virus n'est pas si nette que ce que l'on pensait. En effet, la co-circulation de plusieurs souches (alternativement ou simultanément) a été mise en évidence à plusieurs endroits du territoire australien. Comme la transmission mécanique par les insectes sur de grandes distances est très peu probable chez ce virus, on peut penser que ce sont les pratiques humaines utilisées pour la libération volontaire du virus RHDV qui

expliquent en partie ce pattern phylogéographique. L'utilisation de pièges insuffisamment décontaminés entre les différentes captures de lapins sauvages serait l'explication la plus probable.

A plus grande échelle, les analyses phylogénétiques de tous les isolats de RHDV et RCV disponibles révèlent que les virus bénins (RCV-A1 / RCV-E) ne forment pas un seul groupe monophylétique, distinct des virus pathogènes. On note en particulier que le RCV-E se regroupe avec le RHDV classique, ce qui implique que les mutations associées à l'évolution vers l'augmentation ou l'atténuation de la virulence aient eu lieu au moins deux fois.

A partir des seules analyses phylogénétiques des séquences de RHDV et RCV actuellement disponibles, il est impossible de déterminer si la haute virulence a évolué indépendamment chez les souches classiques de RHDV et chez le nouveau variant RHDV2 ou bien si elle est apparue une seule fois chez un ancêtre commun de ces virus, puis perdue chez les RCV-E et MRCV. Cependant, compte tenu de l'absence de signes de l'existence de souches pathogènes avant les années 1980, un scénario où les deux souches ont évolué séparément à partir d'un ancêtre commun non pathogène semble la plus probable (Mahar et al., 2016).

3.3.2 Taux d'évolution

L'une des observations les plus surprenantes de (Mahar et al., 2016) est que le taux d'évolution du RCV-A1, estimé à environ 5×10^{-3} substitutions / site / an est à la fois très haut pour un virus à ARN et plus haut que celui estimé dernièrement chez le RHDV (Eden, Read, et al., 2015). Un taux élevé pour le RCV-A1 est conforme aux données publiées récemment, qui montrent que, *in vitro*, la polymérase du RCV-A1 a un taux de réplication supérieur à celle du RHDV (Urakova et al., 2016), ce qui peut entraîner une accumulation de mutations plus rapide.

3.3.3 Pression de sélection positive

Malgré l'absence de maladie associée au RCV-A1, des preuves d'évolution adaptative ont été trouvées au niveau de six sites d'acides aminés, dont deux dans le domaine P2 de la protéine de capsid. En particulier, le codon 2067 du RCV-A1 a montré qu'il évoluait sous une pression sélective positive (celui-ci correspond au codon 2072 du RHDV, pour lequel cette caractéristique a été observée précédemment (Eden, Kovaliski, et al., 2015)). Comme pour le RHDV, ce résidu faisant partie de la boucle L1 de la protéine de capsid, pourrait être impliqué

dans les interactions hôte-virus et dans l'élimination par les anticorps neutralisants (Wang et al., 2013).

Les réinfections des survivants sont fréquentes et bien caractérisées pour le RHDV et, même si elles ne provoquent pas de nouveaux signes de maladie, elles déclenchent une forte augmentation des titres en anticorps, en particulier les IgA. De façon similaire, le RCV-A1 provoque une forte réponse immunitaire adaptative, mais peut aussi causer des réinfections. Cela suggère que l'immunité protectrice pourrait être transitoire à la fois pour le RHDV et le RCV-A1, de manière similaire à ce qui a été décrit pour les norovirus humains.

Il n'y a pas de preuve de réelle persistance ou réactivation ni pour le RHDV, ni pour le RCV-A1, ce qui laisse penser que le virus se maintient lui-même au sein des populations en infectant et réinfectant les animaux sensibles. Les variations aux sites clés représentant des épitopes potentiels de neutralisation pourraient présenter un avantage sélectif (Mahar et al., 2016).

4 Emergence d'un nouveau variant pathogène : le RHDV2

4.1 La découverte

Les premiers cas de RHD attribués au RHDV2 ont été décrits par (Le Gall-Recule et al., 2011) suite à la mort de 25 % des lapins vaccinés dans un élevage du nord de la France en août 2010 et à l'augmentation du nombre d'élevages touchés dès octobre 2010. En effet, des mortalités inhabituelles ont été enregistrées dans des élevages de lapins vaccinés et non vaccinés contre le RHDV. La mise en place de la vaccination d'urgence a permis de stopper les mortalités mais dans un délai plus long que d'habitude (en 7-15 jours contre 7-9 jours pour la forme classique de la maladie). Fin janvier 2011, on dénombrait déjà 60 élevages du nord et du nord-ouest de la France touchés par ce nouveau variant. Dans le même temps, le réseau SAGIR a relevé des épizooties de RHD dans de nombreuses populations de lapins sauvages de la même zone géographique. Les mortalités observées sont de l'ordre de 80 à 90 %, c'est-à-dire du même ordre que celles observées lors de l'émergence et de la dissémination du virus dans les populations françaises de lapins naïfs dans les années 1980.

L'étude de trois cas ayant eu lieu mi-octobre 2010 dans trois élevages du nord-ouest de la France a révélé des signes cliniques et des lésions microscopiques typiques de la RHD. Afin de caractériser le virus, la région N-terminale du gène codant pour la VP60 a été amplifiée et séquencée pour les échantillons de foie positifs pour le RHDV. Les séquences nucléotidiques obtenues se sont révélées très proches les unes des autres (98.5 à 100% d'homologie) et les séquences en acides aminés identiques, ce qui montre que les différents cas sont dus au même virus. Ce virus s'est révélé apparenté mais assez distinct (seulement 87.5% d'identité en moyenne) des souches de RHDV et RHDVa circulant en France pour le considérer comme un nouveau variant du virus. Les relations phylogénétiques avec les *Lagovirus* pathogènes et non pathogènes, établies à partir d'une séquence partielle du gène de la protéine de capsid VP60 (354 bp) suggèrent qu'il fait partie d'un nouveau groupe génétique (Figure 31).

Le nom de RHDV2 a été donné en 2013 à ce nouveau virus (Le Gall-Reculé et al., 2013) après avoir été appelé indifféremment RHDVb ou RHDV variant 2010.

4.2 Le RHDV2 français (Le Gall-Reculé et al., 2013)

Les relations phylogénétiques entre le RHDV2 découvert en France et les autres *Lagovirus* connus chez le lapin ont été confirmées lors de l'obtention et de l'analyse de la première séquence complète du gène de la protéine de capsid. Ainsi, les sept séquences des gènes de la VP60 étaient composées de 1740 nucléotides (soit 579 acides aminés) et étaient très proches les unes des autres (en moyenne 1.3% de différence nucléotidique).

Les résultats montrent une identité nucléotidique moyenne entre RHDV2 et RHDV-RHDVa de 82.4%. Le RHDV2 partage 82% d'identité en moyenne avec les trois souches peu ou pas pathogènes et 80.6% d'identité avec le RCV-A1. On note cependant 70.4% d'identité nucléotidiques avec l'EBHSV, ce qui montre une proximité génétique plus grande du RHDV2 avec les *Lagovirus* du lapin par rapport au virus du lièvre.

Les séquences en acides aminés déduites des séquences nucléotidiques ont été comparées à celles d'autres types de RHDV connus (Figure 44) :

- 47 séquences de RHDV et RHDVa appartenant aux différents groupes G1 à G6, le groupe G5 étant celui qui circulait le plus en France avant l'émergence du RHDV2
- 36 séquences de RCV-A1
- Les RCVs non pathogène (X96868), 06–11 (AM268419) et le MRCV moyennement pathogène (GQ166866)

Les séquences en acides aminés obtenues pour les sept souches de RHDV2 sont similaires à 99.3%, alors qu'elles le sont à 89.2% au sein du groupe RHDV-RHDVa, RCV, 06-11 et MRCV et de 87.54% avec les RCV-A1.

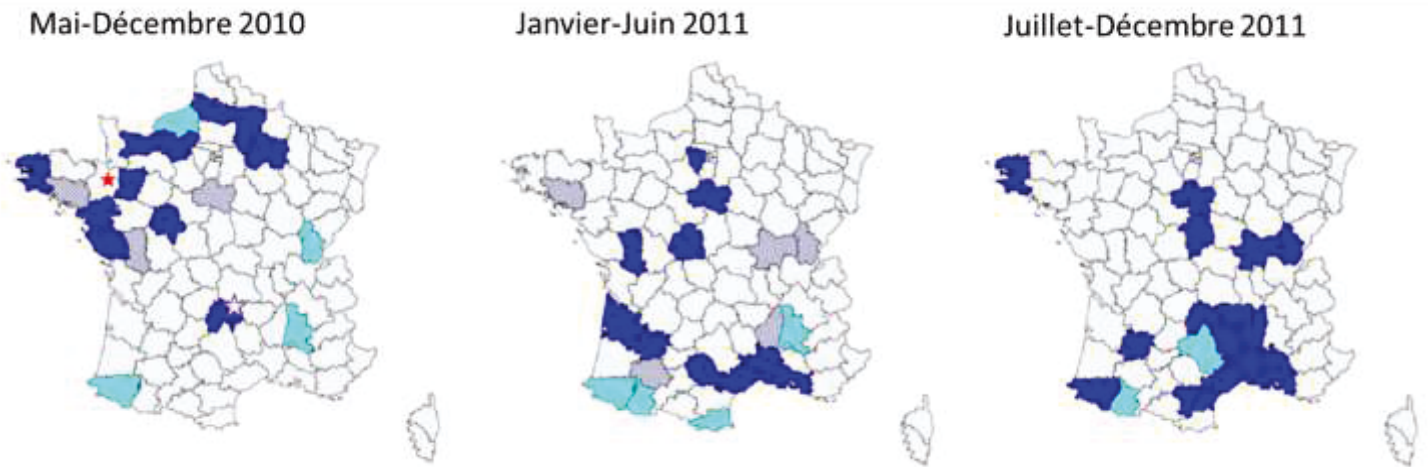
Les résidus différents de la première séquence sont indiqués et les points correspondent aux délétions. Les régions hypervariables V1 à V7 déterminées par (Wang et al., 2013) sont indiquées au-dessus de la première séquence. L'acide aminé S238 (en gras souligné sur la première séquence) correspond au début du domaine de protrusion de la protéine VP60. Les acides aminés mutés chez le RHDV2 et non partagés pas d'autres Lagovirus du lapin sont surlignés en gris.

La plupart des substitutions se localisent dans la partie la plus variable de la protéine de capsid, la région C-terminale, qui constitue le domaine P de la particule et contient de nombreuses régions antigéniques. Cette analyse n'a cependant pas permis de mettre en évidence de recombinaison au sein du gène de la VP60 avec d'autres *Lagovirus*.

4.3 Evolution géographique

Une étude rétrospective basée sur des échantillons collectés en France depuis janvier 2009 montre que les premières apparitions du RHDV2 ont été détectées en avril 2010 dans un élevage du nord de la France et en mai 2010 chez des lapins sauvages du centre de la France (Le Gall-Reculé et al., 2013). Dans les populations sauvages, de mai à décembre 2010 (c'est-à-dire après la première détection du virus), le RHDV2 a été responsable de 74% (25/34) des épizooties de RHD enregistrées. En 2011, le RHDV2 a été responsable de 73% (29/40) des épizooties de RHD enregistrées entre janvier et juin et 95% (41/43) entre juillet et décembre. Le virus a été détecté dans le sud de la France au plus tôt en février 2011, montrant la propagation rapide sur de grandes distances de celui-ci. Chez les lapins domestiques d'élevage, le RHDV2 a été responsable de 93% des épizooties relevées entre octobre 2010 et décembre 2011 (54/58) (Le Gall-Reculé et al., 2013) (Figure 45 et Figure 46).

Figure 45 : Distribution spatiale des épizooties de RHDV dans les populations françaises de lapins sauvages en France en 2010 et 2011.(Le Gall-Reculé et al., 2013)

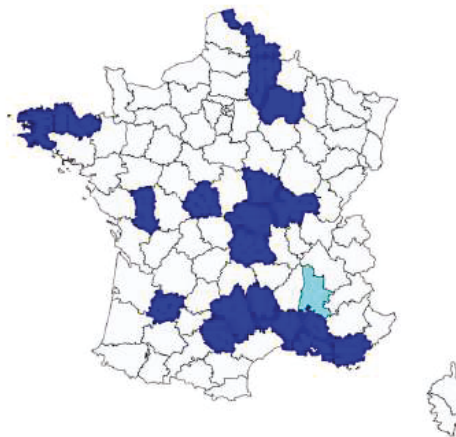


Les données sont regroupées par département. La couleur indique les souches de RHD impliquées dans ces épizooties : bleu clair = RHDV « classique », bleu foncé = RHDV2, quadrillé bleu = RHDV2 + RHDV « classique », blanc = absence de donnée. L'étoile rouge indique le premier foyer de RHDV2 détecté en élevage en avril 2010 ; l'étoile blanche indique le premier foyer de RHDV2 dans les populations sauvages en mai 2010.

