




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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25400

To cite this version:

Goepfert, Romain . *Détection et identification de lagovirus chez diverses espèces de lagomorphes*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 153 p.

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

DETECTION ET IDENTIFICATION DE LAGOVIRUS CHEZ DIVERSES ESPECES DE LAGOMORPHES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

GOEPFERT Romain Jean-Pierre Serge

Né, le 02 Août 1993 à FONTAINEBLEAU (77)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Stéphane BERTAGNOLI

M. Jean-Luc GUERIN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

REPARTITION DES ENSEIGNANTS PAR GRADE

(Mise à jour : 07/09/2018)

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE (6)

Mme	CLAUW Martine	SECTION C.N.E.C.A. N° 8
M.	CONCORDET Didier	3
M.	DELVERDIER Maxence	7
M.	ENJALBERT Francis	6
M.	PETIT Claude	1
M.	SHELCHER François	8

PROFESSEURS 1° CLASSE (17)

M	BAILLY Jean-Denis	4
M.	BERTAGNOLI Stéphane	1
M.	BERTHELOT Xavier	6
M.	BOUSQUET-MELOU Alain	7
M.	BRUGERE Hubert	10
Mme	CADIERGUES Marie-Christine	8
Mme	CHASTANT-MAILLARD Sylvie	6
M.	DUCOS Alain	6
M.	FOUCRAS Gilles	8
Mme	GAYRARD-TROY Véronique	7
M	GUERIN Jean-Luc	6
Mme	HAGEN-PICARD Nicole	6
M.	JACQUIET Philippe	8
M.	LEFEBVRE Hervé	7
M.	MEYER Gilles	8
M.	SANS Pierre	6
Mme	TRUMEL Catherine	7

PROFESSEURS 2° CLASSE (7)

Mme	BOULLIER Séverine	1
Mme	BOURGES-ABELLA Nathalie	7
M.	GUERRE Philippe	7
Mme	LACROUX Caroline	7
M.	MAILLARD Renaud	8
M	MOGICATO Giovanni	7
Mme	LETRON-RAYMOND Isabelle	7

PROFESSEUR CERTIFIÉ (P.C.E.A.)

Mme	MICHAUD Françoise, Professeur d'Anglais
M.	SEVERAC Benoît, Professeur d'Anglais

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE (11)

M.	BERGONIER Dominique	6
Mme	DIQUELOU Armelle	8
M.	JAEG Jean-Philippe	7
M.	JOUGLAR Jean-Yves	8
M.	LYAZRHI Faouzi	3
M.	MATHON Didier	8
Mme	MEYNADIER Annabelle	6
Mme	PRIYMENKO Nathalie	6
M.	RABOISSON Didier	6
M	VERWAERDE Patrick	8
M.	VOLMER Romain	1

MAITRES DE CONFERENCES classe normale (24)

M.	ASIMUS Erik	8
Mme	BENNIS-BRET Lydie	7
Mme	BIBBAL Delphine	4
Mme	BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle	1
Mme	BOUHSIRA Emilie	8
M	CONCHOU Fabrice	8
M	CORBIERE Fabien	8
M.	CUEVAS RAMOS Gabriel	8
Mme	DANIELS Hélène	1
Mme	DAVID Laure	4
Mlle	DEVIERS Alexandra	7
M.	DOUET Jean-Yves	8
Mme	FERRAN Aude	7
Mme	LALLEMAND Elodie	8
Mme	LAVOUE Rachel	8
M.	LE LOC'H Guillaume	8
M	LIENARD Emmanuel	8
Mme	MILA Hanna	6
Mme	MEYNAUD-COLLARD Patricia	8
M.	NOUVEL Laurent	6
Mme	PALIERNE Sophie	8
Mme	PAUL Mathilde	6
M.	VERGNE Timothée	7
Mme	WASET-SZKUTA Agnès	6

A.E.R.C. (6)

Mme	BLONDEL Margaux	8
M.	CARTIAUX Benjamin	7
M.	COMBARROS-GARCIA Daniel	8
Mme	COSTES Laura	4
M.	GAIDE Nicolas	7
M.	JOUSSERAND Nicolas	8

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL (2)

Mme	DORE-BORDE Laura	8
M.	LEYNAUD Vincent	8

Remerciements

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER,

Professeur des Universités,

Praticien hospitalier,

Virologie,

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

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologies infectieuses,

Qui m'a proposé ce travail,

Pour m'avoir encadré avec rigueur, disponibilité et gentillesse,

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

A Monsieur le Professeur Jean-Luc GUERIN,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Responsable de l'équipe virologie de l'UMR INRA-ENVT Interactions Hôtes

Agents Pathogènes,

Aviculture et pathologies aviaires,

Pour avoir gentiment accepté de juger ce travail et faire partie de notre jury,

Sincères remerciements.

A toute l'équipe de microbiologie de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse,

Pour m'avoir aimablement accueilli dans leurs locaux.

Et tout particulièrement à Sokunthea TOP,

Pour m'avoir formé et encadré tout au long de ce travail, ainsi que sa bonne humeur,

Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Table des matières

Table des illustrations.....	13
Liste des abréviations	15
Introduction	17
Première partie : Etude bibliographique sur le genre <i>Lagovirus</i>	23
I. Généralités à propos des <i>Caliciviridae</i>	23
A. Historique.....	23
B. Classification	24
C. Caractéristiques structurales et génomiques	24
1. Propriétés des virions	24
2. Organisation génomique	25
II. Le genre <i>Lagovirus</i>	26
A. Historique : émergence, propagation et situation actuelle	26
1. Le RHDV	26
2. Le RHDVa.....	28
3. Le RHDV2	28
4. Les RCV et RCV-like	29
3. L'EBHSV	29
B. Epidémiologie	30
1. Population atteinte.....	30
a. Espèces affectées	30
i. Le RHDV	30
ii. Le RHDV2.....	31
iii. L'EBHSV	32
b. Facteurs de sensibilité et réceptivité.....	32
i. Âge.....	32
ii. Race et sexe	34
iii. Aspects climatiques	34
iv. Gestion d'élevage	35
v. Immunodépression et infections concomitantes	35

vi. Statut vaccinal.....	35
vii. Protections croisées	35
2. Sources virales et modes de transmission	36
a. Transmissions directes	36
b. Transmissions indirectes.....	36
C. Virologie.....	38
1. Morphologie	38
2. Structure et organisation génomique	41
3. Cycle viral	42
4. Propriétés.....	43
a. Propriétés physico-chimiques	43
b. Attachement, reconnaissance et HBGAs.....	44
c. Variabilité antigénique.....	46
D. Pathogénie	48
1. Voies d'entrée et dissémination du virus	48
2. Tropisme viral	48
3. Cytopathologie	50
E. Conséquences cliniques et anatomopathologiques.....	50
1. Tableaux cliniques.....	51
a. Forme suraiguë	51
b. Forme aiguë	51
c. Forme subaiguë.....	51
d. Forme subclinique ou chronique	51
2. Modifications hématologiques et biochimiques.....	52
a. Hématologie.....	52
b. Biochimie.....	53
c. Temps de coagulation	54
3. Aspects lésionnels	54
a. Lésions macroscopiques	54
b. Lésions microscopiques et histologie	55
F. Immunologie.....	56
1. Réaction immunitaire humorale efficace	56

2. Implication de l'immunité passive	57
3. Protections croisées	57
G. Diagnostic	58
1. Diagnostics épidémiologique, clinique et nécropsique	58
2. Diagnostic de laboratoire.....	59
a. Identification de l'agent pathogène.....	59
i. Microscopie électronique.....	59
ii. Inoculation virale	59
iii. Hémagglutination	60
iv. Western blot.....	61
v. Immunohistochimie	61
vi. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	61
vii. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	62
b. Tests sérologiques.....	62
i. Inhibition de l'hémagglutination	62
ii. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	63
H. Moyens thérapeutiques et préventifs.....	63
1. Outils thérapeutiques.....	63
2. Prophylaxie.....	65
a. Aspects sanitaires.....	65
b. Vaccination	66
i. Aspects réglementaires et disponibilité des vaccins	66
ii. Protocoles vaccinaux	67
iii. Immunité générée	68
III. Focus sur les souches virales peu ou non pathogènes	68
A. Historique.....	68
B. Epidémiologie	70
1. Population atteinte.....	70
a. Espèces affectées	70
b. Sensibilité et réceptivité, différents facteurs.....	70
2. Sources virales et modes de transmission	71
C. Pathogénicité	72

D. Caractéristiques génomiques, protéiques et immunologiques	73
1. Analyses séquentielles et organisation génomique	73
a. Le RCV italien	73
b. La souche Ashington	74
c. La souche Lambay	74
d. Le MRCV	74
e. Les RCV-A1	75
f. Les RCV-E	75
2. Pouvoirs antigéniques et immunogènes	76
E. Hypothèses quant à l'évolution du RHDV	79
1. Evolution et classification des RCVs	79
2. Emergence des virus de la RHD	82
a. Evolution à partir de souches non pathogènes	82
b. Saut d'espèce	84
Deuxième partie : Etude expérimentale d'identification et séquençage de souches virales non pathogènes	89
I. Projet de recherche	89
II. Matériels et méthodes	90
A. Echantillonnage	90
B. Extraction et purification des ARNs	90
1. Extraction	90
2. Purification	91
C. Reverse transcription des ARNs	92
D. Détection du matériel viral par PCR quantitative	93
E. Amplification du matériel génétique par PCR	94
F. Electrophorèses et extractions des produits PCR	97
H. Clonages bactériens	98
G. Séquençage	100
III. Résultats	100
A. Détection du matériel viral par qPCR	100
B. Amplification du matériel génétique par PCR	102
C. Clonages bactériens	104

D. Séquençage et phylogénie	106
IV. Discussion	108
Troisième partie : Etude expérimentale sur la détection de <i>Lagovirus</i> par qPCR multiplex.....	113
I. Concept.....	113
II. Matériels et méthodes	114
A. Amorces	114
B. Matrices employées.....	116
C. Protocole initial	116
III. Interprétation des premiers résultats et mises au point.....	117
A. Premières qPCR multiplex	117
B. Mises au point	120
IV. Discussion	123
Conclusion.....	127
Bibliographie.....	131
Annexes	143

Table des illustrations

FIGURES

Figure 1 : Crystallographie aux rayons X de la capsid du virus Norwalk.....	25
Figure 2 : Organisation génomique selon les différents genres de <i>Caliciviridae</i>	26
Figure 3 : Cycle de transmission du RHDV au sein des populations de lagomorphes.....	38
Figure 4 : Visualisation du RHDV au microscope électronique en coloration négative	39
Figure 5 : Visualisation des VLP au microscope électronique en coloration négative.....	39
Figure 6 : Cryo-microscopie électronique d'un RHDV intact et d'une CLP.....	40
Figure 7 : Représentation schématique en 3 dimensions de la structure de la VP60.....	41
Figure 8 : Organisation génomique du RHDV	42
Figure 9 : Cycle de réplication des <i>Caliciviridae</i>	43
Figure 10 : Expression des antigènes A, B et H aux niveaux trachéal et entérique chez plusieurs lagomorphes.....	46
Figure 11 : Immunohistochimie hépatique chez un lapin adulte à 24 heures post-infection.....	49
Figure 12 : Manifestations cliniques et lésionnelles de la RHD	52
Figure 13 : Aspects lésionnels d'un lapin atteint de RHD	55
Figure 14 : Visualisation des particules virales issues de culture cellulaire sur RK-13 au microscope électronique en coloration négative	60
Figure 15 : Arbre phylogénétique des différents <i>Lagovirus</i> connus.....	81
Figure 16 : Arbre phylogénétique réalisé à partir de la séquence nucléotidique complète de la souche 06-11	81
Figure 17 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons OCCS-06, 25 et 110 avec la qPCR PanLago	101
Figure 18 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec l'échantillon DPY avec la qPCR PanLago	101
Figure 19 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec l'échantillon LES-22 avec la qPCR PanLago	102
Figure 20 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR Phusion avec les amorces U38 et RCV-GC7-R.....	104
Figure 21 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR PrimeStar Max avec les amorces RCV-GC1-F et RCV-GC4-R	104
Figure 22 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR KAPA Taq avec les amorces U38 et RCV-GC7-R.....	105
Figure 23 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR KAPA Taq avec les amorces RCV-GC1-F et RCV-GC4-R.....	105
Annexe 1 – Figure 24 : Alignement des séquences DPY, OCCS-06, OCCS-25 et OCCS-110 avec la souche 06-11	143
Figure 25 : Arbre phylogénétique avec les échantillons DPY, OCCS-06, 25 et 110	107

Figure 26 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2 et EBHSV avec la qPCR PanLago.....	117
Figure 27 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2, OCCS-25, DPY et EBHSV avec la qPCR multiplex Mix1.....	118
Figure 28 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2, OCCS-25, DPY et EBHSV avec la qPCR multiplex Mix2.....	118
Figure 29 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2, OCCS-25, DPY et EBHSV avec la qPCR multiplex finalement retenue.....	121
Figure 30 : Gel d'électrophorèse réalisé suite à la qPCR multiplex.....	123

TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des différents échantillons ayant fait l'objet d'une recherche virale.....	90
Tableau 2 : Caractéristiques des amorces PanLago U38 et L337i.....	93
Tableau 3 : Programme d'incubation de la qPCR PanLago.....	94
Tableau 4 : Liste des amorces utilisées dans les PCR.....	95
Tableau 5 : Programme d'incubation des PCR réalisées avec la PrimeSTAR® Max DNA polymerase.....	96
Tableau 6 : Programme d'incubation des PCR réalisées avec la Phusion HighFidelity DNA polymerase.....	96
Tableau 7 : Programme d'incubation des PCR réalisées avec la KAPA Taq DNA polymerase.....	99
Tableau 8 : Caractéristiques des amorces T3 et T7 s'hybridant sur le plasmide pour le séquençage.....	100
Tableau 9 : Liste des amplicons obtenus par PCR ayant contribué au séquençage.....	103
Tableau 10 : Identités nucléotidiques estimées entre DPY, OCCS-06, 25 et 110 et différents groupes de virus connus.....	106
Tableau 11 : Caractéristiques des amorces spécifiques employées avec U38.....	115
Tableau 12 : Liste des échantillons utilisés au cours de la mise au point de la qPCR multiplex.....	116
Tableau 13 : Valeurs des Cq moyens des différents échantillons obtenues avec les qPCR multiplex Mix1 et Mix2 et la PanLago.....	119
Tableau 14 : Valeurs des Cq moyens des différents échantillons obtenues avec la qPCR multiplex finalement retenue et la qPCR PanLago.....	122
Annexe 2 – Tableau 15 : Liste des souches ayant permis la construction de l'arbre phylogénétique présenté Figure 25.....	152

Liste des abréviations

A : Adénine
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNc : Acide Désoxyribo-Nucléique complémentaire
ALAT : alanine transaminase
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANIHWA : Animal Health and Welfare
AOM : Anticorps d'Origine Maternelle
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ASAT : aspartate aminotransférase
BCV : Bovine Calicivirus
C : Cytosine
CaCV : Canine Calicivirus
CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée
CLP : Core-Like Particule
Cq : Cycle seuil de détection
°C : degré Celcius
dNTP : désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphate
EBHS : European Brown Hare Syndrome
EBHSV : European Brown Hare Syndrome Virus
ECALEP : Emergence of highly pathogenic CALiciviruses in LEporidae through species jumps involving reservoir host introduction
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
FCV : Feline Calicivirus
G : Guanine
GGT : γ -glutamyltransférase
HBGAs : Histo-Blood Group Antigens
HuCV : Human Calicivirus
ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses
Ig : Immunoglobuline
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
IHAP : Interactions Hôtes Agents Pathogènes
kb : kilobase
kDa : kiloDalton
LB : Lysogeny Broth
MAbs : Anticorps Monoclonaux
mA : milliAmpère
MCV : Mink Calicivirus
min : minute

mm : millimètre
µl : microlitre
µM : micromolaire
ng : nanogramme
nm : nanomètre
N/A : Non Disponible
NTA : bras N-terminal de la VP60
NTPase : Nucléoside Tri-Phosphatase
ONCFS : Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage
ORF : Open Reading Frame
PAL : phosphatases alcalines
pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
qPCR : quantitative/real-time Polymerase Chain Reaction
RCV : Rabbit Calicivirus
RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante
RHD : Rabbit Haemorrhagic Disease
RHDV : Rabbit Haemorrhagic Disease Virus
RNase : Ribonucléase dégradant les ARNs
RT : Reverse Transcription
sec : seconde
SMSV : San Miguel Sea lion Virus
T : Thymine
TA : Température Ambiante
Tm : Température de fusion
UMR : Unité Mixte de Recherche
V : Volt
VESV : Vesicular Exanthema of Swine Virus
VLP : Virus-Like Particule
VPg : Protéine liée au génome viral
VP60 : Protéine majeure de capsid
VP10 : Protéine mineure de capsid

Introduction

La maladie hémorragique du lapin, ou RHD pour Rabbit Haemorrhagic Disease, est une maladie très grave et contagieuse affectant le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) rapportée pour la première fois en 1984. Elle est d'abord apparue en Chine suite à une importation de lapins d'Allemagne (Liu et al. 1984), avant de se propager à l'ensemble du globe en une vingtaine d'années. Elle est maintenant devenue endémique en Europe, en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Asie et dans certains pays d'Afrique. Elle est responsable de nombreuses épizooties au sein des populations de lapins domestiques ou sauvages (Abrantes et al. 2012).

La RHD est souvent fatale et survient le plus souvent de façon aiguë à suraiguë, avec un taux de létalité pouvant atteindre 80 à 100% (Cancellotti, Renzi 1991) et des animaux mourant après seulement 2 à 4 jours post-infection (OIE - World Organisation for Animal Health 2016). Les individus infectés présentent un tableau congestivo-hémorragique touchant de nombreux organes ainsi qu'une insuffisance hépatique aiguë entraînant le plus souvent la mort de l'animal. Les impacts économique, vis-à-vis de la production de lapins de chair et de fourrure, et écologique sont majeurs en raison de sa très forte contagiosité. Lors de sa découverte en Chine, la RHD se propagea sur 50 000 km² et tua 140 millions de lapins domestiques en moins d'un an (Liu et al. 1984).

Une seconde maladie très similaire mais ne concernant pas la même espèce de lagomorphe a été objectivée pour la première fois en 1980 en Suède : il s'agit du syndrome du lièvre brun européen, ou EBHS pour European Brown Hare Syndrome. Cette affection est décrite chez plusieurs espèces de lièvres dont les deux principales sont le lièvre brun ou lièvre d'Europe (*Lepus europaeus*) et le lièvre variable (*Lepus timidus*). L'EBHS a ensuite été rapporté dans de nombreux pays d'Europe (Frölich et al. 2007). De manière semblable à la RHD, l'EBHS est hautement contagieux et létal avec des taux de morbidité et létalité très élevés. Les animaux atteints présentent une hépatite aiguë nécrosante sévère souvent associée à une hémorragie pulmonaire (Wibbelt, Frölich 2005).

Ces deux maladies sont causées par deux virus distincts appartenant au genre *Lagovirus*, de la famille des *Caliciviridae*. Le virus de la RHD (RHDV) et le virus de l'EBHS (EHBSV) sont deux virus non-enveloppés à ARN non segmenté simple brin de polarité

positive. Ils persistent longtemps dans l'environnement et se répliquent rapidement lors d'infection. Au moment de leur réplication, l'ARN polymérase ARN-dépendante de ces virus est susceptible d'engendrer de nombreuses substitutions, mutations occasionnant une dérive génétique rapide (Lee, Chung, K 2017).

En 2010, un nouveau variant de RHDV nommé RHDV2 a frappé de nombreux élevages de lapins correctement vaccinés en France, causant de fortes mortalités. Bien que ce nouveau virus s'avère génétiquement proche du RHDV, il reste suffisamment distinct et ne permet pas aux vaccins classiques d'induire une protection croisée (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Boucher, et al. 2011). Retrouvé chez plusieurs espèces de lièvres, le RHDV2 est capable d'induire la maladie chez un panel d'espèces beaucoup plus large que le RHDV (Camarda et al. 2014; Puggioni et al. 2013; Velarde et al. 2017). Plusieurs souches du RHDV2 ont par la suite été retrouvées en Europe, aux Canaries, en Australie, en Amérique du Nord et plus récemment en Afrique (Le Gall-Reculé et al. 2017).

Une étude a mis en évidence en 1996 la présence d'anticorps anti-RHDV chez un grand nombre de lapins issus de plusieurs régions d'Italie malgré l'absence de symptômes habituellement décrits lors d'infection par le RHDV. Il a alors été découvert un virus génétiquement proche du RHDV, mais non pathogène. Ce premier virus fut appelé RCV pour Rabbit Calicivirus ou encore RCV italien (Capucci et al. 1996). D'autres virus similaires non pathogènes ont par la suite été mis en évidence ailleurs dans le monde et furent alors appelés RCVs ou RCV-like. Toutefois, certaines de ces souches se sont avérées intermédiaires en termes de pathogénicité en ayant la faculté de provoquer des symptômes de manière atténuée par rapport à ceux de la RHD. Ces derniers ont alors été classés de peu pathogènes.

En raison de cette diversité génétique au sein des *Lagovirus*, des différents degrés de pathogénicité rencontrés ainsi que du franchissement de barrières d'espèces, deux principales hypothèses quant à l'évolution de la virulence sont aujourd'hui évoquées. La première porte sur l'acquisition de la pathogénicité à partir de souches non pathogènes, via plusieurs modifications au niveau génomique telles que les mutations. La seconde hypothèse est celle d'un saut d'espèce. Elle repose sur l'existence d'une espèce porteuse asymptomatique d'un virus pathogène qui, suite à une importation ou autre changement de territoire, rentre en contact avec l'espèce cible du virus et le lui transmet. Ces deux hypothèses majeures pourraient expliquer l'émergence et l'évolution des *Lagovirus* ainsi que les épizooties jusqu'alors observées.

Afin d'avancer sur ce sujet, il est nécessaire d'obtenir davantage de données sur les RCVs. Les recherches doivent être avant tout d'ordre génétique afin de pouvoir établir des comparaisons avec les génomes des virus pathogènes connus. Cela permettrait alors éventuellement de comprendre le support génétique de la virulence. Conjointement, des données épidémiologiques sont nécessaires afin d'identifier de nouveaux virus et d'éventuelles espèces porteuses asymptomatiques. La mise au point d'outils diagnostiques sensibles et spécifiques quant au virus à identifier s'avère donc être indispensable.

L'objet de cette présente étude est alors double. Il sera tout d'abord tenté d'isoler des séquences nucléotidiques de RCVs les plus complètes possibles à partir d'intestins de différentes espèces de lagomorphes. La présence du virus sera alors évaluée par qPCR (real-time polymerase chain reaction) avant de pouvoir procéder à une amplification du génome viral et à son séquençage. L'autre aspect de l'étude porte sur la méthode de détection même des virus. Une qPCR multiplex sera mise au point dans le but d'obtenir une technique de diagnostic expérimental plus sensible et spécifique pour la détection de *Lagovirus*.

Avant de présenter ces deux axes de recherche, une première partie bibliographique rappellera l'état des connaissances sur les *Lagovirus*.

Première partie

Etude bibliographique sur le genre *Lagovirus*

Première partie

Etude bibliographique sur le genre *Lagovirus*

I. Généralités à propos des *Caliciviridae*

A. Historique

La famille des *Caliciviridae* a historiquement été difficile à établir, nécessitant plusieurs années de recherche. Parmi les premiers virus isolés de cette famille se trouvent le VESV pour Vesicular Exanthema of Swine Virus, le SMSV pour San Miguel Sea lion Virus et le FCV pour Feline Calicivirus. Ces trois virus ont d'abord été associés à la famille des *Picornaviridae*. C'est après avoir pu analyser leur structure, leur stratégie de réplication et leurs propriétés physiques et chimiques que ces virus ont été retirés des *Picornaviridae*. Ainsi, la famille des *Caliciviridae* a été créée puis inscrite en 1979 dans le troisième rapport de l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), son nom faisant référence aux formes en calice visibles à la surface des capsides virales en microscopie électronique.

La première maladie causée par un *Calicivirus* a été rapportée en 1932 aux Etats-Unis. Affectant l'espèce porcine, elle fut appelée exanthème vésiculaire du porc, ou VES pour Vesicular Exanthema of Swine, en raison de la formation de lésions vésiculeuses. La maladie fut éradiquée en 1956, mais ce n'est qu'en 1968 que le virus responsable de la VES sera isolé et identifié.

En 1972 est identifié le (SMSV) à partir d'un lion de mer de Californie. Il a par la suite été montré qu'il s'agissait en réalité d'un virus étroitement lié au VESV également capable de provoquer la VES chez les porcs.

Le FCV, responsable d'atteintes respiratoires et buccales chez le chat, a été isolé pour la première fois en 1957 (Green et al. 2000; Smith et al. 1998; Clarke, Lambden 1997).

La découverte du RHDV et de l'EBHSV a eu lieu plus tardivement, et sera détaillée dans le II.A de cette première partie.

B. Classification

En 1995, le sixième rapport de l'ICTV ne regroupait les différents virus de la famille qu'en un seul genre nommé *Calicivirus*. Grâce à l'évolution de la recherche et des nouveaux moyens disponibles, comme le séquençage génétique et l'analyse phylogénétique, la taxonomie a évolué peu à peu pour finalement adopter de nouveaux systèmes de classification (Green et al. 2000). Ainsi, le neuvième rapport de l'ICTV établi en 2012 (King 2012) considère aujourd'hui les cinq genres suivants :

- Le genre *Vesivirus*, regroupant le VESV, le SMSV, le FCV, les Calicivirus humain (HuCV), canin (CaCV), bovin (BCV), ou encore du vison (MCV).
- Le genre *Lagovirus*, regroupant le RHDV, l'EBHSV et les RCVs, affectant les lagomorphes.
- Le genre *Norovirus*, regroupant les différents génogroupes du virus Norwalk, retrouvé chez l'humain, le bovin, le porc, le chien et les murins.
- Le genre *Sapovirus*, regroupant les différents génogroupes du virus Sapporo, retrouvé chez l'humain, le bovin, le porc et le chien.
- Le genre *Nebovirus*, comportant le virus Newbury-1, affectant les bovins.

Trois autres virus de cette famille n'ont pas pu être rattachés à un genre en particulier : il s'agit du virus Tulane (2008), du virus St-Valérien (2009) et du Calicivirus aviaire (2010). En effet, bien que les analyses morphologiques et phylogénétiques aient permis de les rassembler au sein des *Caliciviridae*, ces virus restent trop distincts des autres pour être classés dans les genres décrits ci-dessus.

C. Caractéristiques structurelles et génomiques

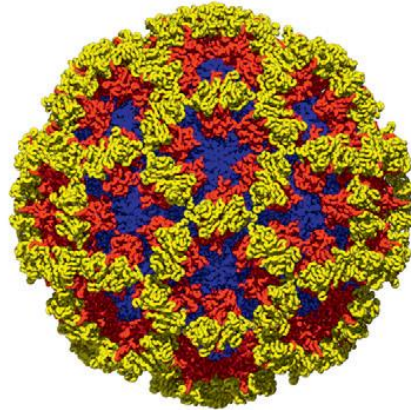
Les *Caliciviridae* présentent plusieurs particularités en termes de structure et de génome qui vont être ici détaillées. Les spécificités des *Lagovirus* seront approfondies dans la partie II.C.

1. Propriétés des virions

Les virions sont non-enveloppés, de structure icosaédrique et d'une taille d'environ 30 à 40 nm de diamètre. Le génome viral code pour une protéine structurale majeure, nommée VP60 (ou VP1). Ces VP60 constituent de nombreux dimères qui entre eux, forment la capsid. L'architecture de cette dernière est caractéristique des *Caliciviridae* en formant un

total de 32 dépressions en forme de calice, comme l'illustre la Figure 1 vis-à-vis du virus Norwalk.

Figure 1 : Crystallographie aux rayons X de la capsid du virus Norwalk. Les domaines S, P1 et P2 formant la capsid sont respectivement représentés en bleu, rouge et jaune. D'après (King 2012).



Les particules virales sont généralement stables dans l'environnement. Plusieurs souches de *Caliciviridae* peuvent présenter des résistances à certains agents chimiques conventionnels (éther, chloroforme ou certains détergents) et à l'inactivation par la chaleur.

Les principales protéines produites par le virus sont la VP60, la protéine structurale mineure nommée VP10 (ou VP2) pour certains virus comme le FCV ou le RHDV, et plusieurs protéines non structurales comme une nucléoside tri-phosphatase (NTPase), une protéase à cystéine, une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et une protéine nommée VPg qui est liée à l'ARN (King 2012).

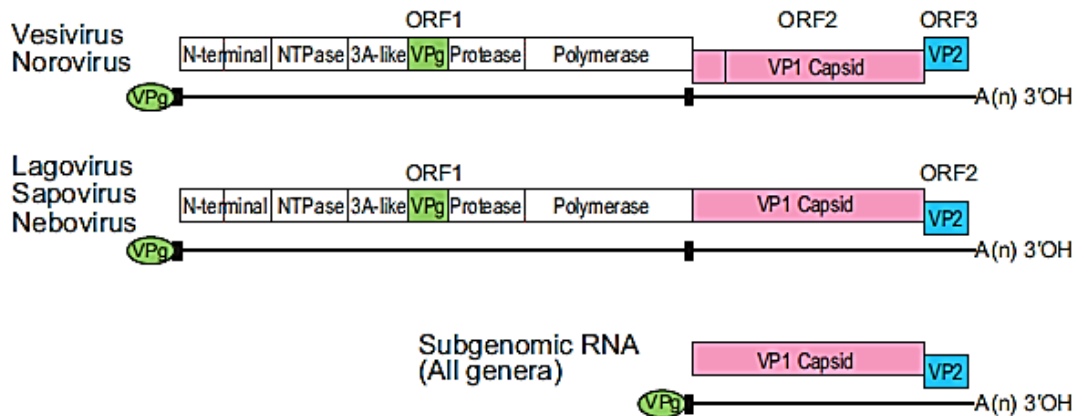
2. Organisation génomique

Le génome viral est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive de 7.4 à 8.3 kb. L'extrémité 3' est polyadénylée tandis que l'extrémité 5' est liée de façon covalente à la protéine VPg. Par ailleurs, un ARN subgénomique est produit lors de la réplication virale. Ce dernier ne mesure que 2.2 à 2.4 kb, et dispose également d'une extrémité 3' polyadénylée et d'une liaison covalente à une VPg sur son extrémité 5'.

L'ARN viral des *Caliciviridae* est organisé en 2 ou 3 cadres de lecture ouverts (ORFs) selon le genre considéré. L'ORF1 code pour les protéines non structurales dans l'ordre suivant : une protéine N-terminale, la NTPase, une autre petite protéine nommée 3A-like, la VPg, la protéase à cystéine et la RdRp. Chez les *Vesivirus* et *Norovirus*, l'ORF2 code pour la VP60 tandis qu'il s'agit de l'ORF1 chez les *Lagovirus*, *Sapovirus* et *Nebovirus*. L'ORF situé

à la fin de l'ARN code quant à lui pour la VP10 (King 2012; Rohayem et al. 2010). La Figure 2 représente l'organisation génomique chez les différents genres de *Caliciviridae*.

Figure 2 : Organisation génomique selon les différents genres de *Caliciviridae*. D'après (King 2012).



II. Le genre *Lagovirus*

A. Historique : émergence, propagation et situation actuelle

1. Le RHDV

La RHDV est une maladie extrêmement virulente dont la première description remonte à 1984 dans la province de Jiangsu en République Populaire de Chine, suite à l'importation de lapins d'Allemagne (Liu et al. 1984). Affectant à la fois les lapins européens (*O. cuniculus*) domestiques et sauvages, la maladie peut se propager très rapidement. A partir de 1985, le virus cause les premières épizooties en dehors de Chine en atteignant tout d'abord la Corée du Sud (Mitro, Krauss 1993).

Il touche ensuite l'Europe en commençant par l'Italie en 1986. La maladie se propage en Tchécoslovaquie et en Pologne en 1987, en France et en Espagne en 1988 (Marchandeu et al. 1998; Alda et al. 2010). La péninsule ibérique est finalement totalement atteinte en 1989 avec le Portugal (Abrantes et al. 2012). Le virus se propage dans le reste de l'Europe durant les années suivantes (Morisse, Le Gall-Reculé, Boilletot 1991). Son émergence en Europe reste controversée. Les échanges commerciaux de viandes étant en hausses (500 tonnes de viandes par an depuis la Chine à l'époque), des lapins infectés importés de Chine constituent une cause probable. Cependant, l'importation du virus depuis plusieurs pays d'Europe Centrale reste envisageable, d'autant plus que les lapins responsables de l'émergence du virus en Chine furent importés d'Allemagne (Cancellotti, Renzi 1991).

Le continent Africain est atteint en 1989 avec la Tunisie (Bousslama et al. 1996). D'autres pays sont ensuite touchés comme l'Égypte en 1991 (Ghanem, Ismail 1992).

Le virus traverse l'Océan Pacifique et arrive en Amérique en Décembre 1988, à Mexico. Le gouvernement mexicain prend rapidement des dispositions afin de contrôler et éradiquer le virus. Les échanges commerciaux de lapins sont interrompus, des mesures d'hygiène et de prévention sont communiquées aux éleveurs, et tous les lapins de Mexico sont abattus et incinérés. Des individus sentinelles sont mis en place afin de surveiller la circulation du virus. Grâce à ces méthodes, les sentinelles sont détectées séronégatives un mois après la mise en place des mesures. La repopulation des lapins s'effectue alors quartier par quartier. L'absence d'une population sauvage sensible au virus a permis au Mexique de l'éradiquer complètement et d'éviter sa propagation. Au total, 110 000 lapins moururent ou furent éradiqués (Gregg, House, Berninger 1991; Abrantes et al. 2012).

Une souche de RHDV de Tchécoslovaquie (CAPM V-351) est importée en Australie sur Wardang Island en 1991 afin de lutter, comme agent biologique, contre les lapins sauvages (*O. cuniculus*) considérés comme nuisibles dans le pays (Cooke, Fenner 2002). En effet, cette espèce introduite en 1859 a rapidement envahi quasiment tout le pays pour finalement devenir la principale espèce nuisible. Par ailleurs, de premiers essais fructueux de contrôle de la population de lapins ont déjà été effectués avec le virus de la myxomatose entre les années 1937 et 1950 en Australie (Fenner 2010). D'abord destiné à des tests de terrain sur une zone de quarantaine, le virus finit par s'échapper en 1995 et se propage dans le pays. Le RHDV tue plus de 30 millions de lapins en 8 semaines (Mutze, Cooke, Alexander 1998). Cette même souche est retrouvée en Nouvelle-Zélande en 1997, probablement due à une introduction illégale (O'Hara 2006).

L'Amérique du Nord n'est touchée quant à elle qu'à partir de 2000 avec les États-Unis. D'autres épizooties de RHD y sont également rapportées durant les années 2001 et 2005. Le virus se propage aussi en Uruguay en 2004 (Abrantes et al. 2012; OIE - World Organisation for Animal Health 2009).

Le RHDV est à ce jour considéré comme endémique sur quasiment tous les continents. Il est toujours responsable d'épizooties, causant de fortes mortalités dans les populations de lapins domestiques et sauvages. Par ailleurs, la fréquence de ces épizooties semble être corrélée avec la présence plus ou moins importante de lapins sauvages sensibles sur un territoire donné (Abrantes et al. 2012).

2. *Le RHDVa*

L'arrivée des premières études épidémiologiques moléculaires a permis de caractériser plus précisément le virus et jusqu'alors, un unique sérotype était décrit chez le RHDV. C'est en 1998 en Italie, puis en 1999 en Allemagne, que l'existence d'un nouveau variant antigénique est mise en évidence. Ce nouveau variant, alors appelé RHDVa, présente plusieurs différences génétiques et antigéniques avec les souches de RHDV connues, et est alors considéré comme un variant bien distinct de RHDV (Capucci et al. 1998; Schirrmeyer et al. 1999). Une approche moléculaire plus détaillée sera réalisée dans la partie II.C.4.c.

Après avoir été identifié en Italie puis en Allemagne, le RHDVa cause des épizooties aux Etats-Unis en 2000 et 2005, et en Uruguay en 2004. Il est également détecté en France en 2000 et à Malte en 2004 (OIE - World Organisation for Animal Health 2009). Le RHDVa semble se propager de la même manière que le RHDV classique, et gagne encore d'autres pays. Plusieurs études montrent que les souches de RHDVa ont tendance à remplacer celles de RHDV. Cela a été établi en Italie, en France, dans la péninsule Ibérique ou encore en Chine (Grazioli et al. 2000; Abrantes et al. 2014; Le Gall-Reculé et al. 2003; Wang et al. 2012). C'est en Janvier 2014 que le premier cas de RHDVa en Australie est répertorié (Schipf, Office International des Epizooties 2014). L'épizootie n'est caractérisée que plus tard, sans pouvoir conclure avec certitude sur une l'origine de cette souche (Mahar et al. 2018).

En Mars 2017, une nouvelle importation volontaire du virus est réalisée en Australie, dans le même objectif de contrôle de la population de lapins sauvages que durant les années 1990. La souche virale importée est un RHDVa issu de Corée du Sud nommée RHDV1-K5 (Wishart, Cox 2016).

3. *Le RHDV2*

Durant l'année 2010, de nombreux cas de RHD se manifestent en France, notamment chez des individus vaccinés. Le tout premier cas est rapporté en Avril dans un élevage dans le Nord tandis que le second concerne des lapins sauvages au centre de la France. Le nombre d'élevages touchés augmente dès Octobre 2010. Fin Janvier 2011, ils sont 60 à être concernés dans le Nord de la France. Les taux de létalité sont classiquement ceux observés lors de RHD, c'est-à-dire 80 à 90%, mais ici chez des individus vaccinés. L'agent responsable est alors identifié comme étant un virus, très semblable au RHDV, mais avec suffisamment de

différences pour être considéré comme une souche distincte des RHDV et RHDVa connus. En 2013, cette nouvelle souche virale est appelée RHDV2, après avoir été nommée de différentes manières comme RHDV variant ou RHDVb (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Boucher, et al. 2011; Le Gall-Reculé et al. 2013).

Tout comme le RHDV classique, le RHDV2 se propage rapidement et de façon similaire au sein des populations domestiques et sauvages de différents lagomorphes dont les espèces seront détaillées dans la partie II.B.1.a. Le virus gagne quasiment toute l'Europe avec l'Espagne et l'Italie en 2011 (Dalton et al. 2012; Puggioni et al. 2013), le Portugal en 2012 (Abrantes et al. 2013), l'Ecosse, l'Angleterre et le Pays de Galles en 2014 (Westcott et al. 2014; Baily et al. 2014). Cependant, des analyses phylogénétiques suggèrent que le RHDV2 était probablement déjà présent en 2010 en Grande Bretagne (Westcott, Choudhury 2014).

Le RHDV2 quitte ensuite le continent européen. Il est retrouvé aux Açores et en Australie en 2015 (Hall et al. 2015; Duarte et al. 2015), et aux Canaries et en Tunisie en 2016 (Martin-Alonso et al. 2016; Institut Pasteur de Tunis 2017). L'Amérique est touchée en Juillet-Août 2016 avec le Québec, puis en Février 2018 avec la Colombie-Britannique (United States Department of Agriculture 2018). De la même façon que le RHDVa avec le RHDV classique, le RHDV2 semble progressivement remplacer les autres souches virales présentes (Le Gall-Reculé et al. 2013; Mahar et al. 2017).

4. Les RCV et RCV-like

Aux différentes souches pathogènes se rajoutent des virus apparentés au RHDV, dénommées RCVs ou RCV-like qui sont, elles, non ou peu pathogènes. Leur évolution semble intimement liée à celle du RHDV et soulève de nombreuses hypothèses. C'est pourquoi une partie leur est dédiée plus loin dans cet écrit à la partie III.

3. L'EBHSV

L'EBHS a été décrit avant la RHD en 1980 en Suède. Principalement caractérisée par des hépatites aiguës et hémorragies touchant divers organes internes (Frölich et al. 2007), elle est responsable d'épizootie chez les lièvres dont les principaux concernés sont le lièvre brun ou lièvre d'Europe (*L. europaeus*) et le lièvre variable (*L. timidus*). De récentes études basées sur l'horloge moléculaire montrent que l'EBHSV aurait pu émerger durant les années 1970 (Lopes, Capucci, et al. 2014).

Depuis son émergence, l'EBHSV s'est propagé dans de nombreux pays d'Europe, comme au Danemark en 1982 ou en Allemagne et en Italie en 1988 (Gav, Mörner 1991; Scicluna, Lavazza, Capucci 1994). Il a également été rapporté en Argentine en 2003. De nos jours, l'EBHS est considéré comme endémique en Europe et reste relativement cantonné à ce territoire (Chiari et al. 2016).

B. Epidémiologie

1. Population atteinte

a. Espèces affectées

i. Le RHDV

Le lapin européen, ou lapin commun, est la seule espèce connue chez qui le RHDV est capable d'engendrer des symptômes et de se répliquer. Aucune répllication virale n'a été détectée après inoculation de RHDV chez 28 différentes espèces de vertébrés (Gould et al. 1997). D'autres études expérimentales similaires sur différentes espèces de lièvres ont montré l'absence de sensibilité de ces espèces au RHDV (Lavazza, Scicluna, Capucci 1996). Enfin, aucune contamination chez l'homme n'ayant été rapporté depuis l'émergence du virus, la RHD n'est pas considérée comme zoonotique. Le RHDV apparait donc comme un virus très spécifique de son hôte. Par ailleurs, il a été montré que deux sous-espèces, *O. cuniculus algirus* et *O. cuniculus cuniculus*, étaient autant sensibles l'une que l'autre au RHDV (Muller et al. 2009).

Cependant, cet aspect de spécificité semble de plus en plus controversé. En effet, une étude plus récente de 2011 a mis en évidence la présence de génome de RHDV chez des rongeurs (*Mus spretus* et *Apodemus sylvaticus*) vivant dans la même niche écologique que le lapin de garenne. Bien qu'aucun signe clinique n'ait été observé, jamais le RHDV n'avait déjà été détecté ailleurs que chez *O. cuniculus* (Merchán et al. 2011). Ces résultats mettent alors en avant un potentiel portage asymptomatique, voire un moyen de transmission du virus par diverses espèces.

Plus récemment en 2014, une étude s'est intéressée à deux lièvres ibériques (*L. granatensis*) retrouvés morts en 1996 et 1998 respectivement. L'analyse nécropsique a révélé des lésions compatibles avec une infection par un *Lagovirus*. Les souches virales ont été séquencées puis une analyse phylogénétique de la protéine de capsid a identifié les souches

comme étant des RHDV. C'est la première mise en évidence d'une infection létale chez une autre espèce que le lapin de garenne par le RHDV (Lopes, Marques, et al. 2014).

En 2015, une étude épidémiologique a mis en évidence chez le lapin à queue blanche ou lapin de Floride (*Sylvilagus floridanus*) la présence d'anticorps anti-RHDV chez 33.7% des animaux collectés. Bien que les titres en anticorps fussent relativement faibles et qu'aucun RHDV ne fut détecté, la séroprévalence pour le RHDV était supérieure à celle pour l'EBHSV. Finalement, cette espèce ne semble pas sensible au RHDV puisqu'elle ne développe aucun signe clinique lors d'inoculation expérimentale du virus (Lavazza et al. 2015). Cela suggère tout de même la possibilité d'un portage asymptomatique du RHDV par le lapin de Floride.

ii. Le RHDV2

En plus d'affecter le lapin européen, une des principales particularités du RHDV2 est sa capacité à franchir la barrière d'espèces et d'entraîner des symptômes chez différentes espèces de lièvres.

C'est pour la première fois en 2013 qu'une étude met en évidence la présence de RHDV2 chez des lièvres suite à une épizootie en Sardaigne en 2011. En effet, les présentations cliniques et nécropsiques de plusieurs lièvres du Cap (*L. capensis mediterraneus*) paraissaient identiques à celles de la RHD retrouvées chez le lapin de garenne. Après isolement, séquençage et analyse de la particule virale responsable, le RHDV2 fut identifié comme l'agent pathogène responsable (Puggioni et al. 2013). Le virus est par la suite retrouvé comme cause d'EBHS-like chez d'autres espèces de lièvres. Il est isolé la même année chez des lièvres corses (*L. corsicanus*) vivant dans la même niche écologique que les lapins *O. cuniculus* (Camarda et al. 2014), avant d'être retrouvé en 2017 chez le lièvre brun (*L. europaeus*) en Europe et Australie (Velarde et al. 2017; Hall et al. 2016) et chez le lièvre variable (*L. timidus*) (Le Gall-Reculé et al. 2017).

Enfin, une étude épidémiologique réalisée par SAGIR en 2015 a évalué la prévalence d'EBHSV et RHDV2 chez les lièvres responsables d'EBHS ou EBHS-like. Parmi les infections bien dues à un *Lagovirus*, 62% étaient dues à l'EBHSV, 37% au RHDV2, et 1% à une coinfection des deux virus (Le Gall-Reculé et al. 2017). Cela souligne l'importance du RHDV2 dans la prévalence d'EBHS-like.

iii. L'EBHSV

L'EBHSV est connu pour sa spécificité envers différentes espèces de lièvres, dont la première identifiée est le lièvre brun (*L. europaeus*). En 2005, une étude montre que le lièvre variable (*L. timidus*) est sensible à ce virus et susceptible d'être infecté lorsque les lièvres bruns avec lesquels il vit sont également présents en faible densité (Syrjälä, Nylund, Heinikainen 2005). Enfin, le lièvre corse pourrait lui aussi constituer une potentielle espèce sensible à ce virus (Alves, Ferrand, Hackländer 2008).

Une étude en 2002 a cependant mis en évidence que, tout comme les lièvres, les lapins à queue blanche (*S. floridanus*) étaient sensibles à l'EBHSV (Tizzani et al. 2002). C'est la seule espèce de lapin qui est à ce jour affectée par ce virus.

b. Facteurs de sensibilité et réceptivité

Dans une espèce donnée, tous les individus ne sont pas autant réceptifs ou sensibles les uns que les autres. Ainsi, plusieurs facteurs mis en évidence semblent avoir une influence sur la maladie.

i. Âge

La sensibilité au RHDV est nettement influencée par l'âge des lapins. En effet, il apparaît que les individus âgés de moins d'un mois sont insensibles au virus par le fait qu'ils ne développent aucun signe clinique. Entre un et deux mois, les lapereaux deviennent progressivement sensibles, mais seul un faible pourcentage d'entre eux est généralement infecté. Enfin, à l'âge de trois mois, les jeunes individus sont autant sensibles que les adultes (Xu 1991). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène.

L'hypothèse la plus « simpliste » correspond à la présence d'anticorps d'origine maternelle (AOM) offrant une protection plus ou moins longue face au virus. Il a été montré que les jeunes lapins recevaient des IgG anti-RHDV à travers le placenta via un transport actif durant les derniers jours de gestation. Ces dernières peuvent ensuite persister en moyenne 8 semaines, avec un maximum pouvant atteindre 12 semaines. Ces durées sont compatibles avec les constats émis précédemment quant à l'augmentation de sensibilité des jeunes jusqu'à l'âge de 3 mois. Par ailleurs, ces AOM semblent réduire les signes cliniques lors d'infections par le RHDV (Cooke et al. 2000). Ces informations semblent cependant controversées par une étude plus ancienne. En effet, il a été montré en 1991 que de jeunes lapins âgés de 20 à 40

jours dépourvus en AOM anti-RHDV pouvaient survivre à l'infection au RHDV. Il est tout de même possible que constater que tous les jeunes infectés n'ont pas survécu à la maladie, les plus âgés en particulier. Cette étude tend donc à remettre en cause l'implication de l'immunité passive vis-à-vis de la résistance au virus (Rodak, Smid, Valicek 1991).

Un des caractéristiques du RHDV est d'être capable d'agglutiner les érythrocytes de l'Homme et de se lier aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif des lapins en utilisant les antigènes A, B et H, antigènes rentrant en jeu dans le système des groupes sanguins (HBGAs). Ces antigènes ne sont donc pas uniquement retrouvés à la surface des érythrocytes mais aussi au niveau des muqueuses du tractus digestif et de l'appareil respiratoire supérieur. Une étude réalisée en 2000 se pencha sur la liaison particulière qu'avait le RHDV vis-à-vis des antigènes A et H de type 2. Il a d'abord été mis en évidence que le RHDV ne se liait quasiment pas sur les cellules épithéliales des très jeunes lapins, en raison du fait que les antigènes A et H de type 2 y étaient très peu exprimés. Plus précisément, l'âge d'apparition des deux antigènes a été évalué au niveau des cellules épithéliales. Il est montré que l'antigène H de type 2 n'apparaît qu'à partir de la 3^{ème} semaine. Son expression devient maximale au bout de la 10^{ème} semaine. L'antigène A quant à lui n'apparaît qu'à partir de la 8^{ème} semaine et atteint son maximum au bout de la 12^{ème} semaine (Ruvoën-Clouet et al. 2000). Ces résultats semblent donc coïncider avec l'évolution progressive jusqu'à 8-12 semaines de la sensibilité des jeunes lapins face au RDHV. Par ailleurs, le système d'antigènes A, B et H semble être étroitement lié à la sensibilité d'un individu au RHDV : une étude plus récente sera développée plus loin dans la partie II.C.4.b. Ce système de liaison entre les HBGAs et le RHDV n'est probablement pas le seul mécanisme. En effet, la recherche de ces antigènes au niveau des hépatocytes est arrivée à la conclusion qu'ils n'étaient pas présents au niveau de ces cellules. Le foie étant l'organe majoritairement atteint lors d'infection, au moins un autre récepteur cellulaire hépatique doit exister (Ruvoën-Clouet et al. 2000; Abrantes et al. 2012).

Un autre processus lié à l'âge des lapins a été mis en avant vis-à-vis de la réponse immunitaire engendrée par le RHDV. Une étude basée sur des analyses au microscope électronique a comparé 36 à 48 h post-inoculation virale l'aspect histologique des infiltrations leucocytaires du foie chez des lapins adultes (sensibles) et des lapins jeunes (résistants). L'étude montre chez les adultes infectés une infiltration leucocytaire principalement constituée d'hétérophiles localisées aux abords d'hépatocytes en dégénérescence, tandis que chez les jeunes, non malades, l'infiltration est dominée par de nombreux lymphocytes situés

en contact direct des hépatocytes sains. Ces résultats suggèrent l'existence d'une présentation d'antigène viral en surface des hépatocytes, alors reconnu par les lymphocytes adjacents. Chez l'adulte, l'atteinte précoce des hépatocytes ne permettraient pas d'arriver à ce mécanisme (Ferreira et al. 2005).

