



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4173](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4173)

To cite this version :

MARTIN, Valérie. *Identification de nouveaux variants apathogènes apparentés au virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV), isolés dans des populations de lapins de Garennes, en France* . Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 122 p.

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

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX VARIANTS APATHOGENES APPARENTES AU VIRUS DE LA MALADIE HEMORRAGIQUE VIRALE DU LAPIN (RHDV), ISOLES DANS DES POPULATIONS DE LAPINS DE GARENNES, EN FRANCE.

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Valérie Elisabeth Renée MARTIN
Née le 31 Août 1984, à Maisons-Laffitte (Yvelines)

Directeur de thèse : **M. le Docteur Stéphane BERTAGNOLI**

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Stéphane BERTAGNOLI
M. Jean-Luc GUERIN

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

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUEIFI	
M. C. PAVAU	M. ECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*

M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENT CONTRACTUEL

- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORRAND Leni**, *Médecine Interne*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Médecine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER,

Professeurs des Universités,

Praticien hospitalier,

Virologie,

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

Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI,

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

Pathologie infectieuse,

Qui a été l'instigateur de ce travail,

Pour avoir accompagné et encadré cette étude avec rigueur, disponibilité et gentillesse.

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

A Monsieur le Docteur Jean-luc GUERIN,

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

Elevage et Santé avicoles et cunicoles,

Pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

A tous les membres de l'unité de microbiologie,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour leur accueil et leur aide dans ce travail.

Et plus particulièrement à Martine MOULIGNE,

Pour sa participation active dans la réalisation de ce travail,

Pour sa gentillesse et son soutien.

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

A mon grand frère, mon doudou

A ma maman et mon papa, pour votre amour, votre affection et votre patience souvent mise à rude épreuve. Merci de m'avoir soutenue et accompagnée pour que je réalise mes projets. Merci maman, pour tes conseils, pour les heures passées à mes côtés à défier les dures lois de l'informatique.

A mon doudou, merci car du plus profond de moi, je sais que tu veilles sur moi. Tu me manques.

A Thiebaut, mon rayon de soleil quotidien. Merci pour les longues heures de lecture, de soutien, de correction. Ta participation à ce travail est comme toute notre vie à deux, une immense preuve d'amour.

A ma famille, la plus merveilleuse qui soit.

Au CDC, A mes amies les plus sincères :

A Claire : Pour ton écoute, pour les week-ends de fêtes aux Escroquettes

A Caro : Pour ta joie de vivre au quotidien, pour nos parties de tarot

A Elise : Pour toutes tes blagounettes, pour tous nos fous rires de potins

A Marie : Pour ta compréhension, pour tous nos repas CDC

A Marion : Pour toutes tes idées loufoques si géniales, pour nos apéros

Vous êtes toutes uniques et irremplaçables. Que le lien qui nous unit perdure encore très longtemps.

A Béatrice, Cassandre, pour toute l'affection que vous me portez et pour tous les moments de bonheur que l'on partage si souvent

A Anne-claire, Isabelle, Irina, Marion, Marylou, Nathou, pour nos souvenirs partagés, nos voyages, nos soirées, nos fous rires, nos années d'étude, tant de moments inoubliables...

A mes co-internes :

A ma petite Aude, sans toi l'internat aurait été bien plus difficile. J'ai trouvé en toi une amie sincère. Faisons en sorte que cette amitié dure de longues années.

A Yold lin, merci de m'avoir redonné confiance quand j'en avais besoin. J'ai adoré travailler avec toi.

A Steph, Rachel, Ariane, pour avoir été présentes et d'une oreille attentive quand j'en avais le plus besoin.

Et aux 9 autres : Axel, Charles, Isa, Lena, Marc, Peps, Romain, Sophie et Toinou
Cette année d'internat n'aurait pas été la même sans toutes nos personnalités rassemblées.

A Allain, pour notre amitié hors du commun.

A Marie, Michel, Chiara et Sofia, pour avoir été ma famille d'adoption durant plus de 4 ans.

A Marie-Anne Krajewski, vous resterez à jamais ma prof préférée.

A tous mes amis de longue date qui se reconnaîtront ici, les amis de Toulouse, de Lyon et d'ailleurs. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	10
--------------	----

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RHD	14
--	-----------

I. Généralités sur la RHD	15
----------------------------------	-----------

1. Historique et répartition géographique	15
2. Synonymie	17

II. Epidémiologie	17
--------------------------	-----------

1. Population atteinte	17
a. Espèce cible	18
b. Réceptivité – sensibilité	18
2. Répartition et évolution dans le temps et dans l'espace	20
3. Sources virales	21
4. Transmission	22

III. Tableau clinique	25
------------------------------	-----------

1. Symptômes	25
2. Perturbations hématologiques et biochimiques	27
a. Modifications biochimiques	27
b. Modifications hématologiques	27
3. Lésions	28
a. Macroscopiques	28
b. Microscopiques	29

IV. Virologie	31
----------------------	-----------

1. Caractéristiques de la famille des <i>Caliciviridae</i>	31
2. Caractéristiques du RHDV	32
a. Morphologie	32
b. Organisation génomique	33
c. Organisation protéique	35
d. Propriétés	37
i. Propriétés physico-chimiques	37
ii. Propriétés hémagglutinantes	39
iii. Pouvoir antigénique et immunogène	41
3. Caractères culturels	43

V. Pathogénie	44
1. Voie d'entrée et dissémination du virus	44
2. Cellules cibles	45
3. Mécanisme pathogénique	45
4. Survenue de la mort	47
VI. Diagnostic	48
1. Diagnostic de suspicion sur le terrain	48
2. Diagnostic de certitude au laboratoire	48
a. Mise en évidence de l'agent	48
b. Analyses sérologiques	52
VII. Prophylaxie	53
1. Prophylaxie sanitaire	54
a. Prophylaxie sanitaire défensive	54
b. Prophylaxie sanitaire offensive	55
2. Prophylaxie médicale	55
a. Nature et obtention du vaccin	55
b. Utilisation du vaccin	56
c. Sérum hyper immun	57

DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CALICIVIRUS APPARENTES AU RHDV	58
---	-----------

I. Preuves de l'existence de tels virus	59
II. Pouvoir pathogène	60
III. Caractéristiques des calicivirus apparentés au RHDV	61
1. Séquences nucléotidiques et protidiques	61
2. Organisation génomique	63
3. Propriétés antigéniques et immunogènes	63
a. propriétés antigéniques	63
b. propriétés immunogènes	65
IV. Epidémiologie des calicivirus apparentés au RHDV	66
V. Origine probable du RHDV et arbre phylogénique	68

I. Résultats des travaux antérieurs	74
1. Caractérisation moléculaire du (des) virus	75
a. Souche 06-11	79
b. Souche 06-08 et 06-09	81
2. Propriétés des souches identifiées	83
II. Matériels et méthodes	83
1. Origine des prélèvements	83
2. Recherche du virus par RT-PCR	87
a. Extraction d'ARN à partir d'organes	87
b. Nettoyage de l'ARN	88
c. Réalisation de la RT	89
d. PCR nichées	90
e. Electrophorèse	93
f. Séquençage du gène de la VP60	93
III. Résultats	93
1. Résultats de la recherche de virus	93
2. Résultats des séquençages des amplicons et analyse des séquences	99
a. Séquençages des amplicons obtenus à partir de foies de Beniguet	99
b. Séquençages des amplicons obtenus à partir des échantillons de Plouédern	101
c. Séquençage de l'amplicon obtenu à partir de l'échantillon de Cerizay (JA 10)	103
IV. Discussion	104
CONCLUSION	108
TABLE DES ILLUSTRATIONS	112
TABLE DES ABREVIATIONS	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118

INTRODUCTION

La RHD, Rabbit Haemorrhagic Disease ou maladie hémorragique virale du lapin, est une maladie virale aiguë extrêmement contagieuse et souvent fatale pour les lapins domestiques et sauvages. Cette maladie affecte seulement les lapins de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. La RHD a été décrite pour la première fois en Chine en 1984. Cette maladie diffuse très facilement ; elle s'est répandue sur tous les continents en quelques années. Elle a été signalée, en France, à partir de 1988 où elle est, à l'heure actuelle, endémique (Mitro and Krauss, 1993). La mort survient chez les adultes et les jeunes lapins de plus de deux mois, généralement dans les 72 heures suivant l'infection, le tableau clinique étant dominé par une hépatite nécrosante et un syndrome hémorragique (Marcato *et al*, 1991), (Mitro and Krauss, 1993).

L'agent causal a été identifié, il s'agit d'un virus très résistants, appartenant à la famille des *Caliciviridae*. Isolé à partir d'extraits de foies de lapins ayant succombé à la RHD, l'agent pathogène se révèle être un petits virus, non enveloppé, à ARN de polarité positive monocaténaire non segmenté, dont la capsid virale est constituée d'une seule protéine structurale majeure : la VP60 agencée selon une symétrie icosaédrique (Parra and Prieto, 1990), (Ohlinger *et al*, 1993), (Clarke and Lambden 1997).

On note des pertes sévères dans les populations d'animaux non vaccinés domestiques et sauvages, où cela peut créer un déséquilibre écologique préjudiciable. La RHD, avec la myxomatose, est responsable de pertes économiques non négligeables. N'oublions pas, en effet, que la France fait partie des 4 premiers producteurs de lapins de chairs au monde avec la Chine, l'Italie et l'Espagne. Le bilan global du secteur cunicole permet d'estimer à 15 000 tonnes les volumes commercialisés et à 10 000 Tonnes les volumes d'auto-consommation. Le bilan financier des échanges de lapins vivants et de viandes de lapins s'élèvent à 13259 milliers d'euros, en 2007 (Braine, 2008).

. La RHD est une maladie qui a un taux de mortalité très élevé, pouvant aller jusqu'à plus de 90%, particulièrement dans des effectifs de lapins exposés pour la première fois au virus. Ainsi, les populations de lapin de garenne ont fortement régressé depuis le début des années 1980, la RHD ainsi que la myxomatose étant en partie responsables de ce déclin, en

interaction avec la structure spatiale des populations. Par exemple, une étude réalisée au niveau d'un parc national australien (Flinders ranges National Park), en novembre 1995, a montré une réduction de 95% de la population de lapins sauvages, un mois après l'introduction du virus sur ce territoire. Une autre étude, réalisée en France en 1995, montre un taux annuel de mortalité de 88% des adultes et de 99% des jeunes, dans des populations de lapins de garennes, ce déclin étant dû à la RHD et également en partie à la myxomatose (Marchandeau *et al*, 1998; Mutze *et al*, 1998). Néanmoins, une étude sérologique, réalisée en 1997, sur 238 lapins provenant d'une animalerie, a prouvé l'existence d'un virus apparenté au RHDV, sans sa pathogénicité (Capucci *et al*, 1997). Plus récemment, des études sérologiques portant sur des populations de lapins de garennes, ont mis en évidence l'existence de virus apparentés au RHDV de pathogénicité plus faible, voire nulle. Leur pouvoir protecteur vis à vis du RHDV, ainsi que leur rôle dans l'épidémiologie de la RHD sont actuellement discutés (White *et al*, 2001; White *et al*, 2004; Marchandeau *et al*, 2005; Forrester *et al*, 2006).

Afin de faire progresser les connaissances sur les virus non pathogènes apparentés au RHDV, des recherches visant à isoler de nouvelles souches virales susceptibles de circuler dans des populations sauvages témoins et de caractériser leurs différences génomiques avec le RHDV ont été initiées. Il avait été décidé de surveiller au niveau sérologique et virologique des lapins sentinelles mis au contact de populations sauvages sur deux territoires d'étude différents, mais les lapins sentinelles se sont révélés eux-même porteurs d'une souche non pathogène apparentée au RHDV. Comme il est probable que les animaux d'élevage et sauvages sont affectés par les mêmes souches (comme c'est le cas pour les souches pathogènes), l'identification de cette souche a été réalisée. Ce travail a permis de caractériser une souche non pathogène de calicivirus apparentée au RHDV et d'établir la séquence entière du gène codant pour la protéine de capsid. Cette étude n'a néanmoins pas permis d'isoler de souches virales circulant dans les populations sauvages (Thèse M P. Fages, 2007).