Figure 46 : Distribution spatiale des épizooties de RHDV dans les populations françaises de lapins sauvages en France en 2012.(Le Gall-Reculé et al., 2013)

Cette carte a les mêmes caractéristiques que les précédentes.

Janvier-Décembre 2012



Ce virus est ainsi resté non détecté jusqu'à l'apparition en août 2010 des premiers cas de VHD dans des élevages de lapins de chair vaccinés contre la maladie, situés dans le nord et le nord-ouest de la France. Il a ensuite diffusé en quelques mois vers le sud de la France. Cette diffusion rapide est assez spectaculaire et peut s'expliquer par la protection imparfaite des

lapins conférée par les souches classiques de RHDV contre le RHDV2. On remarque que le RHDV2 ne semble pas avoir diffusé à partir du Cantal (premier foyer sauvage connu), ce qui pourrait s'expliquer par la distribution fragmentée des populations de lapins de garenne dans cette région.

Les données montrent que dès 2011, le RHDV2 a remplacé presque en totalité les souches classiques de RHDV dans les populations sauvages. Il en est de même en élevage. Cette constatation est importante à prendre en compte pour la filière cynicole puisque les vaccins commerciaux, développés à partir de souches classiques de RHDV, ont une protection limitée contre le RHDV2. (Le Gall-Recule et al., 2013).

Le manque de protection immunitaire croisée induite par les précédents contacts avec les souches « classiques » a facilité la propagation de la maladie chez les lapins domestiques et sauvages. Dans les années qui ont suivi, la maladie s'est propagée à l'Italie (Puggioni et al., 2013 ; Le Gall-Reculé et al., 2013), l'Espagne (Dalton et al., 2012), le Portugal (Abrantes et al., 2013), l'Angleterre et au Pays de Galles (Westcott et al., 2014), l'Ecosse (Baily et al., 2014) et en Allemagne.

En mai 2015, le virus est détecté en Australie (ACT) et s'est depuis disséminé largement en NSW, SA et VIC (Hall et al., 2015).

Récemment, le RHDV2 a été isolé chez des lapins domestiques et sauvages de l'île de Tenerife (archipel des Canaries). La proximité des îles Canaries avec le continent africain pourrait annoncer la dissémination imminente du virus au nord de celui-ci.

4.4 Nouveaux éléments épidémiologiques

4.4.1 Espèces sensibles

Le virus ne franchit pas seulement les frontières des pays mais également les frontières des espèces et le panel d'espèces sensibles au RHDV2 semble s'être considérablement étendu par rapport à celui du RHDV.

Ainsi, c'est lors d'une épizootie de RHDV2 en Sardaigne (2011) qu'est établi un rapport sur un *Lagovirus* ayant un spectre d'hôtes incluant à la fois *Oryctolagus cuniculus* et une espèce du genre *Lepus*. Un peu plus tard, des symptômes de type EBHS ont été observés chez des lièvres *Lepus capensis mediterranea* suite à leur infection par le RHDV2 (Puggioni et al.,

2013). Un lièvre *Lepus corsicanus* a également été touché en Sicile (Italie) lors d'une épizootie de RHD chez les lapins sauvages cohabitant avec lui (Camarda et al., 2014).

En revanche, si l'espèce *Lepus capensis mediterranea* semble extrêmement sensible, les données épidémiologiques disponibles sur le lièvre européen (*Lepus europaeus*) ne permettent pas encore de tirer de conclusion.

4.4.2 Age

Les lapereaux de moins de 30 jours semblent plus sensibles au RHDV2 qu'au RHDV, des mortalités inhabituelles ayant été observées pour ces individus (Dalton et al., 2012 ; Le Gall-Reculé et al., 2013).

4.4.3 Mortalité

L'infection expérimentale de lapins par le RHDV2 a montré des taux de mortalités inférieurs à ceux obtenus avec les souches de RHDV ou RHDVa et les formes subaigües semblent être plus fréquentes (Le Gall-Reculé et al., 2013).

4.5 Pathogénicité et Propriétés antigéniques

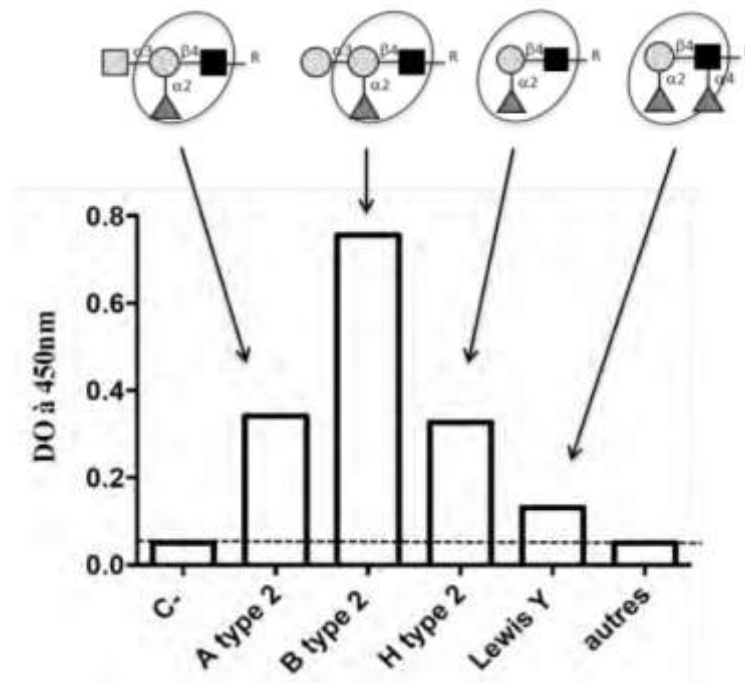
4.5.1 Fixation du RHDV2 aux antigènes tissulaires ABH et de reconnaissance sur les glycanes de duodénum de lapin (Le Gall-Reculé et al., 2015)

Le fait que les lièvres du Cap (*Lepus capensis*) soient hautement sensibles au RHDV2 et insensibles au RHDV indique que les barrières génétiques aux *Lagovirus* au sein des lagomorphes sont contrôlées par seulement quelques facteurs mais que ceux-ci restent inconnus (Puggioni et al., 2013). A l'heure actuelle, les seuls facteurs candidats sont les antigènes des groupes sanguins exprimés à la surface de l'intestin et sur lesquels le RHDV se fixe spécifiquement.

La caractérisation de la fixation aux récepteurs glycosylés a été étudiée pour deux souches RHDV2 (10.28 et 10.32) à partir de pseudo-particules virales recombinantes (VLPs) préparées en système *Baculovirus*. Ces VLPs correspondent à des capsides vides non infectieuses identiques structurellement et antigéniquement aux particules virales. Une série de 50 oligosaccharides synthétiques ont été adsorbés au plastique de plaques ELISA puis incubés en présence des VLPs de chacune des deux souches. La fixation des VLPs a été ensuite quantifiée à l'aide d'anticorps dirigés contre la VP60.

Seuls quatre oligosaccharides ont montré une fixation significative des VLPs. Il s'agit des mêmes structures pour les deux souches de RHDV2 analysées dont le profil de reconnaissance apparaît identique (Figure 47). Les oligosaccharides concernés partagent deux caractéristiques communes. Ils possèdent une structure de base formée par une lactosamine (Gal β 4GlcNAc) et un fucose en position α 1,2 sur le galactose (Gal) de la lactosamine. Cette structure minimale reconnue correspond à l'antigène H type 2 de la famille des antigènes tissulaires de groupe sanguin. La substitution par un galactose en α 1,3, correspondant à l'antigène B type 2, augmente nettement la reconnaissance par le RHDV2, tandis que la substitution par une N-acétylgalactosamine, qui donne l'antigène A type 2, ne change pas le niveau de reconnaissance. En revanche une légère diminution apparaît avec l'addition d'un deuxième résidu fucose en position α 1,3 sur la N-acétylglucosamine de la lactosamine de base (GlcNAc), ce qui donne l'antigène LeY. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance des lapins devrait se faire à peu près indépendamment de leur phénotype ABH puisque les motifs A type 2 et B type 2 sont bien reconnus et qu'en absence de ces motifs, ce sont les motifs H type 2 et éventuellement LeY qui pourront servir de ligand pour le RHDV2.

Figure 47 : Profil de fixation du RHDV2 sur des sucres complexes de type HBGA.



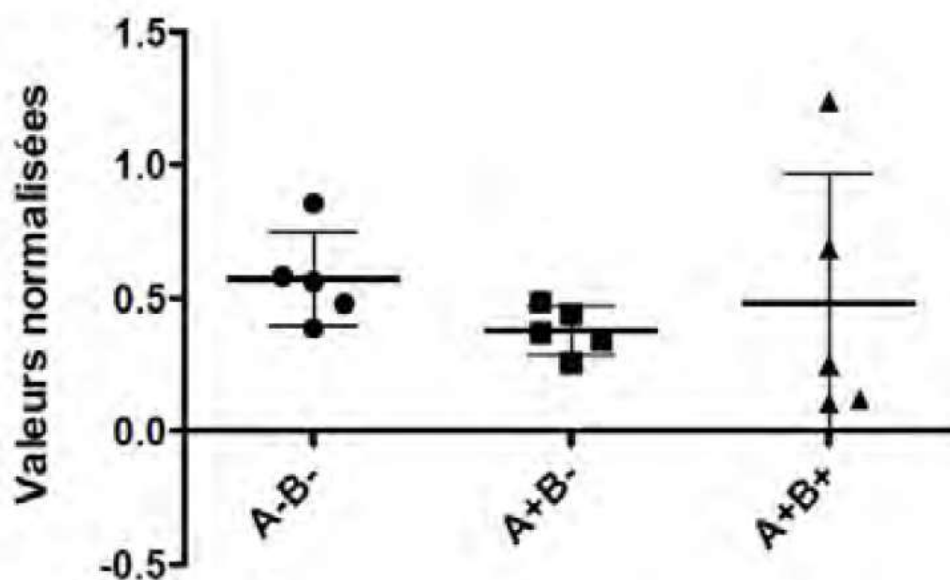
Le contrôle négatif (C-) donne la valeur du bruit de fond du système. Les valeurs obtenues avec l'ensemble des 46 structures de sucres sur lesquelles aucune fixation n'a été observée ont été regroupées (autres). Les 4 valeurs de fixation sur les 4 seules structures reconnues sont montrées. Elles possèdent un motif commun (entouré). Les monosaccharides constituant ces

sucre complexes sont figurés par des symboles. Galactose : rond gris clair ; N-acétylgalactosamine : carré noir ; fucose : triangle gris foncé ; galactose : rond gris clair ; N-acétylgalactosamine : carré gris clair. (Le Gall-Recule et al., 2015)

Pour vérifier cette hypothèse, des préparations de glycanes du duodénum d'une série de lapins ont été immobilisées sur des plaques ELISA. On peut voir sur la Figure 48 que la fixation des VLPs RHDV 10.28 sur ces glycanes se fait indépendamment du groupe ABH des animaux, bien qu'il existe des différences de reconnaissance au niveau individuel.

On note ainsi une différence majeure avec le RHDV, qui de par son pattern de fixation préférentiel sur l'antigène H type 2 provoquait une sélection génétique naturelle des lapins. En effet, dans les zones ayant connu une épizootie de RHD, il a été montré une augmentation de la fréquence de lapins qui exprimaient l'antigène H type 2 de façon diminuée, associée à une augmentation de l'allèle *Sec1* (Ming, Xi, 2010). Cela pourrait expliquer, au moins en partie, la diminution de la sensibilité des lapins aux souches « anciennes » de RHDV au cours du temps et l'échec de leur utilisation comme arme biologique au long cours. Le RHDV2 ne devrait donc pas entraîner ce type de sélection dans les populations d'espèces sensibles.

Figure 48 : Profil de reconnaissance du RHDV2 sur les glycanes de la surface du duodénum de lapins.



Le polymorphisme des antigènes A et B permet de définir 3 sous-groupes de lapins (A-B- ; A+B- et A+B+). Les antigènes H type 2 et Lewis Y servent de précurseurs et sont présents chez tous les animaux testés à des niveaux variables (non montrés). La capacité du virus à reconnaître ces épitopes (voir Figure 47) explique pourquoi les animaux A-B- peuvent être bien reconnus. (Le Gall-Recule et al., 2015)

4.5.2 Profil antigénique

Des études rapportent que plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de capsid VP60 du RHDV ne réagissaient pas avec les virions du RHDV2 (Le Gall-Reculé et al., 2013 ; Puggioni et al., 2013). La première évaluation de ce profil antigénique a été basée sur la réactivité de VLPs de RHDV, RHDV2 et EBHSV avec un panel de trois anticorps monoclonaux dirigés contre des VLPs de RHDV (Bárcena et al., 2015).