Une étude de 2014 a montré l'importance de l'immunité innée chez les jeunes lapins. Une immunosuppression a tout d'abord été induite par injection de méthylprednisolone chez de jeunes individus. Une inoculation intramusculaire de RHDV a ensuite été effectuée, rendant tous les lapins sensibles avant de mourir au bout de 3 jours. L'analyse histopathologique a mis en évidence une dégénérescence des hépatocytes et une infiltration leucocytaire majoritairement dominée d'hétérophiles. Cette étude démontre donc que l'immunité innée des lapereaux semble participer à la résistance face au RHDV et être différente de celle des adultes sensibles (Marques et al. 2014).

Lors de l'émergence du RHDV2, plusieurs mortalités inhabituelles allant jusqu'à 50% ont été objectivées chez de jeunes individus de moins de 35 jours. Ces constats tendent à faire penser que les lapereaux sont plus sensibles aux souches de RHDV2 qu'à celles de RHDV (Dalton et al. 2012).

ii. Race et sexe

A ce jour, aucune prédisposition entre mâles et femelles n'est rapportée. La race ne semble pas non plus avoir une influence (Ohlinger, Haas, Thiel 1993; Marchandea et al. 1998).

iii. Aspects climatiques

Le climat apparaît comme facteur influençant la propagation du RHDV et sa capacité à provoquer des épizooties. En effet, il a été constaté que l'impact du virus était moindre dans les régions plutôt humides et tempérées, tandis que de fortes mortalités étaient provoquées en zones arides et chaudes. L'association de fortes températures et d'une forte humidité ne serait cependant pas favorable à la persistance et propagation du virus dans la région. De ce fait, la dissémination du virus est variable d'une saison à une autre. Ces aspects sont probablement liés à l'activité saisonnière des vecteurs du RHDV et aux variations de densité de lapins (Cooke, Fenner 2002; Henzell, Cunningham, Neave 2002).

iv. Gestion d'élevage

La gestion et la conception des élevages de lapins influent sur la virulence du RHDV. En effet, dans un élevage où la densité d'animaux n'est pas aberrante, le taux de morbidité est estimé à 30% avec des pertes pouvant se limiter à quelques animaux. A contrario, un élevage intensif pourra atteindre un taux de morbidité de 80%, voire perdre jusqu'à 90% de ses animaux dans certains cas. L'hygiène au sein de l'élevage est également un élément à prendre en compte afin de limiter la propagation du virus (Mitro, Krauss 1993).

v. Immunodépression et infections concomitantes

Comme pour beaucoup d'autres maladies infectieuses, une immunodépression est un facteur favorisant la mise en place de le RHD. Ainsi, toute infection concomitante, infestation parasitaire ou encore stress d'élevage capable d'engendrer une baisse d'immunité peut faciliter le développement de la maladie. Une étude de 2004 a suggéré que l'immunosuppression induite par le virus de la myxomatose pouvait faciliter l'infection par le RHDV (Marchandeu et al. 2004).

vi. Statut vaccinal

Depuis l'émergence de la maladie, plusieurs vaccins efficaces ont été élaborés, tout d'abord protégeant contre les souches de RHDV/RHDVa, puis ensuite contre celles de RHDV2 en raison du manque d'efficacité des premiers vaccins (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Boucher, et al. 2011). Ainsi, différentes études ont mis au point et/ou évalué l'efficacité de différents vaccins : la protection vaccinale est excellente jusqu'à 100% dans certains cas (Bertagnoli, Gelfi, Le Gall, et al. 1996; Bertagnoli, Gelfi, Petit, et al. 1996; Spibey et al. 2012; Le Minor et al. 2013; Drews et al. 2011). L'étude approfondie de ces vaccins sera réalisé dans la partie II.H.2.b.

vii. Protections croisées

Lors d'épizooties, plusieurs cas cliniques de RHD atypiques ont été retrouvés dans différents pays et notamment en Australie. Les animaux présentaient des signes cliniques compatibles avec la RHD mais à des intensités variables, et un taux de mortalité inhabituellement faible. Il a par la suite été mis en évidence que ces lapins étaient infectés par des souches non pathogènes, dites RCVs. Après plusieurs analyses immunologiques, il a été montré que certains RCVs étaient capables d'induire la production d'anticorps sériques

généralisant une protection croisée face au RHDV (Nagesha et al. 2000; Strive et al. 2010; Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Fages, et al. 2011; Strive et al. 2013). Ces protections dites croisées entre RHDV et RCVs sont en réalité complexes et seront détaillées dans la partie III.D.2.

2. Sources virales et modes de transmission

a. Transmissions directes

La principale source de contagiosité correspond aux animaux malades au sein de la population. La voie féco-orale constitue l'essentielle voie de transmission, mais le virus a également été identifié dans toutes les sécrétions et excréments de l'animal. La persistance du RHDV est par ailleurs longue puisqu'il a pu être retrouvé jusqu'à 4 semaines post-infection chez des lapins ayant survécu (Ohlinger, Haas, Thiel 1993; Morisse, Le Gall-Reculé, Boilletot 1991).

Une autre source similaire correspond au portage par les jeunes individus. Comme expliqué précédemment, le virus n'engendre chez les lapereaux que peu voire pas de manifestation clinique. Ils restent tout de même réceptifs à l'infection et peuvent transmettre directement le virus aux adultes avant toute séroconversion. Bien que l'infection du jeune reste atténuée par rapport à l'adulte, leur rôle dans la dissémination au sein des groupes d'individus lors d'épizootie ne semble pas négligeable (Matthaei et al. 2014).

b. Transmissions indirectes

Le RHDV semble être un des *Caliciviridae* les plus stables et résistants dans l'environnement. Il ne semble pas être altéré lors de chute des températures, une étude ayant montré que sa capacité infectieuse restait conservée après 9 mois passés à 4°C (Gregg, House, Berninger 1991). Une fois sécrété dans l'environnement par un lapin malade, le virus peut garder son potentiel infectieux au moins 1 mois à température ambiante. De façon similaire, le RHDV est capable de rester contagieux au moins 3 mois post-mortem sur des carcasses de lapins (Henning et al. 2005). La voie de transmission indirecte via l'environnement et les carcasses d'animaux, alors réservoirs du RHDV, semble donc majeure dans la propagation de la maladie.

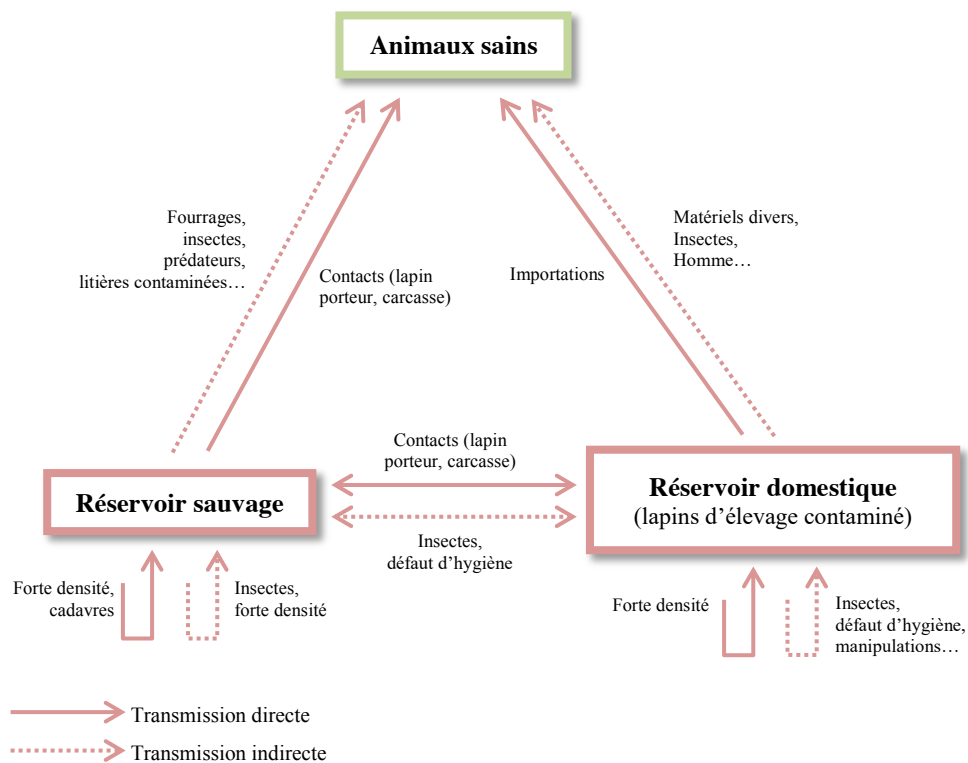
Un autre mode de transmission a également été répertorié. En cherchant comment le virus a pu quitter Wardang Island pour rejoindre l'Australie, le portage du virus par des

insectes vecteurs a été soupçonné. Une étude a en effet montré que plusieurs espèces d'insectes étaient capables de porter et transmettre le RHDV. D'abord mis en évidence avec *Musca vetustissima*, le virus a ensuite été retrouvé chez de nombreuses autres espèces d'insectes dont *Calliphora dubia*, *C. stygia*, *Aedes postspiraculosis*, *Ae. notoscriptus*, *Chrysomya rufifacies* et *Ch. varipes* (McCull et al. 2002). La transmission chez l'animal sain a été mise en évidence expérimentalement, confirmant alors cette hypothèse. Ce mode de transmission explique en partie la rapidité de propagation du RHDV à grande échelle, mais aussi la concomitante prolifération de l'espèce *M. vetustissima* avec la dissémination du virus en Australie (Cooke 2002).

D'autres vecteurs ont par la suite été recherchés. Au sein des mammifères, plusieurs espèces ont été soupçonnées/identifiées comme porteuses asymptomatiques du virus. En ce qui concerne le RHDV et comme expliqué précédemment, *S. floridanus* est suspect de véhiculer le virus (Esteves et al. 2015). Du côté de l'EBHSV, deux prédateurs du lièvre ont récemment été identifiés. Le virus a en effet pu être isolé en 2016 à partir de contenu intestinal de renard roux (*Vulpes vulpes*), puis en 2018 sur les fèces récupérés sur une carcasse d'un loup gris (*Canis lupus*) au Nord de l'Italie (Di Profio et al. 2018; Chiari et al. 2016). Ces deux découvertes montrent ainsi leur potentiel rôle dans une transmission indirecte de l'EBHSV, sans pouvoir affirmer toutefois que le virus excrété dans les fèces reste susceptible d'infecter un nouvel individu.

Compte-tenu de ces différentes voies et modes de contamination, il est alors possible de réaliser un cycle de transmission du RHDV comme représenté sur la Figure 3.

Figure 3 : Cycle de transmission du RHDV au sein des populations de lagomorphes. D'après (Boussignac 2016).



C. Virologie

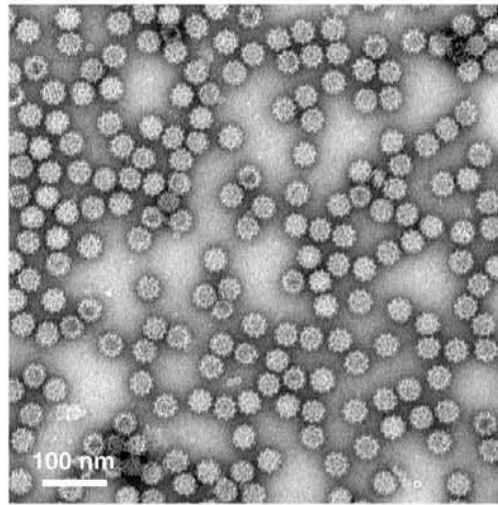
Etant donné les fortes similitudes entre le RHDV et l'EBHSV, seuls les aspects virologiques du RHDV seront développés ici.

1. Morphologie

C'est en 1989 que Lavazza et Vecchi identifient les premières particules virales comme responsables de la RHD, et le virus est alors classé parmi les *Caliciviridae* (Wibbelt, Frölich 2005).

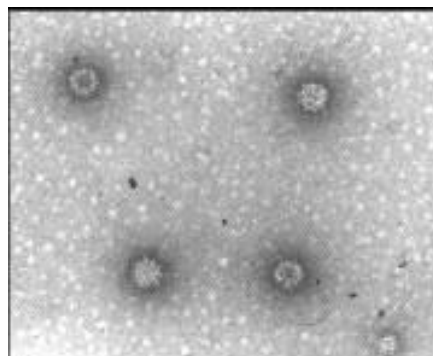
Le virion est non enveloppé et d'un diamètre variable entre 32 et 40 nm. Comme vu précédemment, il présente en sa surface des dépressions en forme de calice avec une symétrie icosaédrique $T = 3$, visibles en microscopie électronique à coloration négative comme l'illustre la Figure 4.

Figure 4 : Visualisation du RHDV au microscope électronique en coloration négative. D'après (Wang et al. 2013).



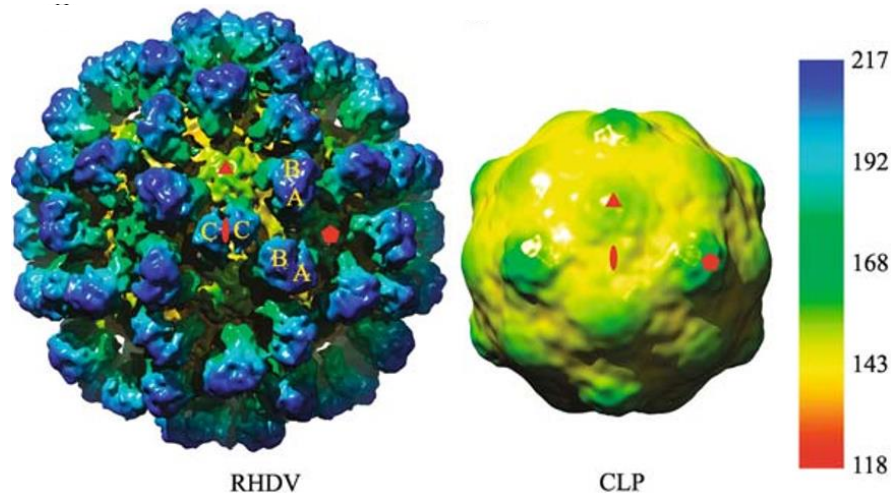
Par ailleurs, la différenciation entre le RHDV et l'EBHSV est impossible uniquement à l'aide d'un microscope électronique (Wirblich et al. 1994). Les VP60 forment la principale partie de la capsid du virion, comprenant 180 protéines de capsides organisées en 90 dimères, responsables des propriétés antigéniques du virus. Cependant lors de l'assemblage dans la cellule hôte, leur agencement et auto-assemblage peuvent constituer des virus-like particules (VLP), capsides dépourvus de matériel génétique à l'intérieur mais conservant les mêmes caractéristiques morphologiques et antigéniques que le virus original, induisant une réponse immunitaire sans déclarer d'infection. Ces VLP sont donc de taille similaire au virion original et possèdent les mêmes dépressions en forme de calice à leur surface. Elles sont ainsi également visualisables au microscope électronique comme le montre la Figure 5 (Hu et al. 2010; Nagesha et al. 1995; Gromadzka et al. 2006).

Figure 5 : Visualisation des VLP au microscope électronique en coloration négative. Le grossissement effectué est au x39000. D'après (Gromadzka et al. 2006).



Le RHDV peut également présenter une autre forme morphologique. Lors d'infection subaiguë ou chronique, des core-like particules (CLP) du virus sont retrouvées dans la rate et le foie. Ces CLP ne sont cependant pas identifiées dans la circulation sanguine. La surface de ces particules ne présente aucune aspérité (les CLP sont également appelées « particules lisses » ou « smooth-RHDV » ou « s-RHDV »), et le virion mesure en moyenne 25 à 29 nm. La Figure 6 illustre la représentation en cryo-microscopie électronique du RHDV original et des CLP.

Figure 6 : Cryo-microscopie électronique d'un RHDV intact et d'une CLP. L'échelle de couleur indique la distance de la surface depuis le centre du virion. Les symboles rouges représentent les axes de symétries 5, 3 et 2 de la capsid. Les lettres A, B et C correspondent à des sous-unités formant entre-elles des capsomères intervenants dans la symétrie du virion. D'après (Hu et al. 2010).

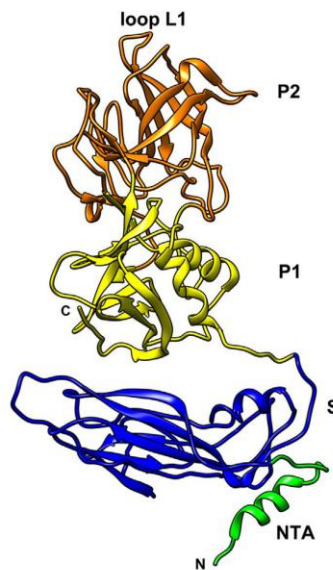


Il a été mis en évidence que les CLP correspondent en réalité à la portion N-terminale des VP60. Par ce fait, à la différence de la forme classiquement retrouvée, celles-ci ne possèdent aucun pouvoir hémagglutinant. Il est cependant notable qu'elles interagissent tout de même avec des anticorps monoclonaux anti-VP60. La formation des CLP est supposée être due à un processus de dégradation d'immuns complexes formés entre le RHDV et des IgM au début de la réponse humorale lors d'infection, mais également d'autres hypothèses existent comme celle soutenant que leur origine est due à une expression incomplète du génome viral codant pour la VP60 (Hu et al. 2010).

La VP60 est composée de trois domaines incluant le bras N-terminale (NTA), le domaine S (pour « shell ») et le domaine P (pour « protrusion ») divisé en deux sous-domaines P1 et P2. Ces différents domaines sont plus ou moins variables au sein des *Caliciviridae*. En effet, il est constaté que le domaine S est plutôt bien conservé dans la famille tandis que les sous-domaines P1 et P2 sont davantage variables, P1 étant conservé de

façon modérée et P2 étant hypervariable. Le bras N-terminale se replie sur le domaine S et joue un rôle important dans l'assemblage des virions, Le domaine P, et notamment le sous-domaine P2, est quant à lui responsable des propriétés antigéniques du RHDV et de sa liaison aux cellules (Wang et al. 2013; Hu et al. 2010; Abrantes et al. 2012). Une représentation schématique est illustrée Figure 7.

Figure 7 : Représentation schématique en 3 dimensions de la structure de la VP60. Celle-ci est subdivisée plusieurs parties : la portion NTA, le domaine S, les sous-domaines P1 et P2, ainsi qu'une boucle L1 formée au niveau de P2. D'après (Moreno et al. 2016).



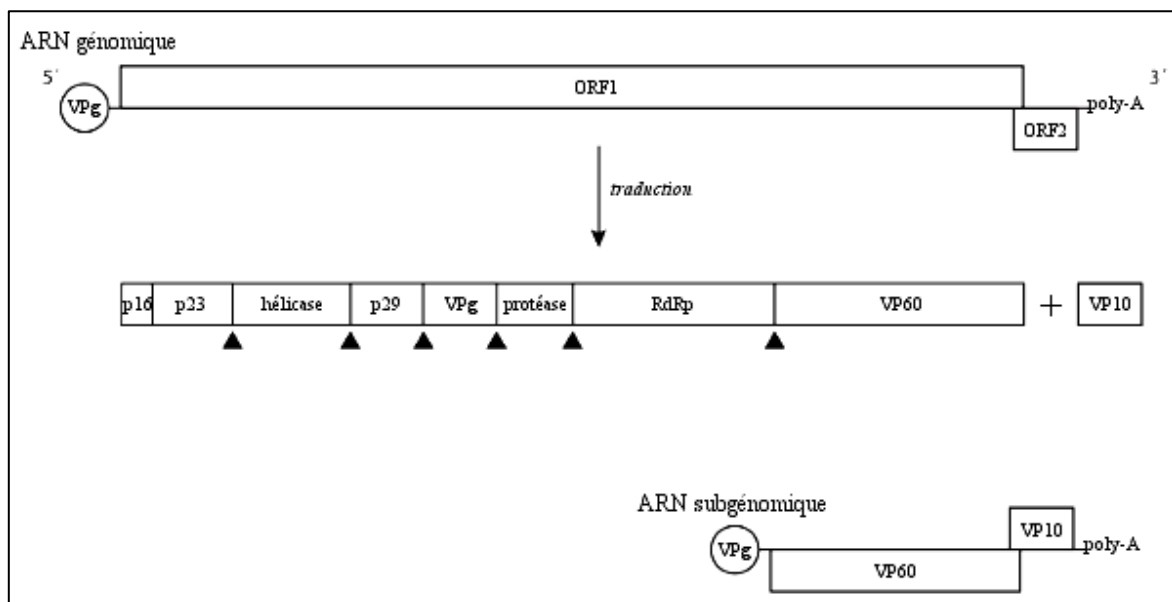
2. Structure et organisation génomique

Le RHDV est séquencé pour la première fois en 1991 (Meyers, Wirblich, Thiel 1991). Le virus dispose d'un ARN monocaténaire de polarité positive de 7437 pb contenant deux cadres de lecture ouverts, ORF1 et ORF2. Lors de la réplication virale, un ARN subgénomique d'environ 2.2 kb codant pour la VP60 et la VP10 est transcrit et contribue à la production de très nombreux virions. Les deux fragments d'ARN sont, comme pour les autres *Caliciviridae*, polyadénylés sur leur extrémité 3' et liés de façon covalente à un résidu Tyr-21 avec une protéine VPg de 10-15 kDa sur leur extrémité 5', permettant leur intégration dans le virion (Hu et al. 2010; Abrantes et al. 2012).

L'ORF1, comprenant les nucléotides 10 à 7044, code pour un polypeptide de 257 kDa, clivé par la suite par une trypsine-like cystéine protéase en protéines non structurales et la protéine majeure de capsid VP60. Les protéines non structurales regroupent les protéines p16, p23 et p29, une hélicase, une ARN polymérase ARN-dépendante, une trypsine-like

cystéine protéase et la VPg. Le rôle des protéines p16, p23 et p29 demeure encore mal connu. L'ORF2, comprenant les nucléotides 7025 à 7378, code quant à lui pour la protéine mineure de capsid VP10, protéine favorisant la réplication virale, induisant l'apoptose et régulant l'expression de la VP60. La VP10 joue ainsi un rôle dans la régulation de la réplication virale et l'émission des virions de la cellule infectée (Hu et al. 2010; Abrantes et al. 2012). Il est ainsi possible de schématiser l'organisation des ARNs génomique et subgénomique comme l'illustre la Figure 8.

Figure 8 : Organisation génomique du RHDV. L'ORF1 code pour une polyprotéine permettant par la suite l'obtention des protéines p16, p23, une hélicase, p29, la VPg, la protéase, la RdRp et la VP60. Les sites de clivage de la polyprotéine sont indiqués par une pointe de flèche. L'ORF2 code pour la VP10. L'ARN subgénomique code quant à lui uniquement pour la VP60 et la VP10. D'après (Abrantes et al. 2012).

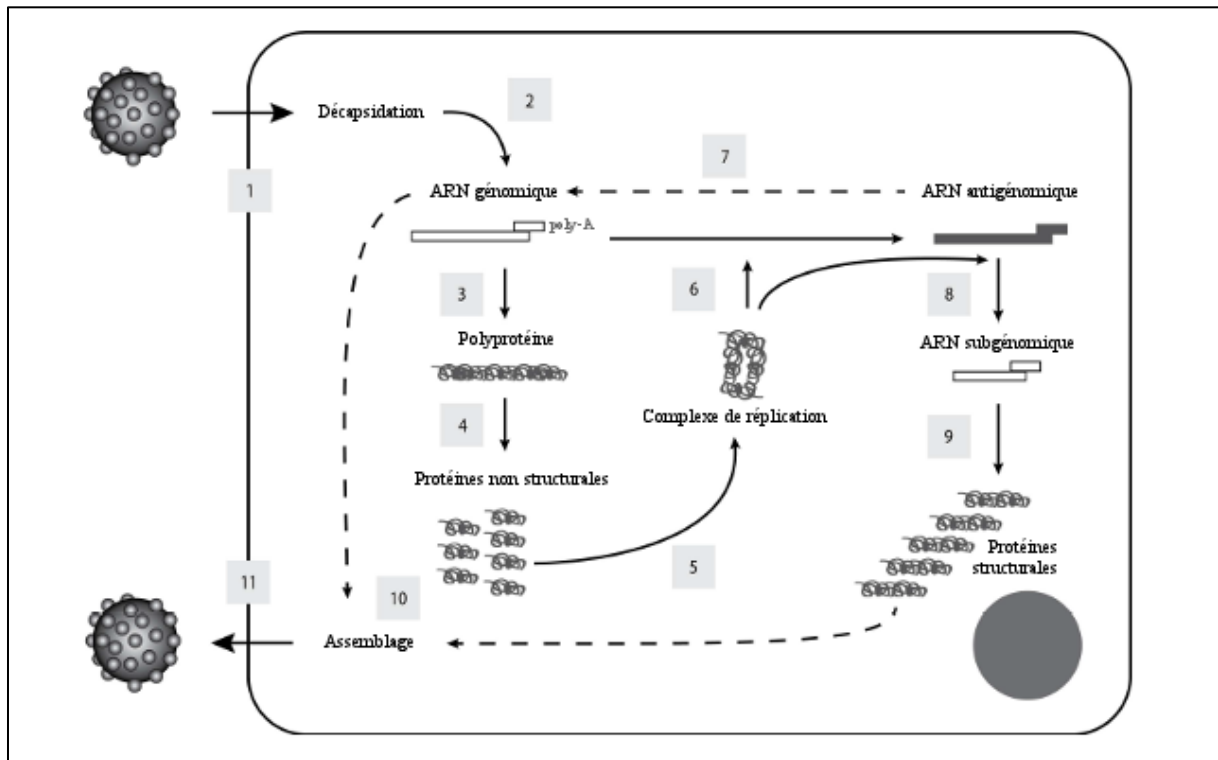


3. Cycle viral

Le cycle viral est semblable à celui des autres *Caliciviridae* représenté Figure 9 (les étapes mentionnées ci-dessous dans le texte font références à celles figurées sur le schéma). Le virion reconnaît tout d'abord la cellule cible via ses récepteurs cellulaires, notamment via les HBGAs (Ming, Xi 2010), puis est internalisé (étape 1). L'ARN viral est alors décapsidé (étape 2) et la protéine VPg rentre en interaction avec les différents acteurs intervenant dans la traduction chez les Eucaryotes. La polyprotéine est traduite (étape 3) puis clivée (étape 4), permettant l'obtention des protéines non structurales. Ces dernières s'associent et participent à la formation d'un complexe enzymatique (étape 5) afin de synthétiser l'ARN antigénomique (étape 6). Ce dernier sert alors de matrice support pour la synthèse de nombreux ARNs

génomiques et subgénomiques (étapes 7 et 8). Ces deux ARN obtenus, plusieurs réplifications du génome peuvent s'effectuer ainsi que leur traduction (étape 9). Les différentes protéines structurales et non-structurales sont ainsi synthétisées et l'encapsidation de l'ARN génomique est réalisée (étape 10). Les virions sont ensuite libérés à l'extérieur de la cellule (étape 11) (Rohayem et al. 2010).

Figure 9 : Cycle de répllication des *Caliciviridae*. Les carrés gris numérotés correspondent aux différentes étapes du cycle viral. D'après (Abrantes et al. 2012).



4. Propriétés

a. Propriétés physico-chimiques

Comme précédemment évoqué, le RHDV est relativement résistant dans l'environnement. Différentes propriétés physico-chimiques sont ici détaillées, sans rappeler toutefois sa capacité à persister dans l'environnement ou dans des carcasses en milieu naturel.

Le virus est résistant à différentes gammes de températures tout en gardant son potentiel infectieux. Plusieurs études expérimentales ont montré que le RHDV peut perdurer au sein de suspension d'organe plus de 225, 413 et 560 jours respectivement à 4°C, -5°C et -20°C. Face à des températures élevées, le virus subsiste au moins 2 jours à 60°C, que ce soit en suspension d'organe ou sur matériel inerte (Xu 1991; Smíd et al. 1991).

Comme beaucoup de *Caliciviridae* entériques, le RHDV présente une résistance à l'inactivation à pH bas. Une étude a mis en évidence une persistance de sa capacité d'infection après 30 min passées dans un milieu à pH 3.0 (Xu 1991).

Le virus est également résistant à plusieurs types de détergents. Le fait que le RHDV soit un virus non enveloppé le rend peu sensible aux désinfectants lipophiles (Doultree et al. 1999). La même étude ayant testé sa résistance à une baisse du pH a également montré une persistance du virus dans 20% d'éther toute une nuit à 4°C ou dans 10% de chloroforme avec agitation durant 10 minutes (Xu 1991). Le RHDV est tout de même inactivé par des solutions d'hydroxyde de sodium à 1% ou autres agents chimiques élevant le pH à plus de 12, détruisant les protéines virales. Des traitements à 1.0-1.4% de formaldéhyde ou à 0.2-0.5% de bêta-propiolactone à 4°C inactivent le RHDV, sans pour autant estomper son pouvoir immunogène (OIE - World Organisation for Animal Health 2009).

b. Attachement, reconnaissance et HBGAs

L'attachement du virus aux cellules cibles constitue la première étape de l'entrée dans celle-ci. Chez les *Caliciviridae*, les facteurs d'attachement ou ligands sont essentiellement des carbohydrates et plus précisément chez le RHDV, des glycanes fucosylés des antigènes du groupe sanguin (également présents dans les tissus, ils sont appelés « histo-blood group antigens » ou HBGAs). Une récente étude s'est penchée sur la spécificité de l'attachement du virus aux différents HBGAs, selon la souche virale ou l'espèce de lagomorphe considérée, l'objectif étant d'apporter de premières informations pouvant expliquer la spécificité d'hôte des différentes souches (Lopes et al. 2017).

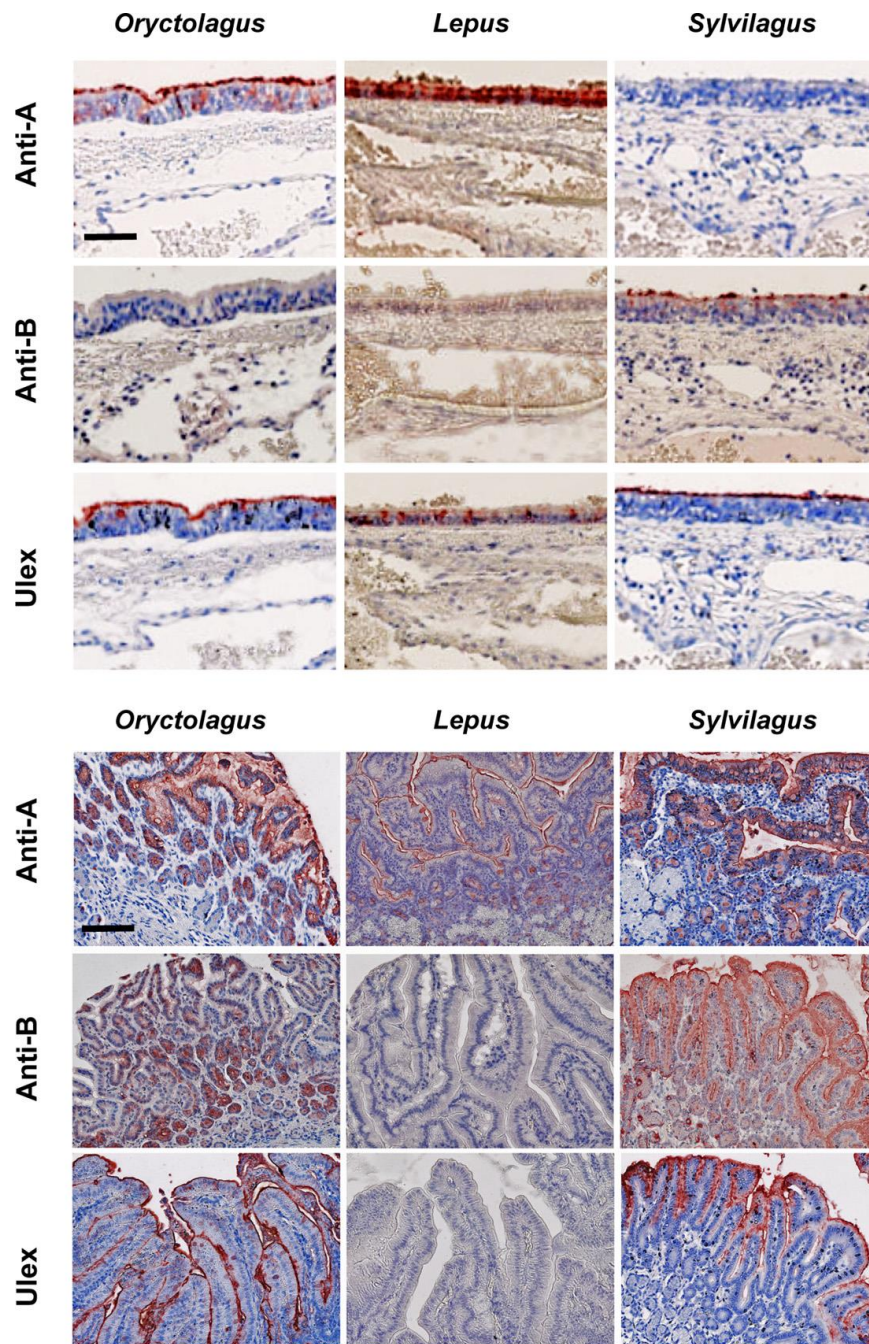
Tout d'abord, les lapins peuvent présenter les phénotypes A^+B^+ , A^-B^- , A^+B^- , A^-B^+ selon l'expression des antigènes A ou B au niveau intestinal. Les antigènes H, exprimés dans tous les cas, permettent la mise en place des deux autres antigènes à la surface cellulaire. Ainsi, tous les phénotypes expriment l'antigène H mais seul le phénotype A^-B^- ne dispose que de ce dernier. Par ailleurs, il a été constaté que le phénotype A^-B^+ était très peu fréquent par rapport aux autres. Ainsi, à partir de phénotypes A^+B^+ , A^-B^- , A^+B^- , l'étude montre que le RHDV classique présente une affinité forte pour les antigènes B, une intermédiaire pour les antigènes A et une faible pour les antigènes H. Les souches de RHDV2 quant à elles semblent suivre les mêmes préférences mais de façon nettement atténuée, étant ainsi moins regardante envers le phénotype.

Concernant l'EBHSV, l'étude met en évidence un glycane spécifique nettement distinct de ceux utilisés par les RHDV. Par ailleurs, ces glycanes semblent préférentiellement présents au niveau de la trachée et de l'intestin grêle des lièvres.

De la même façon, la présence des HBGAs au niveau de la trachée et de l'intestin grêle, portes d'entrée préférentielles du virus, a été estimée chez *O. cuniculus*, *L. europaeus* et *S. floridanus* par immunohistochimie (Figure 10). Il apparaît alors que les antigènes A sont retrouvés en quantité dans la trachée et les intestins d'*O. cuniculus* et *L. europaeus*, mais en quasi voire nulle quantité chez *S. floridanus*. L'antigène B est quant à lui absent de la trachée mais présent dans l'intestin d'*O. cuniculus*, totalement absent chez *L. europaeus* mais retrouvé et dans la trachée et dans l'intestin grêle de *S. floridanus*. Enfin, l'antigène H est retrouvé partout chez *O. cuniculus* et *S. floridanus* mais nulle part chez *L. europaeus*. Par ailleurs, les mêmes résultats ont été obtenus entre trachée et muqueuse nasale chez deux lièvres et deux lapins.

Ainsi, compte-tenu de l'affinité préférentielle des souches pour les HBGAs et l'expression de ces derniers selon la localisation organique et l'espèce, il est alors possible de comprendre pourquoi certaines interactions hôte-virus existent ou n'existent pas. Cependant, ces premiers résultats ne permettent pas à eux seuls d'expliquer totalement la spécificité d'hôte des virus et notamment pourquoi *S. floridanus* n'est pas sensible au RHDV classique (alors que des antigènes B sont présents) mais l'est face à l'EBHSV (alors que le résidu cible de ce virus n'est pas exprimé). Cette étude permet tout de même d'établir la conclusion que l'expression des glycanes selon l'espèce semble intervenir dans la spécificité d'espèce hôte des *Lagovirus*.

Figure 10 : Expression des antigènes A, B et H aux niveaux trachéal et entérique chez plusieurs lagomorphes. Immunohistochimie de sections de trachée (partie supérieure) et de duodénum (partie inférieure) chez *O. cuniculus*, *L. europaeus* et *S. floridanus* par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-A et anti-B et d'UEA-I (lectine d'*Ulex europaeus* I) pour l'antigène H. Les grossissements concernant la partie supérieure et la partie inférieure sont respectivement de x400 et x200. D'après (Lopes et al. 2017).



c. Variabilité antigénique

Comme expliqué précédemment, c'est la protéine majeure de capsid VP60 et plus précisément son sous-domaine P2 qui est responsable des propriétés antigéniques.

De ce fait, les VLPs, formées uniquement à partir des VP60, conservent les propriétés antigéniques du RHDV bien que dépourvues de génome viral. En effet, une étude a mis en évidence que des anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-RHDV ont présenté une immunoréaction contre les VLPs, confirmant la similarité des épitopes avec le RHDV. Par ailleurs, ces VLPs restent capables d'hémoagglutiner les érythrocytes humains. Leur utilisation dans l'élaboration de vaccin représente de ce fait un grand intérêt et sera développé ultérieurement dans la partie II.H.2.b (Nagesha et al. 1995).

Des ressemblances antigéniques ont été mises en évidence entre le RHDV et l'EBHSV. Après inoculations d'EBHSV chez des lapins et de RHDV chez des lièvres, des recherches et titrations d'anticorps anti-EBHSV et anti-RHSV ont été effectuées. Les lièvres ayant reçu une inoculation d'EBHSV ont par la suite présenté un faible titre en anticorps anti-RHDV, tandis qu'ils étaient initialement séronégatifs au RHDV. Cela suggère l'existence d'un déterminant antigénique commun entre les deux virus, comme il avait déjà été évoqué lors d'une étude confrontant le RHDV et EBHSV à plusieurs anticorps monoclonaux (MAbs) : 6 sur 8 MAbs reconnaissaient les épitopes à la fois du RHDV et de l'EBHSV. Un faible titre en anticorps anti-EBHSV a également été trouvé chez les lapins ayant été inoculés par de l'EBHSV. Une épreuve virulente a cependant montré qu'aucune protection n'avait été induite de la part des anticorps anti-EBHSV. De ce fait, et malgré leurs ressemblances, les deux virus présentent tout de même des épitopes neutralisant différents : dans l'étude précédemment évoquée, les 2 autres MAbs sur les 8 n'avaient réagi spécifiquement qu'avec le RHDV (Nauwynck et al. 1993).

En 1998 en Italie est mis en évidence une souche de RHDV présentant quelques propriétés antigéniques distinctes de celles de RHDV jusqu'alors connues. Présentant la même pathogénicité, la souche fût nommée RHDVa. Cette souche ne présentait aucune réaction vis-à-vis du MAbs 1H8 (anticorps permettant une protection contre la RHD) et seule une faible réaction fut observée avec du sérum de lapin ayant déjà rencontré le RHDV. Malgré ces différences antigéniques, les individus vaccinés contre le RHDV furent protégés lors d'inoculation de RHDVa. La similarité de structure de la VP60 était de 93% par rapport au RHDV, avec notamment une importante variation entre les acides aminés 344 et 370 avec seulement 70% de ressemblance au RHDV, séquence intervenant probablement dans la reconnaissance entre l'épitope et le MAbs 1H8 (Capucci et al. 1998).

Les analyses phylogénétiques ont permis de préciser la variabilité génétique du RHDV. De nos jours, les souches de RHDV sont réparties en 6 génogroupes G1 à G6, dont le 6^{ème} G6 correspond aux souches de RHDVa qui restent légèrement distinctes des 5 autres. En ce qui concerne la France, l'arrivée des génogroupes se serait faite ainsi : les génogroupes G1, G2 et G3 seraient d'abord apparues, avant de laisser la place aux génogroupes G4 et G5, puis finalement le RHDVa (Abrantes et al. 2012; Le Gall-Reculé et al. 2003). Dans la suite de cet écrit, le RHDVa sera indifféremment considéré du RHDV classique à moins que la distinction ne soit mentionnée.

Le RHDV2, capable d'infecter un panel d'espèces bien plus large que le RHDV, présente un profil antigénique distinct. Une première étude a permis de montrer que plusieurs MAbs anti-VP60 du RHDV ne réagissaient pas avec les souches de RHDV2 (Le Gall-Reculé et al. 2013). D'autres par la suite ont mis en évidence des différences entre les épitopes du RHDV et RHDV2, toujours à l'aide de MAbs. En particulier, le MAb 1C9 ne réagissait qu'avec la VP60 du RHDV, suggérant une variation antigénique du RHDV2 importante (Bárcena et al. 2015).

D. Pathogénie

1. Voies d'entrée et dissémination du virus

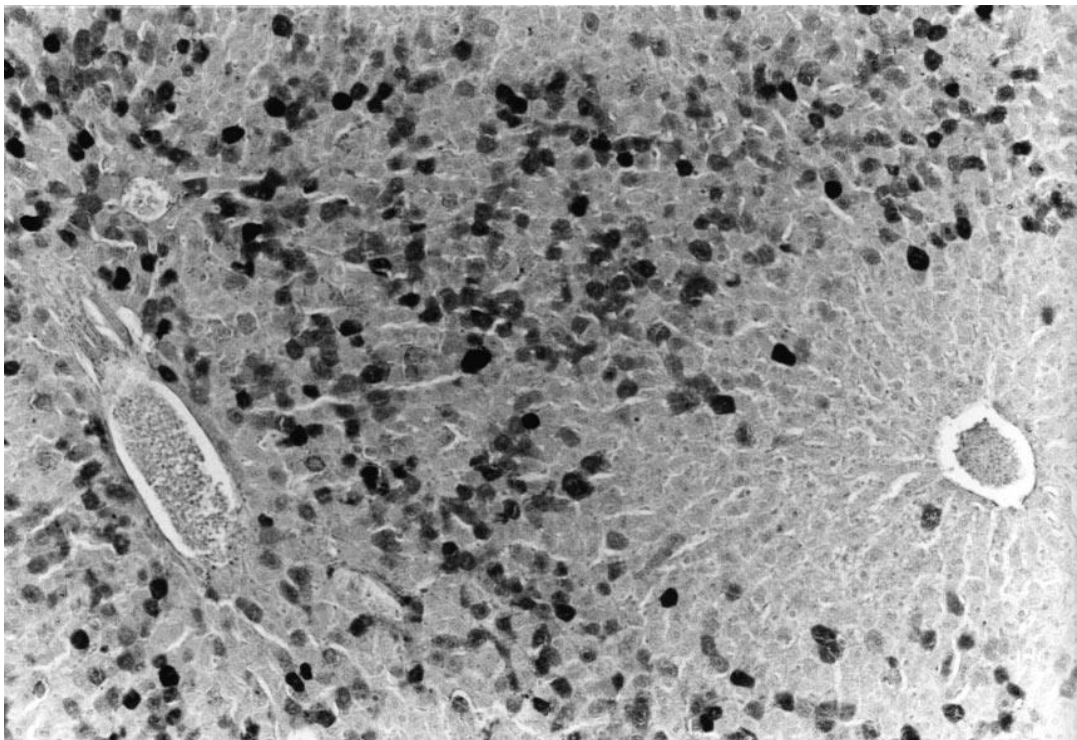
Les principales voies d'entrée du virus semblent être avant tout la voie oro-nasale lors d'ingestion (fèces, carcasses...) ou d'inhalation du virus, des tissus conjonctifs et enfin la voie transcutanée lors de brèches (Marcato et al. 1991). Le virus se répliquerait initialement dans les macrophages alvéolaires, avant d'être disséminé par la circulation sanguine (Kimura et al. 2001). Rapidement, le virus se retrouve dans le foie (12 heures), la rate (36 heures), les reins (moins de 72 heures) puis la trachée. A 72 heures, la charge virale présente dans ces différents tissus devient supérieure à la concentration sérique, suggérant ainsi une potentielle réplication au niveau de ces organes. Le virus est également retrouvé dans d'autres organes, comme le cœur ou les poumons, mais à des concentrations inférieures à celle du compartiment vasculaire, laissant supposer qu'il s'agit d'une simple dissémination virale via le sang pour ces organes (Prieto et al. 2000; Liu, Dang, Wang 2015).

2. Tropisme viral

Bien que le RHDV atteint de nombreux tissus, le principal lieu de la réplication virale se situe au sein des hépatocytes (Gelmetti et al. 1998).

L'atteinte des hépatocytes est d'abord localisée en région centroacineuse avant de s'étendre en région périlobulaire comme l'illustre la Figure 11 (Prieto et al. 2000; Jung et al. 2000). L'infection des cellules hépatiques se poursuit durant toute l'évolution de la RHD chez son hôte. Si l'individu meurt de la maladie, le virus est retrouvé encore longtemps dans le foie et le reste de la carcasse après sa mort. S'il survit à l'infection, comme c'est le cas des jeunes lapins, le foie parvient à se débarrasser du virus et à se régénérer (Marques et al. 2014).

Figure 11 : Immunohistochimie hépatique chez un lapin adulte à 24 heures post-infection. La coloration met en évidence la répartition périlobulaire des virions. D'après (Prieto et al. 2000).



D'autres cellules cibles du virus, dont certaines pourraient notamment avoir un rôle dans la dissémination du virus, ont été mises en évidence. En effet, il semble que le RHDV soit capable d'infecter les macrophages alvéolaires et spléniques, les cellules de Kupffer et les lymphocytes. Les macrophages permettraient notamment au virus de se multiplier localement au niveau du nasopharynx avant d'être disséminé dans l'organisme par la circulation vasculaire (Prieto et al. 2000; Kimura et al. 2001).

Malgré les nombreux cas de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) lors de RHD, les cellules endothéliales ne semblent pas être infectées par le virus. Les CIVD seraient alors plutôt provoquées par des effets indirects du virus (médiateurs, modifications biochimiques...) que par un effet direct du RHDV. Concernant le tractus digestif, le virus n'a été retrouvé ni dans l'intestin grêle ni dans le gros intestin. Les cas d'entérites ne seraient

donc pas dues à une réplication virale locale. De plus, aucune infection bactérienne ou à protozoaires concomitante n'a pu être démontrée (Kimura et al. 2001; Trzeciak-Ryczek, Tokarz-Deptuła, Deptuła 2015).

3. Cytopathologie

L'atteinte hépatique précoce conduit à une insuffisance hépatique aiguë, défaillance étant la principale cause de décès des individus infectés.

Plusieurs mécanismes ont été décrits visant à expliquer la pathogénicité du RHDV au niveau des hépatocytes. Après avoir identifié des signes de nécroses, différentes études ont mis en évidence des phénomènes d'apoptose et d'autophagie. L'apoptose induite serait déclenchée par une augmentation de l'expression des TNF- α et FasL (Ligand for Fas receptor), lesquels permettraient l'activation de récepteurs intervenant dans l'apoptose (voie externe). Le RHDV induirait également un important stress oxydatif contribuant à l'endommagement des mitochondries, l'augmentation de leur perméabilité et activant la voie interne de l'apoptose. Les mécanismes de régénération tissulaire seraient également affectés par notamment une diminution de l'expression du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et de ses récepteurs. Les phénomènes d'autophagies seraient dus au stress du réticulum endoplasmique et la perturbation de l'expression de plusieurs protéines régulatrices de l'autophagie. La dégénérescence du foie ainsi engendrée provoquerait plusieurs modifications biochimiques (cytolyse hépatique, cholestase, défauts de synthèse (notamment des facteurs de coagulation)...), elles-mêmes responsables des signes cliniques observés.

D'autres mécanismes d'apoptose ont également été observés dans d'autres cellules que les hépatocytes. En effet, il a été mis en évidence en 2013 que chez des individus infectés par le RHDV, les lymphocytes et granulocytes présents dans le sang périphérique présentaient des signes d'apoptoses (Niedźwiedzka-Rystwej et al. 2013). Ainsi, le RHDV semble capable d'induire la mort chez plusieurs types cellulaires. Cependant, tout n'est pas à ce jour élucidé et d'autres études sont nécessaires afin d'approfondir la pathogénicité du virus.

E. Conséquences cliniques et anatomopathologiques

Les *Lagovirus* sont responsables de différents tableaux cliniques en raison de la variété de pathogénicité des souches et des différents facteurs de sensibilité évoqués précédemment. Le cas des souches non ou peu pathogènes sera développé dans le III. Dû à l'importante

similitude pathologique engendré par le RHDV et l'EBHSV (Wirblich et al. 1994), l'impact de ce dernier ne sera pas développé.

1. Tableaux cliniques

a. Forme suraiguë

La mort survient en 30 à 36 heures après une ingestion du virus, ou 24 heures en cas d'inoculation par injection. Aucun signe annonciateur n'est visible et l'animal meurt subitement (Kerr, Donnelly 2013).

b. Forme aiguë

L'individu est d'abord prostré, abattu et anorexique. Une congestion des conjonctives palpébrales et des symptômes neurologiques comme de l'opisthotonos (Figure 12.A), des phases d'excitation, une paralysie ou de l'ataxie peuvent être objectivées. L'animal peut aussi présenter des écoulements séro-hémorragiques oculaires et de l'épistaxis (Figure 12.B). Une hyperthermie associée à des signes respiratoires (trachéite, dyspnée ou cyanose) et une augmentation de la fréquence cardiaque peuvent se manifester 24 heures avant la mort, elle-même survenant 48 à 72 heures post-infection (Kerr, Donnelly 2013; Abrantes et al. 2012).