La présente étude a donc pour objectifs d'isoler une souche non pathogène du RHDV circulant dans des populations sauvages afin de la comparer aux souches virales connues. Pour cela, nous avons choisi de réaliser une recherche de virus par RT-PCR sur des prélèvements d'organes provenant de lapins apparemment sains issus de la chasse. Les organes prélevés (foie et intestin), l'ont été dans 9 lieux géographiques distincts principalement au cours de la saison de chasse 2007/2008. De plus, parmi tous les échantillons traités, 19 ont été collectés en 1997 sur l'île bretonne de Beniguet. La RT-PCR

est réalisée sur les ARN totaux extraits à partir de plusieurs organes (foie, intestin) en utilisant des amorces spécifiques du gène de la VP 60.

Avant d'exposer en détail nos travaux, nous feront certains rappels sur la RHD, ainsi qu'une mise au point bibliographique sur les calicivirus apparentés au RHDV. Ces données bibliographiques constitueront les deux premières parties de notre étude, alors que notre expérimentation sera développée dans une troisième partie.

PREMIERE PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RHD

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RHD

I. Généralités sur la RHD

1. Historique et répartition géographique

Actuellement, la RHD est enzootique en Asie, en Europe et en Océanie. La RHD a un fort taux de mortalité : des millions de lapins domestiques et sauvages sont morts en Europe, Asie, Australie, Nouvelle Zélande pendant les vingt cinq dernières années. Elle a, donc, un fort impact économique dans les élevages et un fort impact écologique en décimant les populations sauvages du monde entier. La RHD a été rapportée pour la première fois au printemps 1984 en République Populaire de Chine, où elle a tué 140 millions de lapins fermiers. Cet épisode chinois de RHD est apparu suite à l'importation de lapins angora provenant d'Allemagne de l'Ouest (Cooke, 2002). Puis, des cas ont été annoncés en Corée en 1985. La maladie s'est ensuite rapidement étendue. En 1986, une épizootie a touché le continent européen à partir de 2 foyers, l'Italie et l'Europe de l'Est. Depuis, cette maladie a atteint de nombreux pays dans toute l'Europe de 1987 à 1995 : Hongrie, Allemagne, Danemark, Suisse, Belgique, Luxembourg, Portugal, Autriche, Espagne (en 1988), France (en 1988), Grande Bretagne (en 1992), Irlande (en 1995). Aussi, dès 1989, l'Office International des Epizooties déclara la maladie hémorragique virale du lapin comme faisant partie de la liste B des maladies contagieuses (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993), (Moss *et al*, 2002). Une étude épidémiologique réalisée en France, où la maladie est endémique, sur la période de 1988 à 1995 a montré que le panel des isolats français était issu d'une épizootie (1988-1989) causée par l'entrée en France de 2 géotypes différents, un par le sud (Italie) et un par l'est (Allemagne).

D'autres parties du monde ont vécu des épidémies périodiques dans des populations de lapins domestiqués, dont l'Amérique centrale (Mexique et Cuba). En 1988, elle a été introduite au Mexique par l'intermédiaire de carcasses infectées provenant de Chine, la mise en place d'un programme d'éradication établi en 1989 par le National System for Animal Health Emergencies a permis l'élimination complète de la maladie dès 1992. Plusieurs pays d'Afrique du nord et de l'ouest ont également rapporté des épizooties dans les élevages de lapin (Tunisie et Egypte en 1989), ainsi que l'Arabie Saoudite et Israël (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993). Les Etats-Unis ont enregistré des cas en 1988 et 1989 ; puis en

2000 et 2001, 3 épizooties indépendantes ont été rapportées aux USA. Enfin, un cas a été rapporté, en 2005, dans un élevage en Indiana (rapport sanitaire de l'OIE, 2005). Cependant, les espèces de lapins sauvages trouvées en Amérique du Nord ne sont pas sensibles à la RHD, et à chaque fois qu'une épizootie est apparue, les lapins domestiques atteints ont été supprimés.

À la fin des années 1990, des épizooties ont été annoncées dans quarante pays. La maladie s'est propagée à la faveur des échanges commerciaux, de nombreuses investigations supposant que la dissémination de la maladie a débuté à partir de viandes de lapin provenant de Chine (Ohlinger *et al*, 1993).

L'introduction de la RHD en Australie et en Nouvelle Zélande est tout-à-fait différente. Les populations de lapins européens, introduites sur ces îles, sont considérées comme une nuisance pour l'environnement : ils font des ravages dans la flore et la faune locale. C'est pourquoi, le virus myxomateux a été le premier agent viral introduit dans la nature dans le but d'éradiquer les lapins de garenne, en Australie en 1950. Mais, le programme d'éradication australien a finalement échoué ; via le phénomène de sélection naturelle, des isolats viraux moins pathogènes et des lapins plus résistants vis-à-vis de la myxomatose ont émergé. Après cela, en Australie, le RHDV a été étudié, à son tour, comme moyen de lutte biologique. En 1995, le RHDV a été "malencontreusement" introduit en Australie à partir de l'île de Wardang où il était étudié sur des enclos expérimentaux de lapins. Puis, le RHDV a été importé, de façon illégale, en Nouvelle Zélande en 1997 (Forrester *et al*, 2003), (Henning *et al*, 2005).

Le concept de diffusion d'un virus asiatique virulent, apparu en Chine, n'est pas en accord avec les preuves sérologiques et moléculaires actuelles. En effet, l'étude de Moss *et al*, (2002) montre, par RT-PCR et séquençage à partir de sérum de lapins sains stockés à 4°C pendant presque 50 ans, que contrairement aux avis préexistants, le RHDV a circulé de façon silencieuse à travers la Grande-Bretagne, il y a plus de 50 ans et plus de 30 ans avant que la maladie elle-même ne soit identifiée (Moss *et al*, 2002). De la même manière, l'analyse de sérums collectés en Tchécoslovaquie, 12 ans avant la première épidémie, a révélé la présence d'anticorps spécifiques, ce qui prouverait la présence du virus dès cette époque en Europe (Rodak *et al*, 1990), (Moussa *et al*, 1992), (Mitro and Krauss, 1993). A l'heure actuelle, de nombreuses études tendent à prouver la possibilité d'une infection inapparente ou de

l'existence de virus non pathogènes (Forrester *et al*, 2007). Ceci sera décrit plus précisément dans la 2^{ème} partie de l'étude.

La RHD cause d'énormes pertes et est vécue comme un véritable fléau dans de nombreux pays touchés. C'est pourquoi, la plupart des recherches ont pour but de comprendre les caractéristiques du virus, afin de minimiser ces effets sur les populations domestiques et sauvages de lapins. La maladie est présente sur tous les continents, mais son incidence réelle est très difficile à apprécier, notamment dans les populations sauvages de lapins de garenne.

2. Synonymie

Cette maladie hémorragique provoquant une nécrose hépatique et atteignant les lapins de l'espèce *Oryctolagus cuniculus* a pris son nom officiel de Rabbit Haemorrhagic disease (RHD) en 1989. En français, on traduit ce nom par « maladie hémorragique virale du lapin ». Ce nom lui a été donné par l'office international de l'épizootie pour harmoniser son appellation dans les différents pays atteints.

En effet, dans les premières années de son apparition, la RHD a été nommée de diverses façons selon les pays. En Chine, elle fut appelée « fièvre hémorragique virale » ou encore « pneumonie hémorragique virale » ; en Corée, elle reçut le nom de « mort virale subite » du lapin et enfin en Italie on la nomma « maladie X ». Dans la littérature, on retrouve d'autres appellations telles que : septicémie hémorragique, peste du lapin, hépatite nécrosante infectieuse, viral haemorrhagic disease of rabbit...(Mitro and Krauss, 1993).

II. Epidémiologie

1. Population atteinte

La RHD est une maladie virale mortelle fortement contagieuse et aigüe. Elle est caractérisée par une morbidité et une mortalité très élevée. En effet, elle est fatale dans 80 % à 100 % des cas chez les lapins adultes, dans les jours suivant l'infection.

a. Espèce cible :

Le RHDV a un spectre d'hôte très étroit, puisqu'il semble infecter uniquement les membres sauvages et domestiques de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Les autres espèces de lagomorphes dont les lapins américains (*Sylvilagus*), le lièvre à queue noire (*Lepus californicus*) et le lapin de volcan (*Romerolagus diazzi*), le lièvre brun européen (*Lepus europaeus*), ou le lièvre américain (*Lepus americanus*) - ne semblent pas sensibles. La sensibilité du lièvre brun européen (*Lepus europaeus*) a parfois été décrite, mais cette observation reste très incertaine. Par contre, une maladie similaire, causée par un calicivirus différent, mais néanmoins antigéniquement proche du RHDV, nommée European Brown Hare Syndrome (EBHS), atteint le lièvre depuis les années 1980. Ces deux maladies se ressemblent beaucoup d'un point de vue clinique et lésionnel, elles conduisent, toutes deux, à une nécrose hépatique s'accompagnant des mêmes lésions et signes cliniques et entraînant rapidement une forte mortalité chez les adultes.

La recherche d'anticorps anti-RHDV chez les autres espèces d'animaux domestiques s'est toujours révélée infructueuse, même lors de tentatives d'infection expérimentale. Une seule fois, des anticorps anti-RHDV ont pu être mis en évidence chez un chat vivant dans un foyer de RHD (Mitro and Krauss, 1993). Il a également été décelé des anticorps anti-RHDV chez quelques renards nourris avec des foies de lapins contaminés (Leighton *et al*, 1995).

L'homme n'est pas sensible à la RHD. Aucune étude épidémiologique ne rapporte de répercussion sur la santé humaine, ni parmi les consommateurs, ni parmi les personnes travaillant en contact avec le RHDV (vétérinaire, éleveur, techniciens de laboratoires ...). Ce n'est donc pas une zoonose (Xu, 1991).

b. Réceptivité – sensibilité :

Certains facteurs, environnementaux ou individuels, peuvent influencer la réceptivité et la sensibilité des individus. Nous allons développer ces facteurs :

- **Race :** La RHD apparaît aussi bien sur les lapins de garenne que sur les lapins d'élevage. Mais, une étude réalisée en 1989 par Pages Mante, montre une sensibilité accrue des lapins sauvages en comparaison avec les lapins d'élevage, lors d'une infection expérimentale avec un variant RHDV isolé en Espagne (Ohlinger *et al*, 1993).

Aucune différence significative n'a été trouvée concernant la sensibilité des diverses races de lapins domestiques. Toutes les races de lapins d'élevage sont sensibles : on observe la même morbidité et mortalité lorsque l'on inocule des lapins de race différente (angora, rex, chinchilla...). Cependant, lors d'épidémies naturelles, les lapins à laine semblent être plus sensibles que ceux à viande et à fourrure (Xu, 1991).

- **Type d'élevage** : Plusieurs auteurs ont documenté une relation entre l'apparition d'épidémies de RHD et la gestion et l'hygiène des élevages. Les cas apparaissent de façon plus importante dans les élevages où les lapins sont confinés, avec des conditions d'hygiène moins bonnes. En effet, les élevages possédant des cages individuelles, avec un plancher grillagé, ont des pertes limitées à quelques animaux, tandis que dans des fermes plus traditionnelles, où les lapins sont regroupés sur une litière traditionnelle, les pertes sont supérieures de 90 % (Mitro and Krauss, 1993). La distribution de fourrages verts prédisposerait les clapiers artisanaux. En effet, l'herbe utilisée en élevage traditionnel, ainsi que la litière, peuvent être contaminées par les animaux sauvages.

- **Sexe** : La sensibilité des lapins n'est pas influencée par leur sexe (Xu, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Marchandeaudeau *et al*, 1998).