Ainsi, l'anticorps Mab 2E7, qui reconnaît un épitope linéaire localisé à la fin de la partie C-terminale de la VP60 (aa positions 549-579), dans le sous domaine P1, réagit avec les trois protéines de capsides de *Lagovirus* testées. L'anticorps Mab 1G5, qui reconnaît un épitope linéaire de la boucle L2 du sous-domaine P2 (aa 326-333), réagit avec les protéines de capsides du RHDV et RHDV2 mais pas avec celles de l'EBHSV. Enfin, Mab 1C9 n'a réagi qu'avec la VP60 du RHDV. Cet anticorps se lie à un épitope conformationnel (il ne réagit pas si la VP60 est dénaturée, ou si la VP60 a subi des insertions / délétions et qu'il manque la séquence PGNNAT, qui correspond aux aa 305-310 de celle-ci) (Bárcena et al., 2015).

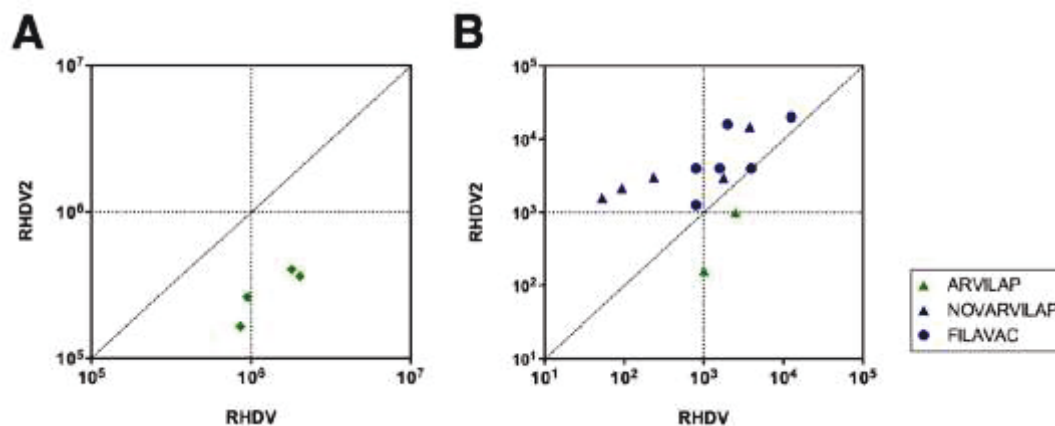
Ces résultats sont cohérents avec les données disponibles sur les séquences des protéines de capsides connues chez les *Lagovirus*, qui montrent que les régions reconnues par les anticorps monoclonaux 2E7 et 1G5 sont relativement conservées au sein des *Lagovirus* testés, alors que la séquence correspondant aux aa 305-310 est incluse dans la région hypervariable V1, connue pour être un site majeur de neutralisation (Wang et al., 2013). Ces résultats suggèrent donc que l'anticorps Mab 1C9 cible un épitope important sur la capsid du RHDV, absent de celle du RHDV2 et qui mérite donc une caractérisation plus précise.

La suite de l'étude de (Bárcena et al., 2015) consiste en l'évaluation des différences de réaction de sérum de lapins en présence de RHDV ou RHDV2. Pour cela, des sérums hyperimmuns dirigés contre des VLPs de RHDV ont été testés par ELISA indirect à la fois contre des VLPs de RHDV et RHDV2. Tous les sérums testés ont montré des titres supérieurs en anticorps anti-VLPs de RHDV (leur antigène apparenté) par rapport aux VLPs de RHDV2 (Figure 49 A).

La même évaluation a également été réalisée à partir de sérums de lapins, 21 jours après vaccination contre le RHDV (vaccin ARVILAP, laboratoires Ovejero, Espagne) ou le RHDV2 (vaccin NOVARVILAP, laboratoires Ovejero, Espagne ou FILAVAC VHD VARIANT, Filavie,

France). Tous les animaux ont développé des réponses spécifiques en anticorps qui étaient significativement supérieures pour l'antigène apparenté (Figure 49 B). L'ensemble de ces résultats montrent qu'il existe une différence marquée entre l'antigénicité des deux capsides, en cohérence avec le manque de protection efficace observé lors de l'utilisation des vaccins RHDV contre le RHDV2.

Figure 49 : Réponse an anticorps chez des lapins vaccinés contre le RHDV et le RHDV2 (ELISA indirect)(Bárcena et al., 2015)



A) Titres de sérums (n=4) issu de lapins immunisés avec des VLPs de RHDV. Chaque échantillon est représenté sur le graphique par un point ayant pour coordonnées sur l'axe x son titre pour le RHDV et sur l'axe y celui pour le RHDV2. Pour la détermination des titres de chaque sérum, des dilutions en séries ont été effectuées à partir de 1/10 000 et répétées 3 fois par échantillon, puis le test ELISA a été mis en œuvre contre le RHDV et le RHDV2 séparément. La densité optique a été corrigée par celle du blanc

B) Titres de sérums de lapins âgés de 8 semaines vaccinés avec ARVILAP (n=2) ou âgés de 4 semaines vaccinés avec FILAVAC (n=2) ou NOVARVILAP (n = 5), respectivement. Le test ELISA a été effectué de la même manière qu'en A), avec des dilutions commençant à 1/30.

5 Hypothèses évolutives et évènements recombinants

L'émergence de la pathogénicité chez les *Lagovirus* est particulièrement intéressante car elle a généré des virus à pathogénicité exceptionnelle à plusieurs reprises au cours des 40 dernières années, sans que les mécanismes évolutifs ne soient élucidés. Deux hypothèses majeures sont évoquées dans la littérature :

- Emergence du pouvoir pathogène à partir de souches initialement non pathogènes par mutations ponctuelles ou recombinaisons homologues,

- Saut d'espèces.

La suite de cette partie a pour objet de mettre en évidence les éléments favorables et défavorables à chacune de ces hypothèses à partir de la bibliographie disponible pour le RHDV2.

5.1 Augmentation de la pathogénicité à partir de souches apathogènes par mutations ponctuelles

L'hypothèse d'une évolution progressive vers la pathogénicité de souches non pathogènes est partagée par certains auteurs. Celle-ci s'appuie sur la détection d'anticorps anti-RHDV dans des échantillons de sang de lapins collectés avant la première épizootie de RHDV documentée en Europe et en Australie, suivie par la caractérisation de plusieurs souches de virus non pathogènes chez les lapins Européens. Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée pour le moment et ne parviendrait pas à expliquer l'émergence brutale d'une forte pathogénicité observée à plusieurs reprises (Esteves et al., 2015).

Pourtant, un changement de neuf acides aminés a été identifié entre les formes virulentes (RHDV) et les formes avirulentes des virus (RCV-A1 / E). Il serait donc intéressant de tester expérimentalement ces changements pour déterminer s'ils jouent un rôle dans les changements de virulence et de tropisme tissulaire. Des études chez les *Norovirus* murins (appartenant aussi à la famille des *Caliciviridae*) ont montré que le simple changement d'un acide aminé dans la protéine NS 1/2 (équivalente à p16/p23) ou dans le domaine P2 de la protéine de capsid pouvait entraîner des changements de tropisme tissulaire et virulence respectivement (Mahar et al., 2016).

Malgré tout, les souches pathogènes et non pathogènes connues à ce jour sont phylogénétiquement séparées et montrent une divergence nucléotidique d'environ 20% pour le gène de capsid. Cela suggère donc que les formes pathogènes n'ont pas pour origine directe les formes non pathogènes. Néanmoins, les souches apathogènes n'ayant pas été exhaustivement caractérisées chez les léporidés européens, on peut penser que les ancêtres des souches pathogènes n'ont pas encore été décrits (Esteves et al., 2015).

5.2 Augmentation de la pathogénicité à partir de souches apathogènes par recombinaisons homologues

Chez les virus à ARN, la majorité de la diversité génétique est produite lors la réplication de l'ARN, par des mutations ponctuelles induites en raison de l'absence d'activité de correction des erreurs des RdRp. Il apparait cependant que des recombinaisons ont un impact plus profond sur l'apparition de propriétés conférant un avantage sélectif (Lai, 1992).

Il est donc possible que des virus virulents aient émergé suite à des recombinaisons génétiques, notamment des recombinaisons homologues. Comme elles requièrent un saut de matrice, les recombinaisons homologues d'ARN impliquent généralement des régions avec des séquences fortement semblables entre les deux molécules d'acides nucléiques initiales (Simon-Loriere, Holmes, 2011). La circulation de plusieurs souches proches de RHDV sur une même zone géographique est donc un prérequis pour qu'il y ait recombinaison. Or, on sait aujourd'hui que plusieurs souches apparentées au RHDV ont pu co-circuler pendant plusieurs années sans causer d'infection apparente (Forrester et al., 2007, 2009).

La première preuve de recombinaison homologue chez les *Lagovirus* a été apportée en 2008 suite à la caractérisation de la souche *Hartmannsdorf* qui possède différents profils phylogénétiques en fonction de la région de capsidex examinée (Abrantes et al., 2008). Par la suite, il a été mis en évidence que la souche initialement identifiée en chine en 1984 avait connu des changements de virulence en parti dus à des recombinaisons (Forrester et al., 2008).

Depuis, l'analyse complète du génome du RHDV2 a révélé plusieurs évènements de recombinaison. Cette étude, basée sur 27 séquences complètes collectées entre 1994 et 2014 dans les populations de lapins sauvages portugais et dans des élevages espagnols, a pu mettre en évidence plusieurs recombinaisons pour les échantillons les plus récents. Les virus recombinants incluent toujours les protéines structurales du RHDV2 avec des protéines non structurales de *Lagovirus* non pathogènes ou pathogènes du génogroupe G1 (Lopes et al., 2015).

Les résultats montrent que les recombinaisons sont présentes chez plusieurs souches de RHDV2 récentes avec un appui statistique fort (P values <<< 0.001, Tableau 2). Le

« breakpoint » a été localisé dans une région du génome proche du codon d'initiation de la VP60, ce qui a été confirmé par l'analyse SimPlot (Figure 50).

Tableau 2 : Résultats de l'analyse des recombinaisons (Lopes et al., 2015)

Table 1. Results of the recombination analysis

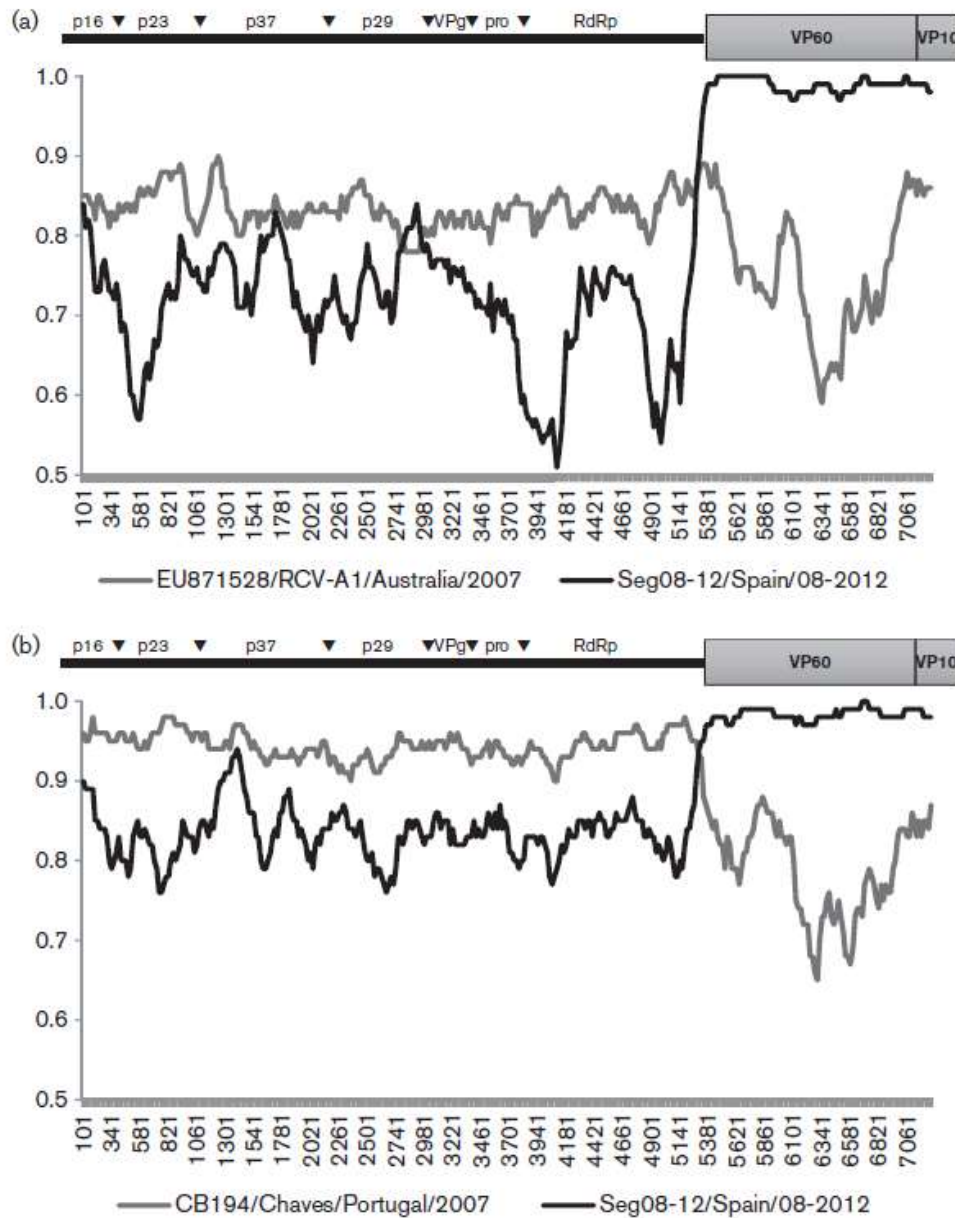
Recombinant strains	Most likely 'parental' strain		Genogroup		Breakpoint†	Average P value		
	NS*	VP60 and VP10	NS*	VP60 and VP10		RDP	GENECONV	BootScan
CBAAnd1/Spain/04-2012	EU871528/RCV-A1/	Seg08-12/Spain/	NP‡	RHDVb	5305	4.272×10^{-125}	2.898×10^{-132}	2.971×10^{-137}
CBMontemor14-1/Portugal/02-2014	Australia/2007	08-2012			(5267-5326)			
CBEstói13-7/Portugal/12-2013								
CBMora14-1/Portugal								
CBEstremoz14-1/Portugal/01-2014 CBEstremoz14-3/Portugal								
CBLavra10-13-1/Portugal/10-2013 CBA Algarve1/Portugal/01-2013 CBA Algarve3/Portugal/01-2013								
Barrancos7-13/Portugal/01-2013								
Barrancos10A-13/Portugal/01-2013 CBCoruche14-1/Portugal								
CBCoruche14-2/Portugal/02-2014								
CBMertola14-2/Portugal/01-2014 CBMertola14-1/Portugal/01-2014 CBA Algarve14-1/Portugal	JX886001/CB194/Chaves/	Seg08-12/Spain/	G1	RHDVb	5336	6.283×10^{-109}	3.610×10^{-106}	6.316×10^{-109}
CBA Algarve14-3/Portugal CBA Algarve14-4/Portugal	Portugal/2006	08-2012			(5264-5343)			