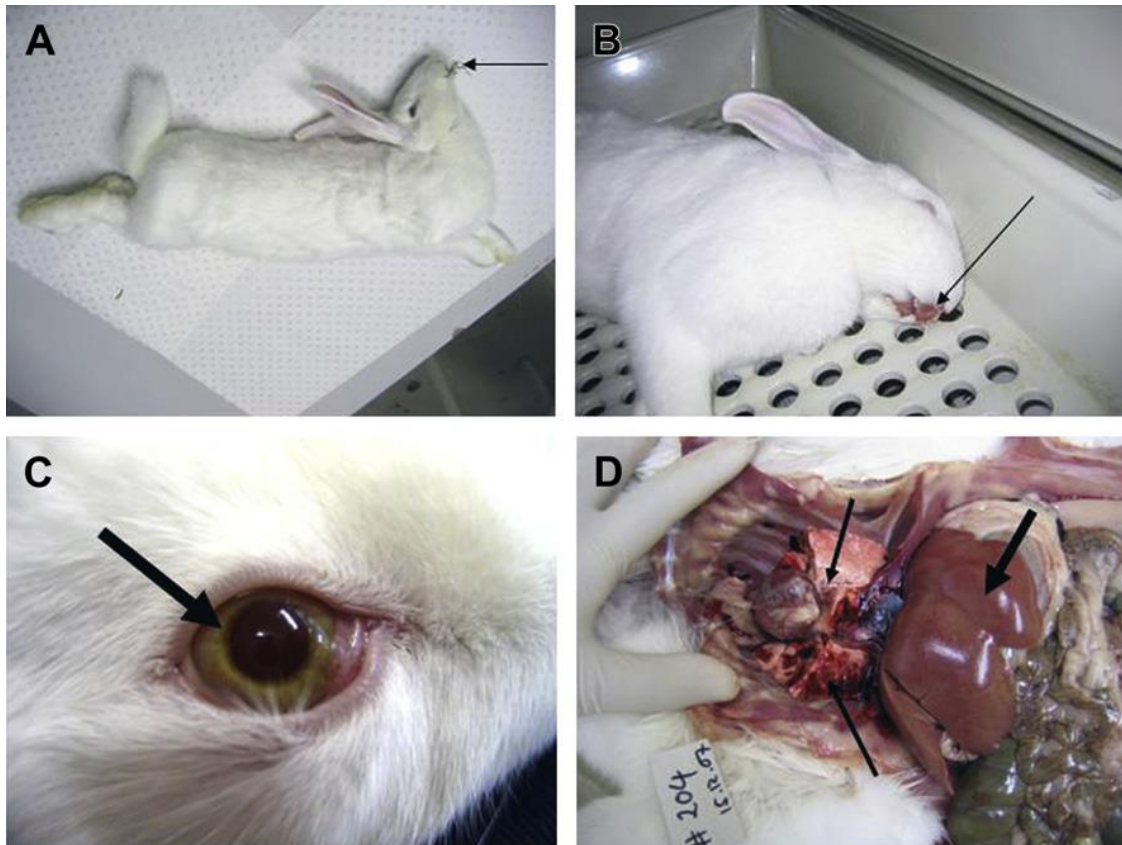
c. Forme subaiguë

Les signes cliniques observés sont similaires à ceux observés lors de forme aiguë mais de façon modérée et davantage d'animaux survivent lors de cette présentation clinique. L'animal présente tout de même des signes d'insuffisance hépatique avec notamment le développement d'un ictère (Figure 12.C), la mort pouvant alors ensuite survenir plusieurs jours à semaines post-infection (Kerr, Donnelly 2013; Abrantes et al. 2012).

d. Forme subclinique ou chronique

Cette forme est essentiellement rencontrée chez les jeunes individus en raison de leur résistance innée. Les individus concernés développent peu voire pas de signes cliniques, la mort ne survenant que rarement dans ce cas de figure (Kerr, Donnelly 2013).

Figure 12 : Manifestations cliniques et lésionnelles de la RHD. (A) Lapin atteint de RHD mort suite à une crise convulsive subite. De la nourriture est encore présente dans la cavité buccale (flèche). (B) Ecoulements sanguins depuis les cavités nasales et buccale (flèche). (C) Ictère visible au niveau de l'iris (flèche) chez un lapin albinos atteint de RHD chronique. (D) Autopsie d'un lapin atteint de RHD : le foie présente une couleur pâle (flèche épaisse) et des hémorragies pulmonaires sont visibles (flèches minces). D'après (Kerr, Donnelly 2013).



2. Modifications hématologiques et biochimiques

a. Hématologie

En ce qui concerne la lignée rouge, aucune modification hématologique n'a pu être observée. Les automates ont rapporté les mêmes nombres d'érythrocytes, taux d'hémoglobines et hématocrites que chez des individus sains (Ferreira, Costa-e-Silva, Oliveira, et al. 2006).

Comme expliqué précédemment, les leucocytes sont directement impactés par le RHDV. Il a été mis en évidence qu'une leucopénie sévère pouvait débiter dès 12 à 18 heures post-infection. Les individus présentent une perte de 90% de leurs leucocytes au moment de leur mort, impliquant d'abord une lymphopénie à 12-18 heures post-infection, puis une perte des hétérophiles à 18-24 heures post-infection. Il est probable que cette leucopénie résulte

directement du tropisme viral du RHDV et de sa cytotoxicité sur les leucocytes circulants et leurs précurseurs dans la moelle osseuse, mais aussi de la sortie du compartiment vasculaire des cellules blanches formant des infiltrations leucocytaires éparses (Ferreira, Costa-e-Silva, Oliveira, et al. 2006).

Une diminution modérée à sévère des plaquettes a été mise en évidence lors d'une infection par le RHDV durant les 6 dernières heures de vie des individus. Cette thrombocytopenie est certainement à corrélérer avec leur consommation lors de CIVD (Ferreira, Costa-e-Silva, Oliveira, et al. 2006).

b. Biochimie

L'insuffisance hépatique est immédiatement diagnostiquée lors d'un bilan biochimique hépatique. Les ASAT (aspartate aminotransférase) semblent être le paramètre le plus sensible de par leur précoce et importante élévation : elles augmentent 12 à 6 heures ante mortem en passant de 10 UI/L à 4000-14000 UI/L. Les ALAT (alanine transaminase) quant à elles augmentent également mais de façon plus lente. Les GGT (γ -glutamyltransférase) et les PAL (phosphatases alcalines) présentent une augmentation précoce mais peu marquée en intensité. Ces quatre paramètres témoignent ainsi d'une cytolysse hépatique et d'une cholestase (Ferreira, Costa-e-Silva, Oliveira, et al. 2006).

D'autres modifications en lien avec la fonction hépatique sont également rapportées. Une hypoglycémie s'installe durant les 6 heures précédant la mort, sans doute en lien avec l'épuisement des réserves en glycogène du foie (Ferreira, Costa-e-Silva, Monteiro, et al. 2006), et serait en partie à l'origine des troubles neurologiques parfois observables. Il est aussi possible d'objectiver une élévation de la bilirubine, responsable de l'ictère (Ferreira, Costa-e-Silva, Oliveira, et al. 2006). Une hyperlipémie associée à une hypercholestérolémie sont visibles 60 heures post-infection, probablement dues à un défaut du métabolisme lipidique. Il est également possible de constater une augmentation de l'ammonium, probablement en lien avec les troubles neurologiques (Chen, Shien, Ooi 2008; Tunon et al. 2003).

Une insuffisance rénale se met en place à partir de 36 heures post-infection. Une élévation de l'urée et de la créatinine a été mise en évidence ainsi que plusieurs désordres électrolytiques. Il est alors observé une hypernatrémie progressive et une hypokaliémie suivie d'une hyperkaliémie (lorsque l'insuffisance rénale devient majeure). Les ions chlorures ne semblent pas varier en concentration (Chen et al. 2008).

Enfin, d'autres perturbations interviennent avec notamment des modifications vis-à-vis des acides aminés aromatiques, responsables en partie d'une potentielle augmentation de la pression intracrânienne (Tunon et al. 2003).

c. Temps de coagulation

Les temps de coagulations sont également affectés. Il a en effet été rapporté un allongement des temps de Quick de céphaline activée, associé à une diminution en concentration des facteurs V et VII à 36-48 heures post-infection (Trzeciak-Ryczek, Tokarz-Deptuła, Deptuła 2015; Kerr, Donnelly 2013).

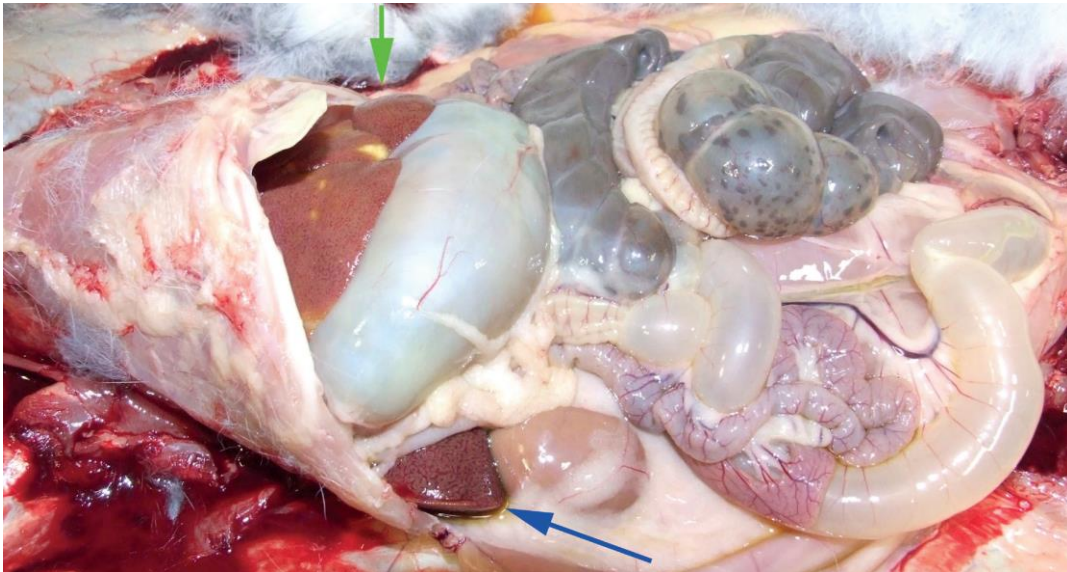
3. Aspects lésionnels

a. Lésions macroscopiques

L'examen nécropsique est essentiellement dominé par des lésions congestivo-hémorragiques sur l'ensemble du cadavre. Toutes les lésions qui sont développées ci-dessous ne sont cependant pas présentes dans tous les cas.

Le foie est l'organe le plus atteint. Il apparaît hypertrophié, pâle et présente un aspect lobulaire plus ou moins marqué. La rate et les reins sont également hypertrophiés mais sombres. Des congestions et hémorragies sont retrouvées sur de nombreux organes ou tissus, le plus souvent sur les reins, le cœur et les poumons, mais aussi en tissu sous-cutané ou au niveau des muqueuses intestinales ou de la vessie. La trachée peut contenir du liquide plus ou moins hémorragique ou de la mousse et peut présenter une muqueuse hyperhémique également. Les Figures 12.D et 13 illustrent quelques exemples de lésions objectivables au moment de l'examen nécropsique (Kerr, Donnelly 2013; Abrantes et al. 2012; Ohlinger, Haas, Thiel 1993).

Figure 13 : Aspects lésionnels d'un lapin atteint de RHD. Il est possible de noter une hépatomégalie associée à une couleur pâle et un aspect lobulaire (flèche verte) ainsi qu'une rate hypertrophiée et déplacée caudalement (flèche bleue). De l'épanchement jaunâtre est également présent. D'après (Rocchi, Dagleish 2018).



b. Lésions microscopiques et histologie

La principale lésion qui est toujours retrouvée est la nécrose de coagulation des hépatocytes, essentiellement située en région péri-lobulaire. Les hépatocytes peuvent apparaître hyper-éosinophiles, et des infiltrations de lymphocytes sont possibles. Lors de RHD subaiguë, le foie peut présenter des signes de régénération cholangio-hépatique. La rate présente une importante déplétion en lymphocytes B et T majoritairement au niveau de la pulpe blanche. Il est également possible d'observer une diminution du nombre de nodules spléniques, une congestion de la pulpe rouge, ainsi qu'une caryorrhesis de nombreuses cellules. Des thrombi peuvent être retrouvés dans tout l'ensemble des tissus, mais essentiellement dans la rate et les reins. Une néphrose est souvent visible avec une atteinte et du cortex et de la médulla. Des hémorragies interstitielles du cortex et une congestion de la médulla sont les lésions le plus souvent observées. L'appareil respiratoire est également dominé par des hémorragies multifocales mais aussi de l'œdème. L'appareil digestif quant à lui présente le plus souvent des infiltrations de lymphocytes et granulocytes ainsi que de l'œdème. Enfin, le cerveau peut être retrouvé également œdématié et infiltré par des lymphocytes, macrophages ou autres cellules plasmatiques (Fuchs, Weissenbock 1992; Marcato et al. 1991; Marques et al. 2014; Kerr, Donnelly 2013).

F. Immunologie

Dans cette partie seront développés les aspects immunologiques qui n'ont pas encore été traités.

1. Réaction immunitaire humorale efficace

Des études ont été menées sur l'efficacité du système immunitaire à contrer une infection du RHDV, et plus particulièrement la réponse humorale. Une étude réalisée en 2000 a soumis de jeunes individus au RHDV et a ensuite suivi, pour ceux ayant survécu à la maladie, leur taux en anticorps dans le temps. Les premiers développés sont les IgM avec un titre maximal à 2 semaines post-infection avant de décliner rapidement. Les IgA apparaissent plus tard mais semblent persister davantage que les IgM, avant de disparaître également. Enfin, des IgG sont synthétisés avec une persistance de plusieurs mois. Dans cette étude, les lapereaux ayant déjà rencontré le RHDV auparavant ont présenté un effet rappel significatif sur leurs pools d'anticorps IgA et IgG (Cooke et al. 2000). Ces résultats ont donc permis de mettre en évidence que le RHDV engendrait une réponse humorale importante.

Une corrélation entre le titre en anticorps et la protection engendrée par ces derniers a été mise en évidence en 2011. Avant inoculation du virus, tous les animaux de l'étude ont été prélevés afin de pouvoir réaliser une quantification de leur titre en anticorps anti-RHDV. Une partie des animaux sont morts de RHD tandis que les autres ont survécu. Il est alors apparu que les animaux ayant résisté à la maladie étaient ceux possédant les titres en anticorps les plus élevés : cela suggère donc que la quantité d'anticorps joue un rôle crucial dans la protection face au RHD (Zheng, Parkes 2011).

Dans la même idée que l'effet rappel décrit précédemment, une autre étude s'est intéressée à la réexposition au virus. Une première inoculation de RHDV a été réalisée chez 10 lapereaux naïfs âgés de 4 semaines, naturellement résistants à la maladie, et une seconde a été effectuée plus tard à l'âge de 8 semaines, âge auquel les jeunes deviennent normalement sensibles. Des prélèvements ont été effectués avant la première inoculation puis toutes les semaines. Bien que n'ayant aucun anticorps anti-RHDV à 4 semaines d'âge, tous les jeunes ont survécu et présenté des titres en anticorps variables. Lors de la seconde inoculation, leurs titres en anticorps ont doublé et aucun signe clinique n'a été détecté (Ferreira et al. 2008). Cette étude souligne l'importance de l'effet rappel dû à la réexposition au RHDV, cette dernière engendrant une protection efficace.

2. Implication de l'immunité passive

Comme il a été vu précédemment, le transfert trans-placentaire d'IgG de la mère octroie une protection efficace contre le RHDV, ces derniers pouvant persister 8 semaines en moyenne avec un maximum de 12 semaines (Cooke et al. 2000).

Une autre étude a mis en évidence l'importance de cette immunité passive. De jeunes lapins de 4 semaines sont exposés au virus puis leur sérum est récupéré à l'âge de 8 semaines. Les sérums collectés sont vérifiés dépourvu en RHDV puis injectés chez des lapins adultes naïfs 24 heures avant, après et au moment d'une inoculation virale. Tous les adultes, normalement sensibles au virus et ne l'ayant encore jamais rencontré, ont survécu sans développer aucun signe clinique. Les titres en anticorps des adultes se sont d'abord avérés élevés sur une courte semaine avant de devenir faibles et perdurer jusqu'à 7 semaines post-infection (Ferreira et al. 2008). Cette étude met donc bien en avant le rôle de l'immunité passive dans la protection face à la RHD.

3. Protections croisées

Dans cette sous-partie seront abordées les potentielles protections croisées qui existent au sein des *Lagovirus*, sans aborder toutefois le cas particulier des RCVs qui sera détaillé dans la partie III.

Lors de la découverte du RHDVa, plusieurs épreuves virulentes ont été réalisées afin d'objectiver ou non une protection croisée entre les virus des génogroupes G1 à G5 et ceux du nouveau génogroupe G6. Malgré leurs différences antigéniques, plusieurs études rapportent que le vaccin classiquement utilisé pour protéger les lapins du RHDV (G1-G5) permet une totale protection face aux souches de RHDVa (Capucci et al. 1998; Le Gall-Reculé et al. 2003).

Dans la même idée, l'émergence du RHDV2 a principalement été remarqué par sa capacité à provoquer la RHD chez des individus vaccinés, montrant que les anticorps anti-RHDV ne protège pas contre le RHDV2 (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Boucher, et al. 2011). Par la suite, il a été élaboré un vaccin capable de protéger les animaux du RHDV2. Ce vaccin ne permettait cependant pas une protection efficace face aux souches classique de RHDV, suggérant ainsi l'incapacité des anticorps anti-RHDV2 à procurer une défense face au RHDV (Le Minor et al. 2013).

Par ailleurs, des études expérimentales visant à stimuler le système immunitaire de lapins par inoculation d'EBHSV ont été réalisées. Afin d'évaluer une potentielle protection croisée, une inoculation de RHDV a ensuite été effectuée. Tous les animaux ayant par la suite développé la RHD, il a été conclu qu'aucune protection clinique n'était induite par l'EBHSV. Par ailleurs, il en a été de même pour des lièvres stimulés avec du RHDV puis exposés à l'EBHSV (Lavazza, Scicluna, Capucci 1996).

G. Diagnostic

1. Diagnostics épidémiologique, clinique et nécropsique

Des informations à la fois épidémiologiques, cliniques et nécropsiques sont nécessaires afin d'établir un diagnostic de RHD, quand bien même le recours à un diagnostic expérimental de certitude sera nécessaire.

Les renseignements épidémiologiques correspondront à une épizootie, avec généralement des symptômes menant au décès de l'animal en seulement quelques jours et un taux de mortalité très important. Etant donné les modes de transmission de ce virus, des informations concernant diverses importations (animaux, carcasses, matériel quelconque...) non contrôlées d'un point de vue sanitaire pourront être rapportées, notamment en élevage. Par ailleurs, d'autres rapports de RHD locorégionales aideront au diagnostic. Le statut vaccinal des individus peut également constituer une aide, bien que l'émergence du RHDV2 en 2010 concernait des animaux vaccinés correctement.

Les tableaux cliniques les plus souvent rencontrés sont ceux des formes suraiguës ou aiguës et n'affectant généralement que les individus adultes de plus de 8 semaines. En effet, à moins que des antécédents de RHD ne soient recensés, les animaux n'auront pas ou peu de protection face au virus. A contrario, les formes atténuées de la maladie seront observables plutôt chez les plus jeunes, ou bien chez les adultes dans le cas où des souches non pathogènes (RCVs) auraient induit une protection partielle. Il sera retrouvé des lésions principalement congestivo-hémorragiques associées à plus ou moins d'autres symptômes ou types de lésions comme énumérées précédemment. Etant donné la forte mortalité, la clinique sera complétée par l'examen nécropsique lors duquel des prélèvements pourront être effectués pour réaliser un diagnostic expérimental de certitude.

2. Diagnostic de laboratoire

L'ensemble des diagnostics expérimentaux est divisé en deux catégories : ceux visant à mettre en évidence l'agent pathogène responsable ou une partie de celui-ci, et ceux quantifiant les anticorps dirigés contre le virus (OIE - World Organisation for Animal Health 2016).

a. Identification de l'agent pathogène

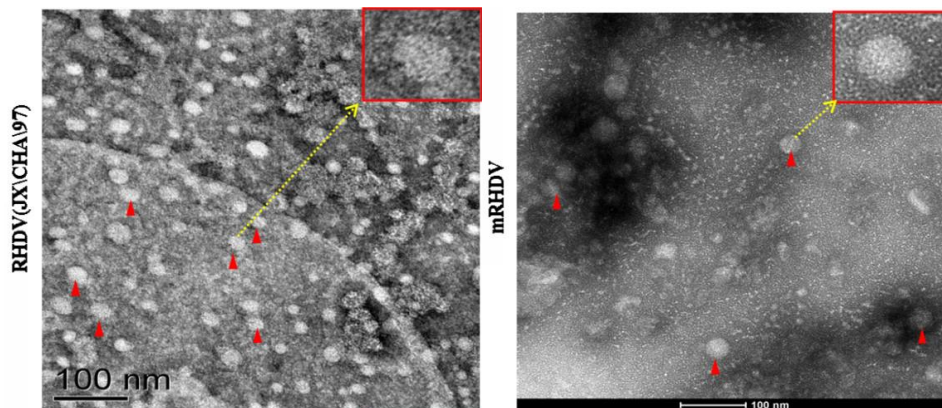
i. Microscopie électronique

Les *Lagovirus* peuvent être observés au microscope électronique en coloration négative. La meilleure technique actuelle correspond à l'ajout d'anticorps anti-RHDV dans l'échantillon à analyser afin d'y observer plus facilement le virus, ce dernier formant avec les anticorps un agrégat rapidement identifiable. La microscopie électronique est cependant limitée étant donné l'existence d'autres outils diagnostiques plus performants et du fait qu'elle ne permet pas de différencier les *Lagovirus* entre eux.

ii. Inoculation virale

Une des principales difficultés à l'étude des *Lagovirus* est la non possibilité de mise en culture *in vitro*. Dans les années 1990, de nombreuses méthodes ont été expérimentées mais aucune n'a vraiment permis d'obtenir une correcte reproduction virale *in vitro*. Cependant en 2017, une étude semble avoir réussi la culture du virus par un changement de deux acides aminés capables ensuite de former un ligand spécifique en surface de la capsid, permettant alors la reconnaissance du virus par des cellules RK-13 et son intégration cellulaire (Figure 14) (Zhu et al. 2017).

Figure 14 : Visualisation des particules virales issues de culture cellulaire sur RK-13 au microscope électronique en coloration négative. Les particules du RHDV mutant (mRHDV) issues de la culture cellulaire sur RK-13 sont visibles et de taille identique à celle de la souche RHDV JX/CHA/97 (contrôle positif), soit d'environ 35 nm. D'après (Zhu et al. 2017).



Face à cette quasi-impossibilité de culture, l'inoculation *in vivo* reste la seule solution permettant de mesurer la capacité d'infection du virus. Cette méthode n'est évidemment pas utilisée en routine pour des raisons éthiques, mais peut être employée de manière encadrée dans certaines études. Elle sert par exemple pour quantifier la virulence de certaines souches virales face à certains titres en anticorps.

iii. Hémagglutination

Cette méthode diagnostique fut la première à être utilisée en routine de laboratoire, aussi bien pour la détection du RHDV, du RHDVa et du RHDV2.

Elle s'appuie sur les propriétés hémagglutinantes du RHDV vis-à-vis des érythrocytes humains. La technique expérimentale correspond à la mise en contact d'hématies de groupe O de l'Homme avec une suspension à 10% de foie ou de rate de l'individu testé. Une agglutination peut être observée en 20 minutes à 2 heures, selon la charge virale. Cette technique comporte plusieurs faux négatifs en cas de charge virale trop faible, c'est-à-dire souvent lorsque l'animal présente une forme subaiguë ou chronique. Cette méthode ne fonctionne pas correctement pour la détection d'EBHSV au sein d'échantillons de lièvre en raison des faibles charges virales trop fréquemment rencontrées lors d'EBHS. La difficulté pratique pour obtenir des érythrocytes humains et les résultats parfois peu convainquant font que cette méthode n'est plus couramment utilisée de nos jours.

iv. Western blot

Cette technique diagnostique permet de confirmer ou non un échantillon revenu douteux aux tests d'hémagglutination ou ELISA (développé plus loin), ou lorsque la présence de nombreuses VLPs est suspectée.

Les protéines VP60 ou ses fragments peuvent ainsi être détectées à l'aide d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux. La méthode consiste à dénaturer les protéines de l'échantillon testé avant de les transférer sur une membrane. Cette dernière est ensuite incubée en présence des anticorps à différents titres. Les échantillons positifs présenteront des protéines de poids moléculaire ou bien de 60 kDa lorsque la VP60 est entière, ou bien de 28 à 41 kDa pour les fragments de la VP60 retrouvés lors la présence de VLPs.

v. Immunohistochimie

Le principe de l'immunohistochimie correspond à la mise en évidence des antigènes sur des coupes de tissu par un marquage utilisant des anticorps spécifiques et une peroxydase. Une fois les coupes histologiques obtenues et préparées, elles sont incubées avec des anticorps monoclonaux ou un sérum anti-RHDV biotinylé. Après lavage, une nouvelle incubation avec une peroxydase (avidin-biotin complex peroxydase) est réalisée. Un dernier lavage avant lecture est opéré.

Il est alors possible d'observer une coloration intense des noyaux et diffuse des cytoplasmes des hépatocytes dégénérés en région périportale, des cellules de Kupffer, des macrophages alvéolaires, spléniques, rénaux et des nœuds lymphatiques. Ces colorations très localisées sont caractéristiques et spécifiques du RHDV.

vi. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Plusieurs tests ELISA sont employés, utilisant la technique dite « sandwich ». Afin de fixer sur le support ELISA tous les variants potentiels qui pourraient se trouver dans l'échantillon à tester, des sérums anti-RHDV et anti-RHDV2 sont employés. Le support, ainsi recouvert d'anticorps, est mis en contact avec l'échantillon. Plusieurs dilutions sont nécessaires pour obtenir ensuite une quantification. Toutes les particules virales alors retenues sur le support sont mises à incuber avec des anticorps spécifiques : les anticorps employés peuvent être dirigés contre les antigènes spécifiques du RHDV G1-G5, du RHDVa, du RHDV2 ou encore contre les épitopes internes afin de détecter les VLPs ou l'EBHSV. Après

l'ajout d'une peroxydase, il est alors possible d'identifier spécifiquement le virus (RHDV, RHDVa, RHDV2, VLPs ou EBHSV) et d'en quantifier la charge.

vii. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

La RT-PCR constitue la méthode diagnostique de choix en termes de rapidité et de sensibilité. En effet, elle a été estimée être 10 000 fois plus sensible que la méthode ELISA. Les échantillons à tester peuvent être issus d'extraction de foie, de rate, d'intestins, d'urine ou encore de sérum. Cette méthode nécessite une rétrotranscription de l'ARN en ADN, puis une amplification de ce dernier. Les amorces utilisées sont généralement désignées à partir du gène codant pour la VP60. Pour l'amplification, des amorces désignées sur des séquences nucléotidiques communes aux différentes souches virales permettent un diagnostic large. Si elles sont désignées sur des portions très spécifiques, l'amplification concernera uniquement des RHDV, RHDVa ou encore RHDV2 selon les cas. Une fois la ou les séquences amplifiées, les mix réactionnels de la PCR sont déposés sur gel d'agarose afin d'observer ou non les amplicons obtenus.

La PCR peut également être observée en temps réel (qPCR) en utilisant des marqueurs fluorescents (sondes TaqMan®, SybrGreen...). Si la séquence nucléotidique à amplifier est présente dans l'échantillon, une fluorescence sera générée au fur et à mesure que les amplicons seront synthétisés, formant ainsi une courbe de la fluorescence en fonction du temps.

b. Tests sérologiques

i. Inhibition de l'hémagglutination

Cette méthode de diagnostic visant à mettre en évidence des anticorps anti-RHDV repose également sur les propriétés hémagglutinantes du virus. Cette fois-ci, le sérum à tester est dilué plusieurs fois puis chaque dilution est mise à incuber avec des antigènes de RHDV. Est ajouté ensuite des érythrocytes de groupe O humains puis le tout est de nouveau incubé durant 30 à 60 minutes. Si l'échantillon ne comporte pas d'anticorps anti-RHDV, une hémagglutination sera observable quelle que soit la dilution de sérum. Cependant, une présence en anticorps en assez grande quantité inhibera l'hémagglutination par formation d'un complexe avec les antigènes viraux. Une hémagglutination sera tout de même toujours

observable pour les réactions dans lesquelles le sérum était le plus dilué. La dernière dilution sans hémagglutination correspond alors au titre en anticorps du sérum.

Cette technique diagnostique n'est cependant plus utilisée en routine pour les mêmes raisons que celles de l'identification de l'agent pathogène par hémagglutination. Elle a maintenant été remplacée par des tests ELISA.

ii. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Les tests ELISA sont plus rapides et faciles à réaliser que la méthode d'inhibition de l'hémagglutination, notamment lorsque de nombreux échantillons sont à tester en même temps. Plusieurs types d'ELISA existent, dont l'ELISA indirect et l'ELISA compétition.

L'ELISA indirect a l'avantage d'être plus sensible que l'ELISA compétition. Un antigène du RHDV est fixé sur un support solide. Le sérum à tester est ensuite mis en contact avec ces antigènes. Les anticorps IgG éventuellement présents dans le sérum se lient à ces derniers, puis des anticorps monoclonaux anti-IgG couplés à une enzyme (péroxydase ou phosphatase alcaline) sont ajoutés après rinçage pour révéler les anticorps sériques.

L'ELISA compétition présente une meilleure spécificité que l'ELISA indirect. Très similaire, des antigènes du RHDV sont fixés à un support puis mis à la fois en contact avec le sérum à tester et avec un sérum polyclonal anti-RHDV couplé à une peroxydase. Il y a alors compétition entre les anticorps polyclonaux couplés à l'enzyme, et les anticorps potentiels du sérum testé. Après rinçage, l'ajout du substrat de l'enzyme permet la lecture des résultats. Un faible signal indique alors un fort titre en anticorps dans le sérum testé, et inversement.

H. Moyens thérapeutiques et préventifs

1. Outils thérapeutiques

Il n'existe pas aujourd'hui de traitement spécifique de la RHD. La prise en charge thérapeutique repose donc sur un traitement symptomatique pas toujours facile à mettre en place en raison de la rapidité d'évolution de la maladie avec une mort survenant en plusieurs heures. Cependant, plusieurs études ont été menées et mettent en évidence l'efficacité de nouveaux moyens thérapeutiques prometteurs.

En 2011, la cardiotrophin-1 fût testée en tant que traitement de la RHD. Cette cytokine, connue pour ses propriétés hépatoprotectrice, est administré à des lapins ayant reçu

une inoculation de RHDV. Tandis que les lapins du groupe témoin (non traités par la cardioprophin-1) sont morts 60 heures post-inoculation, 67% des animaux traités ont survécu jusqu'à la fin de l'étude. La fonction hépatique de ces derniers était moins impactée que chez les témoins d'après les analyses biochimiques. Par ailleurs, une analyse histologique des foies des individus traités avec la cardioprophin-1 a montré un meilleur état des tissus hépatiques, avec notamment une inflammation et un stress oxydatif moins importants. Bien que les charges virales étaient similaires entre les animaux témoins et les animaux traités, la cardioprophin-1 a permis une atténuation de l'inflammation et l'activation de divers mécanismes hépatoprotecteurs, conférant ainsi un meilleur taux de survie face à la RHD (Tunon et al. 2011). Dans la même idée de protection hépatique, une autre étude a montré que la mélatonine pouvait moduler les mécanismes d'autophagie des hépatocytes se produisant lors de RHD, et inhiber la réplication du RHDV (San-Miguel et al. 2014).

Une autre méthode thérapeutique a été testée en 2014. Un fragment de la portion N-terminale de la VP60 a été cloné puis vectorisé. Le plasmide formé a ensuite été inséré dans une bactérie (*Escherichia coli*), permettant ainsi la synthèse de VP60. Ces protéines injectées en intramusculaire chez des poulets ont permis la production d'IgY anti-VP60, lesquelles ont ensuite été récupérées. Ces anticorps ont alors été administrés à des lapins avant ou après une inoculation de RHDV afin d'évaluer leur efficacité en termes de prévention et de traitement. Dans les deux cas, les sujets traités ont montré un taux de survie de 100% face à la RHD. Cette étude a donc permis de mettre en évidence l'efficacité des IgY anti-VP60 comme moyens préventif et thérapeutique face au RHDV (Li et al. 2014).

Dans la même idée, une sérothérapie d'urgence a montré son efficacité. En cas d'exposition au virus, la vaccination nécessitant plusieurs jours à la mise en place de l'immunité ne peut constituer un moyen thérapeutique. Cependant, il a été montré que l'usage d'un sérum hyper-immun pouvait contrer le virus. Ainsi dans certains cas et afin d'éviter la dissémination virale, l'emploi précoce de sérum hyper-immun anti-RHDV peut être employé. Il octroie une protection très rapide face au virus, mais aussi de durée très brève. Il est alors également conseillé de vacciner l'animal rapidement (OIE - World Organisation for Animal Health 2016).

2. Prophylaxie

Bien que certains traitements aient montré leur efficacité dans un contexte d'étude expérimentale, aucun de ces derniers n'a pour le moment été développé. Les méthodes préventives restent encore actuellement le meilleur moyen de lutte contre la RHD.

a. Aspects sanitaires

Depuis son émergence, de nombreuses mesures sanitaires ont été mises au point afin, ou bien en zone non infectée d'éviter l'introduction du virus, ou bien en zone infectée d'éviter sa propagation et permettre son éradication.

Dans le cas où la maladie est diagnostiquée, il est impératif d'agir rapidement dans le but de la contenir. Tous les animaux malades ou suspects de l'être doivent être abattus et un vide sanitaire est nécessaire. Les carcasses sont ensuite incinérées ou bien désinfectées et enterrées à au moins 40 centimètres de profondeur. Les bâtiments d'élevage, le matériel en contact avec les animaux et l'environnement doivent être tous correctement désinfectés. Le transport d'animaux ou de carcasses n'est pas recommandé. Le foyer source de l'infection doit être identifié le plus précisément possible et une zone de protection aux alentours doit être établie. Il est alors conseillé d'y mettre en quarantaine tous les lapins sains et de les vacciner en fonction de la souche virale identifiée. Le RHDV pourra être considéré comme éradiqué si après désinfection aucun nouveau cas n'est répertorié au sein de la zone délimitée autour du foyer durant un mois (Rodak, Smid, Valicek 1991). Ces différentes mesures ont déjà montré leur efficacité lors de l'épizootie de Mexico, permettant une éradication rapide du virus. L'usage de lapins sentinelles semble être un moyen fiable pour vérifier si le virus circule toujours ou non (Gregg, House, Berninger 1991). En ce qui concerne la faune sauvage, le RHDV ne peut être éradiqué facilement. Il est alors nécessaire de garder à distance le virus des individus sensibles en raison de la pression infectieuse plus grande, notamment en clôturant correctement les élevages et en mettant en place des mesures de biosécurité correctes (pédiluves, vêtements spécifiques à l'installation, vaccinations...).

Par ailleurs, le statut de la RHD a très récemment changé en France. En effet, suite à la réunion du Conseil National d'Orientation de la Politique Sanitaire Animal et Végétale s'étant déroulée le 28 mai 2018, un arrêté daté au 30 mai 2018 a classé la maladie en danger sanitaire de deuxième catégorie (Dehaumont 2018; GDS Centre 2018). De ce fait, une intervention de l'Etat ou d'actions collectives dans la mise en place de programmes de prévention, de

surveillance ou de lutte seront probablement maintenant envisagées. Malgré le fait que la RHD est à présent catégorisée, elle n'est pour le moment pas une maladie à déclaration obligatoire.

La prévention de l'introduction du virus dans les zones saines est indispensable. En effet, toute importation d'animaux sensibles au virus, de carcasses, de fourrures ou de fourrages issus de zones endémiques représente un danger d'introduction du RHDV. Pour éviter cela, il est nécessaire de connaître l'origine des animaux importés et de contrôler ces derniers à leur arrivée. Une mise en quarantaine est alors primordiale, et des sérologies peuvent éventuellement être réalisées. Les bonnes pratiques d'hygiène doivent être bien entendues appliquées au sein des établissements (Ohlinger, Haas, Thiel 1993).

b. Vaccination

i. Aspects réglementaires et disponibilité des vaccins

Les vaccins élaborés sont des vaccins inertes, ou bien à partir du virus entier inactivé, ou bien à partir de la VP60. En raison de l'impossibilité de cultiver le virus sur cellules in vitro, l'obtention de particules virales nécessite une inoculation et multiplication in vivo. Le foie des lapins est ensuite récupéré puis le virus extrait. Il est alors chimiquement inactivé de façon à ce que son pouvoir immunogène soit conservé, puis un adjuvant est ajouté. Cette méthode d'obtention soulève un problème éthique ainsi qu'une difficulté de non propagation du virus en dehors des structures d'expérimentation.

Il a donc été mis au point d'autres vaccins n'utilisant que la VP60 comme agent immunogène. En 1996 est construit un vaccin bivalent protégeant à la fois de la myxomatose et de la RHD. Le principe repose sur la construction d'un virus recombinant par intégration du gène codant pour la VP60 du RHDV au sein du génome d'un virus de la myxomatose modifié. Ce virus recombinant permet alors au système immunitaire de reconnaître la VP60 produite par le virus de la myxomatose, virus contre lequel il s'immunise par ailleurs et de produire des anticorps anti-VP60 qui lui permettront une protection efficace face au RHDV (Bertagnoli, Gelfi, Le Gall, et al. 1996). Un vaccin actuellement commercialisé (Nobivac Myxo-RHD, MSD-Animal Health) utilisant cette technologie a vu son efficacité prouvée par une étude en 2012, protégeant alors l'individu vacciné de la myxomatose et du RHDV classique (G1-G6) (Spibey et al. 2012).

Suite à l'émergence du RHDV2 en 2010, il a été nécessaire de produire de nouveaux vaccins efficaces contre cette souche, les protections croisées entre le RHDV et le RHDV2 étant faibles à nulles. Divers vaccins existent à présent, avec notamment la possibilité de vacciner uniquement contre le RHDV2, ou bien de vacciner à la fois contre le RHDV classique et le RHDV2 (Filavac VHD K C+V) (Le Minor et al. 2013).

En ce qui concerne l'EBHSV, aucun vaccin commercial n'est actuellement produit en raison du faible intérêt pratique qu'il représente, les espèces concernées étant principalement sauvages et se reproduisant très rapidement. Cependant, une étude a tout de même montré qu'il était possible de vacciner des lièvres de façon efficace contre l'EBHSV. Le vaccin inactivé employé a permis d'obtenir une réponse immunitaire correcte, bien que la seconde injection n'entraîna pas d'augmentation des titres en anticorps anti-EBHSV mais une augmentation de la durée de l'immunité. Leur protocole suggère qu'il faudrait vacciner toute la population, et notamment pour les jeunes une vaccination à l'âge de deux mois, moment où les AOM disparaissent et où les individus deviennent sensibles (Drews et al. 2011).

ii. Protocoles vaccinaux

Les protocoles vaccinaux ne varient pas beaucoup d'un fabricant à l'autre. Tous recommandent une primovaccination à l'âge de 2-3 mois puis un rappel annuel. Les injections sont réalisées en sous-cutanée la plupart du temps, ou bien en intramusculaire ou intradermique selon les conseils du fabricant (OIE - World Organisation for Animal Health 2016).

Il n'est pas obligatoire de vacciner tous les animaux en élevage. En effet, la durée de vie des lapins de chair étant de 80 jours environs, ils ne seront sensibles au RHDV que durant la seconde moitié de leur vie. Il est alors possible lorsque les bonnes pratiques d'hygiène et mesures sanitaires sont correctement appliquées de ne vacciner que les lapins reproducteurs. Pour ces derniers, un rappel biannuel plutôt qu'annuel est recommandé. Cependant en cas d'épizootie, une vaccination de tous les animaux sains sera nécessaire en raison de la forte probabilité de réinfection (OIE - World Organisation for Animal Health 2016).

Au sein des populations sauvages de léporidés, la vaccination semble impossible pour des raisons économiques et pratiques. En effet, il serait nécessaire de capturer de manière la plus exhaustive possible tous les individus, tout en engendrant un stress considérable. Le vaccin n'ayant qu'une durée d'action efficace d'un an, l'opération devrait être répétée tous les

ans. Ainsi, ce type de procédé n'est pas utilisé. Cependant, l'usage de vaccin qui pourrait être transmis de manière horizontale et par voie oro-nasale serait sans doute un moyen plus simple d'emploi (Abrantes et al. 2012).

iii. Immunité générée

La plupart des vaccins induisent une réponse protectrice en 7 à 10 jours, mais certains peuvent prendre jusqu'à 3 semaines comme le vaccin Nobivac Myxo-RHD d'après son autorisation de mise sur le marché. Pour les vaccins inactivés adjuvés, les anticorps générés sont tout d'abord des IgM durant les premiers jours, puis des IgG au bout de 15 à 20 jours. Seule une très faible proportion en IgA est produite. Parfois même non synthétisés, les IgA sont considérés comme étant des anticorps spécifiques d'une réponse immunitaire au RHDV rencontré naturellement. La durée d'efficacité de l'immunité induite est généralement de 12 mois, mais peut pour certaines formulations aller jusqu'à 15 mois. Concernant les jeunes issus de mères vaccinés, la persistance des AOM peut être plus grande, jusqu'à 80 jours, et une sérologie pourrait indiquer le moment le plus propice à leur vaccination (OIE - World Organisation for Animal Health 2016; Med'Vet 2017; Spibey et al. 2012).

III. Focus sur les souches virales peu ou non pathogènes

A. Historique

C'est pour la première fois en 1996 que le premier virus non pathogène apparenté au RHDV est identifié. Lors d'une étude rétrospective sérologique, des échantillons de sérum de lapin collectés entre 1975 et 1985, soit avant l'émergence de la RHD, ont montré des titres en anticorps anti-RHDV allant de 1:30 à 1:1280. Le virus responsable fut alors détecté et isolé par PCR et Western blot, et le gène codant pour la protéine majeure de capsid fut séquencé. L'analyse comparée des séquences obtenues avec celles de RHDV et EBHSV indiquait qu'il s'agit d'un virus bien distinct, davantage proche du RHDV que de l'EBHSV mais asymptomatique. Ce nouveau virus non pathogène est appelé alors RCV pour Rabbit Calicivirus, ou encore RCV italien afin de le différencier des autres qui seront découverts par la suite. Il semble capable d'induire la production d'anticorps anti-RHDV protecteurs contre la RHD (Capucci et al. 1996; Capucci, Nardin, Lavazza 1997).

Suite à plusieurs constatations de séropositivités anti-RHDV chez des lapins sains en Australie, la recherche d'un virus non pathogène apparenté au RHDV a également été menée

dans ce pays. L'emploi de RT-PCR universelles pour la détection de *Lagovirus* et de Western blot ont permis finalement de détecter un virus effectivement non pathogène, alors nommé RCV-A1 pour Australia-1. Les différents RCV-A1 identifiés semblent proches du RHDV et non pathogènes tout comme le RCV italien. Cependant, ils présentent avec ce dernier plusieurs différences, notamment le fait de n'induire qu'une protection partielle et variable face au RHDV. Après analyse phylogénétique, les RCV-A1 semblent former leur propre clade, suggérant l'existence d'un potentiel ancêtre commun aux RCV-A1, aux autres virus non pathogènes (RCV et RCV-like) et aux RHDV.

En 2007 sur l'île Lambay, se trouvant sur la côte Est de l'Irlande, est de nouveau identifié un passage de virus non pathogène. En effet, bien qu'aucun cas de RHD sur l'île n'ait jamais été rapporté, près de 81% des lapins qui ont pu être prélevés montraient un important titre en anticorps anti-RHDV. Un fragment du génome viral a par la suite été amplifié et séquencé, confirmant la présence du virus. Bien qu'apparaissant non pathogène, le virus Lambay n'a jamais pu être testé expérimentalement (Forrester, Trout, Gould 2007). De façon similaire, l'absence de RHD de l'archipel des Kerguelen et la séroprévalence de 35% des lapins a conduit à une forte suspicion quant à la présence de virus non pathogène sur l'archipel (Marchandeu et al. 2010).

Des lapins séropositifs en bonne santé sont également retrouvés en France et la souche 06-11 est isolée et identifiée. Une étude expérimentale montre qu'elle est capable d'infecter un individu sans provoquer de symptômes, comme pour le RCV et les RCV-A1. D'autres souches similaires à la souche 06-11 seront ensuite découvertes en Europe (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Fages, et al. 2011; Le Gall-Reculé et al. 2015).

En Nouvelle-Zélande sont détectées deux autres nouvelles souches non pathogènes en 2017. Parfois même retrouvées ensembles au sein d'un même hôte (coïnfection), elles restent asymptomatiques pour l'individu infecté. Une analyse phylogénétique a montré que ces deux souches appartenaient aux RCV-A1 (Nicholson et al. 2017).

En 2002 est identifiée une souche particulière à Ashington, en Angleterre. Retrouvée sur un lapin sauvage mort, elle diffère cependant significativement des nombreuses souches de RHDV qui ont pu être retrouvées dans la région. En effet d'un point de vue phylogénétique, elle apparait aussi distincte que le RCV italien vis-à-vis du RHDV, mais sans pour autant présenter pour lui une forte similitude. Bien que cette souche Ashington soit apparue comme

pathogène puisque retrouvée sur un animal mort, son infection expérimentale n'a jamais pu être évaluée. Il est probable qu'il s'agisse en réalité d'une souche non pathogène non responsable de la mort de son hôte (Moss et al. 2002).

Enfin, une épizootie de RHD atypique dans le Michigan fut rapportée en 2009. Bien que les signes cliniques correspondent à ceux classiquement observés en cas de RHD, le taux de mortalité était surprenant puisqu'il n'atteignait que 32.5%. L'agent causal fut identifié comme appartenant bien aux *Lagovirus*, mais était nettement distinct du RHDV, du RCV et de l'EBHSV. Nommé alors MRCV pour Michigan RCV, cette souche de pathogénicité intermédiaire s'inscrit comme virus apparenté au RHDV peu pathogène (Bergin et al. 2009).

Ainsi depuis l'émergence de la RHD, une grande variété de virus peu ou non pathogènes, plus ou moins distincts les uns des autres, a été identifié un peu partout dans le monde, et ce même là où la maladie n'a jamais été rapportée. En plus de leur répartition géographique vaste, de nombreuses analyses notamment moléculaires ont permis de dater l'émergence de ces virus antérieurement à celle du RHDV (Moss et al. 2002; Jahnke et al. 2010). Les hypothèses concernant leur propre évolution et leur classification seront développées dans la partie III.E.1.

B. Epidémiologie

1. Population atteinte

a. Espèces affectées

Ces virus apparentés au RHDV ne semblent affecter qu'*O. cuniculus* de nos jours. Lors de sa découverte en 1996, le RCV italien a été inoculé chez des lièvres mais aucun des individus n'a présenté de symptôme, de séroconversion, ou encore de RT-PCR positive (Capucci et al. 1996). La présence de ce virus chez d'autre espèce n'a pas été rapportée depuis, bien que certaines espèces soient suspectées d'être ou avoir été porteuses de virus apparentés au RHDV, comme le lièvre brun avant l'émergence du RHDV2.

b. Sensibilité et réceptivité, différents facteurs

Tout comme le RHDV, l'impact du RCV semble être influencé par l'âge du lapin. En effet, un transfert d'IgG de la mère au lapereau a été mis en évidence, AOM persistant ensuite jusqu'à 5 semaines après le sevrage. Par la suite, une exposition au virus a permis d'obtenir une séroconversion rapide avec essentiellement des IgM (Capucci et al. 1996). Il est donc

possible que le même phénomène qu'avec le RHDV se produise pour le RCV chez les jeunes, à savoir une protection juvénile procuré par les AOM.

L'influence du climat a été mise en évidence vis-à-vis des infections par les RCV-A1 en Australie. En effet, une étude sérologique dans les populations de lapins a permis de corréler les températures et les précipitations avec la prévalence du RCV-A1. Ces souches virales ont principalement été retrouvées dans les régions pluvieuses et froides, tandis qu'en régions arides aucune d'elles n'a pu être identifiée. Cette constatation permet de comprendre en partie la prévalence du RHDV sur le territoire australien en fonction du climat par le fait que les RCV-A1 semblent conférer une protection partielle face à la RHD. Les RCV-A1 étant absents des zones chaudes et arides, le RHDV y affecte alors les populations de lapins dépourvus en anticorps anti-RHDV et engendre des taux de mortalité classiquement importants. Cependant, la forte prévalence du RCV-A1 en zones pluvieuses et froides octroie aux lapins une protection face au RHDV, ce dernier ayant de ce fait un impact atténué dans ces régions. Leurs répartitions semblent donc être liées entre elles, d'un côté le RCV-A1 atténuant l'impact de la RHD, et de l'autre le RHDV exerçant une pression sélective positive sur les souches de RCV-A1 en raison de sa pathogénicité (Strive, Wright, Robinson 2009; Liu et al. 2014).

2. Sources virales et modes de transmission

Lors de sa découverte, différents modes de transmissions ont été expérimentés. Trois groupes d'animaux ont été formés et séparés dans des cages différentes, deux cages (groupes 1 et 2) en contact direct, et la troisième (groupe 3) à distance afin d'éviter toute possibilité de contact direct ou de transmission par fluides corporelles. Le premier groupe fut alors exposé au RCV par voie oro-nasale, et la séroconversion des animaux des autres cages fut évaluée. En 1 à 2 jours, le groupe 2 avait séroconverti. Au bout de 24 jours d'étude, aucun animal du groupe 3 n'avait séroconverti. Cela suggère donc un mode de transmission par contact direct et non par voie aérienne (Capucci et al. 1996).

Plus exactement, c'est la voie féco-orale qui semble être la plus importante dans la propagation de ces virus. Le virus est détecté dès le 2^{ème} jour post-infection dans les fèces, et peut y être excrété jusqu'au 7^{ème}. Il est également présent dans la bile du 4^{ème} jour jusqu'à 2 mois post-infection. Ces données suggèrent ainsi une importante capacité dans la transmission oro-fécale (Strive et al. 2010).

La persistance du RCV dans l'environnement a également été incriminée vis-à-vis de sa transmission. Ainsi tout matériel contaminé serait susceptible d'être une source virale et d'engendrer une infection (Capucci, Nardin, Lavazza 1997). Cependant, aucune étude n'a encore précisé cette hypothèse.