- **Age** : L'âge influence fortement la sensibilité à la RHD. Les lapereaux de moins de un mois ne sont pas sensibles, ils ne présentent aucun signe clinique et généralement ils survivent à l'infection (Ohlinger *et al*, 1993). La sensibilité augmente, alors, progressivement à partir de l'âge de un mois à trois mois, mais les jeunes représentent un faible pourcentage des infectés. Enfin la majorité des infections concernent les lapins de plus de 3 mois et les adultes (Xu, 1991), (Gelmetti *et al*, 1998), (Marchandeaudeau *et al*, 1998), (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000). Au départ, on pensait que cette faible sensibilité chez les lapereaux âgés de moins de 3 mois était due à une protection provenant des anticorps maternels. Ceci est remis en cause ; en effet, le caractère suraigu/foudroyant de la maladie et l'absence d'anticorps détectable chez les très jeunes lapereaux, ne sont pas en accord avec cette hypothèse (Mitro and Krauss, 1993), (Marchandeaudeau *et al*, 1998). L'infectiosité très basse du RHDV, chez les jeunes lapins, pourrait s'expliquer par une absence de récepteur pour le RHDV, au niveau des muqueuses de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif. Il a été montré que les particules virales peuvent s'attacher aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur, par la reconnaissance d'antigènes A ou H de type 2. Or, ces antigènes ont rarement été observés sur les trachées de jeunes animaux : aucun antigène A de groupe

sanguin n'a été détecté avant la 8^{ème} semaine et les antigènes H ne sont été exprimés qu'à partir de la 3^{ème} semaine. De plus, les antigènes observés l'ont été en très faible quantité par rapport à ce qui est détecté chez les animaux adultes (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000). Les lapereaux de moins de trois semaines, bien qu'insensibles au RHVD, ne sont pourtant pas épargnés par les épidémies de RHD. L'étude d'une épidémie en Australie, à Gum Creek et dans le parc national de Flinders Ranges, montre qu'après le passage du virus, les lapereaux âgés de moins de 3 semaines sont absents des populations sauvages. A priori, ce n'est pas à cause de la sensibilité au RHDV, mais ceci s'expliquerait plutôt par la réduction des populations adultes les élevant, entraînant des sevrages prématurés, ainsi que par un déficit de naissances dû à la mort de nombreuses femelles en gestation (Mutze *et al*, 1998).

- **Facteurs responsables d'une baisse de l'état général** : Parasites, stress, maladies inter récurrentes... Tout ce qui entraîne une diminution de l'état général des lapins favorise l'apparition de maladies dont la RHD (Mitro and Krauss, 1993). Une étude, réalisée en France en 1995 (Marchandea *et al*, 1998) suggère que les caractéristiques immunosuppressives du virus de la myxomatose pourraient être responsables de l'augmentation de la mortalité due au RHDV dans les populations sauvages où les 2 virus cohabitent .

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

La RHD est apparue il y a une vingtaine d'année en Asie : République Populaire de Chine en 1984, et Corée en 1985. La RHD s'est ensuite étendue à toute l'Europe de 1987 à 1995. Au même moment, le virus a atteint l'Afrique ainsi que l'Amérique (Ohlinger *et al*, 1993). De nos jours, elle est présente sur tous les continents. Dans les populations sauvages, la RHD semble plus intensive dans et autour des secteurs couverts de forêts et jouxtant des points d'eau (Mitro and Krauss, 1993).

La majorité des cas de RHD ont un caractère saisonnier : la maladie apparaît annuellement, principalement au printemps (mai) et en hiver (octobre/novembre) (Mitro and Krauss, 1993), (Villafuerte *et al*, 1995). La reproduction de lapins de garenne est associée à la croissance de la végétation qui est reliée à la pluviométrie et aux températures. On a donc un pic de population au printemps qui est corrélé aux pluies de l'automne précédent. Les populations de lapins de garenne augmentent en février et en mars de chaque année, puis, elles atteignent un maximum à la fin de la saison de reproduction aux environs de mai ou

juin. Parallèlement à ce cycle démographique, on a, dans les populations où la RHD est endémique, un cycle annuel avec des pics de cas de RHD, qui sont détectés principalement en hiver et au printemps. Ce cycle est associé à la reproduction des lapins : le pic de mortalité maximale chez les lapins adultes a été détecté au début de la deuxième moitié de la saison de reproduction, quand la proportion de femelles gestantes est la plus élevée et quand la plupart des lapereaux sont encore dans les terriers. Cette relation a été évidente en 1996, quand le retard de la période de reproduction a été associé à un délai équivalent dans l'apparition du pic de la maladie (Calvete *et al*, 2002).

La première épidémie de la maladie, dans une région donnée, cause une très forte mortalité, pouvant aller jusqu'à 100 %. Les épidémies suivantes semblent avoir une mortalité significativement plus faible. Une étude, réalisée en Espagne dans les années 1990, a estimé le taux de mortalité dans une localité, 6 ans après la première épidémie : le taux de mortalité était d'environ 30 % et inférieur à celui estimé lors de la première épidémie de RHD (55-75 %) (Villafuerte *et al*, 1995). Dans les régions enzootiques, la morbidité et la mortalité sont significativement inférieures probablement à cause de la fréquence plus élevée d'animaux présentant des anticorps anti-RHDV (Ohlinger *et al*, 1993). Peu de populations de lapins retrouvent l'effectif qu'elles avaient antérieurement à la maladie. Le rétablissement des populations sauvages est plus important là où la densité est la plus forte avant une épidémie de RHD (Villafuerte *et al*, 1995).

3. Sources virales

Les sources de virus sont très nombreuses, le RHDV étant très résistant dans le milieu extérieur. Les animaux malades, les cadavres d'animaux ayant succombé à la RHD, les éventuels infectés ne présentant pas de symptômes sont des sources virales par l'intermédiaire de leur sang, leurs organes, leurs sécrétions et excréments, leur peau et leurs muqueuses, où on peut détecter du virus particulièrement en fin d'évolution de la maladie et après la mort (Xu, 1991). Les excréments de lapins ayant survécu restent infectieux pour les animaux sensibles jusqu'à 4 semaines après l'infection (Ohlinger *et al*, 1993).

Les vecteurs passifs (équipement, habits, personnes, animaux non sensibles... entrant en contact avec des lapins malades) représentent une autre source importante de virus. En effet, le RHDV reste infectieux pendant 225 jours à 4°C et pendant 2 jours à 60°C ; de plus,

on peut le retrouver dans des matériaux secs pendant 105 jours à température ambiante (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993).

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

Les fourrages constituent une source non négligeable de virus, ils peuvent être contaminés par les lapins sauvages. De même, les cadavres d'animaux morts de RHD et les produits alimentaires en dérivant sont des réservoirs de virus qui jouent un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie puisqu'ils contribuent à sa pérennité (Mitro and Krauss, 1993).

4. Transmission

Le RHDV a plusieurs voies d'entrée naturelles possibles : via l'appareil respiratoire supérieur, via le tractus digestif et enfin au niveau des microlésions cutanées. En plus des voies orales et respiratoires, la transmission expérimentale peut se faire par voie intramusculaire (Mitro and Krauss, 1993). Il semblerait que la voie aérogène sans contact direct entre les lapins ne soit pas contaminante (Henning *et al*, 2005).

La transmission du virus est horizontale, elle peut être directe ou indirecte (voir figure 1). La transmission directe se fait par contact entre un individu sain et un individu infecté ou son cadavre. Dans la nature, la transmission directe est la plus efficace. Dans les populations de lapins de garenne, le mode de transmission fécale-orale est probablement le plus important. Les lapins sont caecotrophes ; or, on l'a vu précédemment, les fèces d'un lapin ayant survécu peuvent être infectantes jusqu'à 4 semaines après l'infection, ce qui facilite la transmission (Ohlinger *et al*, 1993). Les terriers sont également propices à la transmission du virus dans les populations sauvages. En effet, d'après plusieurs études (Marchandeau *et al*, 1998), (Mutze *et al*, 1998), la majorité des lapins atteints par le RHDV meurent sous terre dans les terriers. Dans ces lieux confinés le virus persiste, les lapins s'infectent facilement à partir des cadavres. Pendant la période de reproduction, la fréquentation des terriers par les adultes est fortement augmentée (creusage) ce qui pourrait faciliter l'infection simultanée de nombreux adultes causant ainsi l'épidémie hivernale annuelle (Calvete *et al*, 2002).

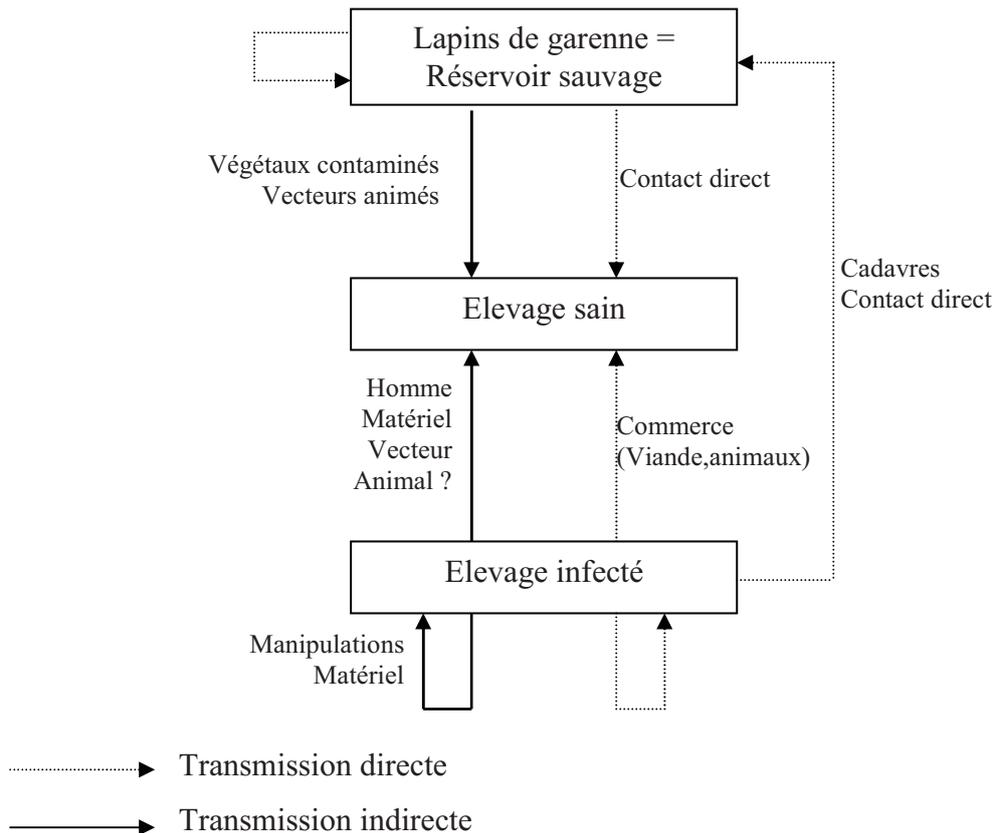


Figure 1 : Cycle épidémiologique de la RHD (d'après Marcus, S., 1996).

La RHD est introduite dans les élevages, principalement, de manière indirecte. Elle est favorisée par la grande résistance du virus dans le milieu extérieur, et se réalise par l'intermédiaire de vecteurs inanimés (végétaux, cages, matériels divers) ou de vecteurs animés (Mitro and Krauss, 1993), (Ohlinger *et al*, 1993), (Henning *et al*, 2005). De nombreux vecteurs animaux sauvages ou domestiques ont été évoqués, dont les rongeurs et les insectes, mais ils n'ont qu'un rôle passif, et n'interviennent pas activement dans la réplication virale (Ohlinger *et al*, 1993). Les hommes font partie des vecteurs animés, ils peuvent contaminer des lapins sains lors de manipulations, de soins ou lors de la venue de visiteurs dans l'élevage. Les lapins domestiques peuvent aussi s'infecter par contact avec des lapins de garenne ou par de la litière, des fourrages contaminés par des lapins sauvages. En effet, plusieurs éleveurs ont noté une corrélation temporelle entre des épizooties chez les lapins domestiques de leur élevage et un déclin des populations de lapins de garenne se trouvant dans la zone (Mitro and Krauss, 1993).

La transmission d'un pays infecté à un pays sain se fait par le biais des importations et des exportations de lapins ou de produits dérivés (Mitro and Krauss, 1993). L'apparition des

cas de RHD, au Mexique, au début de 1989, a été directement reliée aux importations de viande de lapins surgelée provenant de Chine. Traditionnellement, la France et l'Italie importaient de Chine et d'Europe de l'est, des quantités abondantes de viande de lapins ; ceci serait responsable de l'introduction, dans ces pays, du virus. Par exemple, l'Italie reçoit des lapins et de la viande de lapin principalement de Chine, de Hongrie et de Tchécoslovaquie ; entre 1987 et 1988, elle a augmenté ses importations de 18,4 %. Pendant cette période, seule la Suisse a importé des lapins provenant d'Italie et des cas de RHD y ont alors été observés en novembre / décembre 1988. De la même manière, la France, voyant sa disponibilité de viande de lapins diminuer, a augmenté résolument ses importations dans la période 1988-89. Les carcasses reçues provenaient de Chine (60 % de la totalité des importations), et d'Europe de l'Est. De l'été 1988 à l'été 89, la RHD a vu son incidence s'accroître fortement, dans les pays importateurs de lapins en provenance de France (la Belgique, l'Allemagne, l'Italie, la Grande-Bretagne, le Portugal, l'Espagne, la Suisse) (Mitro and Krauss, 1993). L'introduction de la RHD en Australie a été plus originale puisque le virus a été introduit en 1993 pour étudier sa capacité à être utilisé comme agent de contrôle des populations de lapins sauvages qui sont considérés comme nuisibles. En octobre 1995, le virus s'est échappé d'une station de quarantaine et dans le mois qui a suivi, plus de 30 millions de lapins sont morts de RHD, soit une réduction de 95 % de la population de la région (Mutze *et al*, 1998). De même, les fermiers l'ont illégalement introduite en Nouvelle-Zélande en 1997, en tant qu'agent de contrôle biologique (Forrester *et al*, 2003). On ne peut pas exclure que le commerce de peaux et de poils de lapin entre l'Allemagne, la Suisse, la France, la Belgique et la Corée pour l'industrie manufacturière, ait contribué à la diffusion du virus (Mitro and Krauss, 1993).