*Non-structural proteins.

†99 % confidence interval is indicated.

‡Non-pathogenic strain.

Figure 50 : Similarity plot pour deux types de RHDV2 recombinants (Lopes et al., 2015)



A) CBA Algarve1/Portugal/01-2013 (non-pathogenic Lagovirus/ RHDVb)

B) CBA Algarve14-1/Portugal (G1/RHDVb).

L'axe vertical représente le pourcentage d'identité de séquence de chaque souche parentale (lignes grises et noirs) avec le virus recombinant. L'axe horizontal indique la position des nucléotides. Le site où les souches parentales sont identiques avec le recombinant est le breakpoint potentiel. Le schéma de l'organisation du génome est indiqué au-dessus avec les protéines correspondantes (pro = protéase) ; les têtes de flèches indiquent les sites de clivage.

De plus, les séquences complètes de RHDV2 montrent quelques variations de longueur dues principalement à des délétions dans les régions codant pour les protéines non structurales NS1/p16 et NS3/p37. Bien que le rôle biologique de NS1/p16 soit inconnu, il a été récemment montré qu'un grand nombre de mutations dans cette protéine pouvait être associé à une virulence augmentée (Elsworth et al., 2014).

On notera par ailleurs que seul le RHDV2 était présent entre 2012 et 2014, supposant qu'il ait remplacé le groupe G1 implanté localement, ce qui signifierait qu'il possède un avantage sélectif sur les autres souches.

Cependant, il n'existe pour l'instant aucune preuve que ces recombinaisons induisent un changement de virulence et de tropisme tissulaire. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la souche américaine semi-pathogène (MRCV) a un historique recombinant avec les gènes des protéines non structurales d'un RCV-A1 et un gène de VP60 d'un RCV-E. Il est donc peu probable que cette recombinaison entre deux virus bénins à tropisme entérique soit responsable de l'apparition du tropisme hépatique, d'autant plus que les RHDV2 recombinants possédant les gènes non structuraux du RCV-A1 ont un phénotype inchangé (Mahar et al., 2016).

Cela favorise l'hypothèse que se sont les mutations ponctuelles, plutôt que les recombinaisons qui seraient responsables des changements de virulence et de tropismes chez les *Lagovirus*.

5.3 Saut d'espèce cible

Cette seconde hypothèse implique un saut d'espèce à partir d'espèces sympatriques avec les léporidés européens, qu'ils soient natifs ou introduits par l'Homme. Parmi ces espèces, la plus notable est le lapin « cotontail » (*Sylvilagus floridanus*), un léporidé originaire d'Amérique du Nord. Bien qu'aucune donnée ne soit disponible sur la présence des *Lagovirus* chez cette espèce, ils auraient probablement pu passer inaperçu, en causant une infection asymptomatique chez leurs hôtes naturels. Puis, de manière similaire à ce qui a été observé pour la virus de la myxomatose, il est possible que l'infection bénigne dans l'espèce *Sylvilagus* devienne une infection létale chez les lapins européens après le saut d'espèce.

Ainsi, il est intéressant de remarquer que le RHDV et l'EBHSV ont émergé à la même époque et que celle-ci correspond à l'introduction du lapin « cotontail » en Europe. Un grand

nombre de lapins « cotontail » ont été introduits en Europe depuis les années 1960 mais leur caractère illégal fait que cela est très peu connu. La première introduction connue à partir d'individus des Etats Unis a eu lieu en Italie en 1966. Elle a été suivie par des introductions massives de plusieurs milliers d'individus, plus particulièrement en France et en Italie (Esteves et al., 2015).

Aussi, dans la vallée italienne du Pô, où les lapins « cotontail » sont aujourd'hui invasifs, une étude sérologique a montré que 18% et 33% d'entre eux étaient porteurs d'anticorps anti-RHDV et anti-EBHV respectivement, ce qui montre la réceptivité de cette espèce aux *Lagovirus* (Lavazza et al., 2015). Dans cette même étude, la capacité des *Lagovirus* à « sauter » entre les espèces de léporidés a été établie puisque sur quatre lapins « cotontail » inoculés avec l'EBHSV, un cas de mortalité attribué à ce virus a été obtenu et qu'une séroconversion massive a été observée pour deux survivants sur trois (titres en IgM > 1/40 000 et anticorps spécifiques totaux > 1 /1 280). Ces résultats ne font que confirmer les observations de terrain de 1996 et 1998 qui avaient mis en évidence des souches de RHDV entraînant des lésions compatibles avec la RHD chez les lièvres ibériques (*Lepus granatensis*) puis chez le lièvre de Sardaigne (*Lepus capensis mediterraneus*) et le lièvre italien (*Lepus corsicanus*) dans les années 2010 (Puggioni et al., 2013 ; Camarda et al., 2014).

Ainsi, lors d'une épizootie de RHDV2 observée simultanément chez *Lepus capensis mediterraneus* et les lapins, des prélèvements de virus ont révélé une séquence en aa de VP60 identique à 100% chez les deux espèces, prouvant ainsi qu'elles étaient affectées par un agent étiologique unique (Puggioni et al., 2013).

5.4 En réalité, que s'est-il passé ?

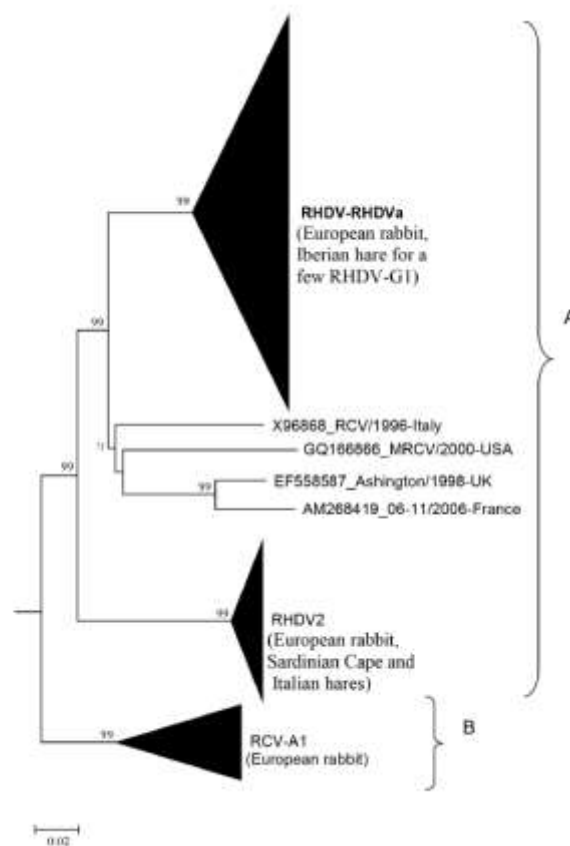
En prenant en compte l'ensemble des données précédentes, on peut donc penser que les léporidés européens sont porteurs de *Lagovirus* d'origines distinctes : des souches ayant évolué avec ces espèces pendant une longue période et un second groupe, qui a potentiellement émergé à la suite d'un saut d'espèce à partir de *Sylvilagus floridanus* (Figure 51) (Esteves et al., 2015). Les souches pathogènes auraient pu émerger suite à ce saut d'espèce.

Cependant, certains auteurs pensent que cette hypothèse est peu probable. En effet, comme toutes les séquences de RHDV se regroupent dans la diversité des souches de *O.*

cuniculus, la reconstruction la plus parcimonieuse à partir de la phylogénie actuelle est que le RHDV provient d'une virus RCV-like de *O. cuniculus*. En conséquence, si *S. floridanus* était la vraie source de RHDV, cela voudrait dire qu'il y aurait un *Lagovirus* de *S. floridanus* s'incluant dans la diversité des virus de *O. cuniculus*. Cela implique à son tour que des virus bénins de *O. cuniculus* se seraient rependus en Amérique, qu'ils auraient eu la capacité à infecter *S. floridanus* et connu une augmentation de virulence, puis soient revenus en Europe en tant que RHDV. Un tel scénario évolutif semble peu probable (Mahar et al., 2016).

Une piste reste inexplorée : compte tenu de la distance temporelle entre l'émergence du RHDV et celle du RHDV2, ne pourraient-ils pas être en fait deux événements complètement indépendants ?

Figure 51 : Origine possible des Lagovirus du lapin européen (*O.cuniculus*), d'après l'hypothèse d'un saut d'espèce (Esteves et al., 2015)



A) Lagovirus pouvant partager des ancêtres communs après un (des) saut(s) d'espèces. B) Virus non pathogènes ayant évolué chez les lapins européens sur une longue période. Cet arbre phylogénétique a été réalisé à partir de 303 séquences du gène de la VP60 de disponibles dans les bases de données publiques (mai 2015) pour les Lagovirus du lapin. Le nom des espèces de léporidés chez lesquelles ont été isolées ces souches est donné entre parenthèses.

Conclusion

Les *Lagovirus* sont les calicivirus des lagomorphes découverts dans les années 1980. En induisant une hépatite fulminante, les souches les plus virulentes sont capables de provoquer la mort de nombreux lapins (RHDV) ou lièvres (EBHSV) en quelques heures.

Depuis sa découverte, ce genre a montré qu'il était capable d'évoluer d'un point de vue pathogénicité, tropisme tissulaire et spécificité d'espèce. Cette caractéristique est liée au génome de ces virus composé d'ARN, qui suite à des mutations mineures peut entraîner des changements de phénotypes majeurs. Ce génome connaît, pour le virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV) un taux d'évolution virale estimé à environ 3.0×10^{-3} substitutions/site/an. Il est probable que ces mutations ponctuelles aient conduit à des changements de tropisme tissulaire et de virulence, alors que des recombinaisons homologues permettent une augmentation de la diversité génétique, pouvant être en lien avec des sauts d'espèces.

Ainsi, le RHDV2, un nouveau variant du virus, découvert en France en 2010 et ayant causé des mortalités inhabituelles dans les populations de lapins sauvages et d'élevages vaccinées s'est révélé mortel pour les lièvres. S'agit-il alors d'un saut d'espèces ou bien existe-t-il un continuum d'espèces pour l'instant inconnues entre ces deux virus considérés jusqu'ici différents ?

Rapidement, ce nouveau virus a remplacé les anciens sur de nombreux territoires, montrant qu'il possède probablement un avantage sélectif. Celui-ci pourrait être en lien avec sa capacité à se fixer sur des types de récepteurs de la muqueuse intestinale qui sont constitués par les antigènes du groupe sanguin (alors que le RHDV se fixait préférentiellement sur l'antigène H type 2).

Malgré ce contexte évolutif vers la virulence, le gouvernement australien a pour projet d'autoriser la libération d'une nouvelle souche sur son territoire (RHDV K5) comme agent de biocontrôle de *O. cuniculus* considéré comme ravageur. Cette souche serait plus efficace que la souche utilisée depuis 1996, car plus adaptée aux régions froides et humides de l'Australie. Ce projet soulève alors un questionnement sur les risques liés à une nouvelle introduction. En effet, même si, jusqu'alors il n'y a pas de preuve d'infection pathogène pour les espèces autres

que lagomorphes, l'échappement du virus vers les espèces d'intérêt pourrait avoir de lourdes conséquences écologiques et économiques dans le monde entier.