Par ailleurs, la transmission du RCV semble très rapide au sein de la population bien que l'infection soit asymptomatique. En effet, une étude sérologique a été effectuée au sein de portées de lapereaux dans un établissement où plusieurs infections de RCV ont été rapportées. L'étude montre une séroconversion d'une grande proportion de la population, allant de 27.6% pour les jeunes à 5-7 jours post-sevrage à 100% pour ceux à 32-33 jours post-sevrage (Capucci, Nardin, Lavazza 1997). Cette séroconversion montre la rapidité avec laquelle la propagation virale peut s'effectuer, qui est d'ailleurs assez similaire à celle du RHDV lors d'épizootie.

C. Pathogénicité

La découverte des virus apparentés au RHDV comme le RCV, les RCV-A1 ou MRCV est due à l'absence de signe clinique et de mortalité, ou dans certains cas plus ambigu à leur taux de mortalité inhabituellement bas.

La plupart des souches identifiées n'engendrent ni mortalité ni symptôme. Ces virus non pathogènes regroupent le RCV, les RCV-A1 et les RCVs européens 06-11 et apparentés, virus dont la pathogénicité a été étudiée expérimentalement, ainsi que la souche Lambay où seule l'absence de signe clinique a été objectivée.

En ce qui concerne les souches Ashington et MRCV, l'aspect de leur pathogénicité semble plus controversé. En effet, comme beaucoup de souches de RHDV, la souche Ashington a été retrouvée sur un animal décédé. Cependant, la divergence établie entre cette dernière et les différents RHDV identifiés jusqu'alors était telle que la possibilité qu'elle corresponde à une souche peu ou non pathogène a été évoquée, la mort du lapin ne pouvant être imputable à la RHD. Malheureusement, aucune infection expérimentale n'a pu être réalisée. Comme expliqué précédemment, le MRCV a été identifié comme responsable de RHD dans le Michigan mais avec seulement 32.5% de mortalité. Les signes cliniques étaient comparables à ceux observés classiquement lors de RHD mais bien moins répandus au sein de la population. Par ailleurs, une inoculation du MRCV n'a entraîné qu'une légère prostration et dysorexie passagère, sans mortalité. Cette souche virale apparaît donc comme intermédiaire

en terme de pathogénicité vis-à-vis des autres virus non pathogènes et du RHDV (Moss et al. 2002; Bergin et al. 2009).

Tandis que le RHDV est préférentiellement détecté dans le foie ou la rate, ces virus apparentés semblent présenter un tropisme différent. En effet, plusieurs recherches du RCV par PCR et Western blot ont été réalisées sur foie, rate, intestin grêle, poumons, trachée et muqueuse nasale : le virus a uniquement été décelé dans l'intestin grêle (Capucci et al. 1996). Plus récemment, le RCV-A1 a été retrouvé dans l'intestin grêle, le gros intestin, les plaques de Peyer, certains nœuds lymphatiques mésentériques et la bile. La présence du virus dans cette dernière, et bien qu'absente du foie, n'est pas encore élucidée mais une potentielle remontée ascendante des voies biliaires depuis le duodénum a été évoquée (Strive et al. 2010). La souche Ashington et le MRCV se distinguent de nouveau des autres virus apparentés au RHDV de par leur tropisme hépatique. En effet, ces deux souches ont été détectées à partir de prélèvement de foie : seul le foie a été testé pour la souche Ashington, tandis que le MRCV a été également identifié dans la rate, le tube digestif, les poumons et la trachée, comme pour le RHDV (Moss et al. 2002; Bergin et al. 2009). Ces différents constats suggèrent que leur pathogénicité peut être directement liée à leur tropisme viral et leur capacité à passer les barrières épithéliales (Abrantes et al. 2012).

D. Caractéristiques génomiques, protéiques et immunologiques

1. Analyses séquentielles et organisation génomique

a. Le RCV italien

La séquence de la protéine de capsid du RCV fût comparée à celles du RHDV et de l'EBHSV. L'alignement des séquences a montré une identité en acides aminés de 91.5% entre le RCV et diverses souches de RHDV, témoignant d'une assez faible divergence. Par comparaison, les différentes souches de RHDV présentaient entre elles une identité moyenne de 98%. Avec l'EBHSV, le RCV présente seulement 75% d'identité, valeur très proche de celle entre l'EBHSV et le RHDV (76.5%) (Capucci et al. 1996).

L'organisation du génome du RCV semble proche à celle du RHDV, avec la présence de 2 ORFs dont le premier code pour une polyprotéine se clivant par la suite en plusieurs protéines structurales et non structurales nécessaires au cycle viral, dans la même disposition que le RHDV (cette similitude sera également retrouvée chez les différents virus apparentés

au RHDV présentés ci-dessous). Cependant, tandis que le RHDV dispose de deux codons d'initiation au début de l'ORF2, le RCV semble quant à lui n'en avoir qu'un seul. Par ailleurs, les polyprotéines du RCV et du RHDV présentent une identité estimée à 92% en ne prenant pas en compte les 4 premiers acides aminés (Capucci et al. 1996).

b. La souche Ashington

La souche Ashington, suscitant plusieurs hypothèses quant à sa pathogénicité, présente 21% de divergence par rapport à certaines souches de RHDV isolées en Grande-Bretagne. Cette forte variation, quasi-similaire à celle entre le RCV et les mêmes souches de RHDV (18%), est à l'origine du doute vis-à-vis de ses caractéristiques pathogéniques. Cependant, la comparaison avec le RCV indique une différence de près de 19%, montrant ainsi que la souche Ashington est tout de même bien distincte du RCV italien (Moss et al. 2002).

c. La souche Lambay

La souche isolée sur l'île de Lambay présente des identités nucléotidiques de 84.9% pour la souche Ashington, 81.0% avec le RCV et 82.8% avec le RHDV. D'après une analyse phylogénétique, les souches Lambay et Ashington seraient apparues après divergence du RCV et partageraient un ancêtre commun avec lui, ancêtre plus proche que celui partagé avec les souches classiques de RHDV (Forrester, Trout, Gould 2007).

d. Le MRCV

Le séquençage du MRCV a permis d'obtenir une séquence de son génome atteignant 7387 pb, ce qui correspond aux tailles génomiques habituellement retrouvées chez les RHDV. Une comparaison phylogénétique basée sur la séquence codant pour la VP60 a été effectuée avec plusieurs souches de RHDV et le RCV. Le MRCV apparaît nettement distinct des RHDV avec des identités nucléotidiques allant de 89.8 à 91.3% et davantage proche du RCV italien avec 91.7% d'identité. Par ailleurs, la comparaison avec les RHDV basée sur la portion codante de la polyprotéine (VP60 exclue) ne montrent que 77.9 à 78.5% de similarité, indiquant bien que le MRCV semble être une souche distincte (Bergin et al. 2009).

L'ORF1 et l'ORF2 codent respectivement pour 2328 et 113 acides aminés, les deux se chevauchant sur 8 pb. Les diverses protéines codées par l'ORF1, telles que l'hélicase, la polymérase, la VPg ou encore la VP60, sont retrouvées dans la même disposition que chez le RHDV. L'ORF2 codant pour la protéine mineure de capsid présente une séquence plutôt

conservée. Tout comme le RCV et à contrario du RHDV, le MRCV semble ne posséder qu'un seul codon d'initiation au début de l'ORF2. Ces analyses suggèrent ainsi que le MRCV n'est pas un RHDV classique, mais plutôt une souche intermédiaire (Bergin et al. 2009).

e. Les RCV-A1

Le génome du RCV-A1 obtenu en 2009 est constitué de 7422 pb sans queue polyA, le rendant ainsi plus court que le RHDV. Plusieurs délétions et insertions de quelques nucléotides sont notables le long du génome, certaines étant partagées avec l'EBHSV. Les RCV-A1 partagent alors 78% et 71% d'identité moyenne avec le RHDV et l'EBHSV respectivement. L'analyse phylogénétique des RCV-A1 suggère que ces virus constituent un groupe monophylétique, partageant un ancêtre commun avec les RHDV, RHDV2, le RCV et autres virus apparentés au RHDV (Strive, Wright, Robinson 2009; Jahnke et al. 2010; Nicholson et al. 2017).

Le premier ORF d'une taille de 7023 pb codent pour 2300 acides aminés tandis que le second plus petit de 342 pb codent pour 113 acides aminés. L'organisation génomique semble être la même, avec notamment la présence d'une polyprotéine. Les acides aminés des RCV-A1 et RHDV présentent en moyenne 86.8% d'identité, certaines protéines étant plus ou moins conservées que d'autres avec 77% d'identité pour la protéine p16, ou 95% pour les protéases. Par ailleurs, les régions non traduites aux extrémités 5' et 3' présentes chez le RHDV semblent conservées chez les RCV-A1 (Strive, Wright, Robinson 2009).

f. Les RCV-E

La souche 06-11 identifiée en 2011 en France a ensuite été regroupée avec d'autres souches semblables à cette dernière. Seule la VP60 de la souche 06-11 a d'abord été séquencée, et a permis d'établir les premières comparaisons avec les autres virus. Le gène codant la VP60 fait alors 1734 pb et comporte plusieurs délétions. Une délétion est par ailleurs partagée avec la souche Ashington et le RCV, mais qui est cependant décalée d'un acide aminé pour ce dernier. Les comparaisons des séquences nucléotidiques codant pour la VP60 montrent que la souche 06-11 paraît plus proche du virus Ashington par rapport au RCV, aux RCV-A1 et aux RHDV, avec comme identités nucléotidiques respectives 93.8%, 85%, 79% et 83%. L'analyse des séquences d'acides aminés a par ailleurs révélé les mêmes similitudes. Le génome complet de la souche 06-11, mesurant 7436 pb, a récemment été obtenu et de nouvelles analyses ont été effectuées. La souche présente une identité

nucléotidique de 86% avec le RHDV, 91% avec le RHDV2, 79% avec les RCV-A1, 81% avec le MRCV et 71% avec l'EBHSV. Cependant, indépendamment de la méthode utilisée, l'analyse phylogénétique du génome complet met en évidence une plus forte similitude de la souche 06-11 avec les RHDV2 qu'avec la souche Ashington ou le RCV, comme l'avaient suggérées les précédentes analyses basées sur la VP60. Ainsi, bien que les souches 06-11 et apparentés étaient d'abord rapprochées des RCV et RCV-like, ces dernières semblent finalement aujourd'hui plus proches des RHDV2 que des autres (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Fages, et al. 2011; Lemaitre et al. 2018).

La région non traduite à l'extrémité 3' est similaire à celle du MRCV, raccourcie par rapport aux RHDV2 et plus longue par rapport aux RHDV et RCV-A1. L'ORF1 mesure 7029 pb et codent pour la polyprotéine de 2342 acides aminés. Il y est retrouvé les mêmes protéines structurales et non structurales, avec le même ordre et les mêmes localisations dans le génome. L'ORF2 mesure quant à lui 342 pb et code pour 113 acides aminés constituant la protéine mineure de capsid. Comme le RCV et le MRCV, la souche 06-11 ne dispose que du deuxième codon d'initiation de l'ORF2 (Lemaitre et al. 2018).

D'autres souches distinctes de celles apparentées au 06-11 ont été identifiées en France, puis ailleurs en Europe. En effet, l'analyse de leur séquence a permis de montrer un fort rapprochement avec les RCV-A1 par rapport aux autres virus. Les identités nucléotidiques étaient de 86% pour les RCV-A1, 80% pour les RHDV, 80.6% pour le RCV, 79.6% pour le MRCV, 80.5% pour la souche 06-11 et 80.8% pour le RHDV2. Elles présentaient également une insertion d'acide aminé sur la VP60 en position 436 similaire avec les RCV-A1. Finalement, l'analyse phylogénétique de ces nouvelles souches a permis de conclure qu'elles formaient avec les RCV-A1 un groupe monophylétique. Afin de les distinguer des précédentes souches 06-11 et apparentées également retrouvées en Europe, le nom de RCV-E pour Europe a été établie. Les virus RCV-E1 regroupent alors les souches 06-11 et apparentées, proches des RHDV2, tandis que les virus RCV-E2 sont constituées des autres souches non pathogènes identifiés en Europe et proches des RCV-A1 (Le Gall-Reculé et al. 2015).

2. Pouvoirs antigéniques et immunogènes

Une étude a cherché à quels HBGAs les RCV-E1, RCV-E2 et RCV-A1 pouvaient se lier de façon plus ou moins spécifique. En évaluant leur capacité à se lier aux parois intestinales de lapins de phénotype AB différents (A^+B^+ , A^-B^- et A^+B^-), il s'est avéré que les

RCV-E2 et RCV-A1 montraient une forte préférence pour les antigènes B, une plutôt intermédiaire pour les antigènes A et une faible pour les antigènes H. Ce profil de liaison semble être le même que chez le RHDV, montrant ainsi des profils antigéniques relativement proches. En ce qui concerne les RCV-E1, la liaison était forte uniquement pour les antigènes B. Ces premières informations concernant leurs affinités d'attachement montrent une certaine spécificité pour les antigènes B. Or, comme il a été décrit précédemment, les antigènes A et B sont tous deux exprimés chez *O. cuniculus*, mais pas de la même manière. Les antigènes A sont retrouvés aussi bien dans le tube digestif que dans la trachée, tandis que l'antigène B n'est lui retrouvé qu'au niveau des intestins. Leur spécificité pour *O. cuniculus* et leur tropisme digestif coïncident donc avec leur préférence pour l'antigène B. Cependant, l'étude montre que *S. floridanus* exprime également l'antigène B au niveau de sa muqueuse intestinale, alors qu'aucun RHDV ou virus apparenté non pathogène n'a encore été détecté chez cette espèce aujourd'hui. A ce stade, il n'est pas encore possible de comprendre tous les mécanismes intervenants dans la spécificité d'hôte des virus non pathogènes (Lopes et al. 2017).

C'est par leur pouvoir immunogène que les RCV et RCV-like ont été découverts. Plusieurs études se sont donc penchées sur l'immunité humorale induite par ces virus.

Une étude a cherché à caractériser les classes d'immunoglobulines anti-RHDV produites lors d'infection par le RCV-A1. Les IgM et IgA peuvent être détectées à partir du 7^{ème} jour post-infection, tandis que les IgG ne sont retrouvées qu'en moyenne vers le 11^{ème} jour avec cependant une importante variation interindividuelle. Le taux d'IgM semble décliner à partir du 14^{ème} jour pour finalement devenir indétectables 2 à 3 semaines post-infection. Les IgA restent elles présentent au moins 28 jours après (Strive et al. 2010).

Le virus ne semble pas stimuler exactement de la même façon le système immunitaire des lapereaux selon leur âge. En effet, les titres en anticorps ont été établis chez des jeunes d'âges différents après le sevrage. Les résultats montrent que plus l'individu est âgé (de 0 à 20 jours en post-sevrage), plus la production en anticorps induite est importante. De plus, les classes des anticorps synthétisés semblent également varier dans le temps en post-sevrage. Dans l'étude considérée, les anticorps des jeunes à 14 jours post-sevrage étaient essentiellement des IgA et des IgM, les IgG étant en très faible quantité ou absentes. A 20 jours post-sevrage, les IgM voient leur quantité diminuer tandis que les IgG augmentent et les IgA persistent. Enfin à 33 jours, seules restent les IgG et les IgA. Par ailleurs, les titres en

anticorps des mères semblent être corrélés à ceux des lapereaux. Il a été montré que chez une mère ayant peu d'anticorps, son lapereau présentera un titre en anticorps faible. Inversement, une mère avec un fort titre en anticorps fournira à son petit davantage d'anticorps (Capucci, Nardin, Lavazza 1997).

Les anticorps anti-RHDV induits par les RCV et RCV-like octroient une protection plus ou moins efficace face à la RHD. Les potentielles protections croisées ont été évaluées expérimentalement avec le RCV, les RCV-A1 et RCV-E1. En ce qui concerne le RCV, la protection générée est totale chez tous les individus et empêche l'apparition de symptôme lors d'exposition au RHDV, aussi bien chez des individus ayant un fort titre en anticorps que ceux en ayant un plus faible (Capucci et al. 1996).

Cette protection semble plus controversée lorsqu'il s'agit de RCV-A1. En effet, parmi les 4 animaux dont le système immunitaire avait été stimulé par le RCV-A1 et chez qui le RHDV a été inoculé par la suite, seul un a survécu sans ne présenter aucun signe clinique. Le second présenta de la fièvre mais survécut, le troisième et quatrième développèrent respectivement une forme aiguë et une forme suraiguë, ces dernières étant cependant davantage étalées dans le temps par rapport aux témoins. Il s'avère que les deux ayant survécus présentaient des titres en anticorps bien plus importants que les deux autres, ainsi que des IgM. Le titre en anticorps et les IgM semblent ainsi influencer l'efficacité de la protection (Strive et al. 2010).

Cependant, une part de cette hypothèse a été réfutée quelques années plus tard en montrant que la protection n'était pas dépendante du titre en anticorps mais du temps s'écoulant entre les deux passages viraux, du RCV-A1 et du RHDV. En effet, le taux de mortalité semble augmenter lorsque les infections deviennent trop espacées. Plus exactement, une étude a montré qu'un espacement de moins de 8 semaines permettait un taux de survie de 38% de la population, contre 13% pour 8 à 10 semaines et 6% à plus de 10 semaines. Enfin, les taux de protections conférés par les RCV-A1 semblent être en moyenne compris entre 33 et 52%, montrant bien que ce virus n'octroie qu'une protection partielle (Strive et al. 2013).

Les RCV-E1 et plus particulièrement la souche 06-11 ont également été testées dans l'induction d'une protection croisée. Ainsi, plusieurs lapins ayant développé des titres en anticorps très importants suite à l'infection par la souche 06-11 reçurent une inoculation intramusculaire de RHDV. Tous les individus sont morts avec les symptômes et lésions

typiques de la RHD, montrant ainsi la totale absence de protection face au RHDV (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Fages, et al. 2011).

Ainsi, les virus non ou peu pathogènes apparentés au RHDV sont capables d'induire une réponse immunitaire. Les anticorps produits persistent alors plus ou moins longtemps et permettent d'octroyer un gradient de protection face au RHDV, allant d'une absence totale pour les RCV-E1, partielle pour les RCV-A1 et totale pour le RCV.

E. Hypothèses quant à l'évolution du RHDV

La découverte de virus non pathogènes a permis d'émettre plusieurs hypothèses quant à l'évolution et l'émergence des RHDV et RHDV2. Avant de les développer en III.E.2, un focus sur l'évolution et l'actuelle classification des RCVs est réalisé.

1. Evolution et classification des RCVs

L'émergence des RCVs semble dater de bien plus longtemps que celle des RHDV puisque de nombreuses identifications ont en effet été réalisées sur des échantillons antérieurs à 1984. Une étude en 2002 portant sur l'analyse d'échantillons de sérum, de foie et de moelle osseuse datant de 1955 a pu mettre en évidence le virus, suggérant ainsi des circulations virales à bas bruit depuis au moins 50 ans (Moss et al. 2002). Plus récemment, l'utilisation de l'horloge moléculaire a permis de dater l'ancêtre commun des RCV-A1 au milieu du 19^{ème} siècle, période correspondante avec à la première introduction de lapins européens sauvages en Australie en 1859. Par ailleurs, la découverte des RCV-E2 en France très proches des RCV-A1 confirme l'origine européenne des RCV-A1. Par la suite, l'émergence du virus de la myxomatose et du RHDV ayant conduit à la perte de 95% de la population de lapins en Australie aurait généré un goulot d'étranglement majeur au sein des RCV-A1 et ainsi permis une importante différenciation génétique (forte dérive génétique) (Jahnke et al. 2010; Le Gall-Reculé et al. 2015).

Au fur et à mesure des découvertes de nouveaux RCVs, de nombreux arbres phylogénétiques plus ou moins différents ont été construits et des hypothèses évolutives ont été émises. Cependant, tous s'accordent à dire que les RCV-A1 et RCV-E2 forment ensemble un groupe monophylétique partageant un même ancêtre commun avec les autres, l'EBHSV étant exclu.

Comme il a été expliqué précédemment, le virus Lambay et le virus Ashington semblent diverger chacun du RCV italien, le plus probablement depuis son introduction d'un côté en Irlande et de l'autre en Angleterre (Forrester, Trout, Gould 2007).

Les RCV-E1 ont d'abord été rapprochés de la souche Ashington, suggérant l'existence d'un ancêtre commun avec elle et d'un autre plus ancien avec le RCV, de la même manière que la souche Lambay (Le Gall-Reculé, Zwingelstein, Fages, et al. 2011). Aujourd'hui, les RCV-E1 semblent davantage proches des RHDV2 et pourraient être à l'origine de l'émergence de ces derniers (Lemaitre et al. 2018).

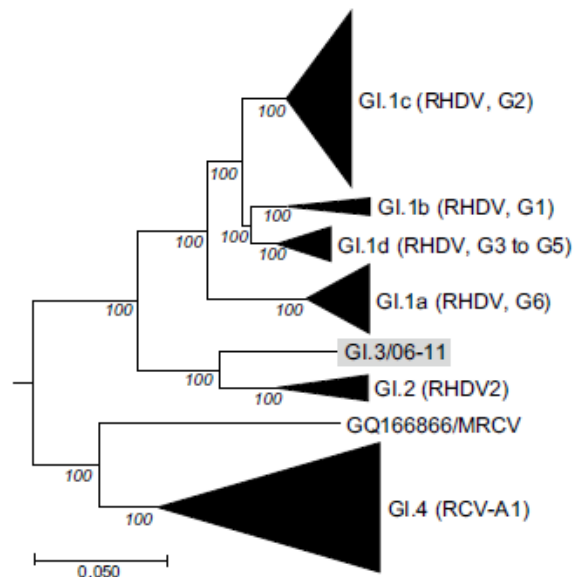
Le MRCV présente quant à lui de nombreuses ressemblances avec les RCV-E1 et RCV-A1 rendant difficile l'interprétation de sa place au sein des arbres phylogénétiques. Il est alors souvent associé et retrouvé proche ou bien des RCV-E1, du RCV et de la souche Ashington, ou bien des RCV-A1 et RCV-E2 selon les études (Mahar et al. 2016).

En conclusion, les virus non ou peu pathogènes semblent exister depuis de très nombreuses années et une forte dérive génétique a conduit à l'obtention d'une importante différenciation génétique. Bien que de nombreux arbres phylogénétiques existent et que tous les virus non ou peu pathogènes ne forment pas ensemble un groupe monophylétique (Jahnke et al. 2010), toutes les études mettent en évidence l'existence d'un ou plusieurs ancêtres communs partagés entre les souches pathogènes et apathogènes. Il est alors distingué d'une part 5 génotypes distincts que sont les RHDV classiques (RHDV G1-5 et RHDVa), les RCV-E1, les RCV-A1 et RCV-E2 ensemble, les RHDV2 ainsi que les EBHSV, et enfin d'autre part les virus difficilement classables comme le RCV italien, le virus Ashington et le MRCV (Le Pendu et al. 2017). Les deux arbres phylogénétiques présentés ci-dessous par les Figures 15 et 16 illustrent les différentes possibilités d'évolution, le deuxième ayant été réalisé plus récemment que le premier et issu de l'étude montrant le fort rapprochement entre les RCV-E1 et les RHDV2.

Figure 15 : Arbre phylogénétique des différents *Lagovirus* connus. Il est retrouvé de haut en bas les RHDV G1-5 (GI.1b-d), les RHDVa (GI.1a), les virus peu ou non pathogènes inclassables comme le RCV italien ou le MRCV, les RCV-E1 (GI.3), les RHDV2 (GI.2), les RCV-A1 et RCV-E2 (GI.4), et les EBHSV (GII.1). Le génotype GII.2 correspond à une seule séquence nucléotidique d'un virus apparenté aux EBHSV (HaCV) et est représenté avec un point d'interrogation en raison de son unicité. D'après (Le Pendu et al. 2017).



Figure 16 : Arbre phylogénétique réalisé à partir de la séquence nucléotidique complète de la souche 06-11. Le *Lagovirus* GII.1/GD89 (code GenBank Z69620) est utilisé comme groupe extérieur afin d'enraciner l'arbre. Il est ici notable que la souche 06-11 et le MRCV semblent davantage proches respectivement des RHDV2 et des RCV-A1. D'après (Lemaitre et al. 2018).



2. *Emergence des virus de la RHD*

Le phénomène d'acquisition de pathogénicité au sein des *Lagovirus* s'est manifesté plusieurs fois depuis la première émergence de la RHD en 1984. De nouveaux variants viraux se sont manifestés et de nombreuses barrières d'espèces ont été franchies. Ajouté à cela, différents degrés de pathogénicité ont été rapportés, allant d'un taux de mortalité de 100% à des infections asymptomatiques. Deux hypothèses majeures quant à l'évolution de la pathogénicité chez les virus apparentés au RHDV ont ainsi été évoquées :

- L'acquisition du caractère pathogène à partir de souches primitivement non pathogènes, faisant intervenir des modifications génétiques comme des mutations ponctuelles ou des phénomènes de recombinaisons ;
- Le saut d'espèce, reposant sur le portage asymptomatique du virus par une espèce non cible pouvant alors le transmettre par la suite à une espèce sensible.

a. Evolution à partir de souches non pathogènes

De nombreuses souches non pathogènes semblent partager un ancêtre commun avec des virus pathogènes, comme par exemple les RCV-E1 avec les RHDV2 ou le RCV italien avec les RHDV. Ainsi, l'évolution progressive avec l'acquisition du caractère pathogène est envisageable, incluant diverses modifications au niveau du génome telles que des mutations ponctuelles ou des recombinaisons lors de coïnfection.

Les virus à ARN sont connus en particulier pour leur taux d'erreurs élevé lors de la réplication. Cette caractéristique est en effet retrouvée chez les *Lagovirus*, et en particulier avec le RHDV où le taux a été estimé à $2.77 \cdot 10^{-3}$ substitutions/site/an en moyenne. Ce taux s'est avéré être encore plus important chez les RCV-A1, atteignant $5 \cdot 10^{-3}$ substitutions/site/an, suggérant ainsi la possibilité d'une accumulation rapide de mutations génomiques (Mahar et al. 2016).

Une étude a remarqué un changement de 9 acides aminés entre plusieurs virus pathogènes et virus non pathogènes, ce qui suggère l'implication des mutations dans l'acquisition de pathogénicité. Cependant, aucun test expérimental n'a été effectué afin de confirmer cette hypothèse. Une étude intéressante chez les *Norovirus* a montré qu'une mutation entraînant le changement d'un seul acide aminé au sein d'une protéine équivalente à la p16/p23 des *Lagovirus* ou du domaine P2 de la protéine de capsid pouvait induire

respectivement un changement de tropisme tissulaire ou un changement de virulence (Mahar et al. 2016).

Une autre étude a mis en évidence que plusieurs mutations situées sur la portion codante pour la protéine p16 étaient caractéristiques de deux souches pathogènes. Le rôle de la p16 n'est pas encore bien connu à ce jour, mais il est suggéré qu'elle intervienne dans l'interaction du virus avec sa cellule cible. Ainsi, de possibles modifications génomiques au niveau du gène de la protéine p16 pourraient être à l'origine d'une pathogénicité (Elsworth et al. 2014).

Il a été mis en évidence en 2008 que de nombreuses recombinaisons pouvaient se produire dans différentes localisations du génome. En particulier, l'étude montre que la souche responsable de la première épizootie en Chine en 1984 présente une recombinaison au niveau du gène codant pour la protéine de capsid avec une ou plusieurs souches de RHDV allemandes. Il a été suggéré que ces virus auraient été introduits en Chine séparément avant de coïnfecter un individu. A partir de là, la recombinaison aurait permis un changement de virulence et conduit à la première épizootie (Forrester et al. 2008).

Les recombinaisons ont également été suspectées d'avoir joué un rôle dans l'émergence des RHDV2 et leur diversité. Une étude de 2015 a mis en évidence que de nombreuses recombinaisons avaient eu lieu chez les RHDV2, concernant essentiellement les gènes codant les protéines structurales. Les portions de génome échangées correspondent à des séquences codantes pour des protéines non structurales issues de virus pathogènes mais aussi non pathogènes, soulignant ainsi le rôle de ces derniers dans l'évolution génomique des virus pathogènes (Lopes et al. 2015).

D'autres recombinaisons faisant intervenir des souches apathogènes ont également été rapportées, notamment avec les gènes de protéines non structurales de RCV-A1 et de VP60 de RCV-E chez le MRCV. Cependant, il paraît peu probable que l'acquisition du tropisme hépatique et de son caractère pathogène soit due à des recombinaisons avec ces deux virus bénins entériques (Mahar et al. 2016).

Malgré toutes ces conclusions, l'hypothèse de l'émergence à partir de souches non virulentes reste controversée. En effet, les virus pathogènes et apathogènes présentent entre eux une divergence nucléotidique moyenne de 20%, et il est donc difficile de penser que les formes pathogènes soient directement issues de celles non pathogènes. L'hypothèse ne peut

cependant pas être réfutée étant donné les observations menées jusqu'à présent et le fait que toutes les souches virales n'aient pas été identifiées de manière exhaustive. En particulier, il est possible que les ancêtres des souches pathogènes n'aient pas encore été décelées (Esteves et al. 2015).

b. Saut d'espèce

Cette hypothèse implique l'existence d'une ou plusieurs espèces insensibles au virus partageant à un moment donné la même niche écologique qu'*O. cuniculus* ou des autres espèces cibles. Elles constitueraient alors un réservoir permettant l'évolution du virus avant que celui-ci ne puisse enfin opérer un saut d'espèce. L'espèce de nos jours la plus soupçonnée est le lapin à queue blanche *S. floridanus* originaire d'Amérique du Nord. Bien qu'aucune preuve quant à la présence du virus chez cette espèce n'ait pu être apportée, plusieurs éléments permettent de suspecter le passage viral.

L'introduction du lapin à queue blanche semble coïncider avec l'émergence des deux virus EBHSV et RHDV. Cette espèce a été massivement importée d'Amérique vers l'Europe de manière illégale durant les années 1960, soit moins de 20 ans avant les premiers cas d'EBHS et de RHD. Ajouté à cela, une étude sérologique a été réalisée dans une région d'Italie où l'espèce *S. floridanus* est considérée comme invasive : il s'est avéré que près de 33% des lapins présentaient des anticorps anti-RHDV. Bien qu'aucun RHDV n'ait pu être détecté, les sérologies suggèrent que cette espèce est réceptive au virus. Enfin, l'étude portant sur l'identification des HBGAs au sein de différents tissus chez *S. floridanus* montre que l'antigène B, qui semble constituer le ligand préféré de toutes les souches de RHDV, RHDV2 ou RCVs, est fortement exprimé au niveau de la trachée et de l'intestin grêle. Ce résultat est alors compatible avec cette hypothèse évolutive (Esteves et al. 2015; Lavazza et al. 2015; Lopes et al. 2017).

D'autres espèces potentielles sont aujourd'hui suspectes vis-à-vis du portage du virus, mais elles restent peu documentées. De la même façon que *S. floridanus*, l'écureuil de Corée (*Tamias sibiricus*) a également été introduit en Europe au même moment que l'émergence de la RHD. Il a d'abord été vendu en tant qu'espèce domestique au cours des années 1960, avant d'être volontairement relâché à l'état sauvage à la fin des années 1970 (Chapuis 2005). Cependant, l'implication de l'écureuil de Corée dans un éventuel saut d'espèce n'a pour le moment encore jamais été documentée.

En réalité, il semblerait que l'origine des souches pathogènes soit double et que les deux phénomènes précédemment développés, l'acquisition de la pathogénicité par des modifications génomiques et le saut d'espèce, se soient produits conjointement (Esteves et al. 2015).

Deuxième partie

Etude expérimentale d'identification et séquençage de souches virales non pathogènes

Deuxième partie

Etude expérimentale d'identification et séquençage de souches virales non pathogènes

I. Projet de recherche

Cette partie expérimentale s'inscrit dans le cadre d'un projet ANIHWA (Animal Health and Welfare) dirigé par l'Agence Nationale de la Recherche nommé projet ECALEP. L'objectif est de constituer un inventaire le plus large possible de souches non pathogènes en recherchant ces dernières chez *O. cuniculus*, *L. europaeus*, *L. timidus*, *S. floridanus* et *T. sibiricus*, bien qu'elles n'aient été pour le moment identifiées que chez *O. cuniculus*. Cette banque de donnée servira par la suite à caractériser le déterminisme génétique de la pathogénicité et comprendre les différents mécanismes d'émergence des *Lagovirus*, validant ou non les hypothèses émises jusqu'à présent. De plus, la détection et description précise de souches non pathogènes chez d'autres espèces permettrait de soutenir l'idée d'une évolution par saut d'espèces et de prévoir ainsi l'émergence de nouveaux virus pathogènes.

Le projet fait l'objet d'une collaboration internationale et regroupe ainsi plusieurs équipes que sont notamment l'ANSES, l'ONCFS et l'UMR INRA-ENVY IHAP. Celle-ci est primordiale en raison de la répartition mondiale des virus et de la nécessité d'obtenir des échantillons de terrain.

Cette partie présente un travail de recherche de RCVs chez des animaux d'espèces différentes retrouvés morts sans signe de RHD. Pour ce faire, le matériel génétique sera extrait de prélèvements d'intestin puis analysé par RT-qPCR. Pour les échantillons positifs seront réalisées de nombreuses PCR puis clonages bactériens afin d'obtenir du matériel génétique en quantité suffisante pour procéder au séquençage. Un travail d'alignement séquentiel et d'identification des souches obtenues sera par la suite effectué.

II. Matériels et méthodes

A. Echantillonnage

La recherche de génome viral est effectuée à partir de prélèvements d'intestin grêle de différentes espèces que sont *O. cuniculus*, *L. europaeus*, *L. timidus*, *S. floridanus* et *T. sibiricus*. Ces prélèvements ont été réalisés chez des individus retrouvés morts ou abattus (campagnes d'élimination) sans aucune présentation clinique de RHD. Par ailleurs, leur statut sérologique anti-RHDV est inconnu. Les organes prélevés sont congelés à -20°C avant d'être acheminées à l'ENVT à l'équipe virologie de l'UMR INRA-ENVT IHAP. Le nom des échantillons et leur origine sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Liste des différents échantillons ayant fait l'objet d'une recherche virale.

Noms	Nombres	Numéros	Espèces	Lieux
OCCS-	5	06, 14, 25, 110, 111	<i>O. cuniculus</i>	Suède
DPY	1	-	<i>O. cuniculus</i>	France
LTF-	2	20, 22	<i>L. timidus</i>	Finlande
LTS-	6	21, 22, 24 - 27	<i>L. timidus</i>	Suède
LES-	2	22, 28	<i>L. europaeus</i>	Suède
SF-CAN-2017-	16	1 - 16	<i>S. floridanus</i>	Canada
SF-USA-2017-	11	17 - 27	<i>S. floridanus</i>	Etats-Unis
TS-F-2018-	15	1 - 15	<i>T. sibiricus</i>	France

B. Extraction et purification des ARNs

Les ARNs viraux éventuellement présents dans les échantillons doivent être extraits puis purifiés avant de procéder à leur mise en évidence par RT-qPCR. Une étape d'extraction est donc tout d'abord réalisée à l'aide de TRAzol Reagent (CliniSciences), puis une purification sur colonne à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Clean-up (Marcherey-Nagel) est effectuée.

1. Extraction

L'étape d'extraction est réalisée à l'aide de TRAzol, solution chimique couramment utilisée dans l'extraction des ARNs des cellules. Il permet de préserver leur intégrité lors de l'étape de broyage tissulaire et de mise en suspension. La procédure d'extraction faisant

intervenir des composés toxiques (TRAzol, chloroforme), toute cette étape est réalisée sous hôte avec le port de gants et de masque.

- **Découpe** : l'échantillon est décongelé puis morcelé dans la glace sur une boîte de pétri. Pour ce faire, la portion d'intestin est redécoupée transversalement (tous les échantillons) et/ou par grattage de la muqueuse seule (OCCS-06, 25, 110 et 111 alors nommés OCCS-06G, 25G, 110G et 111G). La taille de découpe est estimée afin d'obtenir 50 à 100 mg de tissu, soit environ 5 mm x 5 mm.
- **Broyage et homogénéisation** : le tissu est déposé dans un tube de lyse Precellys (Bertin Technologies) avec 1 ml de TRAzol Reagent puis passé au broyeur avec le programme 6500 3*30 D10. Les homogénats sont ensuite transférés dans un nouveau tube Eppendorf.
- **Séparation des phases** : l'échantillon est incubé à température ambiante pendant 5 min puis 200 µl de chloroforme sont ajoutés. Après avoir été agité vigoureusement (vortex) pendant 15 sec, le tube est de nouveau incubé à TA pendant 2 à 10 min. L'échantillon est alors centrifugé à 12000 g pendant 15 min à 4°C, ce qui permet d'obtenir 3 phases : en bas le chloroforme, une interface et en haut une phase aqueuse avec les ARNs. La phase supérieure est transférée dans un nouveau tube Eppendorf.
- **Précipitation des ARNs** : 500 µl d'isopropanol sont ajoutés et mélangés par inversion avec le reste du tube. Après une incubation à TA pendant 10 min, une centrifugation est réalisée à 12000 g pendant 10 min à 4°C.
- **Lavage des ARNs** : ce procédé est réalisé dans la glace afin de préserver les ARNs. Le surnageant est enlevé puis le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 75% (l'échantillon peut alors être stocké 1 an à -20°C ou 1 semaine à 4°C). Après avoir agité brièvement le tube au vortex, une centrifugation est opérée à 7500 g pendant 5 min à 4°C puis le surnageant est enlevé.
- **Elution des ARNs** : le culot est resuspendu avec 100 µl de H₂O RNase-free issu du kit NucleoSpin® RNA Clean-up, puis le tube est incubé au bain-marie à 55-60°C pendant 10 à 15 min.

2. Purification

Cette étape est réalisée avec le kit NucleoSpin® RNA Clean-up directement à la suite de l'extraction des ARNs. Elle permet entre autres d'éliminer les éventuels inhibiteurs de RT-

PCR qui seraient présents dus à la méthode d'extraction employée (phénol, chloroforme). Le kit fournit les réactifs RA1, RA3 et H₂O RNase-free ainsi que les colonnes à membrane.

- **Préparation de l'échantillon :** 300 µl de RA1 et 300 µl d'éthanol absolu sont ajoutés aux 100 µl précédents, puis le tube est agité par vortex.
- **Fixation de l'ARN à la membrane :** une colonne est placée dans un collecteur avant que les 700 µl contenus dans le tube y soient transférés. La colonne est centrifugée à 8000 g pendant 30 sec à TA.
- **Lavage et séchage de la membrane :** le collecteur est vidé puis 700 µl de RA3 sont ajoutés. Une centrifugation à 8000 g pendant 30 sec (TA) est effectuée puis le collecteur est de nouveau vidé et 350 µl de RA3 sont ajoutés. Le tube est centrifugé à 8000 g pendant 2 min (TA).
- **Elution des ARNs :** la colonne est ôtée du tube collecteur et placée dans un Eppendorf. Les échantillons sont incubés 3 min à TA puis 60 µl de H₂O RNase-free sont ajoutés. La colonne est centrifugée à 8000 g pendant 1 min puis l'Eppendorf contenant les ARNs est récupéré et stocké à -80°C.

C. Reverse transcription des ARNs

La reverse transcription (RT) permettant d'obtenir l'ADNc est réalisée indépendamment de la qPCR à l'aide du kit RevertAid RT Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific). L'enzyme RevertAid Reverse Transcriptase présente une activité entre 42 et 50°C avec un optimal à 42°C, et est capable de synthétiser des ADNc jusqu'à 13kb, longueur suffisante pour les *Lagovirus* recherchés. Le kit fournit entre autres un inhibiteur de RNases (RiboLock) protégeant les ARNs de leur dégradation à haute température et des amorces aléatoires de 6 nucléotides (Random Hexamer Primer).

Sont mélangés dans un tube Eppendorf 10 µl de l'échantillon contenant les ARNs précédemment stocké à -80°C ainsi que 2 µl de Random Hexamer Primer à 150 ng/µl. Le tube est incubé à 65°C pendant 5 min puis mis dans la glace pendant 2 min. Il est ensuite ajouté 4 µl de 5X Reaction Buffer (solution tampon), 2 µl de dNTP Mix à 10 mM, 1 µl de RiboLock et 1 µl de RevertAid Reverse Transcriptase. Le mix réactionnel est ensuite incubé à 25°C pendant 10 min, 42°C pendant 60 min, puis 70°C pendant 10 min. Le tube détenant les ADNc obtenus est ensuite stocké à -20°C.

D. Détection du matériel viral par PCR quantitative

La qPCR réalisée à partir des ADNc précédemment obtenus doit permettre d'amplifier de manière spécifique l'ADNc des différents potentiels RCVs présents. Etant donné l'importante diversité génétique, il a été choisi d'employer des amorces dites universelles (ou PanLago) capables d'amplifier la majeure partie des *Lagovirus*. En effet, ces amorces ont été conçues à partir de séquences issues du gène de la VP60, séquences semblables d'une souche à l'autre et donc bien conservées au sein des *Lagovirus*. Ce couple d'amorce a déjà fait l'objet de plusieurs détections de virus et s'avère le meilleur actuellement en matière de sensibilité et spécificité au sein du laboratoire. Les caractéristiques des deux amorces sont répertoriées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des amorces PanLago U38 et L337i. Les localisations nucléotidiques sont basées sur la souche 06-11 (séquence obtenue dans le cadre d'une collaboration (Lemaitre et al. 2018)).

Noms d'amorces	Séquences (5' → 3')	Localisations	Tm	Taille d'amplicon
U38 (sens)	CAGCGGGCACTGCTACCACAGCATC	5342-5366	64°C	326 pb
L337i (antisens)	GAAGCGAAACTGCATGCCACNGCCCA	5641-5667		

La qPCR est effectuée grâce à l'iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), mix comportant déjà tous les éléments nécessaires à sa réalisation (enzyme, dNTPs, milieu tampon...). Le témoin positif employé est un RHDV2 dont le nom d'échantillon est C⁺10401, tandis que le témoin négatif est de l'eau ultra pure obtenue par l'intermédiaire du système Nanopure (Thermo Scientific Barnstead). Afin de pouvoir éventuellement estimer la quantité de copies d'ADNc, une gamme d'ADN plasmidique pSCA-VP60-RHDV2-U38 est utilisée. Elle a été élaborée à partir de l'incorporation de l'amplicon U38/L337i du gène de la VP60 d'un RHDV2 au sein d'un plasmide pSCA. Ce dernier a par la suite été préparé à différentes concentrations pour réaliser la gamme (8 concentrations allant de 10² à 10⁹ copies/2 µl).

L'échantillon à tester issu de la RT précédente est d'abord dilué au 100^{ème}. Dans un puit de plaque pour qPCR sont ajoutés 2.4 µl de H₂O ultra pure, 0.3 µl de chaque amorce U38 et L337i (chacune à 10 µM), 5 µl d'iTaq Universal SYBR® Green Supermix puis 2 µl d'ADNc dilué ou d'ADN plasmidique. La plaque est ensuite centrifugée brièvement à 3000 rpm puis placée dans un LightCycler® 96. Les différentes incubations sont répertoriées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Programme d'incubation de la qPCR PanLago.

Phases	Températures (°C)	Modes d'action	Temps	Vitesses (°C/s)
Preincubation	95	None	3 min	4.4
Amplification (*40 cycles)	95	None	15 sec	4.4
	64	Single	20 sec	2.2
Melting curve	95	None	5 sec	4.4
	65	None	1 min	2.2
	97	Continuous	-	0.11
Cooling	40	None	30 sec	2.2

E. Amplification du matériel génétique par PCR

Les PCR sont réalisées sur les échantillons revenus positifs à la RT-qPCR. Etant donné que le génome viral mesure approximativement 7.5 kb, il est difficile d'obtenir une amplification de toute la séquence nucléotidique en une seule fois. Ainsi, de nombreuses amorces ont été désignées afin d'amplifier morceau par morceau le génome, ces derniers mesurant dans la plupart des cas 1 à 1.5 kb en moyenne. Le séquençage de ces plus petites séquences permettra par la suite de reconstituer le génome complet en les mettant bout à bout. La variabilité génétique étant conséquente chez les *Lagovirus*, il est difficile de pouvoir amplifier toutes les souches virales (RCV-A1, RCV-E2, RCV-E1, RHDV2...) à l'aide d'un seul et même pool d'amorces. La plupart des amorces a donc été conçue à partir de séquences de souches différentes (RCVs, RHDV2...) à plusieurs endroits du génome selon la nécessité et la difficulté rencontrée lors des amplifications. Ainsi, certaines amorces ont été désignées au fur et à mesure des séquençages permettant alors d'avoir des amorces spécifiques aux échantillons concernés. Par ailleurs, de nombreuses combinaisons entre les différentes amorces obtenues ont été essayées. Toutes les amorces employées sont présentées dans le Tableau 4 et ont été ou bien désignées à l'aide de Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>) et d'Oligo Analysis Tool (<http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>) ou bien issues d'un article (Mahar et al. 2016).

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées dans les PCR. Le symbole * signifie que l'amorce a été désignée par autrui (Mahar et al. 2016).

Noms d'amorces	Séquences (5' → 3')	Localisations	Tm (°C)
MICV12 *	GTGAAAGTTATGGCGGTTTTATCG	1-24	N/A
RCV-GCS-F	ATGGCGGCTATGTCACGCCT	10-29	57
RHDV2-GCS-F	ATGGCGGCTATGTCGCGCCTTA	10-31	61
RCV-GC1-F	GGCTATGTCACGCCTTACTG	15-34	58
RHDV2-GC1-F	GCTATGTCGCGCCTTACTG	16-34	59
DPY660-R	GTTGTCCAATGCAAGCCTGA	692-711	59
RHDV2-GC2-F	TTGTATGGTGTGTGTCAGGC	985-1004	59
RCV-GC2-F	TTGTATGGTGTGTGTCAGGC	985-1004	59
RHDV2-GC1-R	CAGAAGCTCTTGACGCCTTC	1024-1043	59
RCV-GC1-R	CACCTTGTCCCAGAAGCTCT	1034-1053	59
RCVf1.5 *	CAGCCYGTGTCYGTATYTTCAA	1548-1571	N/A
OCCS-110-r1.7	CTCACCTGTGTACGAGTCGA	1670-1689	59
RCVr1.8 *	CTTGTACACAGTTGAGRGGCA	1777-1798	N/A
RHDV2-GC3-F	CAGCAAGGACATGTCACACC	1989-2008	59
RHDV2-GC2-R	AGGCATGTTGTGAGGGTACA	2021-2040	59
RCV-GC3-F	GGGATTGTGTTGTGCGGGG	2046-2065	59
RCV-GC2-R	TGACTTCACCAGCTTCTCCC	2063-2082	59
RHDV2-GC3-R	GTCTTGCCTTTCACACCCTG	2986-3005	59
RHDV2-GC4-F	CAGGGTGTGAAAGGCAAGAC	2986-3005	59
RCV-GC3-R	CGTCGTTCCCCAAGTTTACC	3027-3046	59
RCV-GC4-F	GGTAAACTTGGGGAACGACG	3027-3046	59
RCVf3.0 *	GGYAAATGAYGAGTATGAYGAGTGCCA	3037-3062	N/A
OCCS-110-f3.2	TCACAGTCATTGGCAGAGGT	3218-3237	59
RCVr3.3 *	GGRAGYCCYTCATAGTCATTGTCAT	3317-3341	N/A
DPY5-F	TGAGCCGATCGATTACAGGG	3783-3802	59
RCV-GC5-F	GACGAGTTTATTGAGCGGGC	4015-4034	59
RHDV2-GC4-R	TGCCCGCTCAATATACTCGT	4016-4035	59
RHDV2-GC5-F	ACGAGTATATTGAGCGGGCA	4016-4035	59
RCV-GC4-R	CTCCCTTGGTTAGAAAAGCG	4059-4078	59
Lago9 *	TGGNCCNATYGCAGTYGGVRTTGACATGAC	4416-4445	N/A
OCCS-110-r4.5	GCGACATTGTTGAGTCCCAC	4521-4540	59
RCVr4.7 *	ATRCCACTTGGRAGYCTCTTTTRG	4667-4691	N/A
RHDV2-GC5-R	GTCCAACTTTGACACCCACC	4997-5016	59
RHDV2-GC6-F	GGTGGGTGTCAAAGTTGGAC	4997-5016	59
RCV-GC6-F	GGTGGGTGTCAAAGTTGGAC	4997-5016	59
RCV-GC5-R	TTTTGCTCCACTCCAACCTGC	5034-5053	59
DPY5-R	GTGTGCGGTTGAGCTCCTTG	5178-5197	59
U38	CAGCGGGCACTGCTACCACGACATC	5342-5366	64
OCCS-25-6R	CAAGTCTCTTGTGGTCCACC	5487-5507	59
OCCS-110-6R	GGCATCTGTGATTGACCAGG	5540-5559	58
RCVf5.6 *	CAAATGTATGCGGGYTTGGCTGGT	5626-5649	N/A
L337i	GAAGCGAAACTGCATGCCACCNCCCCA	5641-5667	64
OCCS-06-r5.7	GCCCTGGTTCAATTTCAATGC	5726-5746	59
DPY7-F	CCAGTCACCATCACAAATGCC	5797-5816	59
OCCS-110-7F	CAACCCCTGTCCTTACCGG	6035-6053	60
RCVr6.1 *	ACTATCTGRCCRTTCCAYCTGTTGTC	6064-6089	N/A
RHDV2-GC6-R	CAGCCCCACTATCTCACCAT	6077-6096	59
RHDV2-GC7-F	ATGGTGAGATAGTGGGGCTG	6077-6096	59
OCCS-25-7F	AGATAGTGGGCCTTCAACCA	6083-6102	58
RCV-GC7-F	TGAATGGCAGTACGTACGGT	6143-6162	59
RCV-GC6-R	GCTTGACCAACCGTACGTAC	6152-6171	59
OCCS-25-6200F	CGAATGTGCTGGAGTTCTGG	6227-6246	59
OCCS-110-6200F	GTGCTTGAGTTCTGGTACGC	6232-6251	59
RCVf6.5 *	CATCTAYGSTGTTGCAAATGG	6507-6527	N/A
OCCS-06-f6.7	TCATGTTTGCCTCCGTCATC	6680-6699	59
RCVr6.8 *	GYGCMGACGAGTAATTGTTAGCGAC	6792-6817	N/A
RHDV2-GCS-R	TCAAGCACTGGACTCGCCAGTG	7351-7372	61
RHDV2-GC7-R	ATCAAGCACTGGACTCGC	7356-7373	57
RCV-GC7-R	CTCTAACTAAACACTGGACTCGC	7356-7378	59
RCV end *	dT(29)-ATAATTTACTCTAAATTATAAACCAATTAATTAATTAAC	7396-7436-PolyA	N/A
RCV-GCS-R	CTATAAAGCCAATTAACCAAATA	7398-7421	57

Les PCR sont effectuées à l'aide de deux enzymes, ou bien la PrimeSTAR® Max DNA polymerase (Takara), ou bien la Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo

Fisher Scientific). La première a la particularité de se présenter en mix (enzyme, dNTPs, solution tampon...) et d'avoir une grande vitesse d'élongation (5 sec/kb) dans certaines conditions, tandis que la deuxième est reconnue pour sa très haute-fidélité (taux d'erreurs de $4.4 \cdot 10^{-7}$). Le protocole de PCR diffère bien entendu selon l'enzyme employée.