La propagation du virus a parfois traversé les mers, sans que cela soit expliqué par le commerce. Par exemple, en Australie, la RHD a été introduite expérimentalement sur l'île de Wardang et s'est ensuite répandue sur le continent, franchissant une distance d'environ 4 km au dessus de la mer. Trois hypothèses sont privilégiées pour expliquer ce phénomène. La première est que des oiseaux auraient pu transporter le virus sur cette distance, la seconde est que des insectes seraient passés de l'île vers le continent, emportant le virus, et la troisième est que la RHD aurait été introduite volontairement par l'homme sur le continent. L'intervention des oiseaux est également une hypothèse émise pour expliquer l'arrivée du RHDV en Angleterre. La présence de goélands (*Larus sp.*), environ 10 000 couples nicheurs sur l'île de Beniguet et 2 400 couples nicheurs sur l'île de Bono font suspecter une intervention active de ces oiseaux, qui sont d'importants prédateurs du lapin, dans l'arrivée du

virus sur ces îles. Il est en effet possible que le virus puisse transiter dans le tractus digestif de ces animaux ou dans leur régurgitas. La responsabilité des insectes avait déjà été soupçonnée mais, comme pour les oiseaux, cela n'a pas été démontré à ce jour. La transmission par l'homme, en tant que vecteur passif, ne peut pas être exclue mais semble moins vraisemblable. En effet, l'accès à l'île Bono n'est autorisé qu'à quelques personnes dans le cadre de la gestion de la réserve des Sept-îles. Sa fréquentation est donc très ponctuelle et l'hypothèse d'une introduction de ces virus par l'homme y est peu probable (Marchandea *et al*, 1998).

III. Tableau clinique

La RHD est une maladie à l'expression clinique très sévère avec une mortalité très élevée. Les signes cliniques diffèrent beaucoup de ceux causés par la plupart des calicivirus.

1. Symptômes

La RHD est caractérisée par des symptômes inconstants, variés et peu spécifiques, avec une forte morbidité (100 %) et une mortalité de 40 à 90 % chez les lapins adultes. Ces symptômes ne concernent que les animaux adultes et les jeunes de plus de deux mois, les très jeunes étant épargnés (Ohlinger *et al*, 1993), (Teifke *et al*, 2002). En effet, on n'observe aucun signe clinique sur des lapereaux de moins de un mois, la sensibilité augmentant progressivement par la suite pour être maximale après 3 mois (Mitro and Krauss, 1993). La RHD est une maladie d'évolution le plus souvent aiguë à suraiguë (mort en 48 – 72h), mais quelquefois la maladie à une forme subaiguë (la mort survient après 8 jours) (Marcato *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993). La période d'incubation est courte (24 à 72h). Une étude a été réalisée sur 20 lapins infectés expérimentalement, divisés en 5 sous-groupes de 4 lapins recevant respectivement 1, 10, 100, 1000 ou 10000 unités d'hémagglutination (HAU). Cette étude montre, en général, une apparition des symptômes 30h post-inoculation. Seize lapins sont morts et seulement 4 ont survécu (3 ayant reçu la plus faible dose : 1 HAU et 1 a reçu 100 HAU). Pendant les 3 premiers jours, douze lapins sont morts appartenant à tous les sous-groupes ; les 8 lapins survivants n'ont pas montré de signes cliniques pendant cette période ; le quatrième jour, 4 lapins (2 appartenant au sous-groupe 100 HAU, un au sous-groupe 10000HAU, et un au sous-

groupe 1000 HAU) ont présenté des signes cliniques et un ictère puis sont morts 10 jours post-infection (Teifke *et al*, 2002).

Forme suraiguë : Cette forme affecte les lapins les plus sensibles qui n'ont jamais été infectés auparavant. La mort est soudaine et apparaît en quelques heures sans signes cliniques préalables (Marcato *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993).

Forme aiguë : Dans cette forme, les animaux meurent en 1 à 3 jours. Auparavant, ils présentent des symptômes variés et inconstants, qui débute généralement par une forte hyperthermie (40-41,5°C) : anorexie, apathie, prostration, décubitus latéral, signes nerveux sévères (convulsions cloniques, ataxie, paralysie des postérieurs, pédalages...), signes respiratoires sévères (tachypnée, dyspnée, épistaxis, jetage mucohémorragique...), signes oculaires (larmolement hémorragique), cyanose des membranes muqueuses, des oreilles et des paupières, pétéchies (Marcato *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993).

Forme subaiguë : Cette forme se produit plutôt en fin d'épizootie. La plupart des animaux atteints par cette forme présentent des symptômes frustes qui régressent spontanément, puis ils développent des anticorps. Les animaux présentent des signes cliniques similaires à la forme aiguë mais qui sont atténués. Les animaux qui survivent à un épisode aigu développent parfois un ictère sévère et une décoloration des membranes muqueuses, avant de mourir en quelques semaines (Marcato *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993), (Teifke *et al*, 2002).

Forme chronique : elle est considérée comme très rare et dépourvue de symptômes, la forme subclinique est, quant à elle, supposée exister chez les lapines en allaitement (Mitro and Krauss, 1993).

En fin de vie, les lapins de garenne changent de comportement et se terrent dans les terriers, où ils décèdent. Juste avant la mort, les animaux présentent des cris et des gémissements, une relaxation de l'anus, une dilatation abdominale avec de la constipation ou de la diarrhée, une zone périnéale souillée par du mucus et de la matière fécale, une position en opisthotonos. Dans de rares cas, on peut avoir des avortements de fœtus morts. Sur le cadavre, juste après la mort, on pourra avoir, une hématurie, des hémorragies vaginales et des saignements mousseux au niveau des narines (Marcato *et al*, 1991).

2. Perturbations hématologiques et biochimiques

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

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

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

b. Modifications hématologiques (Plassiart *et al*, 1992)

Dans cette étude, 20 lapins ont été inoculés par voie intra nasale et des échantillons de sang ont été obtenus à partir de deux lapins, respectivement 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, et 60h post-inoculation. Mais le lapin numéro 20 est mort à 42h post-inoculation, donc il a été prélevé à ce moment-là, et on a un seul échantillon 60h post-inoculation.

Cette étude montre de fortes modifications hématologiques à et après 39h post-inoculation. On note une leucopénie importante (animaux : 9, 11, 15, 19,20), cette baisse est due à la fois à une diminution du nombre de granulocytes neutrophiles et à une lymphopénie. Certains animaux (13, 15, 17,18) présentent une lymphopénie isolée. L'hématocrite reste dans les valeurs usuelles durant toute l'expérience, sauf chez le lapin numéro 20, pour qui elle est effondrée. On note une thrombocytopénie, plus ou moins sévère, 30h après l'inoculation.

La capacité de coagulation sanguine à été explorée. Les temps de coagulation ont été testés (Temps de Quick et Temps de céphaline activateur) ; ils sont augmentés et indiquent des anomalies dans les voies intrinsèques (animaux 10, 15, 18, 19) et extrinsèques (animaux 9, 10, 11, 13, 15, 18 et 19). L'activité des facteurs V, VII et X est altérée, chez ces mêmes animaux, montrant une coagulopathie significative. Enfin, on a une importante augmentation des taux de fibrine soluble (lapins 9, 10, 11 et 12) et des niveaux de D-dimères supérieurs à 8 µg/ml chez tous les animaux après 30h post-inoculation. Tout ceci est démonstratif d'une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD).

Le fibrinogène n'est pas diminué de façon significative, voire il est augmenté chez quelques animaux (12, 13, 14, 17 et 19). Cette observation est surprenante car le fibrinogène est supposé diminuer dans les cas de CIVD. Mais, ceci peut être expliqué par le fait que le fibrinogène baisse fréquemment dans les premières étapes d'une CIVD.

3. Lésions

D'inexistantes à hautement significatives, les lésions sont surtout caractérisées par l'aspect congestivo-hémorragique des différents organes cibles : poumons, foie, rate, reins, thymus et trachée pour l'essentiel. On peut les distinguer à deux niveaux (macroscopique et microscopique).

a. Macroscopiques :

Lors de mort naturelle, les narines sont souvent souillées par des écoulements de sang, on observe quelquefois un ictère particulièrement visible au niveau du pavillon auriculaire, ainsi que des pétéchies oculaires (Marcato *et al*, 1991).

A l'ouverture du cadavre, on observe parfois une dilatation des vaisseaux sanguins, dans la cavité abdominale. Ceci est accompagné d'une faible coagulation sanguine, avec des pétéchies hémorragiques au niveau de tous les organes. On note, parfois, la présence d'un hydrothorax (Marcato *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993).

Voici le tableau lésionnel organe par organe (Marcato *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993):

Trachée : La muqueuse est congestionnée, avec des pétéchies ou des hémorragies diffuses. Elle peut être remplie de mousse sanglante, de même que les bronches.

Poumon : C'est l'organe le plus sévèrement atteint, au point de vue macroscopique. Ils sont congestionnés avec des hémorragies multifocales de un centimètre de diamètre ou plus, intra-alvéolaires et péri vasculaires.

Foie : il est jaune – gris pale, de consistance fragile avec une accentuation marquée de la lobulation, ou bien, il est dilaté, sombre, rougeâtre et décoloré et, dans certains cas, a une surface granuleuse.

Reins : Ils sont dilatés avec de nombreux microthrombi sombres, rouges. Occasionnellement, ils sont décolorés, pâles.

Rate : On note une congestion, des pétéchies, une splénomégalie.

Tractus digestif : On observe parfois une gastrite catarrhale avec des érosions de la muqueuse, on a aussi une hypertrophie hyperplasique des nœuds lymphatiques mésentériques.

Thymus : Il peut être hypertrophié.

Muscles : On peut avoir une anémie dans la zone des cuisses, des pétéchies et une nécrose focale dans le myocarde.

Système nerveux central : Les vaisseaux sont dilatés dans le cortex et le cervelet. Il est congestionné avec de petites hémorragies dans le cortex.

b. Microscopiques : (Marcato *et al*, 1991), (Plassiart *et al*, 1992), (Ohlinger *et al*, 1993), (Teifke *et al*, 2002).

Si à l'ouverture du cadavre, d'un point de vue macroscopique, le poumon et la trachée semblent être les plus touchés, les lésions microscopiques les plus significatives se situent au niveau hépatique. C'est en effet là que l'on trouve la lésion caractéristique de la RHD : l'hépatite nécrosante aiguë

- **Foie** : l'observation histologique de biopsies de foie montre une hépatite nécrosante aiguë. Il s'agit d'une nécrose multifocale avec apparition de façon précoce d'un infiltrat inflammatoire. La nécrose apparaît en foyers disséminés, mais ceux-ci peuvent devenir confluents et former des aires nécrotiques extensives, surtout à la périphérie des lobules. L'infiltrat inflammatoire est léger à modéré, diffus ou focal, il est constitué de lymphocytes et de granulocytes dans les espaces portes et les sinusoides des foyers de nécrose (cet afflux peut être relié à la leucopénie périphérique). Les autres lésions hépatiques sont variées : gonflement cytoplasmique, stéatose micro vasculaire, apoptose, dépôt de pigments de bile ou de fer. Occasionnellement, on peut avoir au niveau des hépatocytes, une mégalocytose, des binucléations et enfin des granules de calcification. On note aussi des microthrombi intra sinusoidaux et une prolifération des conduits biliaires. Les modifications ultra-structurales sont nombreuses et révèlent des lésions sévères de dégénérescence et de nécrose ; par exemple, accumulation de granules de lipofuscine, de ferritine, de nombreux lysosomes,

épuisement du glycogène, gouttelettes de bilirubine, membranes fragmentant le cytoplasme, dilatation des vésicules et dégranulation du réticulum endoplasmique, altérations des mitochondries et des noyaux, calcifications granulaires... Dans de nombreux hépatocytes, ont pu être observés des agrégats de particules intranucléaires rondes de 17 nm ou 22-27 nm. Dans de rares cas, des « virus like particules » de 25-30 nm de diamètre sont présentes dans le cytoplasme des hépatocytes et des cellules endothéliales

- **Poumon et trachée** : Les biopsies de poumon révèlent des œdèmes alvéolaires, des hémorragies et des infiltrations par des granulocytes. Les capillaires de la sous-muqueuse de la trachée sont congestionnés et quelquefois infiltrés de cellules rondes. Des microthrombi sont présents dans les capillaires alvéolaires.