En conséquence, l'étude des mécanismes évolutifs de ces virus ainsi que le suivi des souches rencontrées sur le terrain constitue un travail important, en permettant de pouvoir anticiper de nouvelles épizooties voire l'émergence d'un éventuel potentiel zoonotique.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BOUSSIGNAC Maxime** intitulée « **Emergence et évolution des Lagovirus.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 2015
Professeur Stéphane BERTAGNOLI
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN




Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRÉ-OBRECHT



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Bibliographie

ABRANTES, J., ESTEVES, P. J. et VAN DER LOO, W., 2008. Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). In : *Archives of Virology*. février 2008. Vol. 153, n° 2, p. 329-335.

ABRANTES, J., LOPES, Ana M., DALTON, Kevin P., MELO, Pedro, CORREIA, Jorge J., RAMADA, Margarida, ALVES, Paulo C., PARRA, Francisco et ESTEVES, Pedro J., 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. In : *Emerging Infectious Diseases*. 2013. Vol. 19, n° 11, p. 1900-1902.

ABRANTES, J., VAN DER LOO, Wessel, LE PENDU, Jacques et ESTEVES, Pedro J., 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) : a review. In : *Vet Res*. 2012. Vol. 43, n° 1, p. 12.

ALHATLANI, B., VASHIST, S et GOODFELLOW, I., 2015. Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. In : *Virus Research*. août 2015. Vol. 206, p. 134-143.

AUGUSTYNIAK, M., 2006. *Les Calicivirus félins (FCV) : Variabilité génétique et pathologique*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire. S.l. : ENVT.

BAILEY, D., KAISER, W. J., HOLLINSHEAD, M., MOFFAT, K., CHAUDHRY, Y., WILEMAN, T., SOSNOVTSEV, S. V. et GOODFELLOW, I. G., 2010. Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. In : *Journal of General Virology*. 1 mars 2010. Vol. 91, n° 3, p. 739-749.

BAILY, J.L, DAGLEISH, M. P., GRAHAM, M., MALEY, M. et ROCCHI, M. S., 2014. RHDV variant 2 presence detected in Scotland. In : *The Veterinary Record*. 19 avril 2014. Vol. 174, n° 16, p. 411.

BÁRCENA, J., GUERRA, B., ANGULO, I., GONZÁLEZ, J., VALCÁRCEL, F., MATA, C.P., CASTÓN, J.R., BLANCO, E. et ALEJO, A., 2015. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. In : *Veterinary Research*. 2015. Vol. 46, n° 1.

BELZ, K., 2004. Rabbit hemorrhagic disease. In : *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. avril 2004. Vol. 13, n° 2, p. 100-104.

BERGIN, I.L., WISE, A. G., BOLIN, S. R., MULLANEY, T. P., KIUPEL, M. et MAES, R.K., 2009. Novel Calicivirus Identified in Rabbits, Michigan, USA. In : *Emerging Infectious Diseases*. décembre 2009. Vol. 15, n° 12, p. 1955-1962.

BHELLA, D. et GOODFELLOW, I. G., 2011. The Cryo-Electron Microscopy Structure of Feline Calicivirus Bound to Junctional Adhesion Molecule A at 9-Angstrom Resolution Reveals Receptor-Induced Flexibility and Two Distinct Conformational Changes in the Capsid Protein VP1. In : *Journal of Virology*. 1 novembre 2011. Vol. 85, n° 21, p. 11381-11390.

BOOTS, M., HUDSON, P. J. et SASAKI, A., 2004. Large shifts in pathogen virulence relate to host population structure. In : *Science (New York, N.Y.)*. 6 février 2004. Vol. 303, n° 5659, p. 842-844.

CAMARDA, A., PUGLIESE, N., CAVADINI, P., CIRCELLA, E., CAPUCCI, L., CAROLI, A., LEGRETTO, M., MALLIA, E. et LAVAZZA, A., 2014. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). In : *Research in Veterinary Science*. décembre 2014. Vol. 97, n° 3, p. 642-645.

CANCELLOTTI, F. M. et RENZI, M., 1991. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. In : *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. juin 1991. Vol. 10, n° 2, p. 409-422.

CAPUCCI, L., FUSI, P., LAVAZZA, A., PACCIARINI, M.L. et ROSSI, C., 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. In : *Journal of Virology*. 1996. Vol. 70, n° 12, p. 8614–8623.

CARSTENS, E. B., 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). In : *Archives of Virology*. janvier 2010. Vol. 155, n° 1, p. 133-146.

CAUL, E. O. et APPLETON, H., 1982. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. In : *Journal of Medical Virology*. 1982. Vol. 9, n° 4, p. 257-265.

CHAUDHRY, Y., NAYAK, A., BORDELEAU, M.-E., TANAKA, J., PELLETIER, J., BELSHAM, G. J., ROBERTS, L. O. et GOODFELLOW, I. G., 2006. Caliciviruses Differ in Their Functional Requirements for eIF4F Components. In : *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, n° 35, p. 25315-25325.

CHEN, L., LIU, G., NI, Z., YU, B., YUN, T., SONG, Y., HUA, J., LI, S. et CHEN, J., 2009. Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60. In : *Journal of General Virology*. 1 décembre 2009. Vol. 90, n° 12, p. 2952-2955.

CHEN, S-Y., CHOU, C-C., LIU, C-I. et SHIEN, J-H., 2008. Impairment of Renal Function and Electrolyte Balance in Rabbit Hemorrhagic Disease. In : *Journal of Veterinary Medical Science*. 2008. Vol. 70, n° 9, p. 951–958.

CHEN, S-Y., SHIEN, J-H. et OOI, H-K., 2008. Hyperlipidemia in rabbit hemorrhagic disease. In : *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 2008. Vol. 57, n° 5, p. 479-483.

CHIARI, M., FERRARI, N., GIARDIELLO, D., AVISANI, D., ZANONI, M., ALBORALI, G.L., LANFRANCHI, P., GUBERTI, V., LORENZO, C. et LAVAZZA, A., 2014. Temporal dynamics of European brown hare syndrome infection in Northern Italian brown hares (*Lepus europaeus*). In : *European Journal of Wildlife Research*. décembre 2014. Vol. 60, n° 6, p. 891-896.

CHUNG, L., BAILEY, D., LEEN, E.O, EMMOTT, E.P, CHAUDHRY, Y., ROBERTS, Lisa O., CURRY, S., LOCKER, N. et GOODFELLOW, Ian G., 2014. Norovirus Translation Requires an Interaction between the C Terminus of the Genome-linked Viral Protein VPg and Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. In : *Journal of Biological Chemistry*. 1 août 2014. Vol. 289, n° 31, p. 21738-21750.

CLARKE, I. N. et LAMBDEN, P. R., 1997. The molecular biology of caliciviruses. In : *Journal of General Virology*. 1997. Vol. 78, n° 2, p. 291–301.

CLAY, S., MAHERCHANDANI, S., MALIK, Y.S. et GOYAL, S.M., 2006. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. In : *American Journal of Infection Control*. février 2006. Vol. 34, n° 1, p. 41-43.

CLOET, J., 2012. *Identification de nouveaux lagovirus non pathogènes apparentés au virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV), isolés dans les populations de lapins sauvages de l'archipel des Kerguelen*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire. S.I. : ENVT.

COOKE, B. D., 2002. Rabbit haemorrhagic disease : field epidemiology and management. In : *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2002. n° 21 (2), p. 347-358.

COOKE, B. D., MCPHEE, S., ROBINSON, A. J. et CAPUCCI, L., 2002. Rabbit haemorrhagic disease: does a pre-existing RHDV-like virus reduce the effectiveness of RHD as a biological control in Australia? In : *Wildlife Research*. 2002. Vol. 29, n° 6, p. 673.

COOKE, B.D., 2013. Rabbits: manageable environmental pests or participants in new Australian ecosystems? In : *Wildlife Research*. 2013. Vol. 39, n° 4, p. 279.

COOKE, B.D., ROBINSON, A.J., MERCHANT, J. C., NARDIN, A. et CAPUCCI, L., 2000. Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. In : *Epidemiology and Infection*. 2000. Vol. 124, n° 3, p. 563–576.

DALTON, K.P., NICIEZA, I., BALSEIRO, A., MUGUERZA, M.A., ROSELL, J.M., CASAIS, R., ÁLVAREZ, A.L. et PARRA, F., 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. In : *Emerging infectious diseases*. 2012. Vol. 18, n° 12, p. 2009.

DI FELICE, E., MAUROY, A., POZZO, F.D., THIRY, D., CECI, C., DI MARTINO, B., MARSILIO, F. et THIRY, E., 2016. Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis. In : *The Veterinary Journal*. 2016. Vol. 207, p. 53-62.

DI GIALONARDO, F. et HOLMES, E.C., 2015. Viral biocontrol: grand experiments in disease emergence and evolution. In : *Trends in Microbiology*. février 2015. Vol. 23, n° 2, p. 83-90.

DI MARTINO, B., DI PROFIO, F., MARTELLA, V., CECI, C. et MARSILIO, F., 2011. Evidence for recombination in neboviruses. In : *Veterinary Microbiology*. décembre 2011. Vol. 153, n° 3-4, p. 367-372.

DOULTREE, J.C., DRUCE, J.D., BIRCH, C.J., BOWDEN, D.S. et MARSHALL, J.A., 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. In : *Journal of Hospital Infection*. janvier 1999. Vol. 41, n° 1, p. 51-57.

DREWS, B., SZENTIKS, C.A., ROELLIG, K., FICKEL, J., SCHROEDER, K., DUFF, J.P., LAVAZZA, A., HILDEBRANDT, T.B. et GOERITZ, F., 2011. Epidemiology, control and management of an EBHS outbreak in captive hares. In : *Veterinary Microbiology*. décembre 2011. Vol. 154, n° 1-2, p. 37-48.

DUARTE, M.D., CARVALHO, C.L., BARROS, S.C., HENRIQUES, A.M., RAMOS, F., FAGULHA, T., LUÍS, T., DUARTE, E.L. et FEVEREIRO, M., 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). In : *Journal of Virological Methods*. 2015. Vol. 219, p. 90-95.

DUFF, J. P., CHASEY, D., MUNRO, R. et WOOLDRIDGE, M., 1994. European brown hare syndrome in England. In : *The Veterinary Record*. 25 juin 1994. Vol. 134, n° 26, p. 669-673.

EDEN, J-S., KOVALISKI, J., DUCKWORTH, J.A., SWAIN, G., MAHAR, J.E., STRIVE, T. et HOLMES, E.C., 2015. Comparative Phylodynamics of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Australia and New Zealand. In : SANDRI-GOLDIN, R. M. (éd.), *Journal of Virology*. 15 septembre 2015. Vol. 89, n° 18, p. 9548-9558.

EDEN, J-S., READ, A.J., DUCKWORTH, J.A., STRIVE, T. et HOLMES, E.C., 2015. Resolving the Origin of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Insights from an Investigation of the Viral Stocks Released in Australia. In : SCHULTZ-CHERRY, S. (éd.), *Journal of Virology*. 1 décembre 2015. Vol. 89, n° 23, p. 12217-12220.

ELSWORTH, P., COOKE, B.D., KOVALISKI, J., SINCLAIR, R., HOLMES, E.C. et STRIVE, T., 2014. Increased virulence of rabbit haemorrhagic disease virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). In : *Virology*. septembre 2014. Vol. 464-465, p. 415-423.

ESCUADERO-ABARCA, B.I., RAWSTHORNE, H., GOULTER, R.M., SUH, S.H. et JAYKUS, L.A., 2014. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? In : *Food Microbiology*. août 2014. Vol. 41, p. 91-95.

ESTEVEZ, P., LOPES, A., MAGALHÃES, M., PINHEIRO, A., GONÇALVES, D. et ABRANTES, J., 2014. Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Detected in Pico, Azores, Portugal, Revealed a Unique Endemic Strain with More Than 17 Years of Independent Evolution. In : *Viruses*. 14 juillet 2014. Vol. 6, n° 7, p. 2698-2707.

ESTEVEZ, P.J., ABRANTES, J., BERTAGNOLI, S., CAVADINI, P., GAVIER-WIDÉN, D., GUITTON, J-S., LAVAZZA, A., LEMAITRE, E., LETTY, J., LOPES, A.M., NEIMANIS, Aleksija S., RUVOËN-CLOUET, Nathalie, LE PENDU, Jacques, MARCHANDEAU, Stéphane et LE GALL-RECUÉ, Ghislaine, 2015. Emergence of Pathogenicity in Lagoviruses: Evolution from Pre-existing Nonpathogenic Strains or through a Species Jump ? In : RALL, Glenn F (éd.), *PLOS Pathogens*. 5 novembre 2015. Vol. 11, n° 11, p. e1005087.

FASTIER, L. B., 1957. A new feline virus isolated in tissue culture. In : *American Journal of Veterinary Research*. 1957. Vol. 18, n° 67, p. 382-389.