Les témoins positifs utilisés sont des ADNc de RHDV2 dont les noms d'échantillons sont C⁺10401 et C⁺LD31. De l'eau ultra pure est employée en guise de témoin négatif.

Dans le cas d'une PCR avec la PrimeSTAR® Max, le mix réactionnel comprend 9.1 µl de H₂O ultra pure, 0.7 µl de chacune des amorces sens et antisens toutes deux à 10 µM, 12.5 µl de PrimeSTAR® Max DNA polymérase et 2 µl d'ADNc dilué au 100^{ème}. Il est ensuite mis à incubé selon le programme présenté dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Programme d'incubation des PCR réalisées avec la PrimeSTAR® Max DNA polymérase.

Phases	Températures (°C)	Temps
Amplification (*35 cycles)	98	10 sec
	55	15 sec
	72	1 min/kb

Lors de PCR avec la Phusion High-Fidelity, le mix réactionnel est composé de 12.2 µl de H₂O ultra pure, 4 µl de 5X Phusion HF Buffer (solution tampon), 0.6 µl de chacune des amorces sens et antisens toutes deux à 10 µM, 0.4 µl de dNTPs, 0.2 µl de Phusion High-Fidelity DNA polymérase et 2 µl d'ADNc dilué au 100^{ème}. Le programme d'incubation est résumé dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Programme d'incubation des PCR réalisées avec la Phusion HighFidelity DNA polymérase.

Phases	Températures (°C)	Temps
Pré-dénaturation	98	30 sec
Amplification (*40 cycles)	98	10 sec
	59	30 sec
	72	15-30 sec/kb
Elongation finale	72	10 min

F. Electrophorèses et extractions des produits PCR

L'emploi d'électrophorèses sur gel d'agarose permet de procéder à la lecture des résultats de PCR ainsi que, dans le cas de résultats douteux obtenus lors de certaines qPCR, confirmer ou infirmer une présence virale.

Un gel d'agarose est préparé, entre 0.8 et 2% selon la taille du fragment d'ADNc amplifié à faire migrer, à partir d'agarose E (Conda) et d'une solution tampon TBE 0.5X (Tris Borate EDTA). Avant de couler le gel est ajouté au mélange du SYBR® Safe DNA Gel Stain utilisé à 20000X (1 µl pour 20 ml de gel préparé). Le gel est placé à l'abri de la lumière et prend en 30 à 120 min. Un tampon de charge 5X est ensuite incorporé au produit PCR avant de déposer le tout sur gel. Les marqueurs employés dépendent bien entendu des fragments PCR et sont ou bien de l'ordre de 100 pb (ExactLadder DNA PreMix 100 bp Plus), ou bien de l'ordre de 1 kb (ExactLadder DNA PreMix 2 Log). Leur dépôt sur gel est de 4 µl. L'électrophorèse est programmée entre 90 et 140 V selon la taille de l'appareil et celle du gel durant 75 à 120 min. La lecture est ensuite réalisée et les éventuels fragments PCR visibles sont récupérés par découpe du gel puis stockés à 4°C.

L'extraction de l'ADN des gels est effectuée à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Marcherey-Nagel). Dans le tube contenant le morceau de gel d'agarose sont ajoutés 200 µl de Buffer NTI pour chaque 100 mg de gel avant que celui-ci soit mis à incubé durant 5-10 min à 50°C. Une fois le gel dissolu, l'échantillon est transféré dans une colonne à membrane placée dans un tube collecteur. Une centrifugation est réalisée à 11000 g pendant 30 sec (TA) puis le collecteur est vidé. Sont ajoutés 700 µl de Buffer NT3, une nouvelle centrifugation est effectuée à 11000 g pendant 30 sec (TA) puis le collecteur est de nouveau vidé. Cette dernière étape est réalisée une seconde fois afin de laver correctement la membrane. Une centrifugation à 11000 g pendant 1 min (TA) est réalisée puis la colonne est placée dans un nouveau tube Eppendorf. Sont ajoutés 20 µl de Buffer NE au centre de la membrane et le tout est incubé à TA durant 1 min. Une centrifugation est effectuée à 11000 g pendant 1 min puis la colonne est jetée. L'échantillon contenant l'ADNc est alors conservé à 4°C.

H. Clonages bactériens

Le matériel génétique obtenu par PCR étant souvent présent en trop faible quantité afin d'effectuer un séquençage convenable, il a été nécessaire d'avoir recours au clonage bactérien en utilisant le kit StrataClone Blunt PCR Cloning.

Pour ce faire, une réaction de ligation entre le produit PCR et le vecteur StrataClone Blunt Vector Mix amp/kan est tout d'abord réalisée. Ce vecteur a la particularité de disposer de gènes octroyant une antibiorésistance (ampicilline et kanamycine) et codant pour une enzyme capable de produire une couleur bleue avec un substrat chromogénique si aucun produit PCR n'est inséré (ce dernier venant s'incorporer au niveau d'un gène *lacZ'* muté). Le produit de ligation est alors intégré au sein de StrataClone SoloPack Competent Cells, circularisé puis exprimé. Les cellules incubées dans un milieu avec ampicilline ayant correctement intégrées le vecteur avec le produit PCR forment alors des colonies de couleur blanche. Ces colonies blanches sont alors ensuite repiquées puis leur matériel génétique contenant le produit PCR est extrait. Il est alors obtenu un grand nombre de séquences nucléotidiques parmi lesquelles se trouvent les ADNc viraux.

- **Ligation de l'insert** : le mix de ligation est formé par 3 µl de StrataClone Blunt Cloning Buffer, 2 µl de produit PCR (5-50 ng) et 1 µl de StrataClone Blunt Vector Mix amp/kan. Une homogénéisation est obtenue par inversions puis le mix est incubé à TA durant 5 min. Une fois terminé, le tube est placé dans la glace.
- **Transformation des cellules compétentes** : les bactéries StrataClone SoloPack Competent Cells sont transférées (50 µl) dans un tube de culture avec 1 µl de produit de ligation avant que le tout soit incubé 20 min dans la glace. Un choc thermique est réalisé à 42°C durant 45 sec puis le tube est de nouveau placé dans la glace 2 min. Sont ajoutés 900 µl de LB medium et une incubation avec agitation de 60 min à 37°C est réalisée. Une boîte de pétri est préparée avec du LB agar et de l'ampicilline (1‰), puis 20 µl de X-gal (substrat chromogénique) à 4% sont répartis de façon homogène à la surface du gel. Une fois l'incubation terminée, 150 µl de bouillon de culture sont déposés et étalés dans la boîte de pétri. Cette dernière est incubée une nuit à 37°C.
- **Isolement des colonies bactériennes** : les colonies possédant le produit PCR sont identifiées (blanches) et repiquées : 4 à 6 colonies sont prélevées et déposées dans des tubes de culture individuels préalablement remplis avec 4 ml de LB medium et 4 µl d'ampicilline (1‰). Les tubes sont incubés avec agitation une nuit à 37°C.

- **Lyse bactérienne et récupération des plasmides :** cette étape est réalisée avec le kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel). Chaque bouillon de culture est transféré dans un nouveau tube Eppendorf (1.75 ml) puis centrifugé à 13000 rpm durant 1 min. Sont ajoutés 150 µl de Buffer A1 puis une agitation au vortex permet de remettre en suspension les cellules. Sont ajoutés alors 250 µl de Buffer A2 puis 5 mélanges par inversion sont réalisés. Le tube est incubé à TA 2 min le temps que les cellules soient lysées. Sont ajoutés 350 µl de Buffer A3 puis des mélanges par inversion sont effectués jusqu'à dissipation de la couleur bleutée. Une centrifugation à >12000 g pendant 3 min est réalisée. Le surnageant est ensuite transféré dans une colonne à membrane placée dans un collecteur. Une nouvelle centrifugation est effectuée mais à 1000-2000 g durant 30 sec, puis le collecteur est vidé. Sont ajoutés dans la colonne 450 µl de Buffer AQ. Le tout est ensuite centrifugé deux fois de suite à >12000 g durant 1 min en vidant à chaque fois le collecteur. La colonne est alors transférée dans un tube Eppendorf, 50 µl de Buffer AE sont ajoutés et une incubation à TA durant 1 min est réalisée. Une centrifugation à >12000 g pendant 1 min permet alors enfin de récupérer les plasmides et le tube est stocké à 4°C.

Afin d'être assuré de la présence du produit PCR, l'ADN plasmidique est dilué au 50^{ème} puis amplifié à l'aide d'une KAPA Taq DNA polymerase. Les amorces utilisées sont les mêmes que celles ayant permis d'obtenir l'amplicon PCR, le contrôle positif l'ADNc de l'échantillon originel dilué au 100^{ème}, les contrôles négatifs de l'eau ultra pure et un plasmide sans l'insert PCR (pSCA). Le mix réactionnel comprend 18.25 µl d'eau ultra pure, 2.5 µl de 10X KAPA Taq Buffer A, 0.75 µl de chaque amorce à 10 µM, 0.5 µl de dNTPs à 10 mM, 0.25 µl de KAPA Taq DNA polymerase et 2 µl de matrice. Le programme d'incubation est présenté dans le Tableau 7. Le produit PCR est déposé sur gel est pour procéder à la lecture des résultats.

Tableau 7 : Programme d'incubation des PCR réalisées avec la KAPA Taq DNA polymerase.

Phases	Températures (°C)	Temps
Pré-dénaturation	95	3 min
Amplification (*35 cycles)	95	30 sec
	59	30 sec
	72	1 min/kb
Elongation finale	72	2 min

G. Séquençage

Avant de procéder au séquençage même, la quantité d'ADNc est estimée par mesure de la densité optique à l'aide du CLARIOstar (BMG LABTECH).

L'échantillon est ensuite envoyé au laboratoire GATC afin que le séquençage y soit réalisé. L'ADNc est dilué de façon à obtenir une concentration de 30 à 100 ng/μl pour les plasmides ou de 10 à 50 ng/μl pour les produits PCR. Le processus requiert la présence d'une amorce à partir de laquelle le séquençage peut débuter. Les amorces employées sont les mêmes que celles utilisées lors des PCR (Tableau 4) ainsi que deux autres supplémentaires s'hybridant sur le plasmide de part et d'autre de l'insert PCR et permettant ainsi d'obtenir un meilleur séquençage des extrémités. Ces deux amorces sont détaillées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques des amorces T3 et T7 s'hybridant sur le plasmide pour le séquençage.

Noms d'amorces	Séquences (5' → 3')	Localisations par rapport à l'insert PCR
T3 primer binding site	AATTAACCCTCACTAAAGGGAA	76 avant
T7 primer binding site	GTAATACGACTCACTATAGG	82 après

Les alignements et analyses des données ont été effectués à l'aide des logiciels BioEdit et MEGA-X. Tous les alignements sont basés sur la séquence nucléotidique complète du RCV-E1 06-11 obtenu dans le cadre d'une collaboration (Lemaitre et al. 2018).

III. Résultats

A. Détection du matériel viral par qPCR

Les qPCR réalisées ne sont revenues positives que pour seulement quelques échantillons que sont OCCS-06 ($C_{q_{moyen}} = 37.74$), OCCS-25 ($C_{q_{moyen}} = 33.83$), OCCS-110 ($C_{q_{moyen}} = 28.97$), DPY ($C_{q_{moyen}} = 31.12$) et LES-22 ($C_{q_{moyen}} = 36.99$). Les courbes de fluorescence et de dissociation sont présentées sur les Figures 17, 18 et 19. Plusieurs échantillons ayant présenté un résultat douteux ont été déposés sur gel. La lecture des gels a ainsi permis d'infirmer la présence de matériel viral pour LTF 22, SF-CAN-2017-7 et 8, LTS-22, 24, 25 et 26 et TS-F-2018-3, 4, 5 et 7, sans pouvoir toutefois trancher pour OCCS-111 en raison de la présence d'une bande très peu intense.

Figure 17 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons OCCS-06 (bleu), 25 (turquoise) et 110 (violet) avec la qPCR PanLago. Les contrôles positif et négatif sont respectivement le C⁺10401 (vert) et de l'eau ultra pure (rouge).

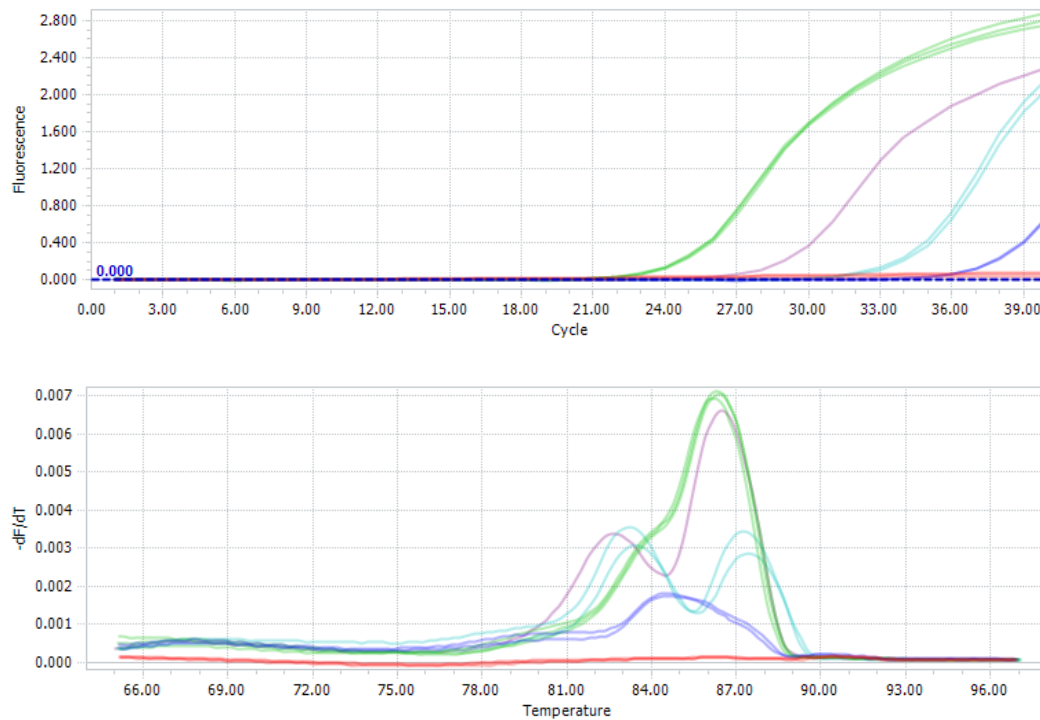


Figure 18 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec l'échantillon DPY (bleu) avec la qPCR PanLago. Les contrôles positif et négatif sont respectivement d'un ADN plasmidique pSCA-VP60-RHDV2-U38 à 10⁷ copies/2 µl (vert) et de l'eau ultra pure (rouge).

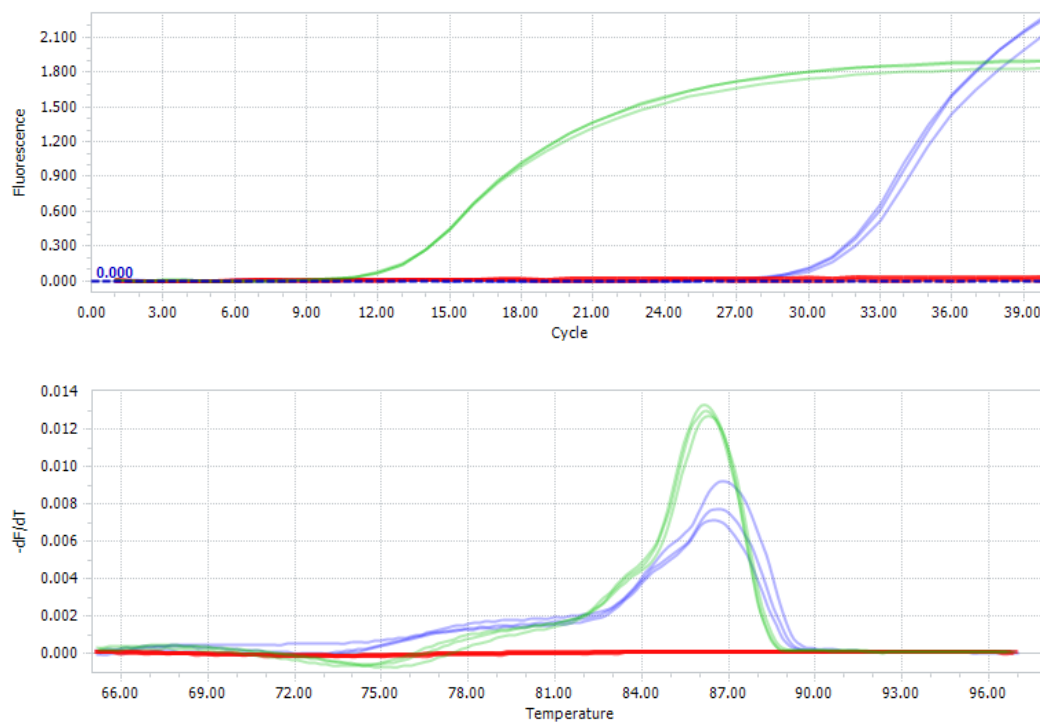
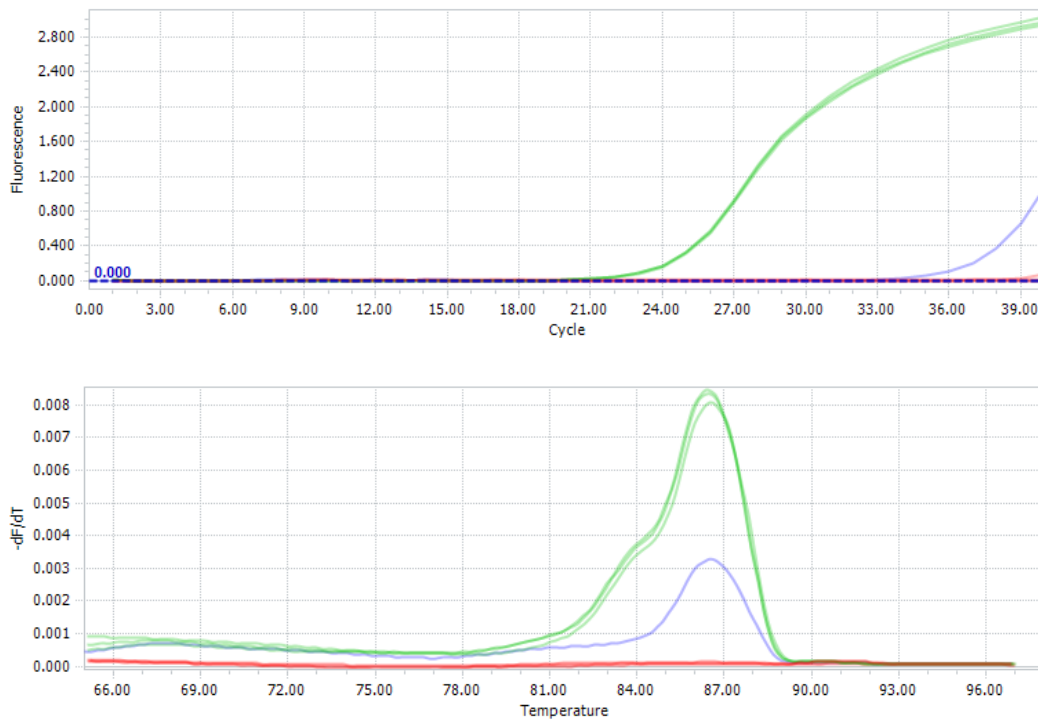


Figure 19 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec l'échantillon LES-22 (bleu) avec la qPCR PanLago. Les contrôles positif et négatif sont respectivement le C⁺10401 (vert) et de l'eau ultra pure (rouge).



Par ailleurs, les échantillons ayant été extraits par raclage des muqueuses intestinales plutôt que par section transverse de celles-ci ont présentés des résultats similaires sauf pour OCCS-06. Ainsi, étaient positifs OCCS-25G ($C_{q_{moyen}} = 33.61$) et OCCS-110G ($C_{q_{moyen}} = 27.55$) et négatifs OCCS-06G et OCCS-111G.

B. Amplification du matériel génétique par PCR

Seuls les échantillons OCCS-06, 25 et 110 et DPY ont permis l'amplification de fragments par PCR. En raison de la difficulté rencontrée à amplifier les séquences nucléotidiques, de nombreuses PCR ont été réalisées avec parfois de légers changements de protocole (températures d'hybridation...). Les amplicons obtenus et ayant présenté par la suite un intérêt dans le séquençage sont répertoriés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Liste des amplicons obtenus par PCR ayant contribué au séquençage. La taille des amplicons est évaluée après séquençage et non à partir de la localisation des amorces sur 06-11. Le symbole * indique que l'amplicon a par la suite fait l'objet d'un clonage bactérien.

Echantillons	Amorces	Tailles des amplicons	Enzymes	Particularités du protocole
DPY	RHDV2-GC1-F RHDV2-GC1-R	1028 pb	Phusion	Température d'hybridation : 61°C Temps d'élongation : 45 sec
DPY *	RCV-GC1-F RCV-GC4-R	4064 pb	PrimeStar Max	
DPY *	RHDV2-GC2-F RHDV2-GC2-R	1056 pb	PrimeStar Max	Temps d'hybridation : 10 sec
DPY	RHDV2-GC3-F RHDV2-GC3-R	1017 pb	Phusion	Température d'hybridation : 61°C Temps d'élongation : 45 sec
DPY	RHDV2-GC4-F RHDV2-GC4-F	1050 pb	Phusion	Temps d'élongation : 45 sec
DPY	RCV-GC4-F RCV-GC4-R	1052 pb	PrimeStar Max	Temps d'hybridation : 10 sec
DPY	RCV-GC4-F RCV-GC4-R	1052 pb	Phusion	Température d'hybridation : 60°C Temps d'élongation : 45 sec
DPY *	RCV-GC4-F RCV-GC5-R	2027 pb	PrimeStar Max	Temps d'élongation : 5 min
DPY *	RCV-GC5-F RCV-GC5-R	1039 pb	PrimeStar Max	Temps d'hybridation : 10 sec
DPY *	RCV-GC5-F RCV-GC5-R	1039 pb	Phusion	Température d'hybridation : 60°C Temps d'élongation : 45 sec
DPY *	RHDV2-GC5-F RHDV2-GC5-R	1001 pb	Phusion	Temps d'élongation : 45 sec
DPY	RHDV2-GC5-F RHDV2-GC5-R	1001 pb	Phusion	Température d'hybridation : 61°C Temps d'élongation : 45 sec
DPY *	RCV-GC6-F RCV-GC6-R	1175 pb	Phusion	Température d'hybridation : 60°C Temps d'élongation : 45 sec
DPY *	U38 RCV-GC7-R	2037 pb	Phusion	
OCCS-06 *	RCVf5.6 RCVr6.8	1201 pb	PrimeStar Max	
OCCS-06 *	U38 OCCS-06-r5.7	405 pb	PrimeStar Max	
OCCS-25 *	U38 RCV-GC7-R	2047 pb	Phusion	
OCCS-110 *	RCVf1.5 RCVr3.3	1790 pb	PrimeStar Max	
OCCS-110 *	OCCS-110-f3.2 OCCS-110-r4.5	1323 pb	PrimeStar Max	
OCCS-110 *	Lago9 RCVr6.1	1674 pb	Phusion	Température d'hybridation : 65°C
OCCS-110 *	RCVf5.6 RCVr6.8	1201 pb	Phusion	Température d'hybridation : 65°C
OCCS-110 *	RCVf5.6 RCVr6.8	1201 pb	PrimeStar Max	Température d'hybridation : 63°C
OCCS-110 *	RCVf5.6 RCVr6.8	1201 pb	PrimeStar Max	
OCCS-110 *	U38 RCV-GC7-R	2046 pb	Phusion	

Les Figures 20 et 21 présentent deux gels d'électrophorèses réalisés à l'issue de PCR différentes. La faible fluorescence est parfois difficile à visualiser ou interpréter et il est alors nécessaire de procéder à un clonage bactérien, la quantité de produit PCR étant trop faible pour un séquençage.

Figure 20 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR Phusion avec les amorces U38 et RCV-GC7-R.

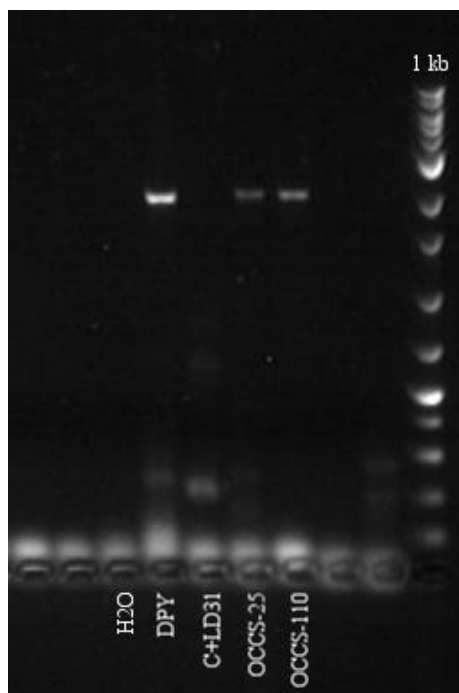
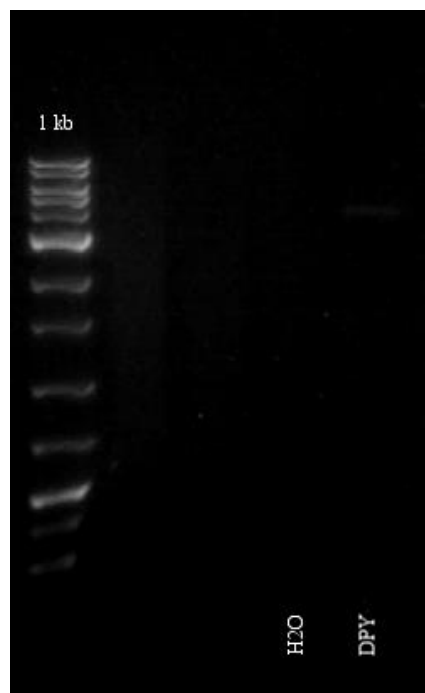


Figure 21 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR PrimeStar Max avec les amorces RCV-GC1-F et RCV-GC4-R.



C. Clonages bactériens

Parmi tous les amplicons obtenus par PCR, ceux présentés dans le Tableau 9 suivis d'un astérisque (*) ont par la suite été insérés dans un plasmide et clonés en bactérie. Un total de 59 plasmides a ainsi été retenus (après PCR KAPA Taq positive), bien que tous n'aient pas été utiles pour le séquençage (nombreux clones pour un seul même amplicon, électrophorégrammes ininterprétables...). Les produits PCR n'ayant pas eu besoin d'un clonage étaient ceux dont l'obtention ne fut pas difficile ou ceux dont la bande fluorescente sur gel d'électrophorèse était intense avec une concentration post-extraction suffisante. Les Figures 22 et 23 présentent deux gels d'électrophorèse post-PCR KAPA Taq. Les bandes fluorescentes sont ici nettement plus intenses qu'avant séquençage.

Figure 22 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR KAPA Taq avec les amorces U38 et RCV-GC7-R. Les échantillons A1, A2, A3 et A4 correspondent aux plasmides dont la ligation a été réalisée avec l'amplicon DPY-U38/RCV-GC7-R obtenu depuis le gel présenté précédemment.

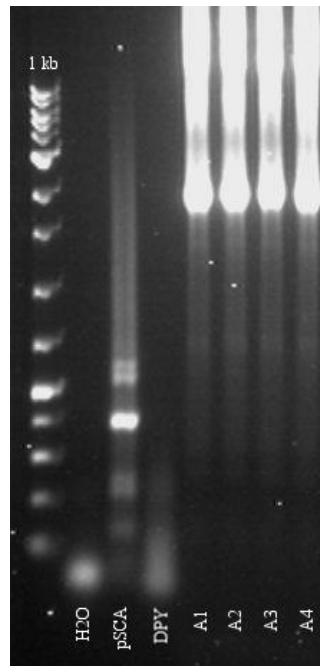
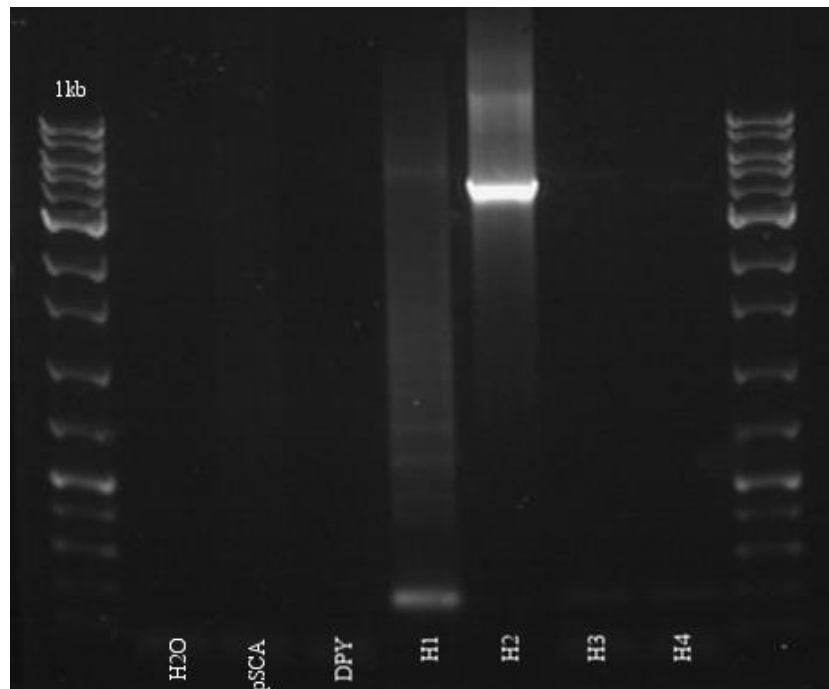


Figure 23 : Gel d'électrophorèse suite à une PCR KAPA Taq avec les amorces RCV-GC1-F et RCV-GC4-R. Les échantillons H1, H2, H3 et H4 correspondent aux plasmides dont la ligation a été réalisée avec l'amplicon DPY-RCV-GC1-F/RCV-GC4-R obtenu depuis le gel présenté précédemment.



Les concentrations des échantillons sans clonage bactérien et des ADNs plasmidiques étaient respectivement en moyenne de 10.23 ng/ μ l et de 319.77 ng/ μ l (écart-types respectifs de 4.44 et 157.12).

D. Séquençage et phylogénie

Le séquençage requiert tout d'abord l'interprétation des électrophorogrammes en tenant compte de leur qualité (bruit de fond...). Les séquences sont ensuite alignées dans BioEdit et grâce à leurs chevauchements partiels, mises bout à bout. Ce travail a permis d'aboutir au séquençage de 4 fragments de longueurs différentes pour les échantillons DPY, OCCS-06, 25 et 110. Les tailles des séquences ainsi obtenues sont respectivement de 7364 pb, 1485 pb, 2046 pb et 5836 pb. Malgré de nombreux essais, notamment en redesignant de nouvelles amorces spécifiques, il n'a pas été possible d'obtenir de plus longs fragments pour OCCS-06, 25 et 110. L'Annexe 1 – Figure 24 présente l'alignement de ces séquences avec la souche 06-11.

Afin d'évaluer leur identité génétique avec les différents génotypes connus, un alignement des séquences codant pour la VP60 a été effectué avec 295 souches différentes de RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2, RCV-A1, RCV-E1, RCV-E2 et EBHSV, ainsi que le virus Ashington, le MRCV et le RCV italien, la liste étant détaillée en Annexe 2 – Tableau 15. Plus exactement, les nucléotides 38 à 1522 de la VP60 ont été alignés, correspondant à une analyse sur 1485 pb.

Les identités nucléotidiques entre DPY, les OCCS et les différents génotypes (RHDV G1-5 et RHDVa ont été différenciés) ont été calculées à partir de l'estimation de leurs distances génétiques et sont répertoriées dans le Tableau 10.

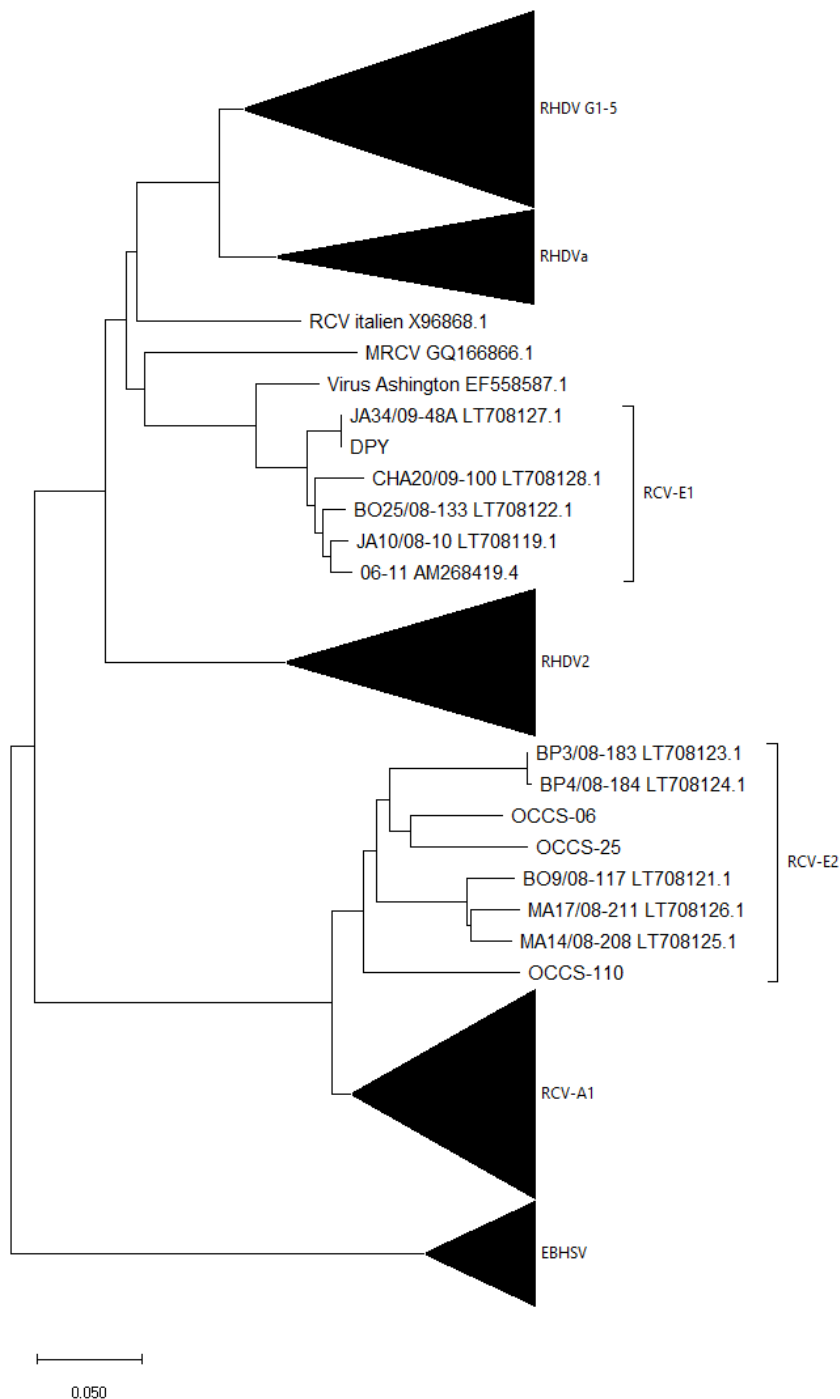
Tableau 10 : Identités nucléotidiques estimées entre DPY, OCCS-06, 25 et 110 et différents groupes de virus connus (en %). Les identités maximales avec les génotypes sont figurées en rouge. L'analyse a été réalisée avec MEGA-X par l'utilisation du modèle Kimura 2-paramètres avec l'option « pairwise deletion » activée.

	RHDV G1-5	RHDVa	RHDV2	RCV- A1	RCV- E2	RCV- E1	EBHSV	DPY	OCCS- 06	OCCS- 25	OCCS- 110
DPY	80,8	79,9	78,2	63,5	62,7	97,1	58,7	-			
OCCS-06	63,9	64,4	64,1	82,9	86,6	63,7	51,0	64,3	-		
OCCS-25	62,8	63,8	62,2	82,7	86,6	62,9	51,7	63,5	90,0	-	
OCCS-110	63,8	63,7	62,4	83,6	85,0	61,3	50,8	61,4	85,5	85,5	-

Par ailleurs, les OCCS-06, 25 et 110 présentaient avec le RCV italien, le virus Ashington et le MRCV des identités nucléotidiques allant de 62.3 à 64.4%. En ce qui

concerne DPY, celui-ci montrait des ressemblances de 82.2% pour le RCV italien, 92.5% pour le virus Ashington et 80.0% pour le MRCV. Un arbre phylogénétique a pu être réalisé à partir des mêmes séquences nucléotidiques (Annexe 2 – Tableau 15). Celui-ci est illustré Figure 25.

Figure 25 : Arbre phylogénétique avec les échantillons DPY, OCCS-06, 25 et 110. Les souches de RHDV G1-5, de RHDVa, de RHDV2, de RCV-A1 et d'EBHSV ont été regroupées afin de faciliter la lecture de l'arbre. Ce dernier a été élaboré par MEGA-X en utilisant la méthode « Neighbor-Joining ». La somme des longueurs de toutes les branches est de 4.33568874. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode Kimura 2-paramètres et sont chiffrées en nombre de substitutions/site. L'option « pairwise deletion » a été activée.



IV. Discussion

Les échantillons issus d'un grattage de la muqueuse intestinale plutôt que d'une section transversale n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative en termes de détection par qPCR. Les Cq moyens obtenus à partir des échantillons OCCS-25 et OCCS-110 étaient en effet très semblables à ceux obtenus avec OCCS-25G et OCCS-110G. Il est tout de même notable qu'OCCS-06G soit revenu négatif tandis qu'OCCS-06 était positif. Le Cq_{moyen} de ce dernier étant relativement élevé, il est possible de supposer que cela soit dû à une trop faible charge virale au niveau intestinal du lapin concerné.

Parmi les différentes qPCR réalisées, plusieurs échantillons dont notamment OCCS-25 et OCCS-110 ont présenté une courbe de dissociation avec 2 pics de températures, correspondant le plus probablement à une amplification non spécifique. Il a donc été nécessaire de réaliser des migrations sur gel afin de vérifier la présence de l'amplicon U38/L337i. En ce qui concerne OCCS-25 et OCCS-110, une seule bande fluorescente était présente et correspondait bien à la taille attendue de l'amplicon U38/L337i.

L'amplification par PCR de fragments a été difficile à réaliser et ce même pour les contrôles positifs utilisés, probablement en raison de l'importante variabilité génétique ou dans certains cas du manque de quantité de matériel viral. Ainsi, quand bien même OCCS-111 permettait d'identifier l'amplicon U38/L337i sur gel d'électrophorèse par une bande très peu intense, aucune séquence n'a pu être amplifiée par PCR pour cet échantillon. Enfin et de manière similaire, LES-22 n'est jamais revenu positif à une seule PCR. Il serait alors nécessaire de redesigner des amorces davantage spécifiques de la souche à séquencer et de progresser pas à pas jusqu'à l'obtention du génome complet.

Bien que les PCR aient permis l'obtention de fragments, le séquençage de ces derniers n'a pas toujours pu être réalisé sur toute la longueur de l'amplicon en une seule fois. Il a en effet été constaté pour certains échantillons comme OCCS-110 que les électrophorégrammes s'estompaient brutalement ou ne permettaient plus une interprétation correcte de ceux-ci une fois arrivé à une région particulière de la séquence. Dans le cas d'OCCS-110, de nombreuses répétitions de séquences riches en G et T étaient observables, pouvant alors expliquer cette difficulté. Le séquençage complet de ces régions a tout de même pu être finalement réalisé par l'utilisation d'autres amplicons.

Finalement, 4 souches ont pu être séquencées, toutes issues uniquement de l'espèce *O. cuniculus*. Les identités et l'arbre phylogénétique obtenus suggèrent un rapprochement d'une part de DPY avec les RCV-E1 et d'autre part des OCCS-06, 25 et 110 avec les RCV-E2. Il est donc probable qu'il s'agisse bien de souches apparentées au RHDV mais aussi non pathogènes.

Les OCCS obtenus présentent une forte identité pour les RCV-E2 et RCV-A1 et semblent ainsi constituer avec ces derniers un groupe monophylétique. Ces souches, issues de lapins vivants initialement en Suède et donc européennes, restent proches des RCV-A1. Ce résultat souligne ce qui a déjà été suggéré dans la littérature, à savoir une probable origine européenne des RCV-A1.

DPY apparaît quant à lui comme faisant partie des RCV-E1. Bien que le virus Ashington soit extérieur aux RCV-E1, DPY présente avec lui une identité élevée et semble partager un ancêtre commun proche. Par ailleurs, le génotype des RCV-E1 est ici davantage proche des RHDV que des RHDV2, comme il a pu déjà être établie lors de la découverte de la souche 06-11 en 2011 à partir de l'analyse des VP60. L'étude réalisée en 2018 basée sur les séquences complètes avait cependant permis de montrer que les RCV-E1 étaient en réalité moins proches des RHDV que des RHDV2. Ainsi, les identités nucléotidiques et l'arbre phylogénétique de cette présente étude étant uniquement effectués à partir des séquences codant pour la VP60 en raison du manque de données (très peu de séquences complètes), il est possible d'envisager que DPY soit en réalité davantage proche des RHDV2. Dans la même idée, l'obtention de séquences plus complètes pour OCCS-06, 25 et 110 pourrait apporter de nouvelles identités par rapport à celles ici acquises et positionner ces souches ailleurs dans l'arbre phylogénétique.

L'analyse des souches obtenues entre elles montre une distance génétique importante entre DPY et les OCCS, en accord avec leur différence de génotypes respectifs. En ce qui concerne les OCCS, l'étude suggère d'une part que les souches OCCS-06 et OCCS-25 soient très proches l'une de l'autre et d'autre part qu'OCCS-110 soit plus distante de ces dernières.

Troisième partie

Etude expérimentale sur la détection de *Lagovirus* par qPCR multiplex

Troisième partie

Etude expérimentale sur la détection de *Lagovirus* par qPCR multiplex

I. Concept

La technique de diagnostic expérimental la plus performante en termes de sensibilité et spécificité pour la détection des *Lagovirus* et actuellement utilisée à l'UMR INRA-ENVT IHAP est la qPCR avec les amorces universelles PanLago U38/L337i, localisées au niveau de la VP60. Cette méthode très rapide et facile permet dans la plupart des cas d'affirmer ou d'infirmer la présence virale au sein d'un échantillon. Lors de la réalisation des qPCR au cours de l'étude précédente, plusieurs résultats sont cependant revenus douteux et notamment lorsqu'il s'agissait d'échantillons suspectés être infectés par un RCV-like. Ces doutes provenaient essentiellement de courbes de dissociation atypiques, avec des pics très peu marqués et/ou décalés sur l'échelle des températures, ou bien d'échantillons sortant très tardivement avec des Cq élevés. Bien qu'une migration sur gel était par la suite effectuée afin d'affirmer ou non la présence de l'amplicon U38/L337i, la mise au point d'une autre technique de diagnostic plus sensible et spécifique constituerait alors un gain de temps par la moindre nécessité de réaliser des gels d'électrophorèse et permettrait de réduire le nombre de potentiels faux négatifs.

Les raisons les plus probables pouvant expliquer l'origine de ces résultats peu convainquant sont la variabilité génétique existante entre les différents *Lagovirus* ainsi qu'une trop faible charge virale. Bien que les amorces PanLago aient été conçues pour être universelles envers toutes les souches, il existe le plus souvent un ou plusieurs mismatches (mésappariements) avec la matrice cible. Ces mismatches restent la plupart du temps présents en petit nombre et n'empêchent ainsi pas pour autant l'hybridation amorce-ADNc et le bon fonctionnement de l'enzyme. Il reste cependant envisageable pour des souches un peu plus variables comme pourraient l'être les RCVs qu'une trop grande quantité de ces mismatches puissent empêcher l'appariement sur l'ADNc. Une faible charge virale est également incriminée, pouvant être due ou bien au fait que les virus ne se multiplient pas autant dans l'intestin que dans le foie comme lors de RHD, ou bien à une altération des ARNs au cours de l'extraction.

Ainsi, cette partie est consacrée à la mise au point d'une nouvelle qPCR. Afin de gagner en sensibilité et spécificité, des amorces spécifiques des différentes souches de *Lagovirus* seront désignées puis utilisées dans une qPCR multiplex. Cette méthode sera comparée à celle précédemment utilisée (PanLago) et fera l'objet de mises au point jusqu'à parvenir aux conditions optimales.

II. Matériels et méthodes

A. Amorces

Il a été choisi de cibler 5 géotypes distincts (dont le RHDV subdivisé en 2 variants) de *Lagovirus* que sont le RHDV G1-5, le RHDVa, le RHDV2, le RCV-A1, le RCV-E1 et l'EBHSV, ces derniers constituant la très grande majorité des souches rencontrées. Pour des raisons pratiques et techniques vis-à-vis du design des amorces, il a été choisi de réduire le nombre d'amorces en utilisant une amorce universelle. Ainsi, la qPCR multiplex s'appuie sur 7 amorces et non 12, avec 6 amorces spécifiques dans un sens et 1 universelle dans l'autre. Ayant à disposition les amorces PanLago, les amorces spécifiques ont été recherchées après U38 dans le sens 3' → 5' et avant L337i dans le sens 5' → 3'.

La conception des amorces doit prendre en compte plusieurs paramètres. Bien que ces derniers n'aient pas été développés dans la partie précédente, leur importance est d'autant plus grande ici puisque la qPCR fait intervenir 7 amorces à la fois.

Il a donc dû être identifié des séquences spécifiques aux géotypes ciblées proches des amorces PanLago. La taille des amplicons avec ou bien U38 ou bien L337i devait être de l'ordre de 100 à 500 pb afin de pouvoir utiliser l'iTaq Universal SYBR® Green Supermix et comparer par la suite avec la méthode habituellement utilisée. Une autre condition a été établie afin de pouvoir distinguer les amplicons sur gel d'électrophorèse au besoin. La taille des amplicons a été choisie différente pour chaque couple d'amorces formé avec U38. Cette disposition permet au besoin d'identifier avec quelle amorce l'échantillon testé a été amplifié, et ainsi de savoir de quel géotype il s'agit. Un autre point très important et éliminant beaucoup de possibilité est la non-hybridation entre les amorces. En effet, la formation de dimères d'amorces impacterait directement la lecture des qPCR par l'émission de signaux fluorescents supplémentaires et monopoliserait les amorces au lieu qu'elles ne se fixent sur l'ADNc recherché. Ainsi, une compétition entre matrices cibles et amorces viendrait empêcher le bon déroulement de la qPCR et atténuerait sa fiabilité. Enfin, les

amorces doivent avoir des Tm similaires ou proches afin qu'elles puissent être toutes utilisées dans le même mix réactionnel. Le design des amorces a été effectué à partir d'une banque de données regroupant les séquences nucléotidiques de la VP60 de RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2, RCV-A1, RCV-E1 et EBHSV ainsi que de Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>) et Oligo Analysis Tool (<http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>).

Compte-tenu de toutes ces contraintes dans le design des amorces, des compromis ont dû être fait. Tout d'abord, aucun lot de 6 amorces n'a pu être désigné à partir de L337i. Il a été autorisé d'opter pour de possibles « amplifications croisées », c'est-à-dire qu'une amorce spécifique puisse éventuellement amplifier un autre génotype en plus que celui ciblé (c'est notamment le cas pour l'amorce spécifique des RHDVa avec les souches de RHDV G1-5). Ce compromis n'est en soi que peu handicapant puisque l'ADNc recherché sera tout de même amplifié quoi qu'il arrive et donc identifié. Pour finir, beaucoup d'amorces qui auraient été intéressantes se sont avérées inutilisables en raison de leur dimérisation évidente.

Ce travail de recherche a permis d'aboutir au meilleur lot d'amorces possible bien qu'un compromis quant à une potentielle formation de dimères a dû être réalisé. Ces amorces ont donc été désignées dans le sens 3' → 5' afin de former des amplicons avec U38. Elles sont présentées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques des amorces spécifiques employées avec U38. Les localisations nucléotidiques sont respectivement basées par rapport au premier nucléotide de la VP60 de RHDV-G1-5 (code GenBank FN552800.1), RHDVa (code GenBank EU003578.1), RHDV2 (code GenBank HE800529.1), RCV-A1 (code GenBank GU368894.1), RCV-E1 (code GenBank AM268419.4) et EBHSV (code GenBank KJ679534.1). La taille des amplicons avec U38 a été calculée à chaque fois.

Noms d'amorces	Séquences (5' → 3')	Localisations	Tm (°C)	Tailles d'amplicons
spc RHDV-G1-5-R	AGAATGTTGGACGGTGTAAAGT	267-288	58	250 pb
spc RHDVa--R	CGATGCGGATGAGTTTTCTG	128-147	57	109 pb
spc RHDV2--R	ACGGATTGTTTTGTGGCGAG	285-304	59	266 pb
spc RCV-A1-R	TGGTTCCAGAGATCGGGCAT	476-495	61	457 pb
spc RCV-E1-R	CACTCAAACCAATGTAGGGAC	559-580	57	542 pb
spc EBHSV-R	AAGAAGTTCACACGCCAAGA	187-206	58	180 pb

B. Matrices employées

Afin de vérifier la capacité des amorces à amplifier leurs souches cibles, des échantillons connus de RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2, RCV-A1, RCV-E1 et EHBSV ont été utilisés. Le Tableau 12 regroupe les différents virus en fonction de leur génotype. Malheureusement, aucun RCV-A1 ou RCV-E1 n'étaient disponibles afin de tester spécifiquement les amorces. Il a donc été choisi de s'appuyer sur les résultats de l'étude précédente en prenant OCCS-25 et DPY dont les analyses indiquaient qu'il s'agissait respectivement d'un RCV-E2 et d'un RCV-E1. De l'eau ultra pure est utilisée en tant que témoin négatif. Le contrôle positif employé est le RHDV2 C⁺10401.