- **Rein** : dès 42h post-inoculation, on peut observer une congestion et de nombreux microthrombi, qui sont majoritairement localisés dans les capillaires glomérulaires et, dans les cas les plus avancés, dans les petites artérioles du cortex rénal. A partir de 54 h post-inoculation, on peut voir une dégénérescence tubulaire.

- **Organes lymphoïdes** : Dans le thymus, après 42 heures post-infection, les modifications sont caractérisées par une nécrose importante des lymphocytes de la zone corticale des lobules thymiques. Ceci peut expliquer la lymphopénie périphérique. Les lésions spléniques sont détectées à partir de 36h post-inoculation. Elles consistent en des foyers de macrophages contenant des corps tingibles et des cellules dégénérées. Une nécrose lymphocytaire a lieu dans la pulpe blanche alors que la pulpe rouge est le lieu d'une congestion et de dépôts hyalins.

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

IV. Virologie

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

1. Caractéristiques de la famille des *Caliciviridae* (Wirblich *et al*, 1996), (Clarke and Lambden, 1997), (Thèse P. Joubert, 2000), (Fauquet *et al*, 2005).

Ces virus présentent des caractéristiques morphologiques, conservées dans toute la famille. Ce sont ces caractéristiques qui leur ont donné leur nom de calicivirus. En effet, ils présentent des dépressions en forme de coupes ou de calices, à la surface de leur capsid, observables en microscopie électronique avec une coloration négative. Ce sont tous de petits virus sphériques de 30 à 40 nm de diamètre, de symétrie icosaédrique $T = 3$.

Pendant les années 1990, des avancées significatives ont été faites au niveau de la compréhension de la biologie moléculaire des calicivirus humains et animaux. Ils sont responsables de nombreuses maladies humaines et vétérinaires : les plus anciens membres de cette famille sont le Vesicular Exanthema of Swine Virus (VESV), le Feline Calicivirus (FCV) et le San Miguel Sea lion Virus (SMSV) :

- Le VESV est le virus prototype de la famille des *Caliciviridae*. Il fut responsable d'exanthèmes vésiculaires épizootiques chez le porc de 1932 à 1959, aux Etats - Unis.

- Le Féline Calicivirus (FCV) a été isolé dès 1957. Il s'agit d'un virus ubiquitaire qui est la cause majeure des maladies respiratoires et des stomatites aiguës du chat.

- Le SMSV fut isolé, quant à lui, en 1972, à partir d'un prélèvement rectal réalisé sur une otarie en Californie. Par la suite, plusieurs sérotypes ont été isolés sur divers mammifères marins et terrestres de la côte pacifique du continent Nord américain.

Au départ, on considérait la famille des *Caliciviridae* comme étant constituée d'un seul genre, mais depuis elle a été subdivisée en 4 genres. Le genre *Lagovirus* comprend RHDV et EBHSV (European Brown Hare Syndrome Virus). Le genre *Vesivirus* comprend VESV, SMSV, FCV, mais aussi, le BCV (Bovine Calicivirus) responsable de maladies respiratoires chez les bovins ou le PCV (Primate Calicivirus) responsable de maladies vésiculaires chez les primates. Les 2 derniers genres sont les *Norovirus* et les *Sapovirus* qui

comprennent des calicivirus isolés chez l'homme, provoquant : vomissements, nausées, diarrhées, douleurs abdominales, fièvre. A part ces virus qui sont les plus connus, de nombreux autres calicivirus ont été répertoriés. A ce jour, tous n'ont pas été rattachés à un genre de la famille (Canine Calicivirus (CaCV), Bovine Enteric Calicivirus (BEV), Porcine Enteric Calicivirus (PEC)...).

Tous les membres de cette famille doivent impérativement répondre à 4 critères :

- Avoir un génome constitué d'un ARN simple brin d'environ 7,5kb de polarité positive, polyadénylé en 3' avec un arrangement caractéristique d'ORF (Open Reading Frame), comprenant une petite ORF, localisée à l'extrémité 3' du génome. Celle-ci code pour une protéine basique dont le rôle précis est encore inconnu même si elle jouerait un rôle dans l'encapsidation du génome viral.

- Présenter une petite protéine VPg (pour Viral Protein linked to the genome), de 10-15 kDa, covalentement liée à l'extrémité 5' de son génome. Cette protéine jouerait un rôle dans l'initiation de la traduction et pourrait servir d'amorce à la polymérase pendant l'initiation de la synthèse d'ARN.

- Présenter une capsidie de symétrie icosaédrique composée d'une seule protéine, la protéine structurale majeure VP60.

- En analyse phylogénétique, former un groupe monophylétique ayant un ancêtre commun.

2. Caractéristiques du RHDV

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

- a. Morphologie (Ohlinger *et al*, 1990), (Parra and Prieto, 1990), (Capucci *et al*, 1991), (Lavazza *et al*, 2004).

La plupart des scientifiques qui ont étudié le RHDV ont aussi décrit sa morphologie. Bien que l'on ait remarqué quelques différences, tous reconnaissent que c'est un virus non enveloppé d'approximativement 32-35nm de diamètre et un profil icosaédrique composé de 32 capsomères. Plus précisément, la capsidie est un icosaèdre formé de 180 molécules de la protéine structurale majeure, organisées en 90 dimères.

Dans des échantillons réservés au diagnostic, observés au microscope électronique, un fort pourcentage de particules virales présente un centre électroniquement dense d'environ 23-

25 nm de diamètre, délimité par un bord d'où rayonnent dix courtes projections périphériques, distribuées régulièrement. Ces projections correspondent, probablement, aux dix capsomères les plus externes. L'aspect le plus significatif de la forme virale dégradée est la perte complète de sa portion externe : le virion devient plus petit et parfaitement hexagonal. Les dépressions semblables à des coupes, caractéristiques, typiques de la famille *Caliciviridae*, sont visibles seulement dans les formes purifiées.

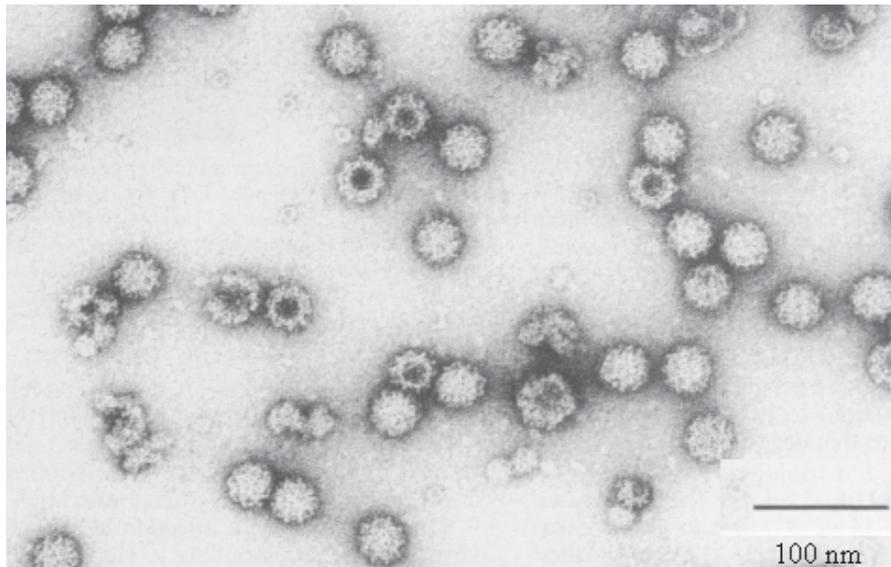


Illustration 1 : Microscopie électronique de virions de RHDV purifiés, après coloration négative avec 1% d'uranyl acétate (d'après Ohlinger *et al*, 1990).

b. Organisation génomique (Wirblich *et al*, 1994), (Clarke and Lambden, 1997), (Thèse P. Joubert, 2000)

Les membres des *Caliciviridae* possèdent un génome viral constitué d'un ARN simple brin, de polarité positive, polyadénylé en 5' de 7,5kb avec un arrangement caractéristique en cadre de lecture (ORF = Open Reading Frame), ce qui les distingue clairement des membres de la famille des *Picornaviridae*. En plus de l'ARN génomique, il a été décrit chez différents calicivirus animaux l'existence d'un ARN subgénomique de 2,2 à 2,7 kb. Il a été démontré pour le RHDV que cet ARN subgénomique était présent dans les particules virales.

Les virions du RHDV isolés de foies de lapins contaminés puis purifiés contiennent un ARN génomique de 7437 nucléotides (7,5kb) et un ARN subgénomique de 2142 nucléotides (2,2kb). Le génome du RHDV est similaire à celui de l'EBHS, mais il diffère de celui des autres calicivirus. En effet, l'ARN génomique du RHDV contient 2 ORFs, alors que celui des autres calicivirus en contient 3. Les 2 ARN sont de polarité positive, polyadénylés en 3' et liés

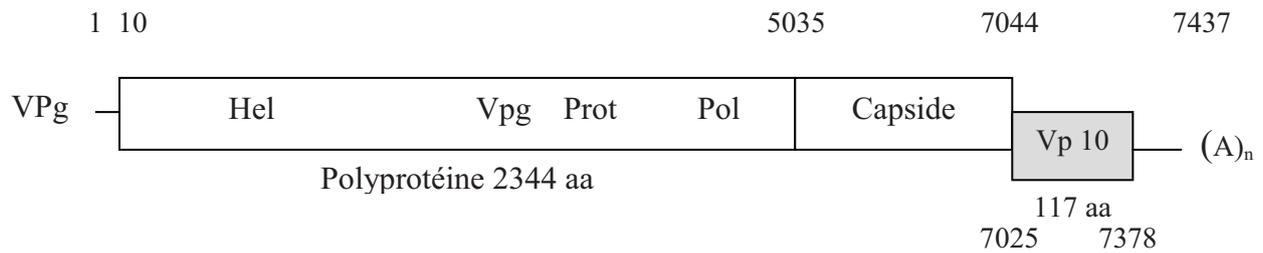
de manière covalente à une petite protéine, la VPg (10-15 kDa). Deux régions non codantes sont conservées aux extrémités 5' et 3' des 2 ARN. Les longueurs de ces régions non codantes sont respectivement de 9 et 59 nucléotides.

L'ORF 1 s'étend du nucléotide 10 au nucléotide 7041. Il code pour une polyprotéine de 257 kDa au sein de laquelle il a été identifié des protéines non structurales, une hélicase, la protéase 3C-like et l'ARN polymérase ARN dépendante, et des protéines structurales, la VPg et la protéine de capsid (VP60). Le virus de l'EBHSV a une organisation similaire. Les autres calicivirus possèdent un ORF codant pour une polyprotéine qui donnera des protéines non structurales et un autre ORF codant pour la protéine de capsid.

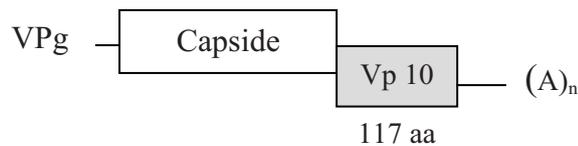
L'ORF 2 du RHDV commence au nucléotide 7025 et se termine au nucléotide 7378, ce qui correspond par la taille et la localisation sur le génome au petit ORF 3 de l'extrémité 3' des autres calicivirus. L'ORF 2 du RHDV possède 17 nucléotides chevauchant avec l'ORF 1. L'ORF 2 code pour une protéine de 117 acides aminés (12kDa) le rôle de cette protéine, nommée Vp10, restant inconnu. Même s'il ressemble beaucoup à l'ORF 3 du FCV, l'ORF 2 du RHDV est bien différent. En effet, l'ORF 3 du FCV ne présente que 3 nucléotides chevauchants et ne montre que 29% d'homologie avec l'ORF 2.