- FENNER, F., 2010. Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia. In : *Revue scientifique et technique*. 2010. Vol. 29, n° 1, p. 103.
- FERREIRA, P. G., COSTA-E-SILVA, A., MONTEIRO, E., OLIVEIRA, M. J. R. et ÁGUAS, A. P., 2006. Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). In : *Veterinary research communications*. 2006. Vol. 30, n° 4, p. 393–401.
- FERREIRA, P.G., COSTA-E-SILVA, A., OLIVEIRA, M.J.R., MONTEIRO, E. et ÁGUAS, A.P., 2005. Leukocyte–hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. février 2005. Vol. 103, n° 3-4, p. 217-221.
- FERREIRA, P.G., COSTA-E-SILVA, A., OLIVEIRA, M.J.R., MONTEIRO, E., CUNHA, E.M et ÁGUAS, A.P., 2006. Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. In : *Research in Veterinary Science*. avril 2006. Vol. 80, n° 2, p. 218-225.
- FERREIRA, P.G., DINÍS, M., COSTA-E-SILVA, A. et ÁGUAS, A.P., 2008. Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008. Vol. 121, n° 3-4, p. 364-369.
- FORRESTER, N.L., BOAG, B., BUCKLEY, A., MOUREAU, G. et GOULD, E.A., 2009. Co-circulation of widely disparate strains of Rabbit haemorrhagic disease virus could explain localised epidemicity in the United Kingdom. In : *Virology*. 2009. Vol. 393, n° 1, p. 42-48.
- FORRESTER, N.L., MOSS, S.R., TURNER, S.L., SCHIRRMIEIER, H. et GOULD, E.A., 2008. Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: Possible impact on evolution and epidemiology. In : *Virology*. juillet 2008. Vol. 376, n° 2, p. 390-396.
- FORRESTER, N.L., TROUT, R.C. et GOULD, E.A., 2007. Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. In : *Virology*. 2007. Vol. 358, n° 1, p. 18-22.
- FRÖLICH, K., FICKEL, J., LUDWIG, A., LIECKFELDT, D., STREICH, W.J., JURČÍK, R., SLAMEČKA, J. et WIBBELT, G., 2007. New variants of european brown hare syndrome virus strains in free-ranging european brown hares (*Lepus europaeus*) from slovakia. In : *Journal of Wildlife Diseases*. janvier 2007. Vol. 43, n° 1, p. 89-96.
- FRÖLICH, K. et LAVAZZA, A., 2008. European Brown Hare Syndrome. In : *Lagomorph biology: evolution, ecology, and conservation*. Berlin ; New York : Springer. p. 253-261. ISBN 978-3-540-72445-2. QL737.L3 L34 2008
- FUCHS, A. et WEISSENBOCK, H., 1992. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). In : *Journal of Comparative Pathology*. 1992. Vol. 107, n° 1, p. 103-113.
- GARCÍA-LASTRA, R., SAN-MIGUEL, B., CRESPO, I., JORQUERA, F., ALVAREZ, M., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. et TUÑÓN, M.J., 2010. Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. In : *Veterinary Research*. janvier 2010. Vol. 41, n° 1, p. 2.

GONG, W. et INVASIVE ANIMALS COOPERATIVE RESEARCH CENTRE, 2009. *The economic impacts of vertebrate pests in Australia*. Bruce, A.C.T. : Invasive Animals Cooperative Research Centre. ISBN 978-0-9806716-0-5.

GOODFELLOW, I., CHAUDHRY, Y., GIOLDASI, I., GERONDOPOULOS, A., NATONI, A., LABRIE, L., LALIBERTÉ, J-F. et ROBERTS, L., 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. In : *EMBO reports*. 2005. Vol. 6, n° 10, p. 968-972.

GOULD, A. R., KATTENBELT, J.A., LENGHAUS, C., MORRISSY, C., CHAMBERLAIN, T., COLLINS, B.J. et WESTBURY, H.A., 1997. The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. In : *Virus Research*. janvier 1997. Vol. 47, n° 1, p. 7-17.

GRANZOW, H, WEILAND, F, STREBELOW, H.-G, LIU, C.M et SCHIRRMIEIER, H, 1996. Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. In : *Virus Research*. avril 1996. Vol. 41, n° 2, p. 163-172.

GREEN, K. Y., ANDO, T., BALAYAN, M. S., BERKE, T., CLARKE, I. N., ESTES, M. K., MATSON, D. O., NAKATA, S., NEILL, J. D., STUDDERT, M. J. et OTHERS, 2000. Taxonomy of the caliciviruses. In : *Journal of infectious diseases*. 2000. Vol. 181, n° Supplement 2, p. S322–S330.

GREGG, D. A., HOUSE, C., MEYER, R. et BERNINGER, M., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. In : *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 1991. n° 10, p. 435-451.

GROVE, J. et MARSH, M., 2011. The cell biology of receptor-mediated virus entry. In : *The Journal of Cell Biology*. 26 décembre 2011. Vol. 195, n° 7, p. 1071-1082.

HALL, R. N., MAHAR, J. E., HABOURY, S., STEVENS, V., HOLMES, E.C. et STRIVE, T., 2015. Emerging Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 (RHDVb), Australia. In : *Emerging Infectious Diseases*. décembre 2015. Vol. 21, n° 12, p. 2276-2278.

HENNING, J., MEERS, J., DAVIES, P. R. et MORRIS, R. S., 2005. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. In : *Epidemiology and Infection*. 11 février 2005. Vol. 133, n° 4, p. 719-730.

HENZELL, R.P., CUNNINGHAM, R.B. et NEAVE, H.N., 2002. Factors affecting the survival of Australian wild rabbits exposed to rabbit haemorrhagic disease. In : *Wildlife Research*. 2002. Vol. 29, n° 6, p. 523.

HILGIER, W., OLSON, J. E. et ALBRECHT, J., 1996. Relation of taurine transport and brain edema in rats with simple hyperammonemia or liver failure. In : *Journal of Neuroscience Research*. 1 juillet 1996. Vol. 45, n° 1, p. 69-74.

HINNEBUSCH, A. G., 2014. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. In : *Annual Review of Biochemistry*. 2014. Vol. 83, p. 779-812.

- HU, Z., TIAN, X., ZHAI, Y., XU, W., ZHENG, D. et SUN, F., 2010. Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. In : *Protein & Cell*. 2010. Vol. 1, n° 1, p. 48-58.
- HURLEY, K. F. et SYKES, J. E., 2003. Update on feline calicivirus: new trends. In : *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 2003. Vol. 33, n° 4, p. 759-772.
- IP, Y.T. et DAVIS, R. J., 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) — from inflammation to development. In : *Current Opinion in Cell Biology*. avril 1998. Vol. 10, n° 2, p. 205-219.
- JAHNKE, M., HOLMES, E. C., KERR, P. J., WRIGHT, J. D. et STRIVE, T., 2010. Evolution and Phylogeography of the Nonpathogenic Calicivirus RCV-A1 in Wild Rabbits in Australia. In : *Journal of Virology*. 1 décembre 2010. Vol. 84, n° 23, p. 12397-12404.
- JUNG, J.Y., LEE, B.J., TAI, J.H, PARK, J.H et LEE, Y.S., 2000. Apoptosis in Rabbit Haemorrhagic Disease. In : *Journal of Comparative Pathology*. 2000. Vol. 123, n° 2-3, p. 135-140.
- KERR, P. J. et DONNELLY, T. M., 2013. Viral Infections of Rabbits. In : *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. mai 2013. Vol. 16, n° 2, p. 437-468.
- KERR, P. J., KITCHEN, A. et HOLMES, E. C., 2009. Origin and Phylodynamics of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. In : *Journal of Virology*. 1 décembre 2009. Vol. 83, n° 23, p. 12129-12138.
- KIMURA, T., MITSUI, I., OKADA, Y., FURUYA, T., OCHIAI, K., UMEMURA, T. et ITAKURA, C., 2001. Distribution of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus RNA in Experimentally Infected Rabbits. In : *Journal of Comparative Pathology*. février 2001. Vol. 124, n° 2-3, p. 134-141.
- KING, A. (éd.), 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses ; ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam : Elsevier. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 9. ISBN 978-0-12-384684-6.
- KINNEAR, M. et LINDE, C. C., 2010. Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus. In : *Journal of General Virology*. 1 janvier 2010. Vol. 91, n° 1, p. 174-181.
- KJELDSBERG, E., 1977. Small spherical viruses in faeces from gastroenteritis patients. In : *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology*. octobre 1977. Vol. 85B, n° 5, p. 351-354.
- KOTWAL, G. et CANNON, J.L, 2014. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. In : *Current Opinion in Virology*. février 2014. Vol. 4, p. 37-43.
- KOVALISKI, J., SINCLAIR, R., MUTZE, G., PEACOCK, D., STRIVE, T., ABRANTES, J., ESTEVES, P.J. et HOLMES, E.C., 2014. Molecular epidemiology of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in Australia: when one became many. In : *Molecular Ecology*. février 2014. Vol. 23, n° 2, p. 408-420.
- KREUTZ, L. C. et SEAL, B. S., 1995. The pathway of feline calicivirus entry. In : *Virus Research*. janvier 1995. Vol. 35, n° 1, p. 63-70.

LAI, M. M., 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. In : *Microbiological reviews*. 1992. Vol. 56, n° 1, p. 61–79.

LALIENA, A., MIGUEL, B.S., CRESPO, I., ALVAREZ, M., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. et TUÑÓN, M.J., 2012. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin: Fulminant hepatic failure, regeneration and melatonin. In : *Journal of Pineal Research*. octobre 2012. Vol. 53, n° 3, p. 270-278.

LARGEAU, M., 2015. *La vaccination des nouveaux animaux de compagnie* [en ligne]. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire. S.l. : ENVT. [Consulté le 23 mars 2016]. Disponible à l'adresse : <http://oatao.univ-toulouse.fr/14189/>.

LAVAZZA, A. et CAPUCCI, L., 2009. Rabbit haemorrhagic disease. In : *Terrestrial Manual*. S.l. : s.n. 2.6.2. p. 1-15.

LAVAZZA, A. et CAPUCCI, L., 2010. Rabbit Haemorrhagic Disease. In : *Terrestrial Manual* [en ligne]. S.l. : s.n. 2.6.2. p. 1-15. Disponible à l'adresse : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.06.02_RHD.pdf.

LAVAZZA, A., CAVADINI, P., BARBIERI, I., TIZZANI, P., PINHEIRO, A., ABRANTES, J., ESTEVES, P.J., GRILLI, G., GIOIA, E., ZANONI, M., MENEGUZ, P., GUITTON, J-S., MARCHANDEAU, S., CHIARI, M. et CAPUCCI, L., 2015. Field and experimental data indicate that the eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) is susceptible to infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus and not with rabbit haemorrhagic disease (RHD) virus. In : *Veterinary Research*. 2015. Vol. 46, n° 1, p. 13.

LAVAZZA, A., SCICLUNA, M. T. et CAPUCCI, L., 1996. Susceptibility of Hares and Rabbits to the European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV) and Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) under Experimental Conditions*. In : *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 12 janvier 1996. Vol. 43, n° 1-10, p. 401-410.

LE GALL, G., HUGUET, S., VENDE, P., VAUTHEROT, J-S. et RASSCHAERT, D., 1996. European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. In : *Journal of general virology*. 1996. Vol. 77, n° 8, p. 1693–1697.

LE GALL-RECUÉ, G., LAVAZZA, A., MARCHANDEAU, S., BERTAGNOLI, S., ZWINGELSTEIN, F., CAVADINI, P., MARTINELLI, N., LOMBARDI, G., GUÉRIN, J-L., LEMAITRE, E. et OTHERS, 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. In : *Vet Res*. 2013. Vol. 44, p. 81.

LE GALL-RECUÉ, G., LE PENDU, J., LEMAITRE, E., LE MOULLAC-VAIDYE, Beatrice, DECORS, A., BEAUTÉ, V., FAURE, E. et MARCHANDEAU, S., 2015. Le nouveau virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD): situation du RHDV2 en Europe et étude de la sensibilité des lapins à ce virus. In : *16èmes Journées de la Recherche Cunicole, 24 et 25 novembre 2015, Le Mans, France*. S.l. : s.n. 2015. p. 21-24.

LE GALL-RECUÉ, G., LEMAITRE, E., ZWINGELSTEIN, F., DECORS, A., PORTEJOIE, Y., FAURE, E. et MARCHANDEAU, S., 2013. Suivi de la propagation dans les populations françaises de lapins de garenne du nouveau virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) caractérisé en

2010. In : *15èmes Journées de la Recherche Cunicole, 19-20 novembre 2013, Le Mans, France*. Le Mans, France : s.n. 2013. p. 237-240.

LE GALL-RECULE, G., ZWINGELSTEIN, F., BOUCHER, S., LE NORMAND, B., PLASSIART, G., PORTEJOIE, Y., DECORS, A., BERTAGNOLI, S., GUERIN, J.-L. et MARCHANDEAU, S., 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. In : *Veterinary Record*. 5 février 2011. Vol. 168, n° 5, p. 137-138.

LE GALL-RECULE, G., ZWINGELSTEIN, F., FAGES, M.-P., BERTAGNOLI, S., GELFI, J., AUBINEAU, J., ROOBROUCK, A., BOTTI, G., LAVAZZA, A. et MARCHANDEAU, S., 2011. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. In : *Virology*. 2011. Vol. 410, n° 2, p. 395-402.