Tableau 12 : Liste des échantillons utilisés au cours de la mise au point de la qPCR multiplex.

Génotypes	Noms des échantillons
RHDV G1-5	11-67
	12-40
RHDVa	10-81
	10-84
RHDV2	13-22
	13-69
	C ⁺ 10401
RCV-A1	OCCS-25
RCV-E1	DPY
EBHSV	G3 E13-40
	G3 E14-13
	G1.3 E14-39

C. Protocole initial

Le protocole initial de la qPCR multiplex a directement été inspiré de celui classiquement utilisé avec les amorces PanLago (iTaq Universal SYBR® Green Supermix). La phase d'hybridation-élongation a cependant été modifiée : la température a été diminuée à 60°C selon les recommandations du fabricant et les T_m des amorces, et la durée a été augmentée à 45 sec en raison de la taille des amplicons allant jusqu'à 542 pb. Deux quantités d'amorces ont été expérimentées. La quantité totale des amorces antisens a été doublée ou

triplée (par rapport à L337i) de façon à avoir ou bien trois fois ou deux fois moins de chaque amorce spécifique par rapport à U38. Ainsi, 0.3 μ l d'U38 à 10 μ M sont ajoutés au mix avec ou bien 0.1 μ l (Mix1) ou bien 0.15 μ l (Mix2) de chaque amorce spécifique à 10 μ M (pour un total de 0.6 ou 0.9 μ l d'amorces antisens). Une qPCR PanLago a également été réalisée sur les échantillons RHDV G1-5, RHDVa, RHDV2 et EBHSV afin d'établir une comparaison (déjà effectuée avec OCCS-25 et DPY).

III. Interprétation des premiers résultats et mises au point

A. Premières qPCR multiplex

La qPCR PanLago a permis de détecter la présence virale au sein de tous les échantillons. Les courbes de fluorescence et de dissociation sont présentées sur la Figure 26. Les valeurs des Cq moyens des échantillons ici testés et d'OCCS-25 et DPY précédemment obtenus sont rapportées dans le Tableau 13. Deux qPCR multiplex ont initialement été testées, l'une avec le Mix1 et l'autre avec le Mix2. Les courbes de fluorescence et de dissociation des deux qPCR multiplex sont présentées sur les Figures 27 et 28 et les Cq moyens sont répertoriés dans le Tableau 13.

Figure 26 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5 (bleu), RHDVa (turquoise), RHDV2 dont C+10401 (vert) et EBHSV (orange) avec la qPCR PanLago. Le contrôle négatif est figuré en rouge.

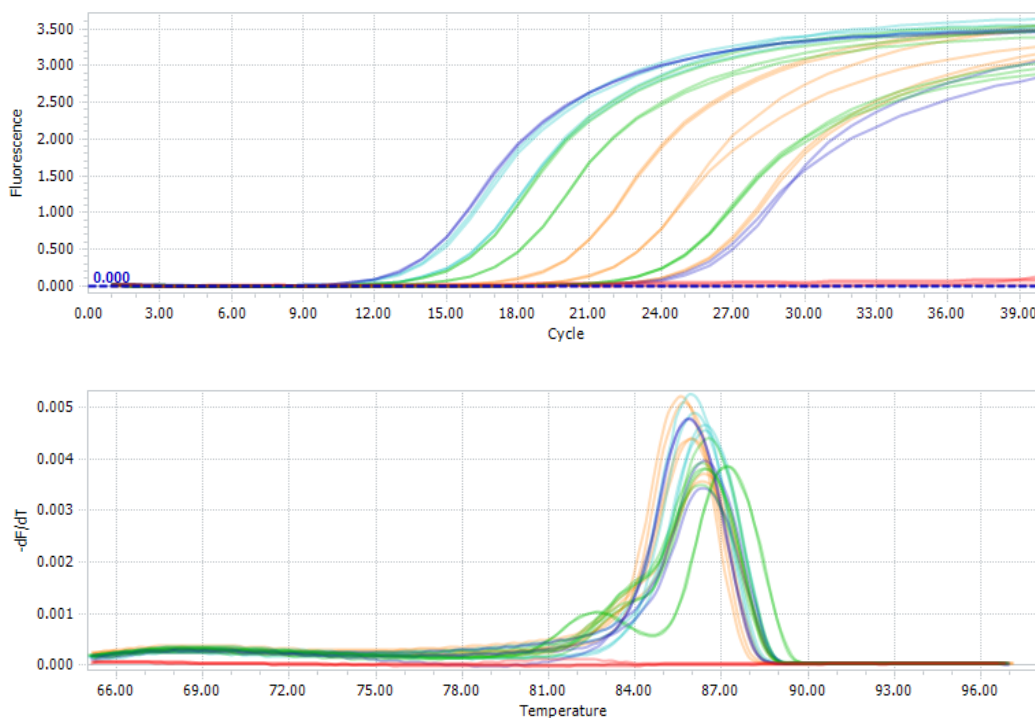


Figure 27 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5 (bleu), RHDVa (turquoise), RHDV2 dont C+10401 (vert), OCCS-25 (gris), DPY (rose) et EBHSV (orange) avec la qPCR multiplex Mix1. Le contrôle négatif est figuré en rouge.

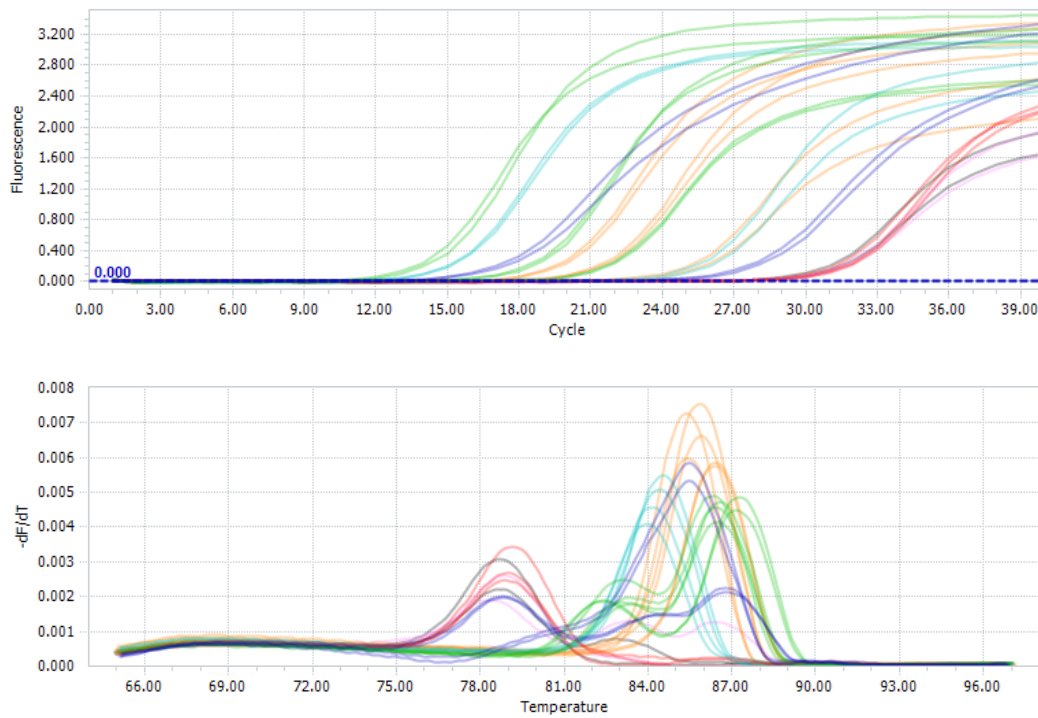
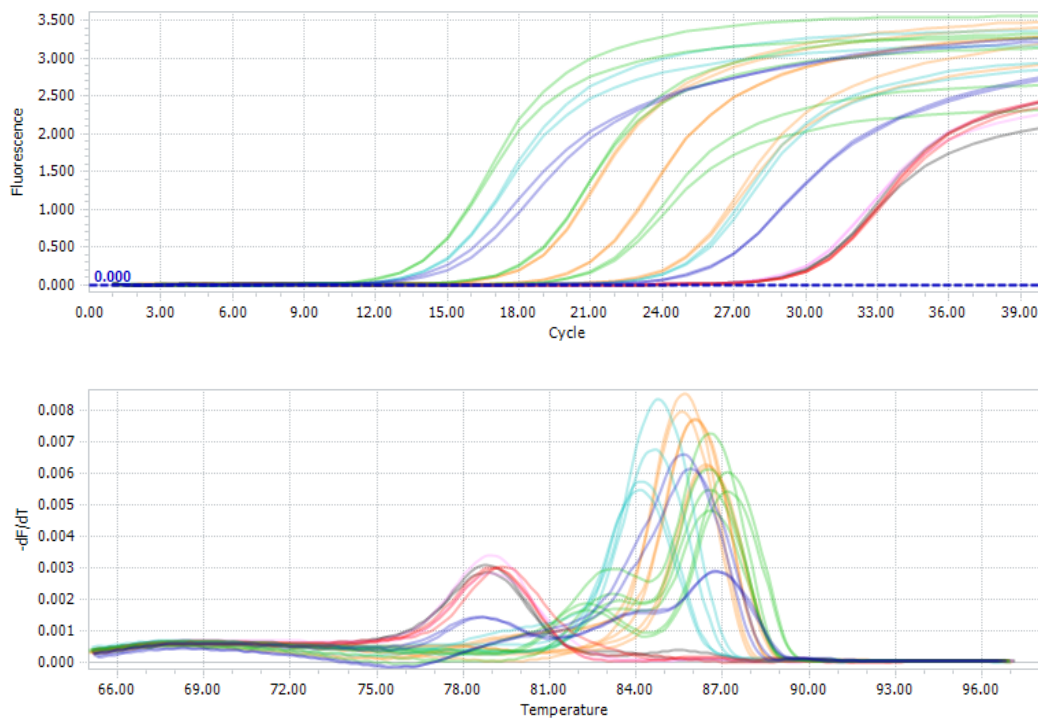


Figure 28 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5 (bleu), RHDVa (turquoise), RHDV2 dont C+10401 (vert), OCCS-25 (gris), DPY (rose) et EBHSV (orange) avec la qPCR multiplex Mix2. Le contrôle négatif est figuré en rouge.



Les résultats des qPCR multiplex mettent en évidence la présence d'ADNc viral au sein de tous les échantillons, OCCS-25 et DPY exclus. Par ailleurs, les courbes de dissociation de ces derniers et de l'eau présentent un pic vers 79°C témoignant en première hypothèse de l'amplification de dimères d'amorces. En ce qui concerne les autres souches, seul le RHDV G1-5 12-40 semble présenter deux pic bien distincts dont un vers 79°C. Enfin, les Cq moyens de tous les échantillons issus de la multiplex Mix1 sont supérieurs à ceux de la multiplex Mix2. Bien que ces valeurs aient un faible poids statistique, la qPCR multiplex Mix2 paraît être légèrement plus sensible que la multiplex Mix1.

La comparaison de la qPCR multiplex Mix2 avec la PanLago montre également une tendance. En effet, les Cq moyens pour un échantillon donné semblent très proches les uns des autres, voire parfois inférieurs avec la multiplex Mix2. Ce constat n'est cependant pas valable pour l'échantillon RHDVa 10-84 où un écart plus important est remarqué.

Tableau 13 : Valeurs des Cq moyens des différents échantillons obtenues avec les qPCR multiplex Mix1 et Mix2 et la PanLago.

Génotypes	Echantillons	Cq moyens (PanLago)	Cq moyens (multiplex Mix1)	Cq moyens (multiplex Mix2)
RHDV G1-5	11-67	13.11	17.21	14.81
	12-40	25.33	27.74	25.74
RHDVa	10-81	13.41	15.09	14.25
	10-84	14.84	25.69	24.56
RHDV2	13-22	15.04	13.91	13.37
	13-69	16.70	18.50	17.70
	C ⁺ 10401	23.82	21.71	21.28
RCV-A1	OCCS-25	33.83	31.23	30.02
RCV-E1	DPY	31.12	31.59	29.69
EBHSV	G3 E13-40	19.14	19.64	18.08
	G3 E14-13	24.98	25.42	24.12
	G1.3 E14-39	21.65	21.44	20.46

Ces conditions initiales montrent des résultats prometteurs pour la qPCR multiplex. Elle permet en effet de détecter la présence virale au sein des échantillons aussi bien que la PanLago mais à l'exception des souches OCCS-25 et DPY. Elle présente tout de même un important défaut à corriger qui est la probable dimérisation d'amorces. La formation de ces

dimères pourrait être à l'origine de la non-détection d'OCCS-25 et DPY par un phénomène de compétition.

B. Mises au point

Il a été nécessaire d'améliorer la qPCR multiplex en corrigeant notamment la formation de dimères d'amorces.

Afin de s'assurer de leur présence, deux nouvelles multiplex ont été réalisées en ne mettant qu'une amorce spécifique à la fois avec U38 et uniquement de l'eau ultra pure. Les quantités d'amorces employées ont été identiques à la PanLago, soit 0.3 µl d'U38 et 0.3 µl d'amorce spécifique. Les deux qPCR ont différé de par leur programme d'incubation. La première a utilisé le même que précédemment, soit avec un temps et une température d'hybridation-élongation de 45 sec à 60°C, tandis que la deuxième a été effectuée avec un temps d'hybridation-élongation de 20 sec, à même température. Les deux qPCR ont mis en évidence la présence de matériel génétique amplifié, ne pouvant ainsi correspondre qu'à des dimères d'amorces. Cependant, le fait d'avoir diminué la durée d'hybridation-élongation a permis d'une part de montrer que les amplicons formés étaient principalement causés par les amorces spc RHDVa-R et spc RCV-A1-R avec U38, et d'autre part de réduire la dimérisation.

Compte-tenu de ces résultats, le temps d'hybridation-élongation de 20 sec a été adopté. Afin de réduire encore la présence de dimères dus à spc RHDVa-R et spc RCV-A1-R, les concentrations en amorces ont été modifiées. Tout comme précédemment, les amorces spécifiques pour RHDVa et RCV-A1 ont été testées individuellement avec U38 et de l'eau ultra pure mais cette fois à des quantités différentes que sont 0.15 µl (comme lors de la multiplex Mix2), 0.06 µl (au 5^{ème}) et 0.03 µl (au 10^{ème}). En ce qui concerne spc RCV-A1-R, le passage à 0.15 µl permet d'atténuer les dimères. Pour spc RHDVa-R, le meilleur compromis entre réduction des amplicons d'amorces et conservation de la sensibilité a été 0.06 µl (le RHDVa 10-81 a conjointement été testé afin d'estimer le Cq selon la dilution, ce dernier augmentant considérablement pour 0.03 µl). Les conditions alors retenues vis-à-vis des quantités d'amorces sont 0.3 µl d'U38, 0.06 µl de spc RHDVa-R et 0.15 µl des autres.

De nouvelles qPCR ont été réalisées afin de vérifier si les amorces spécifiques formaient des dimères entre elles en plus d'U38. Pour cela, toutes les amorces spécifiques ont été croisées deux à deux dans des mix individuels avec de l'eau ultra pure. Sur toutes les qPCR effectuée, aucune amplification n'a été détectée, montrant ainsi que les dimères

observés restent essentiellement dus à U38 avec spc RHDVa-R et éventuellement spc RCV-A1-R et non dus aux amorces spécifiques entre elles.

La qPCR multiplex a de nouveau été réalisée en corrigeant les précédents paramètres. En ce qui concerne les amorces, le mix comprend donc 0.3 μ l d'U38, 0.06 μ l de spc RHDVa-R et 0.15 μ l des autres. La température d'hybridation-élongation reste inchangée à 60°C pour une durée de 20 sec. Deux qPCR multiplex identiques ont été testées avec des durées de 30 et 40 sec afin de trouver un compromis entre détection et amplification de dimères. Toujours dans l'optique de permettre une détection plus précoce, les valeurs moyennes des Cq ont été évalués par rapport à celles de la PanLago. Malgré les modifications apportées, un nouveau compromis a dû être adopté en raison de la persistance des dimères d'amorces dans les 3 cas : la meilleure qPCR ainsi retenue a été celle avec un temps d'hybridation-élongation de 30 sec. Les courbes de fluorescence et de dissociation sont présentées sur la Figure 29 et les Cq moyens sont répertoriés dans le Tableau 14.

Figure 29 : Courbes de fluorescence et de dissociation avec les échantillons RHDV G1-5 (bleu), RHDVa (turquoise), RHDV2 dont C+10401 (vert), OCCS-25 (gris), DPY (rose) et EBHSV (orange) avec la qPCR multiplex finalement retenue. Le contrôle négatif est figuré en rouge.

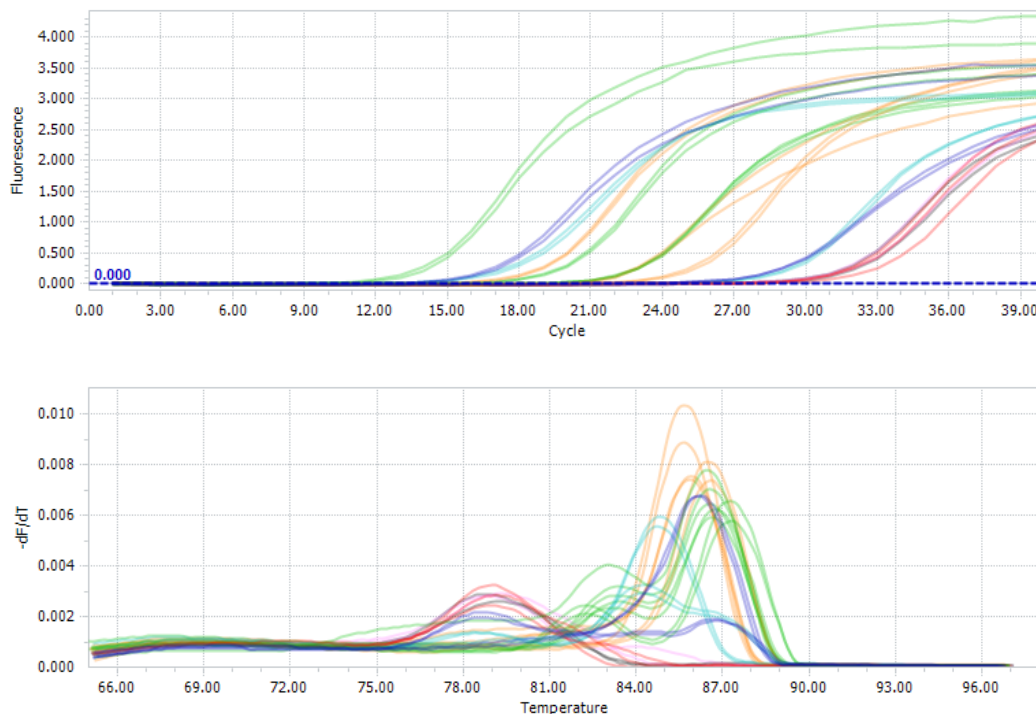


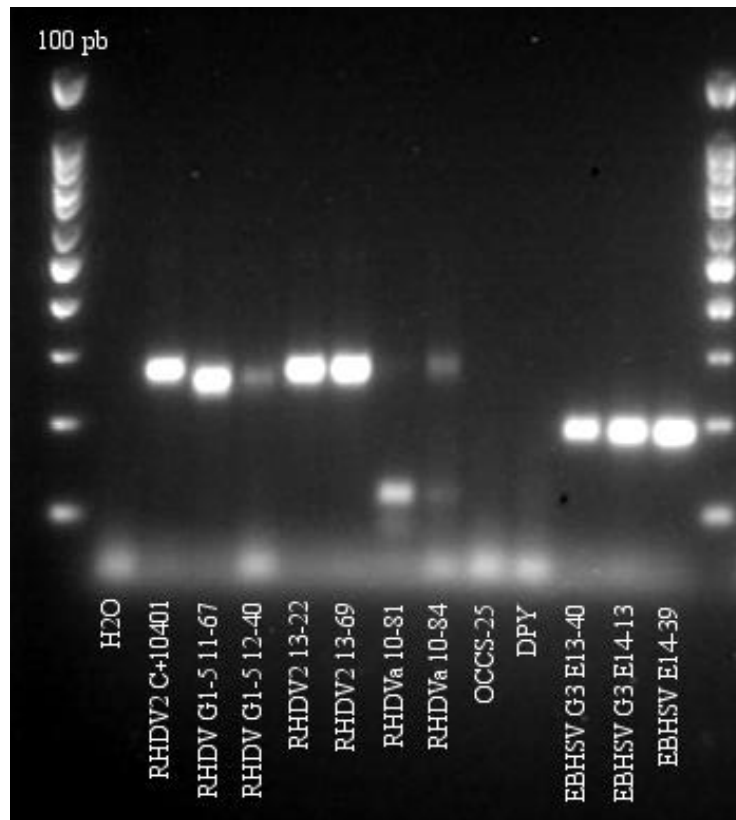
Tableau 14 : Valeurs des Cq moyens des différents échantillons obtenues avec la qPCR multiplex finalement retenue et la qPCR PanLago.

Génotypes	Echantillons	Cq moyens (PanLago)	Cq moyens (multiplex)
RHDV G1-5	11-67	13.11	16.66
	12-40	25.33	28.54
RHDVa	10-81	13.41	17.13
	10-84	14.84	29.02
RHDV2	13-22	15.04	13.74
	13-69	16.70	13.45
	C ⁺ 10401	23.82	22.67
RCV-A1	OCCS-25	33.83	31.52
RCV-E1	DPY	31.12	31.46
EBHSV	G3 E13-40	19.14	22.69
	G3 E14-13	24.98	24.95
	G1.3 E14-39	21.65	18.61

Bien que la qPCR ait été perfectionnée, les dimères d’amorces restent encore en quantité trop importante (dès Cq > 31). Les échantillons OCCS-25 et DPY ne sortent toujours pas, ou bien pour des raisons de compétitions, ou bien par défaut de complémentarité entre les amorces et les ADNc. Les Cq obtenus sont de l’ordre de ceux issus de la qPCR PanLago, certains étant tout de même bien plus élevés comme pour l’échantillon RHDVa 10-84. Ces deux critères font que cette qPCR multiplex semble finalement peu sensible par rapport aux espérances et nécessiterait d’autres améliorations.

Les produits qPCR de la multiplex ont été déposés sur gel afin d’observer les différents amplicons obtenus, gel d’électrophorèse étant présenté Figure 30. Les RHDV G1-5, RHDV2 et EBHSV sortent aux tailles d’amplicons attendus, tandis que les RHDVa sortent à la fois aux tailles d’amplicons prévus mais aussi au niveau des RHDV2. En ce qui concerne OCCS-25 et DPY, aucune bande n’est identifiable.

Figure 30 : Gel d'électrophorèse réalisé suite à la qPCR multiplex.



Afin d'objectiver les « amplifications croisées » entre les amorces spécifiques et les génotypes non cibles de celles-ci, chaque amorce prise individuellement avec U38 a été confrontée à une souche différente (dans les mêmes conditions que le qPCR multiplex en respectant les quantités d'amorces). Après migration sur gel, des amplicons de tailles différentes ont été identifiés pour une seule et même souche, témoignant du fait que certaines amorces spécifiques pouvaient amplifier certains génotypes non cibles comme c'est le cas pour spc RHDV2 avec les RHDVa. Par ailleurs, la qPCR avec le mix réactionnel U38/spc RCV-E1-R a permis d'obtenir une détection de DPY ainsi qu'une bande lors de l'électrophorèse à la taille attendu pour les RCV-E1. Ce résultat suggère que l'amorce spc RCV-E1-R doit probablement rentrer en conflit avec d'autres lors de la qPCR multiplex, empêchant par la suite l'amplification de DPY. Enfin, OCCS-25 n'a pas pu être détecté par aucun couple d'amorces (l'intégrité de son matériel génétique au sein de l'échantillon a cependant pu être vérifiée avec une qPCR PanLago).

IV. Discussion

Malgré toutes les améliorations apportées, la qPCR multiplex génère encore de trop nombreux dimères. Les hybridations entre amorces semblent d'autant plus présentes que le

temps d'hybridation est long et concernent principalement U38 avec spc RHDVa-R et spc RCV-A1-R. Dans les conditions employées, les dimérisations sont détectées très précocement ($Cq > 31$) et empêchent probablement la détection du virus au sein des échantillons dont la charge virale est trop faible. En effet, les ADNc des échantillons autres qu'OCCS-25 et DPY semblent être correctement amplifiés sans majeure interférence avec ces dimères. Une possibilité non explorée dans ce travail est la mise à l'écart complète de l'amorce spc RHDVa-R. En raison des « amplifications croisées » constatées pour les RHDVa avec d'autres amorces spécifiques comme la spc RHDV2-R, l'utilisation de la spc RHDVa-R pourrait ne pas être nécessaire pour leur amplification et mise en évidence. Ainsi, la quantité de dimères pourrait être considérablement diminuée tout en conservant la possibilité de détecter les RHDVa. La non utilisation de l'amorce spc RHDVa-R serait donc à essayer, bien que les amplicons obtenus sur le gel d'électrophorèse témoignent que les RHDVa sont majoritairement amplifiés par leur amorce spécifique dans les conditions actuelles.

L'objectif de mettre au point une qPCR plus sensible que la PanLago n'a pas pu être ici atteint. En plus de ne pas réussir à détecter OCCS-25 et DPY, les Cq des autres échantillons restent proches voire plus élevés de ceux obtenus par la PanLago. Même si certains d'entre eux peuvent paraître plus faible et laisser penser à une meilleure détection, notamment pour les RHDV2, il est impossible de conclure sans analyse statistique. Malheureusement, le trop faible nombre d'échantillons par génotype disponibles et de qPCR effectuées ne permet pas ici d'en réaliser. Dans la même idée, seuls OCCS-25 et DPY représentaient respectivement les RCV-A1 et RCV-E1. Afin de vérifier la performance de la qPCR et des amorces spécifiques associées, d'autres souches de ces génotypes sont nécessaires et notamment de véritables RCV-A1. Il est aussi possible d'envisager que la charge virale d'OCCS-25 soit trop faible pour la multiplex, qPCR moins sensible que la PanLago. Cette dernière en effet permettait une détection d'OCCS-25 plutôt tardive avec un $Cq > 33$. Le fait de ne pas détecter cet échantillon avec la multiplex pourrait ainsi être simplement dû à sa faible charge et la moins bonne détection de la qPCR.

La mise au point de cette qPCR n'est à ce jour pas aboutie et plusieurs améliorations pourraient être envisagées. Comme remarqué précédemment, enlever la spc RHDVa-R du pool d'amorces pourrait résoudre en partie le problème de dimères. Un paramètre n'ayant pas été ici investigué est la température lors de l'hybridation-élongation. En effet, toutes les qPCR multiplex ont été réalisées avec la température de 60°C, hormis une à 64°C non mentionnée dans cette étude n'ayant pas apportée d'amélioration. Ce paramètre influençant l'hybridation

des amorces aux ADNc ainsi que le fonctionnement de l'enzyme, d'autres températures devraient être essayées. Enfin, si aucune de ces solutions ne permet d'aboutir à un multiplex performant, un redesign des amorces est à envisager. Cette étude s'est cantonnée à la VP60 et l'utilisation d'une amorce universelle, restriction ayant conduit à plusieurs compromis dans le choix des amorces optimales. Il aurait ainsi été possible de designer d'autres amorces ailleurs sur le génome, non nécessairement localisées sur un même gène. Ces amorces pourraient être ou bien des universelles ou combinaisons de semi-universelles pour certains génotypes, ou bien uniquement spécifiques. Une étude de 2018 a par exemple réussi à mettre au point une RT-PCR multiplex avec 4 couples d'amorces spécifiques (8 au total) dans le but de différencier les différents génotypes de *Lagovirus* en Australie, dont 2 étaient situés sur le gène de la VP60 et 2 sur celui de la RdRp (Hall et al. 2018).

Bien que cette étude ne permette pas une meilleure détection que la qPCR PanLago, une autre perspective intéressante a été constatée : celle de l'identification du génotype. En effet, les amorces ayant été designées de façon à former avec U38 des amplicons de tailles différentes, ces derniers sont alors distinguables sur gel après électrophorèse et permettent de savoir quelle amorce s'est hybridée sur l'ADNc, et donc de quel génotype il s'agit. Les expériences montrent en réalité que cela n'est valable que pour les souches de RHDV G1-5, RHDV2 et EBHSV, avec un seul amplicon à chaque migration et à la taille attendue. En ce qui concerne les RHDVa, les « amplifications croisées » entraînent la présence de plusieurs bandes et donc une ambiguïté avec les RHDV2 empêchant de conclure quant à l'identification du génotype. Enfin, l'absence d'amplification d'OCCS-25 et DPY suggère que la qPCR multiplex n'est pas encore au point pour l'identification des RCV-A1 et RCV-E1. Il serait donc nécessaire, afin de perfectionner cette méthode comme moyen d'identification, d'améliorer encore la qPCR et de multiplier le nombre d'échantillons à identifier pour chaque génotype.

Conclusion

Ce travail a permis d'aboutir au séquençage et identification de 4 souches apparentées au RHDV. Les lapins sur lesquels les échantillons ont été obtenus ne présentant pas de manifestation clinique de la RHD, les virus ainsi détectés semblaient donc à priori correspondre à des variants non pathogènes comme ceux actuellement connus. L'analyse phylogénétique par la suite réalisée a en effet montré que ces souches présentaient des ressemblances pour deux génotypes différents connus pour leur non pathogénicité. Il a été établie que le DPY semblait plutôt appartenir aux RCV-E1, comme en fait partie le 06-11, tandis que les 3 autres, OCCS-06, OCCS-25 et OCCS-110, étaient davantage proches des RCV-E2 et RCV-A1. Malgré le fait que les séquences nucléotidiques obtenues ne soient pas complètes, le premier projet de cette étude a été mené à bien et souligne encore l'importante diversité des *Lagovirus*.

En raison de la faible charge virale présente dans les échantillons cette variabilité génétique, les détections et amplifications par qPCR et PCR ont souvent abouti à des résultats douteux voire négatifs. Il a donc été nécessaire de performer chaque protocole en testant plusieurs conditions différentes et d'essayer de nombreuses combinaisons d'amorces pour chaque échantillon. Les fragments d'ADNc ainsi obtenus ont finalement une fois alignés permis le séquençage des ADNc.

La recherche de virus non pathogènes requiert donc l'usage de méthodes de diagnostic performantes. Le second axe de ce travail a ainsi visé à mettre au point une qPCR multiplex sans toutefois avoir pu l'optimiser. La qPCR s'appuyant sur des amorces universelles pour la VP60 reste donc finalement la meilleure méthode dans la détection de *Lagovirus* dans cette étude. Cependant, aucun matériel viral correspondant à une souche non pathogène n'a pu être mis en évidence chez *Lepus spp.*, *S. floridanus* ou *T. sibiricus*. Bien qu'aucun cas n'ait encore été rapporté, la recherche de ces virus demeure primordiale chez ces espèces vis-à-vis de l'hypothèse de sauts d'espèces.

Si les souches identifiées dans cette étude ont été récupérées sur des animaux à priori non cliniques, leur pathogénicité n'a pas été évaluée expérimentalement. Comme pour le RCV italien, les RCV-A1 ou les RCV-E1, une étude portant sur l'inoculation de ces souches à des lapins adultes naïfs permettrait par un suivi clinique puis à postériori nécropsique

d'affirmer ou infirmer leur caractère non pathogène. Pour ce faire, l'isolement des particules virales serait cependant nécessaire, processus à ce jour non effectué pour toutes ces souches.

Un autre aspect intéressant à étudier serait l'éventuelle protection croisée que pourraient alors conférer ces souches face aux différents génotypes pathogènes. En effet, le caractère protecteur a été testé expérimentalement pour le RCV italien, les RCV-A1 et les RCV-E1, montrant ainsi l'existence de différences en termes de protection croisée avec notamment un gradient au sein-même des RCV-A1. En s'appuyant sur les résultats obtenus, il est alors possible d'émettre l'hypothèse que DPY et les OCCS possèdent les mêmes caractéristiques que respectivement les RCV-E1 et les RCV-A1, soit l'induction d'une part d'aucune protection et d'autre part de protections variables. A moins d'isoler ces virus, cette étude expérimentale nécessiterait le recours à des animaux vivants et naturellement infectés par ces souches dont l'aspect pratique reste difficile à concevoir.

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 **Romain GOEPFERT** intitulée « **Détection et identification de lagovirus chez diverses espèces de lagomorphes** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 7 novembre 2018
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



M. Romain GOEPFERT
a été admis(e) sur concours en : 2013
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017
a validé son année d'approfondissement le : 11/10/2018
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



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 ANDRE-OBRECHT

Bibliographie

- ABRANTES, J, LOPES, AM, DALTON, KP, MELO, P, CORREIA, RAMADA, M, ALVES, PC, PARRA, F et ESTEVES, PJ, 2013. New Variant of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, Portugal, 2012–2013. *Emerging Infectious Diseases*. Novembre 2013. Vol. 19, n° 11, pp. 1900-1902.
- ABRANTES, J, LOPES, AM, DALTON, KP, PARRA, F et ESTEVES, PJ, 2014. Detection of RHDVa on the Iberian Peninsula: isolation of an RHDVa strain from a Spanish rabbitry. *Archives of Virology*. Février 2014. Vol. 159, n° 2, pp. 321-326.
- ABRANTES, J, VAN DER LOO, W, LE PENDU, J et ESTEVES, PJ, 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research*. 2012. Vol. 43, n° 1, pp. 12.
- ALDA, F, GAITERO, T, SUÁREZ, M, MERCHÁN, T, ROCHA, G et DOADRIO, I, 2010. Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. *BMC Evolutionary Biology*. 10 novembre 2010. Vol. 10, pp. 347.
- ALVES, PC, FERRAND, N et HACKLÄNDER, K (éd.), 2008. *Lagomorph biology: evolution, ecology, and conservation*. Berlin ; New York : Springer. QL737.L3 L34 2008.
- BAILY, J, DAGLEISH, MP, GRAHAM, M, MALEY, M et ROCCHI, MS, 2014. RHDV variant 2 presence detected in Scotland. *Veterinary Record*. 19 avril 2014. Vol. 174, n° 16, pp. 411.1-411.
- BÁRCENA, J, GUERRA, B, ANGULO, I, GONZÁLEZ, J, VALCÁRCEL, MATA, CP, CASTÓN, JR, BLANCO, E et ALEJO, A, 2015. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Veterinary Research*. 24 septembre 2015. Vol. 46, n° 1, pp. 106.
- BERGIN, IL, WISE, AG, BOLIN, SR, MULLANEY, TP, KIUPEL, M et MAES, RK, 2009. Novel Calicivirus Identified in Rabbits, Michigan, USA. *Emerging Infectious Diseases*. Décembre 2009. Vol. 15, n° 12, pp. 1955-1962.
- BERTAGNOLI, S, GELFI, J, LE GALL, G, BOILLETOT, E, VAUTHEROT, JF, RASSCHAERT, D, LAURENT, S, PETIT, F, BOUCRAUT-BARALON, C et MILON, A, 1996. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Journal of Virology*. Août 1996. Vol. 70, n° 8, pp. 5061-5066.
- BERTAGNOLI, S, GELFI, J, PETIT, F, VAUTHEROT, JF, RASSCHAERT, D, LAURENT, S, LE GALL, G, BOILLETOT, E, CHANTAL, J et BOUCRAUT-BARALON, C, 1996. Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine*. 1 avril 1996. Vol. 14, n° 6, pp. 506-510.
- BOUSLAMA, A, M DE MIA, G, HAMMAMI, S, AOUINA, T, SOUSSI, H et FRESCURA, T, 1996. Identification of the virus of rabbit haemorrhagic disease in Tunisia. *The Veterinary record*. 1 mars 1996. Vol. 138, pp. 108-10.
- BOUSSIGNAC, M, 2016. Émergence et évolutions des lagovirus. 2016. pp. 159.
- 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*). *Research in Veterinary Science*. Décembre 2014. Vol. 97, n° 3, pp. 642-645.

- CANCELLOTTI, FM et RENZI, M, 1991. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 1991. pp. 409-422.
- CAPUCCI, L, FALLACARA, F, GRAZIOLI, S, LAVAZZA, A, PACCIARINI, ML et BROCCHI, E, 1998. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Research*. 1 novembre 1998. Vol. 58, n° 1, pp. 115-126.
- CAPUCCI, L, FUSI, P, LAVAZZA, A, PACCIARINI, ML et ROSSI, C, 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *Journal of Virology*. Décembre 1996. Vol. 70, n° 12, pp. 8614-8623.
- CAPUCCI, L, NARDIN, A et LAVAZZA, A, 1997. Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *The Veterinary Record*. 21 juin 1997. Vol. 140, n° 25, pp. 647-650.
- CHAPUIS, JL, 2005. Répartition en France d'un animal de compagnie naturalisé, le Tamia de Sibérie (*Tamias Sibiricus*). 2005. pp. 16.
- CHEN, SY, CHOU, CC, LIU, CI et SHIEN, JH, 2008. Impairment of Renal Function and Electrolyte Balance in Rabbit Hemorrhagic Disease. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2008. Vol. 70, n° 9, pp. 951-958.
- CHEN, SY, SHIEN, JH et OOI, HK, 2008. Hyperlipidemia in Rabbit Hemorrhagic Disease. *Experimental Animals*. 2008. Vol. 57, n° 5, pp. 479-483.
- CHIARI, M, MOLINARI, S, CAVADINI, P, BERTASI, B, ZANONI, M, CAPUCCI, L et LAVAZZA, A, 2016. Red foxes (*Vulpes vulpes*) feeding brown hares (*Lepus europaeus*) infected by European brown hare syndrome virus (EBHSV) might be involved in the spread of the virus. *European Journal of Wildlife Research*. 1 décembre 2016. Vol. 62, n° 6, pp. 761-765.
- CLARKE, IN et LAMBDEN, PR, 1997. The molecular biology of caliciviruses. *Journal of General Virology*. 1997. Vol. 78, n° 2, pp. 291-301.
- COOKE, BD et FENNER, F, 2002. Rabbit haemorrhagic disease and the biological control of wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Australia and New Zealand. *Wildlife Research*. 2002. Vol. 29, n° 6, pp. 689.
- COOKE, BD, ROBINSON, AJ, MERCHANT, JC, NARDIN, A et CAPUCCI, L, 2000. Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiology and Infection*. Juin 2000. Vol. 124, n° 3, pp. 563-576.
- COOKE, BD, 2002. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations: -EN- -FR- -ES-. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 août 2002. Vol. 21, n° 2, pp. 347-358.
- DALTON, KP, NICIEZA, I, BALSEIRO, A, MUGUERZA, MA, ROSELL, JM, CASAIS, R, ÁLVAREZ, AL et PARRA, F, 2012. Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Young Rabbits, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. Décembre 2012. Vol. 18, n° 12, pp. 2009-2012.
- DEHAUMONT, P, 2018. Arrêté du 30 mai 2018. *Legifrance* [en ligne]. 30 mai 2018. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/5/30/AGRGI1815028A/jo/texte/frArrêté du 30 mai 2018 modifiant l'arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales>.
- DI PROFIO, F, MELEGARI, I, SARCHESE, V, ROBOTTO, S, BERMUDEZ SANCHEZ, Sandra, CARELLA, E, ORUSA, R, CAVADINI, P, LAVAZZA, A, MARSILIO, F, MARTELLA, V et DI MARTINO, B, 2018. Potential role of wolf (*Canis lupus*) as passive carrier of European brown hare syndrome virus (EBHSV). *Research in Veterinary Science*. 1 avril 2018. Vol. 117, pp. 81-84.

- DOULTREE, JC, DRUCE, JD, BIRCH, CJ, BOWDEN, DS et MARSHALL, JA, 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*. 1 janvier 1999. Vol. 41, n° 1, pp. 51-57.
- DREWS, B, SZENTIKS, CA, ROELLIG, K, FICKEL, J, SCHROEDER, K, DUFF, JP, LAVAZZA, A, HILDEBRANDT, TB et GOERITZ, F, 2011. Epidemiology, control and management of an EBHS outbreak in captive hares. *Veterinary Microbiology*. 29 décembre 2011. Vol. 154, n° 1, pp. 37-48.
- DUARTE, M, CARVALHO, C, BERNARDO, S, BARROS, SV, BENEVIDES, Sandra, FLOR, L, MONTEIRO, M, MARQUES, I, HENRIQUES, M, BARROS, SC, FAGULHA, T, RAMOS, F, LUÍS, T et FEVEREIRO, M, 2015. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: Disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. *Infection, Genetics and Evolution*. 1 octobre 2015. Vol. 35, pp. 163-171.
- ELSWORTH, P, COOKE, BD, KOVALISKI, J, SINCLAIR, R, HOLMES, EC et STRIVE, T, 2014. Increased virulence of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Virology*. Septembre 2014. Vol. 0, pp. 415-423.
- ESTEVEES, PJ, ABRANTES, J, BERTAGNOLI, S, CAVADINI, P, GAVIER-WIDÉN, D, GUITTON, JS, LAVAZZA, A, LEMAITRE, E, LETTY, J, LOPES, AM, NEIMANIS, AS, RUVOËN-CLOUET, N, LE PENDU, J, MARCHANDEAU, S et LE GALL-RECULE, G, 2015. Emergence of Pathogenicity in Lagoviruses: Evolution from Pre-existing Nonpathogenic Strains or through a Species Jump? *PLoS Pathogens*. 5 novembre 2015. Vol. 11, n° 11.
- FENNER, F, 2010. Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2010. Vol. 29, n° 1, pp. 103-111.
- FERREIRA, PG, COSTA-E-SILVA, A, MONTEIRO, E, OLIVEIRA, MJR et ÁGUAS, AP, 2006. Liver Enzymes and Ultrastructure in Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). *Veterinary Research Communications*. 1 mai 2006. Vol. 30, n° 4, pp. 393-401.
- FERREIRA, PG, COSTA-E-SILVA, A, OLIVEIRA, MJR, MONTEIRO, E et ÁGUAS, AP, 2005. Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 10 février 2005. Vol. 103, n° 3, pp. 217-221.
- FERREIRA, PG, COSTA-E-SILVA, A, OLIVEIRA, MJR, MONTEIRO, E, CUNHA, EM et ÁGUAS, AP, 2006. Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Research in Veterinary Science*. 1 avril 2006. Vol. 80, n° 2, pp. 218-225.
- FERREIRA, PG, DINÍS, M, COSTA-E-SILVA, A et ÁGUAS, AP, 2008. Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Février 2008. Vol. 121, n° 3-4, pp. 364-369.
- FORRESTER, NL, MOSS, SR, TURNER, SL, SCHIRRMIEIER, H et GOULD, EA, 2008. Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: Possible impact on evolution and epidemiology. *Virology*. 5 juillet 2008. Vol. 376, n° 2, pp. 390-396.
- FORRESTER, NL, TROUT, RC et GOULD, EA, 2007. Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology*. 5 février 2007. Vol. 358, n° 1, pp. 18-22.
- FRÖLICH, K, FICKEL, J, LUDWIG, A, LIECKFELDT, D, STREICH, Wolf Jürgen, 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. *Journal of Wildlife Diseases*. Janvier 2007. Vol. 43, n° 1, pp. 89-96.
- FUCHS, A et WEISSENBOCK, H, 1992. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). *Journal of Comparative Pathology (United Kingdom)*. 1992.

- GAV, D et MÖRNER, T, 1991. Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries: a review. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 1991. pp. 6.
- GDS CENTRE, 2018. LAPINS - Mise à jour des Dangers Sanitaires. *GDS Centre* [en ligne]. 8 juin 2018. Disponible à l'adresse : <http://www.gdscentre.fr/index.php/actu-navbar/880-lapins-mise-a-jour-des-dangers-sanitaires>.
- GELMETTI, D, GRIECO, V, ROSSI, C, CAPUCCI, L et LAVAZZA, A, 1998. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. *Journal of Virological Methods*. 1 juin 1998. Vol. 72, n° 2, pp. 219-226.
- GHANEM, IA et ISMAIL, AN, 1992. Occurrence of rabbit haemorrhagic disease in Sharkia province. *Zagazig Veterinary Journal*. 1992. Vol. 20, n° 4, pp. 491-502.
- GOULD, AR, KATTENBELT, JA, LENGHAUS, C, MORRISSY, C, CHAMBERLAIN, T, COLLINS, BJ et WESTBURY, HA, 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. *Virus Research*. 1 janvier 1997. Vol. 47, n° 1, pp. 7-17.
- GRAZIOLI, S, AGNOLETTI, F, SCICLUNA, M, MASOERO, N, GUERCIO, A, FALLACARA, F, LAVAZZA, A, BROCCHI, E et CAPUCCI, L, 2000. Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) subtype « A » (RHDVa) is replacing the original strain in some Italian regions. *Fifth international congress of the European society for veterinary virology*. 1 janvier 2000. pp. 27-30.
- GREEN, KY, ANDO, T, BALAYAN, MS, BERKE, T, CLARKE, IN, ESTES, MK, MATSON, DO, NAKATA, S, NEILL, JD, STUDDERT, MJ et THIEL, HJ, 2000. Taxonomy of the Caliciviruses. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 mai 2000. Vol. 181, n° Supplement_2, pp. S322-S330.
- GREGG, DA, HOUSE, C et BERNINGER, M, 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico : epidemiology and viral characterization: -EN- -FR- -ES-. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 juin 1991. Vol. 10, n° 2, pp. 435-451.
- GROMADZKA, B, SZEWCZYK, B, KONOPA, G, FITZNER, A et KESY, A, 2006. Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta biochimica Polonica*. 1 février 2006. Vol. 53, pp. 371-6.
- HALL, R. N., MAHAR, J. E., READ, A. J., MOURANT, R., PIPER, M., HUANG, N. et STRIVE, T., 2018. A strain-specific multiplex RT-PCR for Australian rabbit haemorrhagic disease viruses uncovers a new recombinant virus variant in rabbits and hares. *Transboundary and Emerging Diseases*. Avril 2018. Vol. 65, n° 2, pp. e444-e456.
- HALL, RN, MAHAR, JE, HABOURY, S, STEVENS, V, HOLMES, EC et STRIVE, T, 2015. Emerging Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 (RHDVb), Australia. *Emerging Infectious Diseases*. Décembre 2015. Vol. 21, n° 12, pp. 2276-2278.
- HALL, RN, PEACOCK, D, KOVALISKI, J, MAHAR, J, MOURANT, R, PIPER, M et STRIVE, T, 2016. Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. *Veterinary Record*. 19 octobre 2016. Vol. 180, pp. vetrec-2016.
- HENNING, J, MEERS, J, DAVIES, PR et MORRIS, RS, 2005. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiology and Infection*. Août 2005. Vol. 133, n° 4, pp. 719-730.
- HENZELL, RP, CUNNINGHAM, RB et NEAVE, HM, 2002. Factors affecting the survival of Australian wild rabbits exposed to rabbit haemorrhagic disease. *Wildlife Research*. 2002. Vol. 29, n° 6, pp. 523.
- 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. *Protein & Cell*. Janvier 2010. Vol. 1, n° 1, pp. 48-58.

- INSTITUT PASTEUR DE TUNIS, 2017. *Rapport 2017 de l'Institut Pasteur de Tunis* [en ligne]. Disponible à l'adresse : www.pasteur.tn/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=543&Itemid=.
- JAHNKE, M, HOLMES, EC, KERR, PJ, WRIGHT, JD et STRIVE, T, 2010. Evolution and Phylogeography of the Nonpathogenic Calicivirus RCV-A1 in Wild Rabbits in Australia. *Journal of Virology*. Décembre 2010. Vol. 84, n° 23, pp. 12397-12404.
- JUNG, JY, LEE, BJ, TAI, JH, PARK, JH et LEE, YS, 2000. Apoptosis in Rabbit Haemorrhagic Disease. *Journal of Comparative Pathology*. 1 août 2000. Vol. 123, n° 2, pp. 135-140.
- KERR, PJ et DONNELLY, TM, 2013. Viral Infections of Rabbits. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. Mai 2013. Vol. 16, n° 2, pp. 437-468.
- 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. *Journal of Comparative Pathology*. Février 2001. Vol. 124, n° 2-3, pp. 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.
- LAVAZZA, A, CAVADINI, P, BARBIERI, I, TIZZANI, P, PINHEIRO, A, ABRANTES, J, ESTEVES, PJ, GRILLI, G, GIOIA, E, ZANONI, M, MENEGUZ, PG, GUITTON, JS, 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. *Veterinary Research*. 24 février 2015. Vol. 46, n° 1, pp. 13.
- LAVAZZA, A, SCICLUNA, MT 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. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 12 janvier 1996. Vol. 43, n° 1-10, pp. 401-410.
- LE GALL-RECUÉ, G, LAVAZZA, A, MARCHANDEAU, S, BERTAGNOLI, S, ZWINGELSTEIN, F, CAVADINI, P, MARTINELLI, N, LOMBARDI, G, GUÉRIN, JL, LEMAITRE, E, DECORS, A, BOUCHER, S, LE NORMAND, B et CAPUCCI, L, 2013. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Veterinary Research*. 8 septembre 2013. Vol. 44, n° 1, pp. 81.
- LE GALL-RECUÉ, G, LEMAITRE, E, BERTAGNOLI, S, HUBERT, C, TOP, S, DECORS, A, MARCHANDEAU, S et GUITTON, JS, 2017. Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Research*. Décembre 2017. Vol. 48, n° 1.
- LE GALL-RECUÉ, G, LEMAITRE, E, BRIAND, FX et MARCHANDEAU, S, 2015. Characterization in France of non-pathogenic lagoviruses closely related to the Australian Rabbit calicivirus RCV-A1: confirmation of the European origin of RCV-A1. *Xth International Congress for Veterinary Virology Changing Viruses in a Changing World. France: Montpellier*. 2015. pp. 183-185.
- LE GALL-RECUÉ, G, ZWINGELSTEIN, F, BOUCHER, S, LE NORMAND, B, PLASSIART, G, PORTEJOIE, Y, DECORS, A, BERTAGNOLI, S, GUERIN, JL et MARCHANDEAU, S, 2011. Virology: Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *The Veterinary record*. 5 février 2011. Vol. 168, pp. 137-8.
- LE GALL-RECUÉ, G, ZWINGELSTEIN, F, FAGES, MP, 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. *Virology*. Février 2011. Vol. 410, n° 2, pp. 395-402.