L'ARN subgénomique recouvre l'extrémité 3' de l'ARN génomique à partir du nucléotide 5296 et contient, ainsi, la fin de l'ORF 1, soit le gène codant pour la protéine de capsid et l'ORF 2. L'étude de Wirblich *et al*, 1994, montre que la traduction de l'ARN subgénomique permet, *in vitro*, la production d'une protéine de 60kDa qui co-migre avec la protéine de capsid mature. L'ARN subgénomique permettrait la synthèse de la plus grande quantité de la protéine de capsid. Il existe plusieurs hypothèses sur le rôle de l'ARN subgénomique des calicivirus. Il pourrait servir d'ARNm pour synthétiser la protéine de capsid ou bien de précurseur pouvant permettre des modifications post-traductionnelles pour générer la protéine de capsid mature.

ARN génomique :



ARN subgénomique :



aa : acide aminé

(A)_n : queue polyadénylée

□ ORF1 □ ORF2

Figure 2 : Organisation génomique du RHDV (d'après Clarke and Lambden, 1997 et Thèse P. Joubert, 2000) Hél=Hélicase, Prot=Protéase, Pol=Polymérase.

c. Organisation Protéique (Boniotti *et al*, 1994), (Wirblich *et al*, 1995), (Martin Alonso *et al*, 1996), (Wirblich *et al*, 1996), (Clarke and Lambden, 1997), (Joubert *et al*, 2000), (Thèse P. Joubert, 2000).

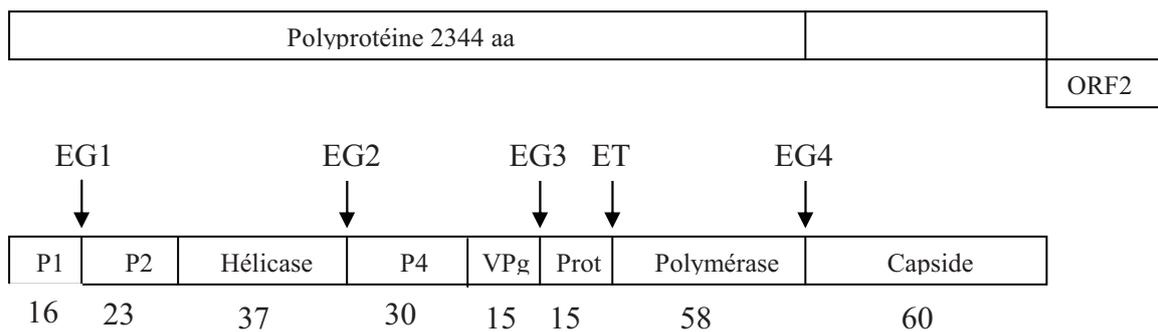
On dénombre 3 protéines décrites dans la particule virale : la protéine structurale majeure VP60, la VPg et la VP10 (protéine structurale mineure). La VPg est liée covalentement à l'extrémité 5' des ARN génomique et subgénomique. La VP10 est codée par l'ORF 2 située à l'extrémité 3' du génome et a un poids moléculaire de 10 kDa. La VP60, protéine de capsid majeure, d'un poids moléculaire de 60 kDa, est produite par la traduction de l'ORF 1 de l'ARN génomique, mais, également et en quantité plus importante, par la traduction de l'ARN subgénomique

L'ORF 1 du RHDV code pour une polyprotéine. Comme pour d'autres virus à ARN de polarité positive, l'obtention des protéines matures du RHDV requiert un clivage protéolytique qui doit être effectué sur des sites de clivages spécifiques. En 1994, l'analyse informatique de la séquence du RHDV a révélé une région située immédiatement devant la

région du gène de l'ARN polymérase qui ressemble aux protéases des *Picornaviridae*. Le RHDV code pour une protéase trypsine-like à cystéine, qui est similaire aux protéases 3C aussi bien dans ses fonctions et sa spécificité, mais qui est plus proche d'une protéase 2A au niveau de la taille.

Au départ, l'expression de l'ADNc du RHDV, *in vitro*, a permis d'identifier 4 produits dérivant de la polyprotéine, avec des masses moléculaires respectivement de : 80, 43, 73 et 60kDa en allant de l'extrémité N à l'extrémité C de la polyprotéine. Le produit de 80kDa correspond à une 2C hélicase et le produit de 60kDa à la VP60. Plus récemment, la carte génétique et l'organisation complète de la polyprotéine du RHDV ont été déterminées et montrent que le clivage de la polyprotéine donne 7 protéines non structurales ainsi que la protéine de capsid. L'ordre des gènes de l'ORF 1 est le suivant (voir figure 3) : NH₂-p16-p23-hélicase-p30-VPg-protéase-polymérase-capsid-COOH.

Pour obtenir ces 8 protéines, la polyprotéine est clivée en différents sites, par une cascade enzymatique auto-catalytique impliquant la protéase 3C-like. Il s'agit d'une protéase trypsine-like à cystéine dont la triade catalytique est définie par l'His-1135, Asp-1152 et la Cys-1212 qui représente le site nucléophile. L'activité de cette protéase a été étudiée dans différents systèmes artificiels. Cette activité se manifeste en *cis* et en *trans*. 4 sites de clivages ont été identifiés, au niveau d'une liaison peptidique entre un acide glutamique et une glycine (EG) aux positions : 143 – 144, 718 – 719, 1108 – 1109 et 1767 – 1768. Le clivage à l'extrémité acide carbonique (extrémité C) de la protéase se fait avec une efficacité plus faible que celui se faisant à l'extrémité amine de la protéase (EG 3). Le site de clivage à l'extrémité C de la protéase se fait au niveau de la liaison peptidique entre un acide glutamique et une thréonine, il se trouve en position 1251-1252.



EG : site de clivage entre acide glutamique et glycine
 ET : site de clivage entre acide glutamique et thréonine
 Prot = Protéase

Figure 3 : Représentation schématique du processus de maturation de la polyprotéine du RHDV (d'après Clarke and Lambden, 1997, et Joubert *et al*, 2000).

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

d. Propriétés

i. *physico-chimiques :*

Le RHDV est très stable et résistant dans l'environnement. Il reste stable face aux écarts de température et il résiste bien à la dessiccation. Par exemple, le virus survit au moins 225 jours dans une suspension d'organe gardée à 4°C, au moins 105 jours à l'état sec sur les vêtements à température ambiante et au moins 2 jours à 60°C, dans une suspension d'organe ou bien à l'état sec. Il conserve aussi son infectiosité aux températures basses et reste tout à fait stable pendant la congélation et la décongélation. L'infectiosité virale n'est pas réduite par traitement avec de l'éther ou du chloroforme et de la trypsine, par l'exposition à un pH 3.0, ou en chauffant à 50°C pendant 1 heure (Mitro and Krauss, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004).

Dans des conditions naturelles, la survie du virus est influencée par le temps d'exposition aux UV et aux variations de température et d'humidité mais aussi par la nature de la source virale. La stabilité de l'ARN viral détecté dans la moelle osseuse de lapin qui avait été laissée exposée à l'environnement, a été étudiée (Moss and *al*, 2002). Pendant le mois de juin 1999, des os de lapins de garenne connus RHDV-positifs, rassemblés sur l'île Ramsey (Royaume Unis), ont été placés dans un secteur protégé, exposés à l'environnement. Chaque semaine, un tibia ou un fémur contenant de la moelle a été pris et analysé par RT-

PCR et séquençage, de façon à apprécier la présence d'ARN du RHDV. Des résultats positifs ont été obtenus pendant chacune des 7 premières semaines après l'exposition des os. Ces résultats démontrent que l'ARN viral dans la moelle d'os de lapin exposés peut survivre pendant des périodes prolongées dans l'environnement, augmentant les occasions pour le virus d'être disséminé par des animaux.

Il est par contre inactivé par l'eau de javel, la soude et les phénols aux concentrations usuelles. Ces désinfectants utilisés aux concentrations usuelles, sont donc très intéressants pour la désinfection des locaux, en association avec un vide sanitaire, et du matériel (Xu, 1991). Le RHDV est inactivé par l'hydroxyde de sodium à 10 %, le formaldéhyde à 1.0-1.4 % et la bêta-propiolactone à 0.2-0.5 %. De tels traitements ne changent pas l'immunogénicité du virus, ce qui est mis à profit pour la fabrication de vaccins à virus inactivés (Lavazza and Capucci, 2004).

Pour apprécier la présence et la quantité de particules virales, dans un échantillon extrait et purifié, on peut utiliser la spectrophotométrie. En effet, des préparations fraîches de particules virales montrent une absorption d'UV maximale à 260 nm et un rapport A_{260}/A_{280} égal à 1,44 ce qui indique la présence d'ARN (Parra and Prieto 1990). Après que le matériel viral ait été extrait et purifié, à partir de foie de lapins infectés, la densité en gradient de centrifugation utilisant le chlorure de césium montre une bande visible à une densité de 1,31 à 1,36 g/cm³. 3 bandes ont été trouvées après centrifugation sur gradient de densité dans le sucrose, représentant des particules avec des coefficients de sédimentation de 175 S, 136 S et 100 S. D'autres auteurs rapportent des valeurs similaires entre 150 et 200 S. Des bandes de densité et de coefficient de sédimentation similaires ont, également, été trouvées pour les autres calicivirus. Ces densités hétérogènes correspondent à des particules ayant perdu ou non leur ARN selon les différentes valeurs de pH et conditions de stockage. Le matériel, obtenu à partir des bandes issues de centrifugation en gradient de densité, a été analysé, au microscope électronique, après coloration négative de la suspension. Des virions de tailles uniformes ont été détectés dans tous les échantillons, mais ce sont les préparations de particules de 175 S qui montrent le plus haut degré d'homogénéité et de pureté (Ohlinger *et al*, 1990), (Ohlinger *et al*, 1993).

ii. Propriétés hémagglutinantes

Le RHDV a la particularité de pouvoir agglutiner les érythrocytes humains. Cette propriété a longtemps été utilisée dans des tests diagnostiques d'hémagglutination, réalisés avec érythrocytes de groupe sanguin « O ». Des études ont, par ailleurs, montré qu'il n'y avait aucune différence significative d'hémagglutination quel que soit le groupe sanguin (A, B, O, AB) des érythrocytes humains utilisés. Le RHDV agglutine les érythrocytes humains avec des titres allant de 10×2^{12} à 10×2^{18} . Les érythrocytes de poulet, d'oie, de mouton peuvent aussi être agglutinés mais à des titres beaucoup plus faibles ($10 \times 2^2 - 10 \times 2^4$), tandis que les hématies d'autres espèces testées (vache, chèvre, rat, souris, lapin, cochon d'inde, canard...) ne peuvent pas être agglutinées (Xu *et al*, 1991), (Capucci *et al*, 1991), (Mitro and Krauss, 1993), (Ruoven-Clouet *et al*, 1995).

Le virus existe dans tous les tissus et les fluides corporels des animaux infectés. Les titres d'hémagglutination dans le foie, la rate et le sérum sont les plus importants, de l'ordre de 10×2^{10} à 10×2^{18} , par rapport aux autres tissus (Xu *et al*, 1991) (voir figure 4).