LI, L., PESAVENTO, P. A., SHAN, T., LEUTENEGGER, C. M., WANG, C. et DELWART, E., 2011. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. In : *Journal of General Virology*. 1 novembre 2011. Vol. 92, n° 11, p. 2534-2541.

LI, L., SHAN, T., WANG, C., COTE, C., KOLMAN, J., ONIONS, D., GULLAND, F. M. D. et DELWART, E., 2011. The Fecal Viral Flora of California Sea Lions. In : *Journal of Virology*. 1 octobre 2011. Vol. 85, n° 19, p. 9909-9917.

LI, Z.X., HU, W.D., LI, B.C., LI, T.Y., ZHOU, X.Y. et ZHANG, Z., 2014. Egg yolk IgY against RHDV capsid protein VP60 promotes rabbit defense against RHDV infection. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. janvier 2014. Vol. 157, n° 1-2, p. 97-104.

LIU, J., FORDHAM, D.A., COOKE, B. D., COX, T., MUTZE, G. et STRIVE, T., 2014. Distribution and prevalence of the Australian non-pathogenic rabbit calicivirus is correlated with rainfall and temperature. In : *PloS one*. 2014. Vol. 9, n° 12, p. e113976.

LIU, S J, XUE, H P, PU, B Q et QIAN, N H, 1984. A new viral disease in rabbit. In : *Anim Husb Vet Med*. 1984. n° 16, p. 253-255.

LIU, W., DANG, R. et WANG, X., 2015. Development of a SYBR-based real-time PCR to detect rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and analyze its tissue distribution in experimentally infected rabbits. In : *Virologica Sinica*. juin 2015. Vol. 30, n° 3, p. 228-230.

LOPES, A. M., DALTON, K. P., MAGALHAES, M. J., PARRA, F., ESTEVES, P. J., HOLMES, E. C. et ABRANTES, J., 2015. Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. In : *Journal of General Virology*. 1 juin 2015. Vol. 96, n° Pt_6, p. 1309-1319.

LOPES, A.M., CAPUCCI, L., GAVIER-WIDÉN, D., LE GALL-RECULE, G., BROCCHI, E., BARBIERI, I., QUÉMÉNER, A., LE PENDU, J., GEOGHEGAN, J.L., HOLMES, E.C., ESTEVES, P.J. et ABRANTES, J., 2014. Molecular evolution and antigenic variation of European brown hare syndrome virus (EBHSV). In : *Virology*. novembre 2014. Vol. 468-470, p. 104-112.

LOPES, A.M., GAVIER-WIDÉN, D., LE GALL-RECULE, G., ESTEVES, P.J. et ABRANTES, J., 2013. Complete coding sequences of European brown hare syndrome virus (EBHSV) strains isolated in 1982 in Sweden. In : *Archives of Virology*. 2013. Vol. 158, n° 10, p. 2193-2196.

- MAHAR, J.E., NICHOLSON, L., EDEN, J-S., DUCHÊNE, S., KERR, P.J., DUCKWORTH, J., WARD, V.K., HOLMES, E.C. et STRIVE, T., 2016. Benign Rabbit Caliciviruses Exhibit Similar Evolutionary Dynamics to their Virulent Relatives. In : *Journal of Virology*. 10 août 2016. p. JVI.01212-16.
- MARCATO, P. S., BENAZZI, C., VECCHI, G., GALEOTTI, M., DELLA SALDA, L., SARLI, G. et LUCIDI, P., 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. In : *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. 1991. Vol. 10, n° 2, p. 371-392.
- MARCHANDEAU, S., BERTAGNOLI, S., PERALTA, B., BOUCRAUT-BARALON, C., LETTY, J. et REITZ, F., 2004. Possible interaction between myxomatosis and calicivirosis related to rabbit haemorrhagic disease affecting the European rabbit. In : *Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association*. 2004. Vol. 155, n° 19, p. 589-592.
- MARCHANDEAU, S., CHANTAL, J., PORTEJOLE, Y., BARRAUD, S. et CHAVAL, Y., 1998. Impact of viral hemorrhagic disease on a wild population of european rabbits in france. In : *Journal of Wildlife Diseases*. juillet 1998. Vol. 34, n° 3, p. 429-435.
- MARQUES, R.M., COSTA-E-SILVA, A., ÁGUAS, A.P., TEIXEIRA, L. et FERREIRA, P.G., 2010. Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. In : *Veterinary Research Communications*. décembre 2010. Vol. 34, n° 8, p. 659-668.
- MARQUES, R.M., TEIXEIRA, L., ÁGUAS, A.P., RIBEIRO, J.C., COSTA-E-SILVA, A. et FERREIRA, P.G., 2014. Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). In : *Vet Res*. 2014. Vol. 45, p. 14.
- MATTHAEI, M., KERR, P.J., READ, A.J., HICK, P., HABOURY, S., WRIGHT, J.D. et STRIVE, T., 2014. Comparative quantitative monitoring of rabbit haemorrhagic disease viruses in rabbit kittens. In : *Virology journal*. 2014. Vol. 11, n° 1, p. 109.
- MAURICE, E., 2015. *Les caliciviroses hypervirulentes : Etude épidémiologique, clinique et virologique chez le chat et le lapin*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire. S.I. : ENVT.
- MCCOLL, K. A., MERCHANT, J. C., HARDY, J., COOKE, B. D., ROBINSON, A. et WESTBURY, H. A., 2002. Evidence for insect transmission of rabbit haemorrhagic disease virus. In : *Epidemiology and Infection*. décembre 2002. Vol. 129, n° 3, p. 655.
- MCCOLL, K. A., MORRISSY, Cj, COLLINS, Bj et WESTBURY, Ha, 2002. Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus in decomposing rabbit carcasses. In : *Australian Veterinary Journal*. mai 2002. Vol. 80, n° 5, p. 298-299.
- MCFADDEN, N., BAILEY, D., CARRARA, G., BENSON, A., CHAUDHRY, Y., SHORTLAND, A., HEENEY, J., YAROVINSKY, F., SIMMONDS, P., MACDONALD, A. et GOODFELLOW, I., 2011. Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4. In : BASLER, C.F. (éd.), *PLoS Pathogens*. 8 décembre 2011. Vol. 7, n° 12, p. e1002413.

- MERCHÁN, T., ROCHA, G., ALDA, F., SILVA, E., THOMPSON, G., DE TRUCIOS, S.H. et PAGÉS, A., 2011. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). In : *Infection, Genetics and Evolution*. août 2011. Vol. 11, n° 6, p. 1469-1474.
- MEREDITH, A., 2012. A vaccine against myxomatosis and RHD: a step forward for rabbit health. In : *Veterinary Record*. 24 mars 2012. Vol. 170, n° 12, p. 307-308.
- MING, Tan et XI, Jiang, 2010. Virus-Host Interaction and Cellular Receptor of Caliciviruses. In : *Caliciviruses: molecular and cellular virology*. S.l. : s.n. p. 111-129.
- MITRO, S. et KRAUSS, H., 1993. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. In : *European journal of epidemiology*. 1993. Vol. 9, n° 1, p. 70–78.
- MORALES, M., BARCENA, J., RAMIREZ, M. A., BOGA, J. A., PARRA, F. et TORRES, J. M., 2004. Synthesis in Vitro of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Subgenomic RNA by Internal Initiation on (-)Sense Genomic RNA: MAPPING OF A SUBGENOMIC PROMOTER. In : *Journal of Biological Chemistry*. 23 avril 2004. Vol. 279, n° 17, p. 17013-17018.
- MOSS, S. R., TURNER, S. L., TROUT, R. C., WHITE, P. J., HUDSON, P. J., DESAI, A., ARMESTO, M., FORRESTER, N. L. et GOULD, E. A., 2002. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus. In : *Journal of General Virology*. 2002. Vol. 83, n° 10, p. 2461–2467.
- MULLER, A., FREITAS, J., SILVA, E., LE GALL-RECUÉ, G., ZWINGELSTEIN, F., ABRANTES, J., ESTEVES, P.J., ALVES, P.C., VAN DER LOO, W., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N. et THOMPSON, G., 2009. Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. In : *Veterinary Microbiology*. mars 2009. Vol. 135, n° 3-4, p. 368-373.
- MULLER, C., 2011. *Apoptose, stress du réticulum endoplasmique et autophagie induits par les LDL oxydées dans les cellules vasculaires. Rôle protecteur des HDL et de chaperones du RE* [en ligne]. S.l. : Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier. [Consulté le 11 mars 2016]. Disponible à l'adresse : <http://thesesups.ups-tlse.fr/1302/>.
- MUTZE, G., COOKE, B. et ALEXANDER, P., 1998. The initial impact of rabbit haemorrhagic disease on european rabbit population in South Australia. In : *Journal of Wildlife Diseases*. avril 1998. Vol. 34, n° 2, p. 221-227.
- MUTZE, G., KOVALISKI, J., BUTLER, K., CAPUCCI, L. et MCPHEE, S., 2010. The effect of rabbit population control programmes on the impact of rabbit haemorrhagic disease in south-eastern Australia: Rabbit control, population density and RHDV. In : *Journal of Applied Ecology*. octobre 2010. Vol. 47, n° 5, p. 1137-1146.
- NAGESHA, H. S., MCCOLL, K. A., COLLINS, B. J., MORRISSY, C. J., WANG, L.-F. et WESTBURY, H. A., 2000. The presence of cross-reactive antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in Australian wild rabbits prior to the escape of virus from quarantine. In : *Archives of virology*. 2000. Vol. 145, n° 4, p. 749–757.

NAGESHA, H. S., WANG, L. F., HYATT, A. D., MORRISSY, C. J., LENGHAUS, C. et WESTBURY, H. A., 1995. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. In : *Archives of virology*. 1995. Vol. 140, n° 6, p. 1095–1108.

NIEDŹWIEDZKA-RYSTWEJ, P., HUKOWSKA-SZEMATOWICZ, B., TOKARZ-DEPTUŁA, B., TRZECIAK-RYCZEK, A., DZIAŁO, J. et DEPTUŁA, W., 2013. Apoptosis of peripheral blood leucocytes in rabbits infected with different strains of rabbit haemorrhagic disease virus. In : *Acta Biochimica Polonica*. 2013. Vol. 60, n° 1, p. 65–69.

NIMS, R. et PLAUSIC, M., 2013. Inactivation of Caliciviruses. In : *Pharmaceuticals*. 21 mars 2013. Vol. 6, n° 3, p. 358-392.

NYSTRÖM, K., LE GALL-REULÉ, G., GRASSI, P., ABRANTES, J., RUVOËN-CLOUET, N., LE MOULLAC-VAIDYE, B., LOPES, A.M., ESTEVES, P.J., STRIVE, T., MARCHANDEAU, S., DELL, A., HASLAM, S.M. et LE PENDU, J., 2011. Histo-Blood Group Antigens Act as Attachment Factors of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Infection in a Virus Strain-Dependent Manner. In : BARIC, R.S. (éd.), *PLoS Pathogens*. 25 août 2011. Vol. 7, n° 8, p. e1002188.

OEHMIG, A., 2003. Identification of a calicivirus isolate of unknown origin. In : *Journal of General Virology*. 1 octobre 2003. Vol. 84, n° 10, p. 2837-2845.

OHLINGER, V. F., HAAS, B. et THIEL, H. J., 1993. Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. In : *Vet Res*. 1993. Vol. 24, n° 2, p. 103–116.

OHLINGER, VOLKER F., HAAS, BERND, MEYERS, GREGOR, WEILAND, F. et THIEL, H. J., 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. In : *Journal of Virology*. 1990. Vol. 64, n° 7, p. 3331–3336.

OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (éd.), 2015. 13.2 : Rabbit Haemorrhagic Disease. In : OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (éd.), *Recommendations applicable to OIE Listed diseases and other diseases of importance to international trade*. 24th ed. Paris : OIE. Terrestrial animal health code, World Organisation for Animal Health ; 2.

OKA, T., WANG, Q., KATAYAMA, K. et SAIF, L.J., 2015. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. In : *Clinical Microbiology Reviews*. 2015. Vol. 28, n° 1, p. 32-53.

OSSIBOFF, R. J., ZHOU, Y., LIGHTFOOT, P. J., PRASAD, B. V. V. et PARKER, J. S. L., 2010. Conformational Changes in the Capsid of a Calicivirus upon Interaction with Its Functional Receptor. In : *Journal of Virology*. 2010. Vol. 84, n° 11, p. 5550-5564.

PÉREZ-FILGUEIRA, D.M., RESINO-TALAVÁN, P., CUBILLOS, C., ANGULO, I., BARDERAS, M.G., BARCENA, J. et ESCRIBANO, J.M., 2007. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. In : *Virology*. août 2007. Vol. 364, n° 2, p. 422-430.

PESAVENTO, P.A., CHANG, K-O. et PARKER, J. S.L., 2008. Molecular Virology of Feline Calicivirus. In : *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. juillet 2008. Vol. 38, n° 4, p. 775-786.