- LE GALL-RECUÉ, G, ZWINGELSTEIN, F, LAURENT, S, DE BOISSÉSON, C, PORTEJOIE, Y et RASSCHAERT, D, 2003. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Archives of Virology*. 1 janvier 2003. Vol. 148, n° 1, pp. 65-81.
- LE MINOR, OL, BEILVERT, F, MOULLEC, TL, DJADOUR, D et MARTINEAU, J, 2013. Evaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin contre le virus variant de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD). *15^{ème} Journées de la Recherche Cunicole*. 2013. pp. 4.
- LE PENDU, J, ABRANTES, J, BERTAGNOLI, S, GUITTON, JS, LE GALL-RECUÉ, G, LOPES, AM, MARCHANDEAU, S, ALDA, F, ALMEIDA, T, CÉLIO, AP, BÁRCENA, J, BURMAKINA, G, BLANCO, E, CALVETE, C, CAVADINI, P, COOKE, B, DALTON, K, DELIBES MATEOS, M, DEPTULA, W, EDEN, JS, WANG, F, FERREIRA, CC, FERREIRA, PG, FORONDA, P, GONÇALVES, D, GAVIER-WIDÉN, D, HALL, RN, HUKOWSKA-SZEMATOWICZ, B, KERR, PJ, KOVALISKI, J, LAVAZZA, A, MAHAR, JE, MALOGOLOVKIN, A, MARQUES, RM, MARQUES, S, MARTIN-ALONSO, A, MONTERROSO, P, MORENO, S, MUTZE, G, NEIMANIS, A, NIEDZWIEDZKA-RYSTWEJ, P, PEACOCK, D, PARRA, F, ROCCHI, M, ROUCO, C, RUVOËN-CLOUET, N, SILVA, E, SILVÉRIO, D, STRIVE, T, THOMPSON, G, TOKARZ-DEPTULA, B et ESTEVES, PJ, 2017. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *Journal of General Virology*. 1 juillet 2017. Vol. 98, n° 7, pp. 1658-1666.
- LEE, JH, CHUNG, MI et K, Kyung, 2017. Structure and Function of Caliciviral RNA Polymerases. *Viruses*. 6 novembre 2017. Vol. 9, n° 11, pp. 329.
- LEMAITRE, E, ZWINGELSTEIN, F, MARCHANDEAU, S et LE GALL-RECUÉ, G, 2018. First complete genome sequence of a European non-pathogenic rabbit calicivirus (lagovirus GI.3). *Archives of Virology*. 2018. Vol. 163, n° 10, pp. 2921-2924.
- LI, ZX, HU, WD, LI, BC, LI, TY, ZHOU, XY et ZHANG, Z, 2014. Egg yolk IgY against RHDV capsid protein VP60 promotes rabbit defense against RHDV infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 janvier 2014. Vol. 157, n° 1, pp. 97-104.
- LIU, J, FORDHAM, DA, COOKE, BD, COX, T, MUTZE, G et STRIVE, T, 2014. Distribution and Prevalence of the Australian Non-Pathogenic Rabbit Calicivirus Is Correlated with Rainfall and Temperature. *PLOS ONE*. 8 décembre 2014. Vol. 9, n° 12, pp. e113976.
- LIU, SJ, XUE, HP, PU, BQ et QIAN, NH, 1984. A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine (Xumu yu Shouyi)*. 1984. Vol. 16, n° 6, pp. 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. *Virologica Sinica*. Juin 2015. Vol. 30, n° 3, pp. 228-230.
- LOPES, AM, BREIMAN, A, LORA, M, LE MOULLAC-VAIDYE, B, GALANINA, O, NYSTRÖM, K, MARCHANDEAU, S, LE GALL-RECUÉ, G, STRIVE, T, NEIMANIS, A, BOVIN, NV, RUVOËN-CLOUET, N, ESTEVES, PJ, ABRANTES, J et LE PENDU, J, 2017. Host specific glycans are correlated with susceptibility to infection by lagoviruses, but not with their virulence. *Journal of Virology*. 29 novembre 2017. pp. JVI.01759-17.
- LOPES, AM, CAPUCCI, L, GAVIER-WIDÉN, D, LE GALL-RECUÉ, G, BROCCHI, E, BARBIERI, I, QUÉMÉNER, A, LE PENDU, J, GEOGHEGAN, JL, HOLMES, EC, ESTEVES, PJ et ABRANTES, J, 2014. Molecular evolution and antigenic variation of European brown hare syndrome virus (EBHSV). *Virology*. 1 novembre 2014. Vol. 468-470, pp. 104-112.
- LOPES, AM, DALTON, KP, MAGALHÃES, M, PARRA, F, Francisco, ESTEVES, PJ, HOLMES, EC et ABRANTES, J, 2015. Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. *Journal of General Virology*. 2015. Vol. 96, n° 6, pp. 1309-1319.

- LOPES, AM, MARQUES, S, SILVA, E, MAGALHÃES, M, PINHEIRO, A, ALVES, PC, LE PENDU, J, ESTEVES, PJ, THOMPSON, G et ABRANTES, J, 2014. Detection of RHDV strains in the Iberian hare (*Lepus granatensis*): earliest evidence of rabbit lagovirus cross-species infection. *Veterinary Research*. 24 septembre 2014. Vol. 45, n° 1, pp. 94.
- MAHAR, JE, HALL, RN, PEACOCK, D, KOVALISKI, J, PIPER, M, MOURANT, R, HUANG, N, CAMPBELL, S, GU, X, READ, A, URAKOVA, N, COX, T, HOLMES, EC et STRIVE, T, 2017. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival. *Journal of Virology*. 1 novembre 2017. Vol. 92, pp. JVI.01374-17.
- MAHAR, JE, NICHOLSON, L, EDEN, JS, DUCHÊNE, S, KERR, PJ, DUCKWORTH, J, WARD, VK, HOLMES, EC et STRIVE, T, 2016. Benign Rabbit Caliciviruses Exhibit Evolutionary Dynamics Similar to Those of Their Virulent Relatives. *Journal of Virology*. 15 octobre 2016. Vol. 90, n° 20, pp. 9317-9329.
- MAHAR, JE, READ, AJ, GU, X, URAKOVA, N, MOURANT, R, PIPER, M, HABOURY, S, HOLMES, EC, STRIVE, T et HALL, RN, 2018. Detection and Circulation of a Novel Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Australia. *Emerging Infectious Diseases*. Janvier 2018. Vol. 24, n° 1, pp. 22-31.
- MARCATO, PS, 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. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 juin 1991. Vol. 10, n° 2, pp. 371-392.
- MARCHANDEAU, S, BERTAGNOLI, S, LÉONARD, Y, SANTIN-JANIN, H, PÉRALTA, B, LE GALL-RECLÉ, G et PONTIER, D, 2010. Serological evidence for the presence of non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus-like strains in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of the Kerguelen archipelago. *Polar Biology*. 1 juillet 2010. Vol. 33, pp. 985-989.
- 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. *Journal of Wildlife Diseases*. Juillet 1998. Vol. 34, n° 3, pp. 429-435.
- MARCHANDEAU, S, LETTY, J, BERTAGNOLI, S, PERALTA, B, BOUCRAUT-BARALON, C et REITZ, F, 2004. Possible interaction between myxomatosis and calicivirosis related to rabbit haemorrhagic disease affecting the European rabbit. *Veterinary Record*. 6 novembre 2004. Vol. 155, n° 19, pp. 589-592.
- MARQUES, RM, TEIXEIRA, L, ÁGUAS, AP, RIBEIRO, JC, COSTA-E-SILVA, A et FERREIRA, PG, 2014. Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). *Veterinary Research*. 2014. Vol. 45, n° 1, pp. 14.
- MARTIN-ALONSO, A, MARTIN-CARRILLO, N, GARCIA-LIVIA, K, VALLADARES, B et FORONDA, P, 2016. Emerging rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) at the gates of the African continent. *Infection, Genetics and Evolution*. 1 octobre 2016. Vol. 44, pp. 46-50.
- MATTHAEI, M, KERR, PJ, READ, AJ, HICK, P, HABOURY, S, WRIGHT, JD et STRIVE, T, 2014. Comparative quantitative monitoring of rabbit haemorrhagic disease viruses in rabbit kittens. *Virology Journal*. 2014. Vol. 11, n° 1, pp. 109.
- MCCOLL, KA, MERCHANT, JC, HARDY, J, COOKE, BD, ROBINSON, AJ et WESTBURY, HA, 2002. Evidence for insect transmission of rabbit haemorrhagic disease virus. *Epidemiology and Infection*. Décembre 2002. Vol. 129, n° 3, pp. 655-663.
- MED'VET, 2017. Médicament NOBIVAC® Myxo-RHD Lyophilisat et solvant pour suspension injectable pour lapins. [en ligne]. 2017. Disponible à l'adresse : <http://www.med-vet.fr/medicament-nobivac-myxo-rhd-lyophilisat-solvant-p2322>.

- MERCHÁN, T, ROCHA, G, ALDA, F, SILVA, E, THOMPSON, G, DE TRUCIOS, SH et PAGÉS, A, 2011. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Infection, Genetics and Evolution*. 1 août 2011. Vol. 11, n° 6, pp. 1469-1474.
- MEYERS, G, WIRBLICH, C et THIEL, HJ, 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus - molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*. Octobre 1991. Vol. 184, n° 2, pp. 664-676.
- MING, T et XI, J, 2010. Virus-Host Interaction and Cellular Receptor of Caliciviruses. *Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology*.
- MITRO, S et KRAUSS, H, 1993. Rabbit hemorrhagic disease: A review with special reference to its epizootiology. *European Journal of Epidemiology*. Janvier 1993. Vol. 9, n° 1, pp. 70-78.
- MORENO, N, MENA, I, ANGULO, I, GÓMEZ, Y, CRISCI, E, MONTOYA, M, CASTÓN, JR, BLANCO, E et BÁRCENA, J, 2016. Rabbit hemorrhagic disease virus capsid, a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses. *Scientific Reports*. Octobre 2016. Vol. 6, n° 1.
- MORISSE, JP, LE GALL-RECUÉ, G et BOILLETOT, E, 1991. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 1991. Vol. 10, pp. 283-295.
- MOSS, SR, TURNER, SL, TROUT, RC, WHITE, PJ, HUDSON, PJ, DESAI, A, ARMESTO, M, FORRESTER, NL et GOULD, EA, 2002. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *Journal of General Virology*. 2002. Vol. 83, n° 10, pp. 2461-2467.
- MULLER, A, FREITAS, J, SILVA, E, LE GALL-RECUÉ, G, ZWINGELSTEIN, F, ABRANTES, J, ESTEVES, PJ, ALVES, PC, 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. *Veterinary Microbiology*. 30 mars 2009. Vol. 135, n° 3, pp. 368-373.
- MUTZE, G, COOKE, BD et ALEXANDER, P, 1998. The initial impact of rabbit haemorrhagic disease on rabbit populations in South Australia. *Journal of wildlife diseases*. 1 janvier 1998. Vol. 34, pp. 221-227.
- NAGESHA, HS, MCCOLL, KA, COLLINS, BJ, MORRISSY, CJ, WANG, LF et WESTBURY, HA, 2000. The presence of cross-reactive antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in Australian wild rabbits prior to the escape of virus from quarantine. *Archives of Virology*. 1 avril 2000. Vol. 145, n° 4, pp. 749-757.
- NAGESHA, HS, WANG, LF, HYATT, AD, MORRISSY, CJ, LENGHAUS, C et WESTBURY, HA, 1995. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. *Archives of Virology*. 1 juin 1995. Vol. 140, n° 6, pp. 1095-1108.
- NAUWYNCK, H, CALLEBAUT, P, PEETERS, J, DUCATELLE, R et UYTTEBROEK, E, 1993. Susceptibility of hares and rabbits to a Belgian isolate of European Brown Hare Syndrome Virus. *Journal of Wildlife Diseases*. Avril 1993. Vol. 29, n° 2, pp. 203-208.
- NICHOLSON, LJ, MAHAR, JE, STRIVE, T, ZHENG, T, HOLMES, EC, WARD, VK et DUCKWORTH, JA, 2017. Benign Rabbit Calicivirus in New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*. 1 juin 2017. Vol. 83, n° 11.
- 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. *Acta Biochimica Polonica*. 15 mars 2013. Vol. 60, n° 1.

- O'HARA, P, 2006. The illegal introduction of rabbit haemorrhagic disease virus in New Zealand. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. Avril 2006. Vol. 25, n° 1, pp. 119-123.
- OHLINGER, VF, HAAS, B et THIEL, HJ, 1993. Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Veterinary Research*. 1993. Vol. 24, n° 2, pp. 103-116.
- OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009. Rabbit haemorrhagic disease. In : *Terrestrial Manual*. Chap. 2.6.2. pp. 947-961.
- OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2016. Rabbit haemorrhagic disease. In : *Terrestrial Manual*. Chap. 2.6.2, pp. 1-18.
- PRIETO, JM, FERNANDEZ, F, ALVAREZ, V, ESPI, A, GARCÍA, A, MARÍN, JF, ALVAREZ, M, MARTÍN, JM et PARRA, F, 2000. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Research in Veterinary Science*. 1 avril 2000. Vol. 68, n° 2, pp. 181-187.
- PUGGIONI, G, CAVADINI, P, MAESTRALE, C, SCIVOLI, R, BOTTI, G, LIGIOS, C, LE GALL-REULÉ, 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*). *Veterinary Research*. 2013. Vol. 44, n° 1, pp. 96.
- ROCCHI, S et DAGLEISH, MP, 2018. Diagnosis and prevention of rabbit viral haemorrhagic disease 2. In *Practice*. Janvier 2018. Vol. 40, n° 1, pp. 11-16.
- RODAK, L, SMID, B et VALICEK, L, 1991. Application of control measures against viral haemorrhagic disease of rabbits in the Czech and Slovak Federal Republic. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 juin 1991. Vol. 10, n° 2, pp. 513-524.
- ROHAYEM, J, BERGMANN, M, GEBHARDT, J, GOULD, E, TUCKER, Paul, MATTEVI, A, UNGE, T, HILGENFELD, R et NEYTS, J, 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Research*. Août 2010. Vol. 87, n° 2, pp. 162-178.
- RUVOËN-CLOUET, N, GANIÈRE, JP, 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. *Journal of Virology*. Décembre 2000. Vol. 74, n° 24, pp. 11950-11954.
- SAN-MIGUEL, B, CRESPO, I, VALLEJO, D, ÁLVAREZ, M, PRIETO, JM, GONZÁLEZ-GALLEGO, J et TUÑÓN, MJ, 2014. Melatonin modulates the autophagic response in acute liver failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *Journal of Pineal Research*. 1 avril 2014. Vol. 56, n° 3, pp. 313-321.
- SCHIPP, M et OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014. Réf. OIE = 14719. 2014: *Rabbit haemorrhagic disease, Australia* [en ligne]. Immediate notification report. Disponible à l'adresse : http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=14719.
- SCHIRRMEIER, H, REIMANN, I, KÖLLNER, B et GRANZOW, H, 1999. Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Archives of Virology*. Avril 1999. Vol. 144, n° 4, pp. 719-735.
- SCICLUNA, MT, LAVAZZA, A et CAPUCCI, L, 1994. European brown hare syndrome in Northern Italy : results of a virological and serological survey: -EN- -FR- -ES-. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 septembre 1994. Vol. 13, n° 3, pp. 893-904.
- SMÍD, B, VALÍČEK, L, RODÁK, L, STĚPÁNEK, J et JURÁK, E, 1991. Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology*. 1 janvier 1991. Vol. 26, n° 1, pp. 77-85.

- SMITH, AW, SKILLING, DE, CHERRY, N, MEAD, JH et MATSON, DO, 1998. Calicivirus Emergence from Ocean Reservoirs: Zoonotic and Interspecies Movements. *Emerging Infectious Diseases journal*. 1998. Vol. 4, n° 1.
- SPIBEY, N, MCCABE, VJ, GREENWOOD, NM, JACK, SC, SUTTON, D et VAN DER WAART, L, 2012. Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Veterinary Record*. 24 mars 2012. Vol. 170, n° 12, pp. 309-309.
- STRIVE, T, ELSWORTH, P, LIU, J, WRIGHT, JD, KOVALISKI, J et CAPUCCI, L, 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. *Veterinary Research*. 2013. Vol. 44, n° 1, pp. 51.
- STRIVE, T, WRIGHT, JD, 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. *Virology*. Mars 2010. Vol. 398, n° 1, pp. 125-134.
- STRIVE, T, WRIGHT, JD et ROBINSON, AJ, 2009. Identification and partial characterisation of a new lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology*. 5 février 2009. Vol. 384, n° 1, pp. 97-105.
- SYRJÄLÄ, P, NYLUND, M et HEINIKAINEN, S, 2005. European Brown Hare Syndrome in free-living mountain hares (*Lepus timidus*) and European brown hares (*Lepus europaeus*) in Finland 1990-2002. *Journal of Wildlife Diseases*. Janvier 2005. Vol. 41, n° 1, pp. 42-47.
- TIZZANI, P, LAVAZZA, A, CAPUCCI, L et MENEGUZZI, PG, 2002. Presence of infectious agents and parasites in wild population of cottontail (*Sylvilagus floridanus*) and consideration on its diffusion of pathogens infecting hares. *European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians (EAZWV) 4th scientific meeting, joint with the annual meeting of the European Wildlife Disease Association (EWDA)*. 2002. pp. 4.
- TRZECIAK-RYCZEK, A, TOKARZ-DEPTUŁA, B et DEPTUŁA, W, 2015. The importance of liver lesions and changes to biochemical and coagulation factors in the pathogenesis of RHD. *Acta Biochimica Polonica*. 2015. Vol. 62, n° 2, pp. 169-171.
- TUNON, MJ, SAN MIGUEL, B, CRESPO, I, RIEZU-BOJ, JI, LARREA, E, ÁLVAREZ, M, GONZÁLEZ, I, BUSTOS, M, GONZÁLEZ-GALLEGO, J et PRIETO, JM, 2011. Cardiotrophin-1 Promotes a High Survival Rate in Rabbits with Lethal Fulminant Hepatitis of Viral Origin. *Journal of Virology*. Décembre 2011. Vol. 85, n° 24, pp. 13124-13132.
- TUNON, MJ, 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. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1 avril 2003. Vol. 141, n° 4, pp. 272-278.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2018. *Rabbit Hemorrhagic Disease in British Columbia, Canada*. Emerging Risk Notice - Animal Health.
- VELARDE, R, CAVADINI, P, NEIMANIS, A, CABEZÓN, O, CHIARI, M, GAFFURI, A, LAVÍN, S, GRILLI, G, GAVIER-WIDÉN, D, LAVAZZA, A et CAPUCCI, L, 2017. Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. Décembre 2017. Vol. 64, n° 6, pp. 1750-1761.
- WANG, X, HAO, H, QIU, L, DANG, R, DU, E, ZHANG, S et YANG, Z, 2012. Phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in China and the antigenic variation of new strains. *Archives of Virology*. Août 2012. Vol. 157, n° 8, pp. 1523-1530.
- WANG, X, XU, F, LIU, J, GAO, B, LIU, Y, ZHAI, Y, MA, J, ZHANG, K, BAKER, TS, SCHULTEN, K, ZHENG, D, PANG, H et SUN, F, 2013. Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography. *PLoS Pathogens*. 17 janvier 2013. Vol. 9, n° 1.

- WESTCOTT, David G., FROSSARD, Jean-Pierre, EVEREST, David, DASTJERDI, Akbar, DUFF, J. Paul et CHOUDHURY, Bhudipa, 2014. Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain. *Veterinary Record*. 29 mars 2014. Vol. 174, n° 13, pp. 333.1-333.
- WESTCOTT, DG et CHOUDHURY, B, 2014. Rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant in Great Britain. *Veterinary Record*. 2014. Vol. 176, n° 3, pp. 74-74.
- WIBBELT, G et FRÖLICH, K, 2005. Infectious Diseases in European Brown Hare (*Lepus europaeus*). *Wildlife Biology in Practice*. 17 juin 2005. Vol. 1, n° 1.
- WIRBLICH, C, MEYERS, G, OHLINGER, VF, CAPUCCI, L, ESKENS, U, HAAS, B et THIEL, HJ, 1994. European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *Journal of Virology*. Août 1994. Vol. 68, n° 8, pp. 5164-5173.
- WISHART, J et COX, T, 2016. Rollout of RHDV1 K5 in Australia: information guide. Second edition. *PestSmart Toolkit publication. The Centre for Invasive Species Solutions, Canberra, ACT*. 2016. pp. 58.
- XU, WY, 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. 1991. Vol. 10, n° 2, pp. 393-408.
- ZHENG, T et PARKES, JP, 2011. Rabbit haemorrhagic disease: Advantages of cELISA in assessing immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Microbiology*. 15 décembre 2011. Vol. 153, n° 3, pp. 387-392.
- ZHU, J, MIAO, Q, TAN, Y, GUO, H, LIU, T, WANG, B, CHEN, Z, LI, C et LIU, G, 2017. Inclusion of an Arg-Gly-Asp receptor-recognition motif into the capsid protein of rabbit hemorrhagic disease virus enables culture of the virus in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 26 mai 2017. Vol. 292, n° 21, pp. 8605-8615.

Annexes

Annexe 1 – Figure 24 : Alignement des séquences DPY, OCCS-06, OCCS-25 et OCCS-110 avec la souche 06-11.

	5 15 25 35 45 55 65 75
06-11	GTGAAAGTTA TGGCGGCTAT GTCACGCCTT ACTGGCATGA CAACTGCTAT TCTCCCAGCG AAGAAACCTT TAAGTTACTT
DPY	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	85 95 105 115 125 135 145 155
06-11	CCTGGACCTC AGGGACAAGA CCCCTCCCTG TTGTATTTCGG GCGCCCGGGA AACTGGCTTG GCCAGTTTTC CTGGACCAAA
DPY	CCTGGACCTC AGGGACAAGA CCCCTCCCTG TTGTATTTCGG GCGCCCGGGA AACTGGCTTG GCCAGTTTTC CTGGACCAAA
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	165 175 185 195 205 215 225 235
06-11	ACGGAAAAGA AGGACCTCTG GAGACATGCG ACAAAATGTGG CAAATGGCTT AATGGATTTC GTGTTTTTCGG ACTAGAGGAT
DPY	ACGGAAAAGA AGGACCTCTG GAGACATGCG ACAAAATGTGG CAAATGGCTT AATGGATTTC GTGTTTTTCGG ATTAGAGGAT
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	245 255 265 275 285 295 305 315
06-11	CTCGGTGAAG TTGCTTATG CTCTGTGATT AAACAGCAAC ACAAAATTGG ACCCACCTGT TTGTGTAACC GTGCATACAT
DPY	CTCGGTGAAG TTGCTTATG CTCTGTGACT AAACAGCAAC ACAAAATTGG ACCCACCTGT TTGTGTAACC GTGCATACAT
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	325 335 345 355 365 375 385 395
06-11	ACACGACTGC GGCCGCTGGC GGCGCCGCGAG TCGTTTTCTT AAACACTACA AGGCATTGAA CAAAGTCATC CCCTGTGCTT
DPY	ACACGACTGC GGCCGCTGGC GGCGCCGCGAG TCGTTTTCTT AAACACTACA AGGCATTGAA CAAGTCATC CCCTGTGCTT
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	405 415 425 435 445 455 465 475
06-11	ACCGGTTTCAG TGAAGAGATC CCCACCCCTA TCTTTGAGGG TGAGGTTGAC GACTTGTGTTG TTGAGCTTGG GGCACCAACC
DPY	ACCGGTTTCAG TGAAGAGATC CCCACCCCTG TCTTTGAGGG TGAGGTTGAC GACTTGTGTTG TTGAGCTTGG GGCACCAACC
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	485 495 505 515 525 535 545 555
06-11	AGCATGGGCT TCATGGACAA GAAACTGCTT AAGAAAGGTA AGAAACTGAT GGACAAGTTT GTCGACGTTG ACGAGCCCTG
DPY	AGTATGGGCT TCATGGACAA GAAACTGCTT AAGAAAGGTA AGAAACTAAT GGACAAGTTT GTCGACGTTG ACGAGCCCTG
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	565 575 585 595 605 615 625 635
06-11	TCTGACATCA AAGGACGCCA GCCTTCTCGA CTCATTGCCC TCTGACAGCA CCATACGTGC GAAGCTGGAG GAGGAGTATG
DPY	TCTGACATCA AAGGACGCCA GCCTTCTCGA CTCATTGCCC TCTGACAGTA CCATACGTGC GAAGCTGGAG GAGGAGTATG
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	645 655 665 675 685 695 705 715
06-11	GTGTTGAGAT GGTACAGGCA GCACGAGACA GGAAGACTT CATGAGAAAC CTCAGGCTTG CATTGGACAA CCGGCCCGCT
DPY	GTGTTGAGAT GGTGCAGGCA GCACGAGACA GGAAGACTT CATGAGAAAC CTCAGGCTTG CATTGGACAA CCGGCCCGCT
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

									
	725	735	745	755	765	775	785	795		
06-11	AACCCTATGA	CTTGGTACAC	GAAGCTCGGC	AACATCACGG	AAAAAGGAAA	ACAGTGGGCG	AAGAAGATTG	TTTATGGTGC		
DPY	AACCCTATGA	CTTGGTACAC	AAAGCTCGGC	AACATCACGG	AAAAAGGAAA	ACAGTGGGCG	AAGAAGATTG	TTTATGGTGC		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	805	815	825	835	845	855	865	875		
06-11	CCACAGAGTT	ACTGACCCCC	TAAAAACGTT	AGCTTCAATC	TTATTGGTTG	GCCTCCACAA	CGCTATTGCT	GTGGACACAA		
DPY	CCACAGGGTC	ACTGACCCCC	TGAAAACGTT	AGCTTCAATC	TTATTGGTTG	GCCTCCACAA	CGCTATTGCT	GTGGACACAA		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	885	895	905	915	925	935	945	955		
06-11	CAGTGATGTT	GTCACGTTTC	AAACCTGTAA	ACCTACTGGC	TATTCTCATG	GACTGGACTA	ACGACTTGAC	TGGGTTTCATC		
DPY	CAGTGATGTT	GTCACGTTTC	AAACCTGTAA	ACCTACTGGC	TATTCTCATG	GACTGGACTA	ACGACTTGAC	TGGGTTTCATC		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	965	975	985	995	1005	1015	1025	1035		
06-11	ACCACGCTTG	TGAGGCTGTT	AGAGTTGTAT	GGTGTGTGTC	AGGCCACCGT	CAACTTGATC	ATTGAAGGTG	TGAAGAGCTT		
DPY	ACCACGCTTG	TGAGGCTGCT	AGAGTTGTAT	GGTGTGTGTC	AAGCCACCGT	CAACTTGATC	ATTGAAGGTG	TGAAGAGCTT		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	1045	1055	1065	1075	1085	1095	1105	1115		
06-11	CTGGGACAAG	GTGGTCTGCG	CAACGGAGCG	TTGCTTTGAC	TTGCTCAAAA	GACTGTTTGA	CACATTTCGAG	GAATCTGTCC		
DPY	CTGGGATAAG	GTGGTCTGCG	CAACGGAGCG	TTGCTTTGAC	TTGCTCAAAA	GACTGTTTGA	CACATTTCGAG	GAATCTGTCC		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	1125	1135	1145	1155	1165	1175	1185	1195		
06-11	CTACAGGACC	AACAGCAGGC	TGCCTCATCT	TTATGGCTTT	TGCTTCTCC	ACTGTTGTGG	GGTATTTGCC	CAACAATAGT		
DPY	CTACAGGACC	AACAGCAGGC	TGCCTCATCT	TCATGGCTTT	TGCTTCTCC	ACTGTTGTGG	GGTATTTGCC	CAACAATAGT		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	1205	1215	1225	1235	1245	1255	1265	1275		
06-11	GTGATCACAA	CCTTTATGAA	GGGCGCTGGC	AAGTCCACAA	CGTTTGCAGG	GGTGGTTGGT	GCCATCCGAA	CGTTGTGGAT		
DPY	GTGATCACAA	CCTTTATGAA	GGGCGCTGGT	AAGTCCACAA	CGTTTGCAGG	GGTGGTTGGT	GCCATCCGAA	CGTTGTGGAT		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	1285	1295	1305	1315	1325	1335	1345	1355		
06-11	CACCATCAAC	CAACATATGG	TGGCTAAGGA	CCTCACCAGC	ATACAGCAAA	AGGTTATGAC	AGTTGTGAAA	ATGGCTAATG		
DPY	CACCATCAAC	CAACACATGG	TGGCTAAGGA	CCTCACCAGC	ATACAGCAAA	AGGTTATGAC	AGTTGTGAAA	ATGGCTAATG		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	1365	1375	1385	1395	1405	1415	1425	1435		
06-11	AGGCAGGCAC	GTTGGACCAG	CTCGAGATCG	TTAGTGCCT	CTGCTCAGAT	TTGGAAAACA	CACTGACAAA	CAGGTGCACC		
DPY	AGGCAGGCAC	GTTGGACCAG	CTTGAGATCG	TTAGTGCCT	CTGCTCAGAT	TTGGAAAACA	CACTGACAAA	CAGGTGCACC		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	1445	1455	1465	1475	1485	1495	1505	1515		
06-11	CTGCCATCAT	ACAACCAACA	CCTCGGAATC	TTGAATGCAT	CCCAGAAGGT	CATAAGTGAC	CTACACACCA	TGGTCTTTGG		
DPY	CTGCCATCAT	ACAACCAACA	CCTCGGAATT	TTGAATGCTT	CCCAAAAGGT	CATAAGTGAC	CTGCACACCA	TGGTCTTTGG		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
									
	1525	1535	1545	1555	1565	1575	1585	1595		
06-11	GAAGATCAAC	ATGACAAAAGC	AGAGACCACA	GCCTGTGGCT	GTCATTTTCA	AAGGAGCCCC	AGGCATTGGC	AAAACCTACT		
DPY	GAAGATCAAC	ATGACAAAAGC	AGAGACCGCA	GCCTGTGGCT	GTCATCTTTA	AAGGAGCCCC	AGGCATTGGC	AAGACTTACT		
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
OCCS-110	-----	-----	-----CA	GCCTGTGGCT	GTCATTTTCA	AGGGTGCTCC	AGGTATTGGT	AAAACATACT		

	1605	1615	1625	1635	1645	1655	1665	1675
06-11	TGGTCCACAG	GCTTGCGCGA	GACTTGGGTT	GCCAACACCC	GAGCACGATT	AACTTTGGCC	TTGACCATTT	TGACTCATAC
DPY	TGGTCCACAG	GCTTGCGCGA	GACTTGGGTT	GCCAACACCC	AAGCACGATT	AACTTTGGCC	TTGACCATTT	TGATTTCGTAC
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	TGTTTCACAG	GCTCGCGCGC	GACCTAGGTT	GCCAGCACCC	AAGCACCATC	AACTTTGGCC	TTGACCACCT	CGACTCGTAC
	1685	1695	1705	1715	1725	1735	1745	1755
06-11	ACAGGTGAGG	AAGTGGCTAT	TGCGGATGAG	TTC AACACCT	GTGGGGACGG	GGAGAGTTGG	GTTGAACGTG	TCATCCAAAT
DPY	ACAGGTGAGG	AAGTGGCTAT	TGCGGATGAG	TTT AACACCT	GTGGGGATGG	GGAGAGTTGG	GTTGAACGTG	TCATCCAAAT
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	ACAGGTGAGG	AGGTAGCCAT	AGCCGATGAG	TTT AACACCA	GTGGTGACGG	GGAGAGCTGG	GTTGAGCTTT	TCATT CAGAT
	1765	1775	1785	1795	1805	1815	1825	1835
06-11	GGTCAACACA	AATCCGTGCC	CACTCAACTG	TGACAAAGCT	GAAAACAAAA	ACAAGGTCTT	CAACTCAAAG	TATTTGCTGT
DPY	GGTCAACACA	AATCCGTGCC	CACTCAACTG	TGACAAAGCT	GAAAACAAAA	ACAAGGTCTT	CAACTCAAAG	TATTTGCTGT
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	GGTAAACACA	AATCCGTGCC	CCCTCAACTG	TGACAAAGTT	GAAAACAAAA	ACAAGGTGTT	CAACTCAAAG	TACTTGCTCT
	1845	1855	1865	1875	1885	1895	1905	1915
06-11	GCACAACAAA	CTCCAGCATG	ATACTGAACG	CGACACACCC	TCGTGCTGGC	CGGTTTTTACA	GGAGGGTTCAT	GATCGTTGAA
DPY	GCACAACAAA	CTCCAGCATG	ATACTGAACG	CGACACACCC	TCGTGCTGGC	CGGTTTTTACA	GGAGGGTTCAT	GATCGTTGAA
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	GCACAACAAA	CACCAACATG	GTA CTCAATG	CAACTCACCC	TCGAGCTTGT	GCCTTTTACA	GAAGAGTTAT	CACTGTGGAG
	1925	1935	1945	1955	1965	1975	1985	1995
06-11	GCGCGAAATA	AGGCTGTCTGA	GAGCTGGCAG	AGCACTAGAC	ACGGCTCCAA	GCCAGGGAAA	TCGTGCTTCA	GCAAGGACAT
DPY	GCGCGAAATA	AGGCTGTCTGA	GAGCTGGCAG	AACACTAGAC	ACGGCTCCAA	GCCAGGGAAA	TCGTGCTTCA	GCAAGGACAT
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	GTGCGTAAAC	AGGCCGTTGA	AAGCTGGCAG	GCCACCAAGC	ATGGTTCAAA	GCCTGGGAAA	AGTTGCTACA	GCAAGGATAT
	2005	2015	2025	2035	2045	2055	2065	2075
06-11	GTACACCTC	ACCTTCCAGG	TGTACCCCCA	CAACATGCCT	GCCCCGGGAT	TTGTGTTTGT	CGGGGAGAAG	CTGGTGAAGT
DPY	GTACACCTC	ACCTTCCAGG	TGTACCCCCA	CAACATGCCT	GCCCCGGGAT	TTGTGTTTGT	CGGGGAGAAG	CTGGTGAAGT
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	GTACACCTC	ACTTTCCTAG	TTTACCCCTA	CAACATGCCT	GCCCCCGGGT	TTGTTTTTGT	TGTTGAAAAA	TTAGTAAAGT
	2085	2095	2105	2115	2125	2135	2145	2155
06-11	CACAGTTGC	GCCCAGGGAG	TACAAGTACA	GTGAGCTCTT	GGACTTGATC	AAAAGCGAGC	ACCCTGACGT	GGCCTCATTC
DPY	CACAGTTGC	GCCCAGGGAG	TATAAGTACA	GTGAGCTCTT	GGACTTGATC	AAAAGCGAGC	ACCCTGACGT	GGCCTCATTC
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	CACAGTTGGC	AGTCAGGGAG	TACTCGTATG	CTCACCTTCT	GGACATGCTG	AAAAATGAAC	ATCCTGACGT	G---TCGTTT
	2165	2175	2185	2195	2205	2215	2225	2235
06-11	GAGGGTGCCA	ACAAGTTCAA	TTTCATCTAC	CCAGACGCCC	AATACGAACA	GCGCTCCTC	ATGTGGAAC	AGTACTTTGT
DPY	GAGGGTGCCA	ACAAGTTCAA	CTTCATCTAC	CCAGACGCCC	AATATGAACA	GCGCTCCTC	ATGTGGAAC	AGTACTTTGT
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	GAGGGTGCTA	CCAAGTTTAA	CTTTGTCTAC	CCCAGCGCGC	AATATGACCA	AGCACTTCTT	ATGTGGAAC	AATATTTTAT
	2245	2255	2265	2275	2285	2295	2305	2315
06-11	CATGTATGGA	TGTGTAGCAA	GGCTTGCAAA	GAACCTTGTT	GAAGATATCC	CATACAACCA	AGTCCACATA	TCAAAGGCAA
DPY	CATGTATGGA	TGTGTAGCAA	GGCTTGCAAA	GAACCTTGTT	GAAGACATCC	CATACAACCA	AGTTACACATA	TCAAAGGCAA
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	CATGTATGGG	TGTGTGCAA	GGCTTGCTAA	AGAATTATG	GACGACATCC	CATACAACCA	AGTCCACATA	TCAAAGAAGA
	2325	2335	2345	2355	2365	2375	2385	2395
06-11	GTGACCCCAA	AATTGACGGG	TGTGTGGAGT	ACCAGTGCAA	GTTCCAACAT	CTCTGGCGTA	TGGTTCCACA	GTTTGTTTTG
DPY	GTGACCCCAA	AATTGACGGG	TGTGTGGAGT	ACCAGTGCAA	GTTCCAGCAT	CTTTGGCGTA	TGGTTCCACA	GTTTGTTTTG
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	GTGACCAAAA	GTTCTCTAAC	TGTGTAGAGC	ACCAATGTGA	GCTCAAGCAC	ATTTGCGGCT	TGGTGCCCAA	GTTTGTGATG
	2405	2415	2425	2435	2445	2455	2465	2475
06-11	GGGTGTGTGA	ACATGACAAA	CCAACTTGGT	ACCCCTTAA	CCCAGCAACA	GTTAGATAGG	ATCACCACCG	GGGTGAGGG
DPY	GGGTGTGTGA	ATATGACAAA	CCAACTTGGC	ACCCCTTAA	CCCAGCAACA	GTTAGATAGG	ATCACCACCG	GGGTGAGGG
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-110	GGTGTGTGCA	ACATGACAAC	CCAGCTAGGC	ACCCCTCTGA	CCCAACAACA	ACTGGACAGA	ATCAGCAATG	GGGTGGAAGG

	2485	2495	2505	2515	2525	2535	2545	2555	
06-11	TGTCACCGTC	ACAACGGTGA	ACAACATCCT	GCCGTTCCAT	TCACAAACCA	CACTCATAAA	CCCCTCCTTC	ATCAAGCTGA	
DPY	TGTCACCGTC	ACAACGGTGA	ACAACATCCT	GCCGTTCCAT	TCACAAACCA	CGCTCATAAA	CCCCTCCTTC	ATCAAGCTGA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TGTTACAGTC	ACAACGGTGA	ACAACATCCT	ACCGTTCCAC	TCGCAGACAA	CACTCATAAA	CCCCTCTTTT	ATAAAACTAA	

	2565	2575	2585	2595	2605	2615	2625	2635	
06-11	TTTGGGCAGT	GAGAAAGCAC	CTCAAGGGAC	TCAGTGGTGT	GACTAAGGTG	GCTCAATTCA	TTTGGCGTGT	CATGACCAAT	
DPY	TTTGGGCAGT	GAGAAAGCAC	CTCAAGGGAC	TCAGTGGTGT	GACTAAGGTG	GCTCAATTCA	TTTGGCGTGT	CATGACCAAT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TTTGGGCAGT	AAGGAAACAC	CTCAAGGGAC	TCAGTGGTGT	GACCAGAGTT	GCCAAGTTCA	TCTGGCACGT	GATGAGCAAC	

	2645	2655	2665	2675	2685	2695	2705	2715	
06-11	CCAGTGGACG	CCTATGGTAC	CCTTGTTAGA	ACACTCACTG	GGGCTGCCAC	CTTCTCGGAT	GACCCAGTTT	CAACAACGAT	
DPY	CCAGTGGACG	CCTATGGCAC	CCTTGTTCAGA	ACACTCACTG	GGGCTGCCAC	CTTCTCGGAT	GACCCAGTTT	CAACAACGAT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CCAGTAAATG	CTTATGACAC	TCTCATTAGA	ACACTCACTG	GGGCTGCTAC	ATTTTCAGAT	GACCTGTCT	CAACAACCAT	

	2725	2735	2745	2755	2765	2775	2785	2795	
06-11	AATATGTTC	AACTGCACAA	TCCAAATTCA	CTCCTGCGGT	GGGTGCTTGT	TGAGGTACTC	AAGAGACCC	GCCCCGTGG	
DPY	AATATGTTC	AACTGCACAA	TCCAAATTCA	CTCCTGTGGT	GGGTGCTTGT	TGAGGTACTC	AAGAGACCC	GTCCCCGTGG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TATTTGCTCC	AACTGTACGA	TCCAGATTCA	CACTTGTGGT	GGCTTACTTG	TCAGGTATTC	AAGAGATCCC	GCCCCAGTTG	

	2805	2815	2825	2835	2845	2855	2865	2875	
06-11	CGTCAGACAA	CGTTGACCGT	GGTGATCAGG	GTGTTGACAT	ATTCACTGAC	CCTAACCTCA	TCTCTGGGTT	CAGTTGGAGG	
DPY	CGTCAGACAA	CGTTGACCGT	GGCGATCAGG	GTGTTGACAT	GTTCACTGAC	CCTAACCTCA	TCTCTGGGTT	CAGTTGGAGG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CGTCAGACAA	TGTTGACCGC	GGTGACCAAG	GTGTTGACAT	TTTCACTGAC	CCTAATCTTA	TCTCTGGGTT	TAGTTGGAGA	

	2885	2895	2905	2915	2925	2935	2945	2955	
06-11	CAGATTGCC	ACTTGTGTTG	TGAGGTGCTT	TCCCACTTGT	GCGCAAACCA	CCTTGTTAAC	CTTGCAACCA	TGGCAGCACT	
DPY	CAGATTGCC	ACTTGTGTTG	TGAGGTGCTT	TCCCACTTGT	GCGCAAACCA	CCTTGTCAAC	CTTGCAACCA	TGGCAGCACT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CAAAATTGCAC	ATCTGTTCGT	AGAGGTTCTT	TCACATCTGT	GTGCGAACCA	TCTTGTGAAC	CTGGCAACCA	TGGCGGCGCT	

	2965	2975	2985	2995	3005	3015	3025	3035	
06-11	GGGTGCTGTT	GCGACAAAGG	CTTTCAGGG	TGTGAAAGGC	AAGACAAAAC	GTGGTCGTGG	TGCAAGGGTA	AACTTGGGGA	
DPY	GGGTGCTGTT	GCGACAAAGG	CTTTCAGGG	TGTGAAAGGT	AAGACAAAAC	GTGGTCGTGG	CGCAAGGGTA	AACTTGGGGA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TGGTGCAGTT	GCAACGAAGG	CTCTGCAAGG	GGTTAAAGGC	AAGACAAAAC	ATGGCCGCGG	TGCAAGAGTG	AACTTGGGCA	

	3045	3055	3065	3075	3085	3095	3105	3115	
06-11	ACGACGAATA	CGACGAGTGG	CAAGCTGCGC	GTAGAGAGTT	CGTCAACGCA	CATGACATGA	CTGCAGAGGA	GTATCTCGCC	
DPY	ACGACGAATA	CGACGAGTGG	CAAGCTGCGC	GTAGAGAGTT	CGTCAACGCA	CATGACATGA	CTGCAGAGGA	GTATCTCGCC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	ATGATGAGTA	TGATGAGTGG	CAAGCAGCAC	GCAGGGAGTT	CAAAAATGCA	CATGACATGA	CTGCTGAAGA	GTACCTTGAG	

	3125	3135	3145	3155	3165	3175	3185	3195	
06-11	ATGAAGAACA	AAGCTGCCAT	GGGAAGTGAC	GACCAAGACT	CTGTCAATGTT	CAGGAGTTGG	TGGACCCGGA	GGCAGTTGAG	
DPY	ATGAAGAACA	AAGCTGCCAT	GGGGAGTGAC	GATCAAGATT	CTGTTATGTT	CAGGAGTTGG	TGGACCCGGA	GGCAGTTGAG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	ATGAAGAACA	GAGCTGCAAT	GGGTAGTGAC	GACCAGGACT	CTATTATGTT	TAGGAGTTGG	TGGACACGAA	GGCAGCTAAG	

	3205	3215	3225	3235	3245	3255	3265	3275	
06-11	ACCTGACGAG	GACCAAGTCA	CCATTGTCGG	TAGGGGTGGA	GTGAGAAAAC	AAGTCATTTC	CACCAGGGCC	AGACAGGCC	
DPY	ACCTGACGAG	GACCAAGTCA	CCATTGTAGG	TAGGGGTGGA	GTGAGAAAAC	AAGTCATTTC	CACCAGGGCT	AGACAGGCC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	ACCTGACGAG	GACCAAGTCA	CAGTCATTGG	CAGAGGTGGA	GTGAGGAATG	AGGTCATACG	CACCAGGGTT	AAACAGGCC	

	3285	3295	3305	3315	3325	3335	3345	3355	
06-11	CAAAAGGGCC	AAAAACACTG	GATGATGGTG	GTTTCTATGA	CAATGACTAT	GAGGGTCTGC	CAGGATTCAT	GAGGCACAAC	
DPY	CAAAAGGGCC	AAAAACACTG	GATGATGGTG	GTTTCTATGA	TAATGACTAT	GAGGGTCTGC	CAGGATTCAT	GAGGCACAAC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CAAAAGGGCG	CAAGACACTT	GACGACGGTG	GTTTTTATGA	CAATGACTAT	GAGGGGCTGC	CTGGTTCAT	GCGCCACAAC	

	3365	3375	3385	3395	3405	3415	3425	3435	
06-11	GGCAGCGGTT	GGATGATTCA	CATAGGCAAC	GGGTTGTACA	TATCTAACAC	CCACACCGCC	CGGTCAAGCT	GCTCAGAGAT	
DPY	GGCAGCGGTT	GGATGATTCA	CATAGGCAAC	GGGTTGTACA	TATCTAACAC	CCACACCGCC	CGGTCAAGCT	GCTCAGAGAT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	GGTAGTGGCT	GGATGATACA	TATTGGCAAT	GGTTTGTATA	TATCCAACAC	TCACACAGCA	AAGTCCAGTT	GCAGTGAGAT	

	3445	3455	3465	3475	3485	3495	3505	3515	
06-11	AGTCACATGC	TCACCCACCA	CTGACCTGTG	CCTTGTCAAG	GGTGAGACGA	TCCGCAGTGT	TGCCCAAATT	GCTGAAGGGA	
DPY	AGTCACATGC	TCACCCACCA	CTGACCTGTG	CCTTGTCAAG	GGTGAGACGA	TCCGCAGTGT	TGCCCAAATT	GCTGAAGGGA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	AGTCACCTGC	TCCCAACTA	CTGACCTGTG	TCTTGTGAAG	GGTGAAGTTA	TCAGGAGTGT	CGCACAAATT	TCCGAAGGTA	

	3525	3535	3545	3555	3565	3575	3585	3595	
06-11	CCCCAGTCAG	TGACTGGAAG	AAGTCCCCCA	TCACAACCTA	TGGCATTAAAG	AAAACTTTAT	CAGACTCCAC	CAAAATTGAC	
DPY	CCCCAGTCAG	TGACTGGAAG	AAGTCCCCCA	TCACAACCTA	TGGCATTAAAG	AAAACTTTAT	CAGACTCCAC	CAAAATTGAC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CGCCTGTCTG	TGACTGGAAG	AAGTCTCCCA	TATCCACCTA	TGGGATAAAG	AAAACTTTAT	CTGACTCTAC	AAAGATAGAA	

	3605	3615	3625	3635	3645	3655	3665	3675	
06-11	GTACTGGCGT	ATGACGGTTG	CACACAGACG	ACCCATGGGG	ACTGTGGGCT	CCCGTTGTAT	GATTCCCTGTG	GGAAGATTGT	
DPY	GTACTGGCGT	ATGACGGTTG	CACACAGACG	ACCCATGGGG	ACTGTGGGCT	CCCGTTGTAT	GATTCCCTGTG	GGAAGATTGT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	GTGCTTGCAT	ACGATGGTAC	AACCCAAACC	ACCCACGGGG	ATTGTGGGTT	GCCATTGTAT	GATGAGTGTG	GCAAAATTGT	

	3685	3695	3705	3715	3725	3735	3745	3755	
06-11	TGCCATTTCAC	ACCGGCAAAC	TACTGGGGTT	TTCAAAGATG	TGCACATTGA	TCGACCTCAC	CGTAACAAAG	GGGTGTATG	
DPY	TGCCATTTCAC	ACCGGCAAAC	TACTAGGGTT	TTCAAAGATG	TGCACACTGA	TCGACCTCAC	CGTAACAAAG	GGGTGTATG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TGCCATCCAC	ACTGGTAAGC	TCCTTGGTTC	TTCAAAGATG	TGCACACTCA	TTGACATGAC	AGTAACAAAG	GGGGTTTACC	

	3765	3775	3785	3795	3805	3815	3825	3835	
06-11	AAACATCAAA	CTTTTCTGTG	GGTGAGCCGA	TCGATTACAG	GGGCATTACT	GCGCACAGGC	TTGTTGGCGC	GGAACCTAGG	
DPY	AAACATCAAA	CTTTTCTGTG	GGTGAGCCGA	TCGATTACAG	GGGCATTACT	GCGCACAGGC	TTGTTGGCGC	GGAACCTAGG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	AGACAACCAA	CTTCTTTGTG	GGTGACCCCA	TCAGCTACCG	TGGCATCAAC	GCTAACAGGT	TAGTTGGCGC	AGAACCCCGG	

	3845	3855	3865	3875	3885	3895	3905	3915	
06-11	CCCCCTGTTA	GTGGAAGTAG	GTATGCCAGG	GTCCCAGGTG	TGCCAGATGA	GTATAAGACT	GGTTACAGGC	CAGCCAATCT	
DPY	CCCCCTGTTA	GTGGAAGTAG	GTATGCCAGG	GTCCCAGGTG	TGCCAGATGA	GTATAAGACT	GGTTACAGGC	CAGCCAATCT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CCCCCTGTTT	CGGGCACACG	CTATGCCAGG	GTTCCAGGCG	TGGATGAAAA	GTACAAGACA	GGATACCGCC	CTGCTAATCT	

	3925	3935	3945	3955	3965	3975	3985	3995	
06-11	TGGGCGCAGT	GATCCAGACA	GTGACAAGTC	ACTCATGAAC	ATTGCAGTAA	AGAACCTGCA	GGTTTACCAA	CAAGAACCCA	
DPY	TGGGCGCAGT	GATCCAGACA	GTGACAAGTC	ACTCATGAAC	ATTGCAGTAA	AAAACTGCA	GGTTTATCAG	CAAGAACCCA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TGGGCGGGGC	GACCCAGACA	GCAACTGCAC	GCTTATGAAC	ATAGCAGTTC	AAAACCTTCA	AGTTTACCAG	CAAGATCCAA	