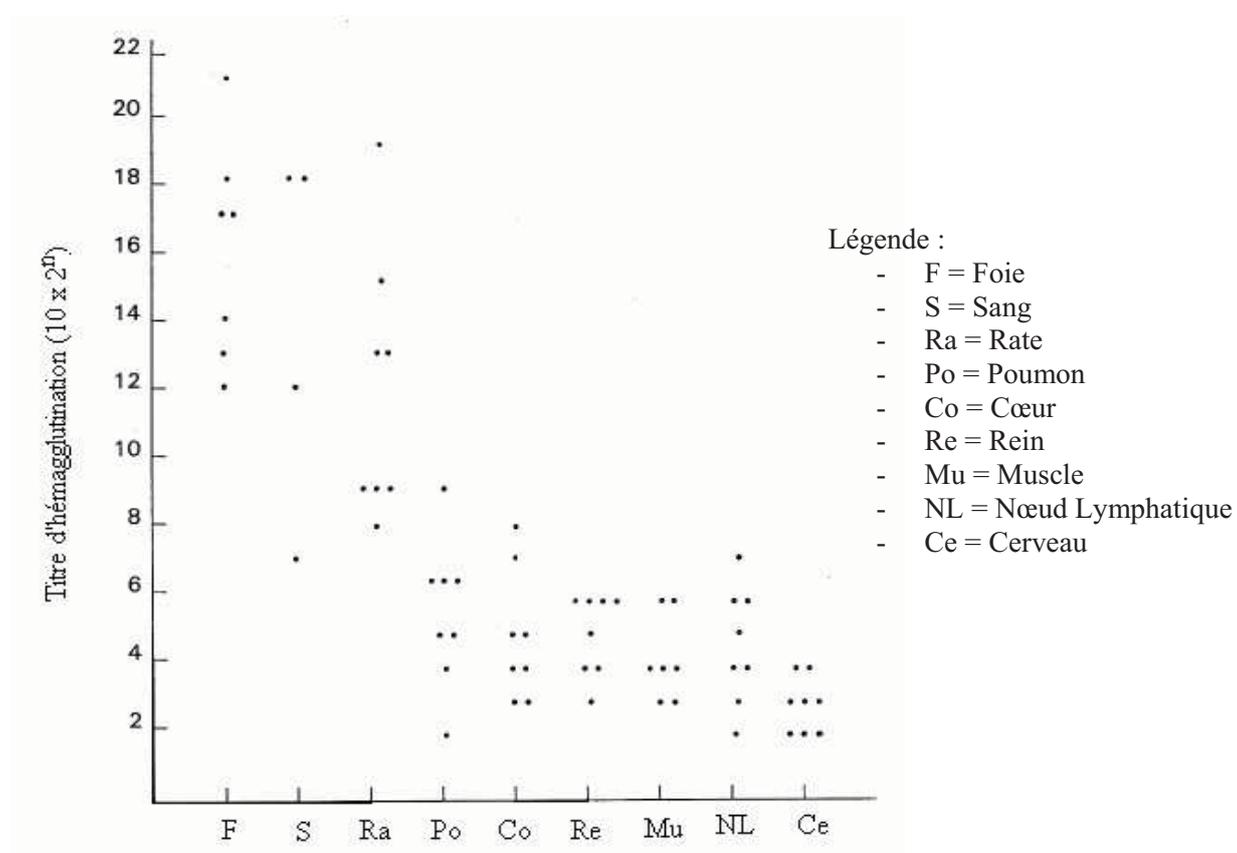


Figure 4 : Titres d'hémagglutination en fonction des organes, de lapins RHDV positifs, testés (d'après Xu *et al*, 1991).

Les températures (de 4 à 37°C) n'affectent pas significativement les propriétés hémagglutinantes du RHDV. Le titre d'hémagglutination maximal se fait à un pH optimal de 6, néanmoins le titre d'hémagglutination varie très peu de pH 4 à pH 7,2. L'activité d'hémagglutination peut être détruite par traitement avec 0,5 % de trypsine, 2 % de sodium borohydrure ou 2 % de chloramine T. Mais elle reste stable, après traitement du virus par des RDE (Receptor Destroying Enzyme), de l'éther, du chloroforme, du sodium métabisulfite, du periodate de potassium ou du formaldéhyde, ou bien après chauffage à 50°C pendant 60 min ou à 56°C pendant 15 min. Un stockage des organes infectés par le RHDV au froid, pendant une longue période ne baisse pas significativement le titre d'hémagglutination. Par exemple, quand les tissus sont gardés à 4°C et à 15°C pendant 3 mois, le titre d'hémagglutination diminue respectivement de $2^2 - 2^4$ et $2^4 - 2^6$. Cependant, des congélations et décongélations répétées sont délétères (Xu *et al*, 1991), (Capucci *et al*, 1991).

Les récepteurs viraux à la surface des érythrocytes humains sont sensibles au chloroforme, à l'éther, ce qui est en faveur de la nature lipidique du récepteur et stable à la trypsine, au périodate de potassium, au RDE et au sodium borohydrure. Ils sont, également, fortement résistants au chauffage, puisqu'un traitement à 95°C pendant 15 min n'affecte pas leur capacité à être agglutinés par le RHDV (Xu *et al*, 1991).

La capacité du RHDV à agglutiner les globules rouges humains prouve la présence de récepteurs spécifiques du RHDV à la surface des érythrocytes humains. La structure des hématies humaines est bien connue et des déterminants variés sont identifiés comme sites récepteurs de nombreuses molécules hémagglutinantes et agents pathogènes. Des tests d'hémagglutination ont été réalisés, avec des globules rouges humains et animaux, dans le but d'identifier le récepteur du virus présent sur la membrane globulaire. Les tests ont montré : que l'agglutination n'est pas modifiée par le traitement des érythrocytes par des protéases ou des glycosidases, et qu'aucune agglutination n'est obtenue avec des érythrocytes provenant de cordon ombilical ou de fœtus humains. Les glycolipides et les glycoprotéines extraits des membranes de globules rouges humains d'adultes ont été testés pour la recherche d'un éventuel pouvoir inhibiteur de l'agglutination provoqué par le virus. Ceci a montré que l'essentiel de l'activité inhibitrice est retrouvé associé aux glycolipides hautement glycosylés (polyglycosilcéramides) ; une faible mais significative activité inhibitrice est aussi associée aux glycolipides neutres. Par contre, aucune activité inhibitrice n'est contenue dans les fractions sialoglycoprotéiques délipidées. Ces résultats suggèrent donc que le récepteur du RHDV, présent à la surface des globules rouges humains, correspond à un antigène porté par

un glycolipide membranaire non exprimé avant la naissance. Enfin, une faible activité a également été trouvée au niveau de surfaces membranaires d'érythrocytes de moutons, suggérant qu'un composé glycolipidique similaire se trouve à la surface de ces cellules (Ruvoen-Clouet *et al*, 1995).

Il a été démontré que la capacité du RHDV à agglutiner les érythrocytes humains dépend de la présence d'antigène ABH à la surface de ces cellules. En effet, les érythrocytes d'individu de rare phénotype Bombay, complètement dépourvu d'antigènes ABH, ne sont pas agglutinés. De plus, les cellules de cordon ombilical présentent beaucoup moins de ces antigènes que les cellules adultes. Plus précisément, l'étude de Ruvoen-Clouet *et al*, 2000, montre que des particules virales extraites de foie de lapins infectés par le RHDV, ainsi que des particules semblables aux particules virales natives provenant de protéines de capsid virales recombinantes (VLPs : Virus-like particles), se lient spécifiquement aux oligosaccharides synthétiques A et H de type 2. Les cellules épithéliales, au niveau de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif de lapins, montrent aussi la présence d'antigènes ABH. Les 2 types de particules virales (natives et VLPs) peuvent s'attacher à ces cellules (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000).

Les tissus de jeunes lapins sont quasiment dépourvus d'antigène A ou H de type 2. En effet, ces antigènes ne sont pas (à 8 semaines) ou peu (de 8 à 12 semaines) exprimés et il n'y a qu'une très faible quantité de particules virales qui s'attachent à ces tissus. Ceci corrélé à la faible infectiosité du RHDV chez les jeunes lapins laisse supposer que les antigènes A et H peuvent participer au processus d'infection, ces cellules étant les premières rencontrées par le virus (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000).

iii. Pouvoir antigénique et immunogène

Le virus de la RHD entraîne la formation d'anticorps spécifiques. Ces anticorps peuvent être mis en évidence soit chez des animaux ayant survécu à l'infection, soit chez des jeunes lapins, résistants à la maladie, ayant été en contact avec le virus. Les anticorps anti-RHDV sont détectables 5 jours après l'infection ; leur titre se maintient pendant plus de 8 mois (Ohlinger *et al*, 1993). De plus, il s'établit une immunité transmissible au jeune par voie colostrale (Mitro and Krauss, 1993).

Le pouvoir immunogène est porté par la protéine de capsid VP60. Chez les lapins ayant survécu à l'infection, on a une séroconversion, les anticorps anti-VP60 induits sont

protecteurs (Parra and Prieto, 1990). Après l'injection simultanée de RHDV et d'anticorps monoclonaux (Mabs), il a été montré que seulement un des Mabs spécifiques du RHDV (1 H8) induisait une forte activité neutralisante *in vivo*. Par ailleurs, des Mabs présentant des réactions croisées avec l'EBHSV ont également été testés *in vivo*. Aucune activité neutralisante n'a été détectée avec ces Mabs. Ces résultats ont mené aux hypothèses suivantes. Les Mabs spécifiques du RHDV sont dirigés contre des épitopes externes et les Mabs responsables de réactions croisées avec l'EBHSV reconnaissent des épitopes internes. Par Western blot, le site de fixation du Mab neutralisant *in vivo* (le 1 H 8), a été localisé au niveau de la protéine VP60. Plus précisément, le Mab 1 H 8 serait dirigé contre des épitopes externes correspondant aux régions C-terminales de la VP60 (Capucci *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Laurent *et al*, 1997).

En 1997, un variant antigénique du RHDV nommé RHDVa a été identifié en Italie (Cappuci *et al*, 1998). Il présente un profil antigénique particulier puisqu'il ne réagit pas avec l'anticorps 1H8 qui est un anticorps protecteur contre la RHD ; par contre, des lapins vaccinés classiquement en sont protégés. Le RHDVa présente en fait des modifications de la séquence de la VP60 dans une région (acides aminés 344-434) contenant les épitopes principaux des calicivirus (Cappuci *et al*, 1998).

Les Virus-like particules (VLPs) sont des protéines similaires à la VP60, qui peuvent être produites dans divers systèmes recombinant - système baculovirus recombinant, système de poxvirus recombinant (virus myxomateux ou de la vaccine), tubercule transgénique de pomme de terre ... (Laurent *et al*, 1994), (Nagesha *et al*, 1995), (Martin Alonso *et al*, 1996), (Bertagnoli *et al*, 1996), (Barcena *et al*, 2000). Par exemple, la VP60 a été exprimé dans un système de baculovirus recombinant. Des cellules d'insectes ont été infectées par ce baculovirus recombinant. La protéine recombinante VP60 a alors été retrouvée dans le surnageant des cellules d'insectes infectées. Elle s'est auto assemblée sans nécessité d'autres composants viraux, formant ainsi des particules similaires au virus (VLPs), structurellement et immunologiquement indifférenciables du virion natif (Laurent *et al*, 1994), (Nagesha *et al*, 1995). Les VLPs ont des caractéristiques antigéniques intéressantes. En effet, elles présentent les mêmes propriétés antigéniques et immunogènes que les particules virales natives. De nombreuses études explorent les possibilités de production de VLPs dans différents systèmes. En effet, les VLPs permettent l'obtention de plus grandes quantités d'antigènes viraux qu'avec des préparations de virus provenant de foies de lapins infectés. Les perspectives sont importantes pour la fabrication de vaccins ne présentant pas de risque pour les lapins

domestiques, ou de vaccins permettant la vaccination des lapins de garenne (Laurent *et al*, 1994), (Nagesha *et al*, 1995), (Bertagnoli *et al*, 1996), (Barcena *et al*, 2000).

3. Caractères cultureux

Le RHDV est difficile à faire croître en culture cellulaire. A l'heure actuelle, le RHDV n'est toujours pas adapté à la culture cellulaire malgré les très nombreuses lignées testées (RK, PK-15, BHK-21, MA-104, IBRS-2, HeLa, Vero...). De même, des essais de propagation de l'agent viral dans des œufs embryonnés de poulet sont restés infructueux (Xu *et al*, 1991), (Mitro and Krauss, 1993). Des équipes chinoises avaient réussi des cultures cellulaires du RHDV sur des cellules épithéliales provenant de reins de lapin nommées DJRK (pour Du and Ji Rabbit Kidney) mais ces résultats n'ont pas pu être confirmés, vraisemblablement parce qu'ils concernaient un parvovirus et non le RHDV (Ji *et al*, 1991). Les méthodes d'inoculation ont également été modifiées, par exemple, par inoculation juste après l'adsorption des cellules sur une surface en verre, par inoculation de cellules en phase S, en substituant le sérum de lapin par du sérum de veau... Aucune modification n'a été un succès (Xu *et al*, 1991).