PRIETO, J.M, FERNANDEZ, F, ALVAREZ, V, ESPI, A, GARCÍA, MARÍN, J.F, ALVAREZ, M, MARTÍN, J.M et PARRA, F, 2000. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. In : *Research in Veterinary Science*. avril 2000. Vol. 68, n° 2, p. 181-187.

PUGGIONI, G., CAVADINI, P., MAESTRALE, C., SCIVOLI, R., BOTTI, G., LIGIOS, C., LE GALL-RECUÉ, G., LAVAZZA, A. et CAPUCCI, L., 2013. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). In : *Vet Res*. 2013. Vol. 44, p. 96.

QIU, L., WANG, X., HAO, H., MU, G., DANG, R., WANG, J., ZHANG, S., DU, E. et YANG, Z., 2013. Oral administration of attenuated *Salmonella typhimurium* containing a DNA vaccine against rabbit haemorrhagic disease. In : *Journal of Virological Methods*. mars 2013. Vol. 188, n° 1-2, p. 108-113.

RAMIRO-IBÁÑEZ, F., MARTÍN-ALONSO, J.M., PALENCIA, P.G., PARRA, F. et ALONSO, C., 1999. Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. In : *Virus research*. 1999. Vol. 60, n° 1, p. 21–28.

RICHARDSON, B. J., PHILLIPS, S., HAYES, R. A., SINDHE, S. et COOKE, B. D., 2007. Aspects of the biology of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in coastal eastern Australia. In : *Wildlife Research*. 2007. Vol. 34, n° 5, p. 398.

RODAK, L., SMID, B et VALÍČEK, L., 1991. Application of control measures against viral haemorrhagic disease of rabbit in Czeck and Slovak Federal Republic. In : *Rev. Sci. Tech. OIE*. 1991. n° 10(2), p. 513-524.

ROHAYEM, J., BERGMANN, M., GEBHARDT, J., GOULD, E., TUCKER, P., MATTEVI, A., UNGE, T., HILGENFELD, R. et NEYTS, J., 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections. In : *Antiviral Research*. 2010. Vol. 87, n° 2, p. 162-178.

RUVOËN-CLOUET, N., GANIÈRE, J-P., ANDRÉ-FONTAINE, G., BLANCHARD, D. et LE PENDU, J., 2000. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. In : *Journal of virology*. 2000. Vol. 74, n° 24, p. 11950–11954.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S., ALVAREZ, M., CULEBRAS, J.M., GONZALEZ-GALLEGO, J. et TUÑÓN, M.J., 2004. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic viral disease. In : *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. octobre 2004. Vol. 144, n° 4, p. 215-222.

SAN-MIGUEL, B., CRESPO, I., VALLEJO, D., ÁLVAREZ, M., PRIETO, J., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. et TUÑÓN, M.J., 2014. Melatonin modulates the autophagic response in acute liver failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. In : *Journal of Pineal Research*. avril 2014. Vol. 56, n° 3, p. 313-321.

SCICLUNA, M. T., LAVAZZA, A. et CAPUCCI, L., 1994. European brown hare syndrome in northern Italy: results of a virological and serological survey. In : *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. septembre 1994. Vol. 13, n° 3, p. 893-894.

SHIVANNA, V., KIM, Y. et CHANG, K-O., 2014. Endosomal acidification and cathepsin L activity is required for calicivirus replication. In : *Virology*. septembre 2014. Vol. 464-465, p. 287-295.

SIMMONDS, P., KARAKASILIOTIS, I., BAILEY, D., CHAUDHRY, Y., EVANS, D. J. et GOODFELLOW, I. G., 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. In : *Nucleic Acids Research*. 2008. Vol. 36, n° 8, p. 2530-2546.

SIMON-LORIERE, E. et HOLMES, E.C., 2011. Why do RNA viruses recombine? In : *Nature Reviews Microbiology*. 4 juillet 2011. Vol. 9, n° 8, p. 617-626.

SMÍD, B., VALÍCEK, L., STĚPÁNEK, J., JURÁK, E. et RODÁK, L., 1989. Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. In : *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*. mai 1989. Vol. 36, n° 3, p. 237-240.

SPIBEY, N., MCCABE, V. J., GREENWOOD, N. M., JACK, S. C., SUTTON, D. et VAN DER WAART, L., 2012. Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. In : *Veterinary Record*. 24 mars 2012. Vol. 170, n° 12, p. 309-309.

STREETZ, K., LEIFELD, L., GRUNDMANN, D., RAMAKERS, J., ECKERT, K., SPENGLER, U., BRENNER, D., MANNS, M. et TRAUTWEIN, C., 2000. Tumor necrosis factor α in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. In : *Gastroenterology*. août 2000. Vol. 119, n° 2, p. 446-460.

STRIVE, T., ELSWORTH, P., LIU, J., WRIGHT, J.D., KOVALISKI, J., CAPUCCI, L. et OTHERS, 2013. The non-pathogenic Australian rabbit calicivirus RCV-A1 provides temporal and partial cross protection to lethal Rabbit Haemorrhagic Disease Virus infection which is not dependent on antibody titres. In : *Vet Res*. 2013. Vol. 44, p. 51.

STRIVE, T., WRIGHT, J., KOVALISKI, J., BOTTI, G. et CAPUCCI, L., 2010. The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. In : *Virology*. mars 2010. Vol. 398, n° 1, p. 125-134.

STRIVE, T., WRIGHT, J.D. et ROBINSON, A.J., 2009. Identification and partial characterisation of a new lagovirus in Australian wild rabbits. In : *Virology*. février 2009. Vol. 384, n° 1, p. 97-105.

STUART, A. D. et BROWN, T. D. K., 2006. Entry of Feline Calicivirus Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis and Acidification in Endosomes. In : *Journal of Virology*. 1 août 2006. Vol. 80, n° 15, p. 7500-7509.

TEIFKE, J.P., REIMANN, I. et SCHIRRMEIER, H., 2002. Subacute Liver Necrosis after Experimental Infection with Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV). In : *Journal of Comparative Pathology*. février 2002. Vol. 126, n° 2-3, p. 231-234.

THIEL, H. J. et KÖNIG, M., 1999. Caliciviruses: an overview. In : *Veterinary Microbiology*. 1999. n° 69, p. 55-62.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., HAAS, C. N., JACANGELO, J., RILEY, K. et GERBA, C. P., 2003. Inactivation of Feline Calicivirus and Adenovirus Type 40 by UV Radiation. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 janvier 2003. Vol. 69, n° 1, p. 577-582.

TIAN, X-T., LI, B-Y., ZHANG, L., JIAO, W-Q. et LIU, J-X., 2011. Bioinformatics analysis of rabbit haemorrhagic disease virus genome. In : *Virology journal*. 2011. Vol. 8, n° 1, p. 1.

TUNON, M. J., SAN MIGUEL, B., CRESPO, I., RIEZU-BOJ, J. I., LARREA, E., ALVAREZ, M., GONZALEZ, I., BUSTOS, M., GONZALEZ-GALLEGO, J. et PRIETO, J., 2011. Cardiotrophin-1 Promotes a High Survival Rate in Rabbits with Lethal Fulminant Hepatitis of Viral Origin. In : *Journal of Virology*. 2011. Vol. 85, n° 24, p. 13124-13132.

TUÑÓN, M.J., SANCHEZ-CAMPOS, S., GARCIA-FERRERAS, J., ALVAREZ, M., JORQUERA, F. et GONZALEZ-GALLEGO, J., 2003. Rabbit hemorrhagic viral disease: Characterization of a new animal model of fulminant liver failure. In : *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. avril 2003. Vol. 141, n° 4, p. 272-278.

URAKOVA, N., FRESE, M., HALL, R.N., LIU, J., MATTHAEI, M. et STRIVE, T., 2015. Expression and partial characterisation of rabbit haemorrhagic disease virus non-structural proteins. In : *Virology*. octobre 2015. Vol. 484, p. 69-79.

URAKOVA, N., NETZLER, N., KELLY, A., FRESE, M., WHITE, P. et STRIVE, T., 2016. Purification and Biochemical Characterisation of Rabbit Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases and Identification of Non-Nucleoside Inhibitors. In : *Viruses*. 14 avril 2016. Vol. 8, n° 4, p. 100.

VALLEJO, D., CRESPO, I., SAN-MIGUEL, B., ÁLVAREZ, M., PRIETO, J., TUÑÓN, M.J. et GONZÁLEZ-GALLEGO, J., 2014. Autophagic response in the Rabbit Hemorrhagic Disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. In : *Vet Res*. 2014. Vol. 45, p. 15.

VINJÉ, J., 2015. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. In : DOERN, G. V. (éd.), *Journal of Clinical Microbiology*. 2015. Vol. 53, n° 2, p. 373-381.

WANG, Xue, XU, Fengting, LIU, Jiasen, GAO, Bingquan, LIU, Yanxin, ZHAI, Yujia, MA, Jun, ZHANG, Kai, BAKER, Timothy S., SCHULTEN, Klaus, ZHENG, Dong, PANG, Hai et SUN, Fei, 2013. Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography. In : SAPHIRE, Erica Ollmann (éd.), *PLoS Pathogens*. 2013. Vol. 9, n° 1, p. e1003132.

WESTCOTT, D.G., FROSSARD, J-P., EVEREST, D., DASTJERDI, A., DUFF, J. P., STEINBACH, F. et CHOUDHURY, B., 2014. Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain. In : *The Veterinary Record*. 29 mars 2014. Vol. 174, n° 13, p. 333.

WIRBLICH, C., MEYERS, G., OHLINGER, V.F., CAPUCCI, L., ESKENS, U., HAAS, B. et THIEL, H-J., 1994. European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. In : *Journal of virology*. 1994. Vol. 68, n° 8, p. 5164–5173.

WIRBLICH, C., THIEL, H-J. et MEYERS, G., 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. In : *Journal of virology*. 1996. Vol. 70, n° 11, p. 7974–7983.

XU, S., WANG, D., YANG, D., LIU, H. et TIAN, P., 2015. Alternative methods to determine infectivity of Tulane virus: A surrogate for human norovirus. In : *Food Microbiology*. 2015. Vol. 48, p. 22-27.

XU, W. Y., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. In : *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. juin 1991. Vol. 10, n° 2, p. 393-408.

XU, Z. J. et CHEN, W. X., 1989. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. In : *Veterinary Research Communications*. 1989. Vol. 13, n° 3, p. 205–212.

ZANNI, M. L., BENASSI, M. C., SCICLUNA, M. T., LAVAZZA, A. et CAPUCCI, L., 1993. Clinical evolution and diagnosis of an outbreak of European brown hare syndrome in hares reared in captivity. In : *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. 1993. Vol. 12, n° 3, p. 931-940.

ZHENG, T. et PARKES, J.P., 2011. Rabbit haemorrhagic disease: Advantages of cELISA in assessing immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). In : *Veterinary Microbiology*. décembre 2011. Vol. 153, n° 3-4, p. 387-392.

ZONTA, W., MAUROY, A., FARNIR, F. et THIRY, E., 2016. Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus. In : *Food and Environmental Virology*. 2016. Vol. 8, n° 1, p. 1-12.

Toulouse 2016

BOUSSIGNAC Maxime

TITRE : EMERGENCE ET EVOLUTION DES LAGOVIRUS

RESUME : Les Lagovirus sont des virus à ARN positif simple brin, spécifiques des lagomorphes. Depuis leur découverte dans les années 1980, ils ont montré leur capacité à évoluer et à présenter des tropismes tissulaires et des virulences variables et sont responsables de pertes économiques et de perturbations écologiques majeures.

De nombreuses études phylogénétiques, phylogéographiques et épidémiologiques légitiment aujourd'hui certaines pistes sur les mécanismes évolutifs, ayant conduit à l'apparition de nouveaux variants tels que le RHDV2 en 2010. Ainsi, les mutations ponctuelles seraient majoritairement responsables de l'émergence du tropisme hépatique, en lien avec l'augmentation de virulence. Lors de co-infections, les recombinaisons homologues produisent une diversité génétique significative pouvant conduire à l'élargissement du spectre d'hôte.

MOTS-CLES : CALICIVIRIDAE, LAGOVIRUS, RHDV, EBHSV, POUVOIR PATHOGENE, VP60, LIEVRES, LAPINS.

TITLE : EMERGENCE AND EVOLUTION OF LAGOVIRUSES

ABSTRACT: Lagovirus are positive single-stranded RNA virus, specific of lagomorphs. Since their discovery in the 1980s, they demonstrated their evolution ability and show variable tissue tropism and virulence and are responsible for major economic losses and ecological disturbances.

Many phylogenetic, phylogeographical and epidemiological studies legitimize now certain tracks of the evolutionary mechanisms, leading to the appearance of new variants such as RHDV2 in 2010. Thus, point mutations are mainly responsible for the emergence of hepatic tropism linked with increasing virulence. When co-infections, homologous recombination produce significant genetic diversity which may lead to a larger host range.

KEYWORDS: CALICIVIRIDAE, LAGOVIRUS, RHDV, EBHSV, PATHOLOGY, VP60, HARES, RABBITS.