	4005	4015	4025	4035	4045	4055	4065	4075	
06-11	AGCTTGACAA	GGTTGACGAG	TTTATTGAGC	GGGCGGTGTC	CGACGTTTTG	GGCTACTTGC	GCTTTCTAAC	CAAGGGAGAG	
DPY	AGCTTGACAA	GGTTGACGAG	TTCATTGAAC	GGGCGGTGTC	CGACGTTTTA	GGCTACTTGC	GCTTTCTAAC	CAAGGGAGAG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	AATTGATAA	GGTTGATGAG	TTTATAGAGC	GTGCTGCCTC	TGACGTGATT	GGATTTCTCA	GGTTTTTAAC	GAAGGGCCAG	

	4085	4095	4105	4115	4125	4135	4145	4155	
06-11	CGCCAGTCAA	ACCTGAACCT	CAAGGCGGCT	TTTAAACACC	TAGACCTGTC	TACCTCTTGT	GGTCCCTTTG	TTCCGGGGAA	
DPY	CGCCAGTCAA	ACCTGAACCT	CAAGACGGCT	TTTAAACACC	TAGACCTGTC	TACCTCTTGT	GGTCCCTTTG	TTCCGGGGAA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	AAACAGGAGA	ATCTGCATTT	CAAAGCCGCT	TTTAAACACC	TGGACATGTC	AACATCATGT	GGTCCCTTTG	TTCTGGTTAA	

	4165	4175	4185	4195	4205	4215	4225	4235	
06-11	GAAGATTGAC	CACGTGAAAG	ACGGAGTGAT	GGACCAAGTT	CTGGCAAAAC	ATCTTTACAA	ATGCTGGAGT	GTTGCCAACT	
DPY	GAAGATTGAC	CACATGAAAG	ACGGAGTGAT	GGACCAAGTT	CTGGCAAAAC	ATCTTTACAA	ATGCTGGAGT	GTTGCCAACT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	GAAGATAGAC	CACATCAGTG	ACGGAGTTAT	GGACCAGACC	TTGTCAAAAC	ACCTTTACAA	GTGTTGGAGC	GTTGCCAAAT	

	4245	4255	4265	4275	4285	4295	4305	4315	
06-11	CTGGCAGGGC	TCTCCACCAC	ATATACGCGT	GTGGACTAAA	AGATGAGCTT	AGACCCCTTG	ACAAGGTGAA	GGAGGGAAAG	
DPY	CTGGCAAGGC	TCTCCACCAC	ATATACGCGT	GTGGACTAAA	AGATGAGCTT	AGACCCCTTG	ACAAGGTGAA	GGAGGGAAAG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CTGGCAAAGC	CCTCCACCAT	GTGTACGCCT	GTGGCTTGAA	GGACGAGTTG	CGCCCGTTGG	ACAAGGTGAA	AGTTGGAATA	

	4325	4335	4345	4355	4365	4375	4385	4395	
06-11	AAGAGACTGT	TGTGGGGCTG	TGACGTCGGC	GTTGCTGTGT	GTGCCGCGGC	CGTTTTCCAC	AACATATGCT	ACAAGCTAAA	
DPY	AAGAGACTGT	TGTGGGGCTG	TGACGTCGGC	GTTGCTGTGT	GTGCCGCGGC	CGTTTTCCAC	AACATATGCT	ACAAGCTAAA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	AAGAGACTGC	TTTGGGGCTG	TGACGTTGGC	GTGGCGCTGT	GTGCCGCGGC	TGTGTTCCAC	AATATTTGTT	ACAAGTTGAA	

	4405	4415	4425	4435	4445	4455	4465	4475	
06-11	GATGGTCGCA	CGATTTGGCC	CTATTGCAGT	CGGCGTCGAC	ATGACATCCC	GTGACGTCGA	CGTTATTATC	AACAACCTCA	
DPY	GATGGTCGCA	CGGTTTGGCC	CTATTGCAGT	TGGCGTCGAC	ATGACATCCC	GTGACGTCGA	CGTTATTATC	AACAACCTCA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	GATGGTTGCT	AGATTTCGGAC	CAATTGCAGT	GGGGGTTGAC	ATGACCTCAA	GGGATGTTGA	TGTCATGATA	AACAACCTCA	

	4485	4495	4505	4515	4525	4535	4545	4555	
06-11	CCGCCAAGGC	CAGCGACTTC	CTGTGCTTGG	ACTATTCAAA	ATGGGACTCC	ACCATGTCCAC	CATGTGTTGT	TAGGCTGGCC	
DPY	CCGCCAAGGC	CAGCGACTTC	CTGTGCTTGG	ACTACTCAAA	ATGGGACTCC	ACCATGTCCAC	CATGTGTTGT	TAGGCTGGCC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TGTCCAAGGC	CAGTGACTTC	TTATGTTTGG	ACTATTCAAA	GTGGGACTCA	ACAATGTCCG	CATGTGTAAT	CCGACTGGCA	

	4565	4575	4585	4595	4605	4615	4625	4635	
06-11	ATTGACATCT	TGGCTGACTG	CTGTGAGCAG	ACGGAACTCA	CCAAGAGTGT	TGTACTCACA	CTGAAAGTCT	ACCCCATGAC	
DPY	ATTGATATCT	TGGCTGACTG	CTGTGAGCAG	ACGGAGCTCA	CTAAGAGTGT	TGTGCTCACA	CTAAAGTCTC	ACCCCATGAC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	ATTGACATCC	TTGCAGATTG	CTGTGAGCAA	ACCGAACTCA	CAAAGAGCGT	TGTCTCACT	CTGAAATCAC	ACCCCATGAC	

	4645	4655	4665	4675	4685	4695	4705	4715	
06-11	CATTCTCGAC	GCTATGATTG	TACAAACCAA	ACGTGGCCTC	CCAAGTGGTA	TGCCCTTAC	CTCGGTCATC	AACCTATTTT	
DPY	CATTCTCGAC	GCTATGATTG	TGCAAAACAA	ACGTGGCCTT	CCAAGTGGTA	TGCCCTTAC	CTCGGTCATC	AACCTATTTT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CATTCTTGAC	GCAATGATCG	TTCAGACCAA	GAGAGGGCTT	CCGAGCGGCA	TGCCCTTAC	CTCTGTTATC	AATTCAGTAT	

	4725	4735	4745	4755	4765	4775	4785	4795	
06-11	GCCATTGGTT	GCTTTGGTCC	GCAGCTGTTT	ACAAGTCCCTG	CGCTGAGATT	GGCCTACACT	GCTCCAACCT	GTACGAGGAC	
DPY	GCCATTGGTT	GCTTTGGTCC	GCAGCTGTTT	ACAAGTCCCTG	CGCTGAGATT	GGCCTGCACT	GCTCCAACCT	GTACGAGGAC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	GTCATTGGTT	GCTTTGGTCA	GCAGCGGTGT	ACAAGGATG	TGCAGAAATA	GGTCTTCATT	GTTCCAACCT	GTATGAAGAT	

	4805	4815	4825	4835	4845	4855	4865	4875	
06-11	GCCCCATTCT	ACACGTATGG	TGATGACGGC	GTGTACGCCA	TGACCCCAAT	GATGGTAAGC	CTCCTGCCCG	CCATAATAGA	
DPY	GCCCCATTCT	ACACGTATGG	TGATGACGGC	GTGTACGCCA	TGACCCCAAT	GATGGTGAGC	CTCCTGCCCG	CCATAATCGA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	GCCCCTTTCT	ACACATACGG	AGACGACGGA	GTGTATGCTA	TGACACCCAT	GATGGTCAGT	TTGCTACCTG	CCATCCTTGA	

	4885	4895	4905	4915	4925	4935	4945	4955	
06-11	CAACTTGAGG	GACTATGGAT	TATCACCAC	TGCCGCGGAC	AAGACGGAGT	ACATAGATGT	TTGTCCGCTC	AACAAAATTT	
DPY	CAACTTGAGG	GACTATGGAT	TGTCACCAC	TGCCGCGGAC	AAGACGGAGT	ACATAGATGT	TTGCCCGCTC	AACAAAATTT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	AAACCTCCGC	GATTATGGTC	TTTCCCCAC	GCCGCTGAT	AAGACTGAAT	TCATTGACGT	GTGTCCATTG	AAAGATGTGT	

	4965	4975	4985	4995	5005	5015	5025	5035	
06-11	CATTTTTGAA	GCGCACCTTT	GAGCTCACAG	ACATCGGGTG	GGTGTCAAAG	TTGGACAAGT	CTAGTATACT	TAGGCAGTTG	
DPY	CATTTTTGAA	ACGCACCTTT	GAGCTCACAG	ATATCGGGTG	GGTGTCAAAG	TTAGACAAGC	TTAGTATACT	TAGGCAGTTG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CGTTTTTAAA	ACGACACTTT	AGAATGACTG	ACATTGGTTG	GGTGTCTCTG	CTTGACAAGT	CCAGTATTCT	TAGGCAACTT	

	5045	5055	5065	5075	5085	5095	5105	5115	
06-11	GAGTGGAGCA	AAACAACATC	CAGGCATATG	GTGATTGAAG	AGACACATGA	CCTGGCCAAG	GATGAACGTG	GCGTGCAGCT	
DPY	GAGTGGAGCA	AAACAACATC	CAGGCATATG	GTGATTGAAG	AGACACATGA	CCTGGCCAAG	GACGAACGTG	GTGTGCAGCT	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	GAGTGGTGCA	AGACCAGCAA	GCGGCACATG	ACCCTGGAAG	AAACCCATGA	CCTTGCCAAA	GAAGAGCGTG	GTGTTCAACT	

	5125	5135	5145	5155	5165	5175	5185	5195
06-11	CGAAGAGCTG	CAGGTTGCCG	CTGCCGCCCA	CGGCCAAGAG	TTTTTTTGACT	TTGTGTGCAA	GGAGCTCAAC	CGACAACAAG	
DPY	CGAGGAGCTG	CAGGTTGCCG	CTGCCGCCCA	CGGCCAAGAG	TTTTTTTGACT	TTGTGTGCAA	GGAGCTCAAC	CGACAACAAG	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	TGAAGAACTC	CAAGTGGTGG	CTGCCGCCCA	TGGA AAAAGAA	TTTTTTTGACT	TCATTAAACC	AGAATTAGAG	CGCCAGCAAG	
	5205	5215	5225	5235	5245	5255	5265	5275
06-11	CATACACACA	GTTTAGTGTT	TACAGCTACG	ATGCTGCTAG	GAAGATACTG	GCAGATCGAA	AAAGGGTCGT	CTCGGTAGTA	
DPY	CATACACACA	GTTTAGTGTT	TATAGCTACG	ATGCTGCTAG	GAAGATACTG	GCAGATCGAA	AAAGGGTCGT	CTCGGTAGTA	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CCTACACACA	GTTCAATGTT	TACAGCTTTG	AAGCAGCTTG	GAAGATTCTT	GCTGACCGCA	AGAGAGTCGT	CTCGGTAGTA	
	5285	5295	5305	5315	5325	5335	5345	5355
06-11	CCTGACGACG	AATTTGTGAA	TGTTATGGAG	GGCAAAGCCC	GCATAACGCC	GCAAGGCGAG	GCAGCGGGTA	CTGCTACCAC	
DPY	CCTGACGACG	AATTTGTGAA	TGTTATGGAG	GGCAAAGCCC	GCATAACGCC	GCAAGGCGAG	GCAGCGGGTA	CTGCTACCAC	
OCCS-06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
OCCS-110	CCTGACGACG	AATTTGTGAA	TGTTATGGAG	GGCAAAGCCC	GCACGACGCC	GCAAGGCGAA	GTTGACGGTA	CTGCTACCAC	
	5365	5375	5385	5395	5405	5415	5425	5435
06-11	AGCATCAGTC	CCCGGAACCA	CAACCGATGG	TATGGACCCT	GGTGTGTGGG	CCACAACCAG	TGTGGTCACC	ACTGAGAACG	
DPY	AGCATCAGTC	CCCGGAACCA	CAACCGATGG	CATGGACCCT	GGTGTGTGGG	CCACAACCAG	TGTGGTCACC	ACTGAGAACG	
OCCS-06	AGCATCAGTT	CCCGGAACCA	CAACCGACGG	TATGGACCCC	GGTGTGTGGG	CCACCACCAG	TGTGGTCACC	ACTGAGAATG	
OCCS-25	AGCATCAGTT	CCCGGGACCA	CAACCGACGG	CATGGACCCC	GGTGTGTGGG	CTACCACCAG	TGTGGTCACC	ACCAGGAATG	
OCCS-110	AGCATCAGTC	CCCGGTACCA	CAACCGATGG	TATGGACCCC	GGCGTTGTGG	CCACCACTAG	TGTGGTCACT	GCCGAGAATG	
	5445	5455	5465	5475	5485	5495	5505	5515
06-11	CGTCCACATC	GATCGCGACG	GCGGGGATTG	GCGGCCACC	CCAGCAGGTG	GACCAACAAG	AGACATGGAG	GACAAACTTT	
DPY	CGTCCACATC	GATCGCGACG	GCGGGGATTG	GCGGCCACC	CCAGCAGGTG	GACCAACAAG	AGACATGGAG	GACAAACTTT	
OCCS-06	CGTCCACGTC	GGTCGCAACG	GCGGGAATTG	GTGGTCCACC	TCAACAAGTG	GATCAACAGG	AGACTTGGAG	GACAAAATTT	
OCCS-25	CGTCCACGTC	GGTTGCAACG	GCGGGAATTG	GCGGCCACC	TCAACAAGTG	GACCAACAAG	AGACTTGGAG	GACAAAATTT	
OCCS-110	CATCCACATC	GGTTGCAACG	GCGGGGATTG	GCGGTCCACC	TCAACAAGTG	GACCAACAGG	AAACTTGGAG	AACAAAATTT	
	5525	5535	5545	5555	5565	5575	5585	5595
06-11	TACTACAATG	ATGTTTTTAC	TTGGTCAGTA	GCGGACGCC	CTGGCAGTAT	CCTGTACACC	GTTCAGCACT	CCCCACAAAA	
DPY	TACTACAATG	ATGTTTTTAC	TTGGTCAGTA	GCGGACGCC	CTGGCAGTAT	CCTGTACACC	GTTCAGCACT	CCCCACAAAA	
OCCS-06	TACTATAATG	ATGTTTTTAC	TTGGTCAGTC	ACGGACGCC	CTGGTAGCAT	ACTGTACACC	GCTCAACACT	CTCCACAGAA	
OCCS-25	TACTACAATG	ATGTTTTTAC	TTGGTCAGTC	ACAGATGCAC	CTGGTAGCAT	ACTGTACACT	GCTCAACACT	CTCCACAGAA	
OCCS-110	TATTATAATG	ATGTTTTTAC	CTGGTCAATC	ACAGATGCC	CTGGCAGTAT	ATTGTATACT	GCCCAGCATT	CACCATTGAA	
	5605	5615	5625	5635	5645	5655	5665	5675
06-11	TAACCCATTT	ACAGCCGTGC	TGAGCCAGAT	GTACGCCCGC	TGGGCCGGTG	GTATGCAGTT	CCGCTTTATA	GTTGCCGGGT	
DPY	TAACCCATTT	ACAGCCGTGC	TCAGCCAGAT	GTACGCCCGC	TGGGCCGGTG	GTATGCAGTT	CCGCTTCATA	GTTGCCGGGT	
OCCS-06	CAATCCATTC	ACAACAGTGC	TGAGTCAGAT	GTATGCCCGC	TGGGCTGGTG	GCATGCAATT	CAGGTTCAAT	GTCGCTGGCT	
OCCS-25	CAACCCATTC	ACAACAGTGC	TGAGTCAGAT	GTATGCTGGT	TGGGCTGGTG	GCATGCAATT	TAGTTCATT	GTTGCTGGCT	
OCCS-110	CAACCCATTC	ACAACAGTGC	TGAGCCAGAT	GTATGCTGGT	TGGGCTGGTG	GCATGCAGTT	CAGGTTCAAT	GTCGCTGGTT	
	5685	5695	5705	5715	5725	5735	5745	5755
06-11	CAGGTGTGTT	TGGTGGCGCA	TTAGTTGCTG	CAGTTATACC	ACCAGGCATA	GAGATTGGAC	CTGGCTGGA	GGTCAGGCAA	
DPY	CAGGTGTGTT	TGGTGGCGCA	TTGGTTGCTG	CAGTTATACC	ACCAGGCATA	GAGATTGGAC	CTGGCTGGA	GGTCAGGCAA	
OCCS-06	CAGGCGTTTT	TGGTGGACGT	CTGGTCGTGG	CGATTATACC	ACCAGGCATT	GAAAATTGAAC	CAGGCTGGA	GGTCAGGCAA	
OCCS-25	CAGGGTCTTT	TGGTGGACGA	TTGGTCGTGG	CAATCATCCC	ACCAGGCATT	GAAAATTGAAC	CAGGACTGGA	GGTCAGGCGA	
OCCS-110	CAGGCATTTT	CGGTGGCGGT	TTGGTTGTGG	CAATCATCCC	ACCAGGCATT	GAGATTGAAC	CAGGACTGGA	GGTCAGGCGA	
	5765	5775	5785	5795	5805	5815	5825	5835
06-11	TTTCCCACAG	TTGTCATCGA	CGCTCGCTCA	CTCGAGCCAG	TCACCATCAC	AATGCCGGAC	TTGCGTCCCA	ACATGTATCA	
DPY	TTTCCCACAG	TTGTCATCGA	CGCCCGCTCA	CTCGAGCCAG	TCACCATCAC	AATGCCGGAC	TTGCGTCCCA	ACATGTATCA	
OCCS-06	TTCCCCATG	TTGTTGTCGA	CGCCCGATCG	CTGGAACCAG	TCACCATCAC	CATGCCAGAC	TTGCGGCCGA	ACATGTATCA	
OCCS-25	TTCCCCATG	TTGTTGTCGA	CGCTCGATCA	CTGGAACCAG	TAACAATCAC	TATGCCAGAT	TTGCGGCCGA	ACATGTATCA	
OCCS-110	TTCCCCACG	TTGTTGTCGA	CGCCCGTCA	CTGGAACCAG	TTACCATTAC	CATGCCAGAC	CTGAGACCGA	ATATGTACCA	
	5845	5855	5865	5875	5885	5895	5905	5915
06-11	CCCAACTGGT	GACCCGTGCC	TTGTCCTTAC	ATTGGTTTTG	AGTGTTTATA	ACAACCTTAT	CAATCCATTT	GGTGGATCTA	
DPY	CCCAACTGGT	GACCCGTGCC	TTGTCCCTAC	ATTGGTTTTG	AGCGTTTATA	ACAACCTTAT	CAATCCATTT	GGTGGATCTA	
OCCS-06	CCCCACCGGT	GATCCTGGCC	TTGTCCCTAC	TCTGGTCGTT	AGTGTTTACA	ACAACCTCAT	TAACCCATTT	GGGGGGACCA	
OCCS-25	CCCCACCGGT	GATCCTGGTC	TCGTCCCTAC	TCTGGTTGTC	AGTGTCTACA	ACAACCTCAT	TAACCCGTTT	GGGGGGACCA	
OCCS-110	CCCCACCGGC	GACCCGTGTT	TAGTTCCCTAC	CTGTTTGTTC	AGTGTTTACA	ACAATCTCAT	CAACCCGTTT	GGGGGGACCA	
	5925	5935	5945	5955	5965	5975	5985	5995
06-11	CTAGTGCAAT	CCAAGTCACA	GTAGAAACAA	GGCCAAGTGA	AGACTTTGAG	TTTGTGATGA	TTCTGTCCTC	CTCCAGCAAA	
DPY	CTAGTGCAAT	CCAAGTCACA	GTAGAGACAA	GGCCAAGTGA	AGACTTTGAG	TTTGTGATGA	TTCTGTCCTC	CTCCAGCAAA	
OCCS-06	CAAATGCAAT	ACAAGTGACA	GTTGAGACTA	AACCAAGTGA	TGACTTTGAA	TTTGTGATGG	TTCTGTCCTC	CTCCAGTAAG	
OCCS-25	CAAATGCAAT	ACAAGTAACA	GTTGAGACAA	AACCAAGTGA	TGACTTTGAG	TTTGTGATGG	TTCTGTCCTC	CTCCAGTAAG	
OCCS-110	CAAATGCAAT	ACAAGTGACA	GTTGAAACAA	AACCAAGTGA	AGACTTTGAG	TTTGTGATGG	TTCTGTCCTC	GTCCAGCAAG	

	6005	6015	6025	6035	6045	6055	6065	6075
06-11	ACTGTTGATT	CAGTCTCGCC	CGCAGGCCTA	CTCAGCACCC	CAGTCTCTCAC	TGGGGTTGGC	ACTGACAACA	GATGGAATGG
DPY	ACTGTTGACT	CAGTCTCGCC	CGCAGGCCTA	CTCAGCACCC	CAGTCTCTCAC	TGGGGTTCGGC	ACTGACAACA	GATGGAATGG
OCCS-06	ACTGTTGACT	CGATCTCACC	AGCCGGTCTT	CTCAGCACCC	CTGTCTCTCAC	TGGGGTTGGT	ACTGACAACA	GGTGGAAACGG
OCCS-25	ACTGTTGACT	CGATTTTACC	AGTCTGGTCTT	CTCACAACCT	CTGTCTCTCAC	TGGTGTGGC	ACCGATAACA	GATGGAACGG
OCCS-110	ACTGTTGACT	CAATTTTACC	AGCTGGTCTC	CTCACAACCC	CTGTCTCTTAC	CGGGTTGGC	ACTGACAACA	GGTGGAAATGG

	6085	6095	6105	6115	6125	6135	6145	6155
06-11	TCAGATAGTG	GGGCTGCAAC	CGGTTCCCTGG	TGGGTTTTTCT	ACATGTAACA	GGCACTGGAA	TTTGAATGGC	AGTACGTACG
DPY	CCAAATAGTG	GGGTGCAAC	CGGTTCCCTGG	TGGGTTTTTCT	ACATGCAACA	GGCACTGGAA	TTTGAACGGC	AGTACATACG
OCCS-06	CCAGATAGTG	GGTCTTCAAC	CAGTCCCTGG	TGGGTTCTCA	ACATGCAACA	GACATTGGAA	CCTGAACGGA	AGCACATTCG
OCCS-25	CCAGATAGTG	GGCCTTCAAC	CAGTCCCGG	TGGGTTCTCA	ACATGCAATA	GGCATTGGAA	TCTGAACGGA	AGCACATTCG
OCCS-110	CCAAATAGTG	GGCCTGCAGC	CAGTCCCTGG	TGGGTTTTTCA	ACTTGCAACA	GACACTGGAA	TTTGAACGGG	AGCACGTTTG

	6165	6175	6185	6195	6205	6215	6225	6235
06-11	GTTGGTCAAG	CCCTTCGTTT	ACCGACATTG	ACCACCGCAG	GGGTGTCGCA	ACCCGCCCTG	GCACCACGGA	CGTGCTTCAG
DPY	GTTGGTCAAG	CCCTTCGTTT	ACCGACATTG	ACCACCGCAG	GGGTGTCGCA	ACCCGCCCTG	GCACCACGGA	CGTGCTTCAG
OCCS-06	GTTGGTTCAG	CCCTCGGTTT	GCCGACATTG	ATCACCCACG	TGGTAGTGGC	AGCTACCCTG	GCAGCGGTGG	AGTGAATGTG
OCCS-25	GTTGGTTCAG	CCCTCGGTTT	ACTGACATTG	ATCATCCAAG	GGGTAGTGGC	AGCTACCCTG	GCAGCGGTGG	AACGAATGTG
OCCS-110	GTTGGTCAAG	CCCTTCGTTT	ACTGACATTG	ACCACCCACG	TGGTAGTGGT	AGCTACCCTG	GGAGCAGTGG	AACAAATGTG

	6245	6255	6265	6275	6285	6295	6305	6315
06-11	TTCTGTTACG	CTAGTGCCCG	GTCGCAACCC	GAGAACCCCA	TTTCCCAAGT	CGCGCCAGAT	GGTTTCCCGG	ACATGTGCGT
DPY	TTTTGGTACG	CTAGTACCCG	GTCGCAACCC	GAAACCCCA	TTTCCCAAT	CGCGCCAGAT	GGTTTCCCGG	ACATGTGCGT
OCCS-06	CTTGAGTTTT	GGTATGTCTA	GACTGGCACT	GCAACTGACA	ACCCCATCTC	TCAGATCGCC	CCAGATGGTT	TTCTGTGACAT
OCCS-25	CTGGAGTTCT	GGTATGCCCA	GACTGGTACT	GCAAGTGACA	ATCCCATCTC	TCAGATTGCT	CCAGATGGTT	TTCTGTGACAT
OCCS-110	CTTGAGTTCT	GGTACGCTCA	GACTGGTACT	GCCAATGACA	ACCCCATTTT	TCAGATTGCC	CCGATGGTTT	TCCGTGACAT

	6325	6335	6345	6355	6365	6375	6385	6395
06-11	CATCCCTTTT	AACGGTCCCA	GTGTCCCGC	TGCAGGGTGG	GTGGGTTTGG	GTGCAATTTG	GAATAGCGAC	AGTGGCGCCC
DPY	TATCCCTTTT	AACGGTCCCA	GTGTCCCGC	TGCAGGGTGG	GTGGGTTTGG	GTGCAATTTG	GAATAGCGAC	AGTGGCGCCC
OCCS-06	GTGCTTTTGG	CCCTTTAATG	GCCAGAACAT	CCCAACTGGA	GGGTGGGTTG	GGTTTGGCGA	AGTTTGGAA	AGCGCAAATG
OCCS-25	GTGCTTTTGG	CCCTTTAATG	GCCAGAACAT	CCCAACTGGA	GGGTGGGTTG	GGTTTGGCGA	AGTTTGGAA	AGCGCAAATG
OCCS-110	GTGCTTTTGG	GCTTTCAACG	GCCAGAATGT	TCCAACGTGA	GGGTGGGTTG	GATTTGGTGA	GGTTTGGAA	AGCGCAAATG

	6405	6415	6425	6435	6445	6455	6465	6475
06-11	CCAACGTTAC	GACTGTTCAA	GCATACCAAT	TGGGTTTTTGC	CACTAATGCG	CCAAACAACG	TGCAGCCAC	TACCAACACC
DPY	CCAATGTTAC	AACTGTTCAA	GCATACCAAT	TGGGTTTTTGC	CACTAATGCG	CCAAACAACG	TGCAGCCAC	TACCAACACC
OCCS-06	GAACCCCTTA	TGTTGGTACT	GTTCAAGCCT	ATGAGCTGGG	CTTTGCCACT	GGAGCCCCAA	ACAACATCCA	ACCTACCACC
OCCS-25	GAACCCCTTA	TGTTGGCACT	GTTCAAGCCT	ATGAGCTGGG	CTTTGCCACT	GGAGCTCCAA	ACAACATCCA	ACCTACCACC
OCCS-110	GAACCTCCTA	TGTTGGCACT	GTTCAAGCCT	ATGAACTGGG	TTTTGTCTACT	GGAGCACCTA	ACAACATTCA	ACCCACAACC

	6485	6495	6505	6515	6525	6535	6545	6555
06-11	TCAGGCGCTC	AGGTTGTTGC	CAAGTCTATT	TATGCCGTTT	CAACAGGTTT	AGCCCCAAAAC	CCGGCCGGGT	TGTTCTGTGAT
DPY	TCAGGCGCTC	AGGTTGTTGC	CAAGTCTATT	TATGCCGTTT	CAACAGGCTC	AGCCCCAAAAC	CCGGCCGGGT	TGTTCTGTGAT
OCCS-06	AACACCTCGG	GGGCGCAGGT	TGTCGCCAAA	TCCATATACG	CTGTTGCAAA	CGGCCAGAAT	CAGGTTACGG	CTGGGTTGTT
OCCS-25	AGCACCTCAG	GAGCGCAGGT	TGTTGCCAAG	TCCATATACG	CTGTTGCAAA	CGGCCAAAAT	CAAGGCACAG	CTGGGTTGTT
OCCS-110	AGCACCTCGG	GAGCACAGGT	TGTTGCCAAA	TCCATATACG	GTGTTGCTAA	TGCCAGAAT	CAAGGCACAG	CTGGGCTGTT

	6565	6575	6585	6595	6605	6615	6625	6635
06-11	GGCCTCTGGT	ATCATATCCA	CCCCAAATGC	CACCGCTATC	ACGTACACAC	CCCAACCGGA	CAGGATTGTC	AATGCACCCG
DPY	GGCCTCTGGT	ATCATATCCA	CCCCAAATGC	CACCGCTATC	ACGTACACAC	CCCAACCGGA	CAGGATTGTC	AATGCACCCG
OCCS-06	TGPTTGGCTG	TCTGGCATCA	TTTCCACCC	AAATGTTGCC	AAACCAACTA	CGTATACACC	CCAGTACACC	AGTATCGTCA
OCCS-25	TGPTTGGCTG	TCTGGGTGCA	TTTCTACCC	AAACGGGCC	AACTCTACCA	CGTACACACC	CCAGCCAAC	AGGATTGTCA
OCCS-110	TGTTGTTAGT	TGGGCATCA	TTTCCACTCC	AAATGGCCCC	AAACCCACCA	CGTACACACC	CCAGCCAAC	AGAATTGTCA

	6645	6655	6665	6675	6685	6695	6705	6715
06-11	GCACTCCCGC	CGCCGCCCTT	GTAGGCAGGA	ATGTGCCCAT	CATGTTTCGG	TCCATCATCA	GGCGCACCGG	CGACATCAAC
DPY	GCACTCCCGC	CGCTGCCCTT	GTAGGCAGGA	ATGTACCCTT	CATGTTTCGG	TCCGTCTGTC	GGCGTACC	CGACATCAAC
OCCS-06	ATGCACCTGG	CACCTCTGCT	GCCGCCCCCG	TGGGAGAAA	CGTGCCTGTC	ATGTTTGGCT	CCGTATCAG	CGCCTGCG
OCCS-25	ATGCACCTGG	TACCCCTGCT	GCCACCCCCA	TCGGAAGGAA	CGTACCTGTT	ATGTTTCGCT	CTGTATTAG	CGCCTGCGT
OCCS-110	ACGCACCTGG	CACCCCTGCT	GCTGCTCTG	TTGTTAGAAA	TGTCCTGTC	ATGTTTCGCT	CTGTTATCAG	CGCCTGCGT

	6725	6735	6745	6755	6765	6775	6785	6795
06-11	GCCGCGGCTG	GGTCAATCCA	TGGGACTCAA	TATGGCACAG	GCTCTCAGCC	ATTGCCAGTA	ACAATTGGAC	TTTCACTCAA
DPY	GCCGCGGCTG	GGTCAATCCA	TGGGACTCAA	TACGGCACAG	GCTCTCAGCC	ATTGCCAGTA	ACAATTGGAC	TTTCACTCAA
OCCS-06	GACATCAACG	CCGGGCTGG	CTCGGCCAAC	GGTACCAGT	ACGGTACAGG	CTCCCAACCA	TTACCAGTCA	CAATTTGGCT
OCCS-25	GACATCAACG	CCGGAGCTGG	CTCAGCCAAC	GGGACTCAGT	ACGGCACAGG	CTCCCAACCA	TTCCAGTCA	CAATTTGGCT
OCCS-110	GACATCAACG	CCGGGCTGG	CTCAGCCAAC	GGAATCAGT	ACGGCACAGG	CTCACAACCA	CTCCAGTAA	CAATTTGGACT

	6805	6815	6825	6835	6845	6855	6865	6875
06-11	CAATTAATCA	TCAGCACTCA	TGCCCTGGACA	GTTTTTTCGTT	TGGCAGTTGA	CCTTTGCCCT	TGGCTTCATG	GAAATTTGGTT
DPY	CAATTAATCA	TCAGCACTCA	TGCCCTGGACA	ATTTTTTCGTT	TGGCAGTTGA	CCTTTGCCCT	TGGCTTCATG	GAAATTTGGTT
OCCS-06	TTTCGTAAC	AATTAATCGT	CTGCAC	-----	-----	-----	-----	-----
OCCS-25	TTTCGTAAC	AATTAATCAT	CGGCCTCAC	GCCTGGGCAG	TTTTTTCGTT	GGCAGTTAAA	TTTCACTTCT	GGCTTCATGG
OCCS-110	CTGCTGAAC	AATTAATCGT	CGGCCTCAC	GCCTGGACAG	TTTTTTCGTT	GGCAGTTAAA	TTTCACTTCT	GGCTTCATGG

	6885 6895 6905 6915 6925 6935 6945 6955
06-11	TGAGCGTTGA CGGGTACTTC TATGCAGGAA CAGGGGCTTC AACCACCCCTC ATTGACTTGA CTGAACTTAT TGATATACGC
DPY	TGAGCGTTGA TGGGTACTTT TATGCAGGAA CAGGGGCTTC AACCACCCCTC ATTGACTTGA CTGAACTCAT TGATATACGC
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	AAATTGGTTT GAGCGTTGAT GGGTACTTTT ATGTAGGTGC AGGAGCTTCA ACCACACTTA TAGACCTGAC TGAATTGATT
OCCS-110	AGATTGGTTT GAGCGTTGAT GGGTACTTTT ACGTGGGTGC AGGAGCATCA ACAAACACTCA TAGATCTGTC TGAACTGATT

	6965 6975 6985 6995 7005 7015 7025 7035
06-11	CCTGTGGGAC CCAGGCCATC CACAAGCACA CTCGTGTTTA ACCTGGGGGG CACAACCAAG GGCTTTTCCT ATGTCTGAGT
DPY	CCTGTGGGAC CCAGGCCATC CACAAGCACA CTCGTGTTTA ACCTGGGGGG CACAACCAAT GGCTTTTCCT ATGTCTGAGT
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	GACATACGCC CTGTGGGACC CAGGCCATCC ACAAGCACAC TTGTGTTCAA CTGGGGGGGC GCAGCTAATG GCTTTTCTTA
OCCS-110	GATATACGCC CTGTGGGACC CAGGCCATCT ACGAGCACAC TTGTGTTCAA CTGGGGGGGC GCGACCAATG GCTTTTCTTA

	7045 7055 7065 7075 7085 7095 7105 7115
06-11	TTATTGGGTT GGGACTTGCA GGTGCCGGTG TCTTGAGCAA CGCATTGCTC CGCAGGCAAG AACTGCAGTT AAAAAACAA
DPY	TTATTGGGTT GGGACTTGCA GGTGCCGGTG TCTTGAGCAA CGCATTGCTC CGCAGGCAAG AACTGCAGTT AAAAAACAA
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	TGCTCTGAGTT TATTGGACTA GGACTTGACG GTGCTGGCGT TTTGAGCAGC GCACTGCTCC GCAGGCAGGA GTTACAACCTG
OCCS-110	TGCTCTGAGTT TATTGGATTG GGACTTACAG GTGCCGCGT TTTGAGCAAT GCATTGCTCC GCAGGCAAGA ATTGCAGTTG

	7125 7135 7145 7155 7165 7175 7185 7195
06-11	GCCTTGGAAC ACGGGTTGGT ATTTAAAGCC GACCAATTAG GTAGGTTAGG TTTTAAATCCA AATGAAGTTA AAAATGTGAT
DPY	GCCTTGGAAC ATGGGTTGGT ATTTAAAGCC GACCAATTAG GTAGGTTAGG TTTTAAATCCA AATGAAGTTA AGAATGTGAT
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	CAGAAACAGG CCTTAGAAAA TGGATTAGTT TTGAAAGCAG AGCAGTTAGG TAGGATAGGT TTTAACCCAA ATGAGGTTAA
OCCS-110	CAAAAGCAAG TTTTAGAGAA TGGATTAGTT TTGAAAGCTG AGCAGTTAGG TAGAATAGGT TTTAATCCAA ATGAGGTTAA

	7205 7215 7225 7235 7245 7255 7265 7275
06-11	TGTAGGTAAT AGTTTTAGTA ATAATGTTAA GTTAAGTAAT ATGCATAATG ATGCTAGTGT AGTTGATGCT TATAATGTGT
DPY	TGTAGGTAAT AGTTTTAATA ATAATGTTAA GTTAAGTAAT ATGCATAATG ATGCTAGTGT AGTTAATGCT TATAATGTGT
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	GAGTATGATT GTAGGTAGTA ATTTAAATAG TAATGTTAGG TTAAGCAATA TGCATAATGA TGCTAGTGTG GTTAATGCTT
OCCS-110	GAGTATGATT GTAGGTAGTA ATTTGAATAG TAGTATTAGG TTAAGTAATA TGCATAATGA TGCTAGTGTG GTTAATGCTT

	7285 7295 7305 7315 7325 7335 7345 7355
06-11	ATAATCCTGC CAGCAATGGC ATTAGGAAGA AGATTAAGAG TTTTAATAAT AGTGTTAAGA TTTATAATAC CACTGGCGAG
DPY	ATAATCCTGC CAGCAATGGC ATTAGGAAGA AGATTAAGAG TTTTAATAAT AGTGTTAAGA TCTATAATAC CACTGGCGAG
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	ATAATATGTA TAATCCTGTT AGTAATGGTA TTAGGAAGAA GATTAAAAGT TTTAATAATA ATGTTAAGAT TTATAATACC
OCCS-110	ATAATATATA TAATCCTGTT AGCAATGGCA TTAGGAAAAA GATTAAAAGT TTTAATGATA ATGTTAAGAT TTATAATACC

	7365 7375 7385 7395 7405 7415 7425 7435
06-11	TCCAGTGTGTT AGTTAGAGTT GATTTGTTAA TTAGAATTAT TTGGTTTAAAT TGGCTTTATA GTTTAAAGTA AGCTATAAAA
DPY	TCCAGTGTGTT AGTTAGAGTT GATTTGTTAA TTAGAATTAT TTGGTTTAAAT TGGCTTTATA GTTTAAAGTA AGCTATAAAA
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	ACTGGCGAGT CCAGTGTGTTA GTTAGAGTTA TTAGAATTAT TTGGTTTAAAT TGGCTTTATA GTTTAAAGTA AGCTATAAAA
OCCS-110	ACTGGCGAGT CCAGTGTGTTA GTTAGAGTTA TTAGAATTAT TTGGTTTAAAT TGGCTTTATA GTTTAAAGTA AGCTATAAAA

	7445 7455
06-11	AAAAAAAAAA A.....
DPY	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-06	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-25	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
OCCS-110	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

Annexe 2 – Tableau 15 : Liste des souches ayant permis la construction de l'arbre phylogénétique présenté Figure 25. 47 souches ne sont ici pas répertoriées en raison de leur obtention dans le cadre d'une collaboration.

Code GenBank	Classification	Code GenBank	Classification
AF231353.1	RHDV G1-5	Y15427.1	RHDV G1-5
AF295785.1	RHDV G1-5	Z29514.1	RHDV G1-5
AF402614.1	RHDV G1-5	Z49271.2	RHDV G1-5
AJ006019.1	RHDV G1-5	AB300693.2	RHDVa
AJ319594.5	RHDV G1-5	AF258618.2	RHDVa
AJ495856.2	RHDV G1-5	AF453761.1	RHDVa
AJ535092.2	RHDV G1-5	AJ302016.3	RHDVa
AJ535094.3	RHDV G1-5	AJ303106.2	RHDVa
AM085133.1	RHDV G1-5	AJ969628.1	RHDVa
AY925210.1	RHDV G1-5	AY269825.1	RHDVa
AY926883.1	RHDV G1-5	AY523410.1	RHDVa
AY928268.1	RHDV G1-5	DQ069280.1	RHDVa
AY928269.1	RHDV G1-5	DQ069281.1	RHDVa
AY928270.1	RHDV G1-5	DQ205345.1	RHDVa
DQ189077.1	RHDV G1-5	DQ280493.1	RHDVa
DQ189078.1	RHDV G1-5	DQ530363.1	RHDVa
EF363035.1	RHDV G1-5	DQ841708.1	RHDVa
EF558572.1	RHDV G1-5	EF558581.1	RHDVa
EF558573.1	RHDV G1-5	EF558582.1	RHDVa
EF558574.1	RHDV G1-5	EF558583.1	RHDVa
EF558575.1	RHDV G1-5	EF558584.1	RHDVa
EF558576.1	RHDV G1-5	EU003578.1	RHDVa
EF558577.1	RHDV G1-5	EU003581.1	RHDVa
EF558578.1	RHDV G1-5	EU003582.1	RHDVa
EF558579.1	RHDV G1-5	FJ212322.1	RHDVa
EF558580.1	RHDV G1-5	FJ794179.1	RHDVa
EF558585.1	RHDV G1-5	FJ794180.1	RHDVa
EU003579.1	RHDV G1-5	GU339228.1	RHDVa
EU003580.1	RHDV G1-5	GU564448.1	RHDVa
EU650679.1	RHDV G1-5	HM623309.1	RHDVa
EU650680.1	RHDV G1-5	HQ917923.1	RHDVa
FJ212323.1	RHDV G1-5	JF412629.1	RHDVa
FN552800.1	RHDV G1-5	JN165233.1	RHDVa
FR823354.1	RHDV G1-5	JN165234.1	RHDVa
FR823355.1	RHDV G1-5	JN165235.1	RHDVa
GU373617.1	RHDV G1-5	JN165236.1	RHDVa
GU373618.1	RHDV G1-5	FR819781.3	RHDV2
JX886001.1	RHDV G1-5	HE800529.1	RHDV2
JX886002.1	RHDV G1-5	HE800530.1	RHDV2
KF594473.1	RHDV G1-5	HE800531.1	RHDV2
KF594476.1	RHDV G1-5	HE800532.1	RHDV2
KT006727	RHDV G1-5	HE819400.1	RHDV2
KT006744	RHDV G1-5	KM878681.1	RHDV2
KT006747	RHDV G1-5	KM979445.1	RHDV2
KX357653.1	RHDV G1-5	KP129395.1	RHDV2
KX357654.1	RHDV G1-5	KP129396.1	RHDV2
KX357667.1	RHDV G1-5	KP129397.1	RHDV2
KX357668.1	RHDV G1-5	KP129398.1	RHDV2
KX357670.1	RHDV G1-5	KP129399.1	RHDV2
KX357671.1	RHDV G1-5	LT168834.1	RHDV2
KX357672.1	RHDV G1-5	LT168835.1	RHDV2
KX357677.1	RHDV G1-5	LT168839.1	RHDV2
KX357678.1	RHDV G1-5	LT168840.1	RHDV2
KX357695.1	RHDV G1-5	LT168841.1	RHDV2
KX357706.1	RHDV G1-5	LT168842.1	RHDV2
L48547.1	RHDV G1-5	LT168845.1	RHDV2
M67473.1	RHDV G1-5	EU871528.1	RCV-A1
MH190418.1	RHDV G1-5	GU368888.1	RCV-A1
U49726.1	RHDV G1-5	GU368889.1	RCV-A1
U54983.1	RHDV G1-5	GU368890.1	RCV-A1
X87607.1	RHDV G1-5	GU368891.1	RCV-A1
Y15424.1	RHDV G1-5	GU368892.1	RCV-A1

Code GenBank	Classification
GU368893.1	RCV-A1
GU368894.1	RCV-A1
GU368895.1	RCV-A1
GU368896.1	RCV-A1
GU368897.1	RCV-A1
GU368898.1	RCV-A1
GU368899.1	RCV-A1
GU368900.1	RCV-A1
GU368901.1	RCV-A1
GU368902.1	RCV-A1
GU368903.1	RCV-A1
GU368904.1	RCV-A1
GU368905.1	RCV-A1
GU368906.1	RCV-A1
GU368907.1	RCV-A1
GU368908.1	RCV-A1
GU368909.1	RCV-A1
GU368910.1	RCV-A1
GU368911.1	RCV-A1
GU368912.1	RCV-A1
GU368913.1	RCV-A1
GU368914.1	RCV-A1
GU368915.1	RCV-A1
GU368916.1	RCV-A1
GU368917.1	RCV-A1
GU368918.1	RCV-A1
GU368919.1	RCV-A1
GU373614.1	RCV-A1
GU373615.1	RCV-A1
GU373616.1	RCV-A1
KX357655.1	RCV-A1
KX357656.1	RCV-A1
KX357657.1	RCV-A1
KX357658.1	RCV-A1
KX357659.1	RCV-A1
KX357660.1	RCV-A1
KX357661.1	RCV-A1
KX357662.1	RCV-A1
KX357663.1	RCV-A1
KX357664.1	RCV-A1
KX357665.1	RCV-A1
KX357666.1	RCV-A1
KX357669.1	RCV-A1
KX357673.1	RCV-A1
KX357674.1	RCV-A1
KX357675.1	RCV-A1
KX357676.1	RCV-A1
KX357679.1	RCV-A1
KX357680.1	RCV-A1
KX357681.1	RCV-A1
KX357682.1	RCV-A1
KX357683.1	RCV-A1
KX357684.1	RCV-A1
KX357685.1	RCV-A1
KX357686.1	RCV-A1
KX357687.1	RCV-A1
KX357688.1	RCV-A1
KX357689.1	RCV-A1
KX357690.1	RCV-A1
KX357691.1	RCV-A1
KX357692.1	RCV-A1
KX357693.1	RCV-A1
KX357694.1	RCV-A1
KX357696.1	RCV-A1
KX357697.1	RCV-A1
KX357698.1	RCV-A1
KX357700.1	RCV-A1
KX357701.1	RCV-A1
KX357702.1	RCV-A1
KX357703.1	RCV-A1
KX357704.1	RCV-A1

Code GenBank	Classification
KX357705.1	RCV-A1
KX357707.1	RCV-A1
NC_011704.1	RCV-A1
LT708121.1	RCV-E2
LT708123.1	RCV-E2
LT708124.1	RCV-E2
LT708125.1	RCV-E2
LT708126.1	RCV-E2
AM268419.4	RCV-E1
LT708119.1	RCV-E1
LT708122.1	RCV-E1
LT708127.1	RCV-E1
LT708128.1	RCV-E1
X96868.1	RCV italien
EF558587.1	Virus Ashington
GQ166866.1	MRCV
KJ679533.1	EBHSV
KJ679534.1	EBHSV
KJ679535.1	EBHSV
KJ679536.1	EBHSV
KJ679537.1	EBHSV
KJ679538.1	EBHSV
KJ679539.1	EBHSV
KJ679540.1	EBHSV
KJ679541.1	EBHSV
KJ679542.1	EBHSV
KJ679543.1	EBHSV
KJ679544.1	EBHSV
KJ679545.1	EBHSV
KJ679546.1	EBHSV
KJ679547.1	EBHSV
KJ679548.1	EBHSV
KJ679549.1	EBHSV
KJ679550.1	EBHSV
KJ679551.1	EBHSV
KJ679552.1	EBHSV
KJ679553.1	EBHSV
KJ679554.1	EBHSV
KJ679555.1	EBHSV
KJ679556.1	EBHSV
KJ679557.1	EBHSV
KJ679558.1	EBHSV
KJ679559.1	EBHSV
KJ679560.1	EBHSV
KJ679561.1	EBHSV
KJ679562.1	EBHSV
KJ679563.1	EBHSV
KJ679564.1	EBHSV
KJ679565.1	EBHSV
KJ679566.1	EBHSV
KU961677.1	EBHSV
KU961678.1	EBHSV
MF356366.1	EBHSV
NC_002615.1	EBHSV
Z32526.1	EBHSV
Z69620.1	EBHSV
-	DPY
-	OCCS-06
-	OCCS-25
-	OCCS-110

TITRE : DETECTION ET IDENTIFICATION DE LAGOVIRUS CHEZ DIVERSES ESPECES DE LAGOMORPHES

RESUME : Les *Lagovirus* regroupent les virus responsables de la maladie hémorragique du lapin (RHDV) et du syndrome du lièvre brun européen, affections très souvent létales et contagieuses chez plusieurs espèces de lagomorphes. Bien que le RHDV ait longtemps été considéré comme spécifique de *Oryctolagus cuniculus*, de nombreux variants génétiques virulents pour un plus large panel d'espèces ont émergés. Par ailleurs, plusieurs virus génétiquement proches du RHDV mais non pathogènes ont été identifiés. Les analyses phylogénétiques et épidémiologiques de tous ces différents virus suggèrent que l'évolution des *Lagovirus* pourrait être expliquée ou bien par sauts d'espèces avec passage du virus d'un hôte réservoir à un hôte sensible, ou bien par l'acquisition du caractère pathogène via des modifications génétiques chez des variants apathogènes. Cette présente étude a pour visée de compléter les données actuelles via la détection et le séquençage de souches non pathogènes ainsi que d'élaborer une méthode de détection des *Lagovirus* plus performante. Ce travail présente le séquençage de 4 souches dont les analyses suggèrent un rapprochement génétique avec les virus non pathogènes connus ainsi que l'élaboration d'une qPCR multiplex.

MOTS-CLES : LAGOVIRUS, RHDV, RCV, LAGOMORPHE, SEQUENCAGE, QPCR, MULTIPLEX

TITLE: DETECTION AND IDENTIFICATION OF LAGOVIRUSES AMONG VARIOUS LAGOMORPH SPECIES

ABSTRACT: *Lagoviruses* include viruses responsible for rabbit haemorrhagic disease (RHDV) and the European brown hare syndrome, two lethal and contagious afflictions in several lagomorph species. Although RHDV was considered as a virus specific to *Oryctolagus cuniculus* for a long time, numerous genetic variants that proved to be virulent in other species have emerged. Besides, several viruses that are genetically close to RHDV but non-pathogenic have been identified. Phylogenetic and epidemiologic analyses of all these different viruses suggest that the evolution of *Lagoviruses* could be explained by jump species with virus transmission from a reservoir host to a susceptible host or by pathogenicity acquisition through genetic modifications among non-pathogenic variants. The aim of this present study is to complete the current data via non-pathogenic strain sequencing and the development of a more effective method for *Lagoviruses* detection. This work presents the sequencing of 4 strains whose analyses suggest a genetic link with already known non-pathogenic viruses and the development of a multiplex qPCR.

KEYWORDS: LAGOVIRUS, RHDV, RCV, LAGOMORPH, SEQUENCING, QPCR, MULTIPLEX