Actuellement, pour obtenir du virus, par exemple pour la préparation de vaccins, on inocule volontairement des lapins sains, avec des broyats d'organes (foie, rate ou poumon) de lapins infectés. Plusieurs voies d'administration peuvent être utilisées : voie intramusculaire, intraveineuse, intra nasale, intra péritonéale, orale ou sous-cutanée. On observe généralement la mort des lapins inoculés dans les 48 à 72 h (Mitro and Krauss, 1993), (Ohlinger *et al*, 1993).

Etant donné la difficulté de multiplier le virus RHDV en culture cellulaire, la plupart des études menées sur la maturation de la polyprotéine et sur l'organisation génomique ont été réalisées *in vitro*, en systèmes bactériens (*Escherichia coli*) (Martin Alonso *et al*, 1996), en systèmes eucaryotes acellulaires (réticulocytes lysés...(Martin Alonso *et al*, 1996), (Joubert *et al*, 2000)), en cellules infectées (des hépatocytes de lapin (Konig *et al*, 1998)). Par exemple, pour permettre l'exécution d'études *in vitro*, des hépatocytes de lapin ont été isolés par perfusion de foie et gradient de centrifugation. Après inoculation avec du RHDV purifié, plus de 50 % des hépatocytes se sont avérés infectés, permettant la détection de 13 polypeptides spécifiques du RHDV. Ceci a permis d'aboutir à un modèle précis d'organisation génomique du RHDV (Konig *et al*, 1998). Un autre exemple de méthode ayant permis l'étude du RHDV ,

est la construction de plasmides, incluant le gène luciférase, permettant la traduction des protéines du RHDV dans divers systèmes d'expression (Joubert *et al*, 2000).

En 2006, le premier clone infectieux du RHDV, a été construit. C'est un clone de la souche JX/CHA/97 du RHDV, contenant un nucléotide silencieux (nucléotide 2908) servant de marqueur génétique. L'injection directe à des lapins des ARN transcrits à partir de ce clone ADNc a effectivement déclenché une infection. Les virus, récupérés à partir de ces lapins, contenaient le marqueur génétique. Par ailleurs, la transfection d'ARN transcrits dans des cellules RK-13 a abouti à la synthèse d'antigènes viraux, indiquant que les clones d'ADNc sont capables de se répliquer. Ce clone moléculaire infectieux stable est un outil important pour les recherches à venir, permettant une meilleure compréhension de la biologie moléculaire et de la pathogénie du RHDV (Liu *et al*, 2006).

V. Pathogénie

1. Voie d'entrée et dissémination du virus

Le virus RHDV pénètre naturellement majoritairement par la voie orale, mais d'autres voies de pénétration sont possibles : la voie respiratoire, la voie conjonctivale et enfin la voie transcutanée à la faveur d'une plaie (Marcato *et al*, 1991).

On l'a vu précédemment dans les propriétés hémagglutinantes du RHDV, le virus est capable de s'agglutiner aux érythrocytes humains et surtout de s'attacher aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif des lapins de plus de 2 mois, par l'intermédiaire d'antigène de groupe sanguin ABH. Les jeunes lapereaux, qui ne sont pas sensibles au RHDV, n'expriment pas les antigènes ABH. Cette observation suggère, même si elle n'est pas prouvée, que la capacité du RHDV à s'attacher aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif chez les lapins matures participent au processus infectieux et à l'entrée du virus dans l'organisme (Ruvoen-Clouet *et al*, 2000).

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

72 et 106 heures, il peut être détecté dans grand nombre de phagocytes mononucléaires du sang et des tissus (Moussa *et al*, 1992). D'autres études, basées sur la détection de l'ARN viral par RT-PCR dans les différents tissus atteints, montrent la présence dès 18h post-inoculation du RHDV dans le foie et la rate (Thèse P.Joubert, 2000).

2. Cellules cibles :

Une étude (Gelmetti *et al*, 1998) a comparé différentes techniques de mise en évidence du RHDV (ELISA, Hybridation in situ, et test immunohistochimique), dans des tissus de lapins après infection expérimentale par voie oro-nasale. Cela a confirmé des études précédentes suggérant que le foie est le site le plus important de la réplication du RHDV. L'hybridation in situ a montré que la réplication virale débute immédiatement après l'inoculation, en mettant en évidence la présence d'ARN du RHDV dans le cytoplasme des hépatocytes 8h post-infection.

Même si le RHDV se réplique majoritairement dans les hépatocytes, d'autres études montrent que le RHDV a d'autres types cellulaires cibles où il peut également se répliquer (Moussa *et al*, 1992), (Teifke *et al*, 2002). En effet, des antigènes spécifiques ont été détectés en plus petite quantité dans la rate, les poumons et les nœuds lymphatiques. Une méthode de double immunomarquage a permis d'identifier des cellules infectées par le RHDV, dans d'autres organes lésés. Il s'agit majoritairement de cellules phagocytaires mononucléaires tels que les macrophages des tissus hépatiques, alvéolaires, des organes lymphoïdes ou de la pulpe rouge splénique mais aussi des monocytes circulants et des cellules de Küpffer (Thèse P. Joubert, 2000).

3. mécanisme pathogénique (Marcato *et al*, 1991), (Plassiart *et al*, 1992), (Thèse P. Joubert, 2000).

L'observation de particules virales dans les hépatocytes peu de temps après l'infection, ainsi que les altérations ultra structurales du foie, suggèrent que les dommages nécrotiques et inflammatoires de cet organe sont le point central de la pathogénie du virus. Le RHDV induit, au cours de sa réplication, la mort des hépatocytes par apoptose. En effet, on détecte l'apoptose au niveau des hépatocytes infectés 40h post-infection.

Les lésions microscopiques de thrombi de fibrine trouvées dans la microcirculation de nombreux organes, ainsi que les modifications hématologiques (prolongation des temps de coagulation, baisse du nombre de plaquettes...) sont en faveur d'une coagulopathie de consommation, une CIVD (coagulation intra vasculaire disséminée), donnant lieu à une défaillance de la coagulation sanguine et à des hémorragies multifocales. Cette CIVD résulte de plusieurs mécanismes :

- La nécrose hépatique favorise la CIVD en activant les facteurs extrinsèques de la coagulation, libération massive de thromboplastine. Par ailleurs, les lésions hépatiques en association avec les lésions spléniques empêchent la clairance et le renouvellement des facteurs de coagulation activés, ce qui est un facteur additionnel de CIVD.
- La CIVD est aussi directement viro-induite. En effet, il apparaîtrait que la CIVD et la nécrose hépatocellulaire surviennent simultanément. Dans l'étude de Plassiart *et al* (1992), l'observation d'un lapin est en faveur de cette hypothèse. Ce lapin a présenté une concentration élevée en complexes solubles et en D-dimères sans présenter d'hépatite. On aurait une induction périphérique de la CIVD par des lésions endothéliales disséminées (voie intrinsèque de la coagulation) provoquées par la virémie. Deux mécanismes peuvent expliquer les lésions endothéliales : la réplication virale induisant une lyse rapide ou bien un mécanisme indirect lié à l'agrégation de monocytes infectés sur la surface endothéliale des vaisseaux favorisant alors la sécrétion de cytokines par ces monocytes de même que l'expression de facteurs pro-coagulants sur la surface endothéliale.
- Enfin, la réaction anticorps-antigènes en créant des complexes immuns est connue pour provoquer des microthromboses. Cependant, l'évolution rapide de la maladie rend ce phénomène improbable ou mineur s'il est présent.

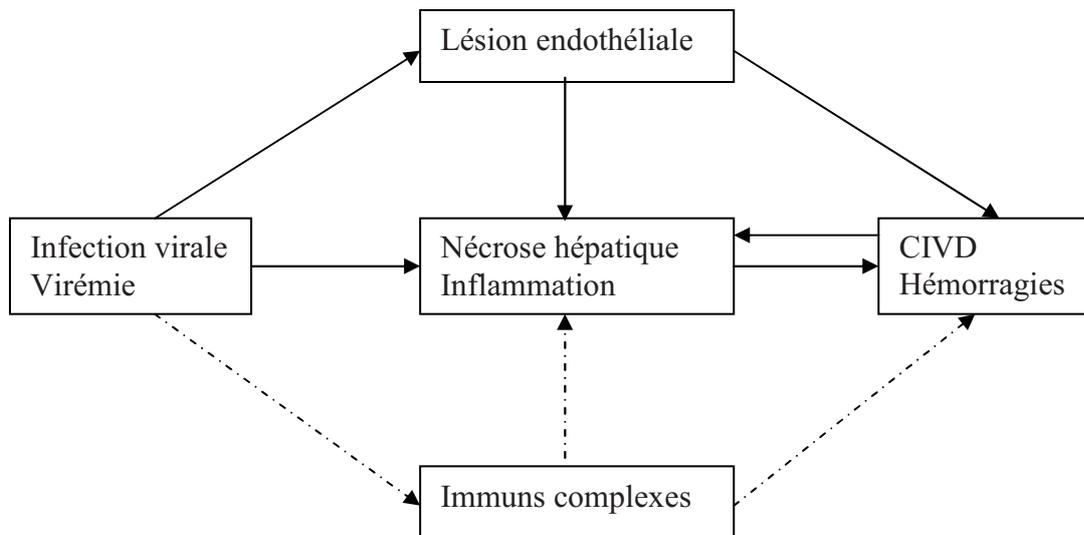


Figure 5 : Pathogénie hypothétique de la nécrose hépatique lors de RHD (d'après Marcato *et al*, 1991).

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

4. Survenue de la mort

La maladie a une évolution très rapide, de par l'initiation de la CIVD qui conduit à de multiples défaillances organiques par ischémie et à de multiples hémorragies : nécrose des surrénales, désordres circulatoires au niveau des reins, nécrose hépatique, œdèmes et hémorragies pulmonaires, tout ceci contribuant à un choc fatal.

VI. Diagnostic

1. Diagnostic de suspicion sur le terrain

Généralement les critères épidémiologiques, ainsi que les symptômes et les lésions qui sont variables, orientent le diagnostic de par leur caractère aigu, hémorragique. En effet, une mortalité élevée et brutale sur les lapins de plus de 2 mois en bon état général, avec la présence de signes cliniques tels que des épistaxis, des signes nerveux même s'ils ne sont pas toujours présents, et à l'autopsie, les lésions macroscopiques peuvent être assez évocatrices de la maladie (aspect congestivo-hémorragique des organes, lésions pulmonaires, trachéales, hépatiques...) renforcent la suspicion. Mais les observations de terrain ne donnent qu'une suspicion, qui doit être confirmée par des analyses de laboratoire pour avoir le diagnostic de certitude. En effet le diagnostic différentiel comprend des septicémies causées par des pasteurelles, des staphylocoques, qui provoquent, également des morts soudaines, des intoxications, coup de chaleur...(Mitro and Krauss, 1993).

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

2. Diagnostic de certitude au laboratoire

a. Mise en évidence de l'agent

On utilise des biopsies de foie, car c'est l'organe qui contient le plus fort titre viral (de 10^3 à $10^{6,5}$ DL50). La quantité de virus qui se trouve dans les autres parties du corps est directement proportionnelle à la vascularisation. Ainsi la rate et le sérum sont très riches en virus et peuvent servir de matériel alternatif pour faire le diagnostic. En cas de forme chronique ou subaiguë de la maladie, le plus haut titre de particules virales se trouvera dans la rate.

Le traitement initial de l'échantillon consiste en une homogénéisation mécanique d'un fragment d'organe dans 5-20% de PBS (Phosphate Buffer Saline), de pH 7,2, puis il faut filtrer et centrifuger l'échantillon. Le surnageant pourra être directement examiné par ELISA ou par test d'hémagglutination. Par contre, si l'échantillon doit être observé par microscopie électronique, il faut une seconde centrifugation, avant l'ultracentrifugation finale.

Après traitement initial, le virus reste stable à température ambiante, mais il est quand même préférable que les autres étapes se fassent à 4°C (Capucci *et al*, 1991), (Lavazza and Capucci, 2004).

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

- L'infection expérimentale

Elle ne peut être pratiquée que sur l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Elle doit être réalisée sur des lapins sensibles au virus, de plus de 40-50 jours et dépourvus d'anticorps spécifiques. Les lapins sont inoculés avec des suspensions de foie filtrées ayant subi un traitement antibiotique. Les animaux sont inoculés par voie intramusculaire, intraveineuse ou oronasale. Quand la maladie se manifeste cliniquement, les signes cliniques et les lésions sont similaires à ceux d'une infection naturelle. Une augmentation de la température corporelle est enregistrée entre 18 et 24 heures post-infection suivie dans 70 à 90 % des cas de la mort entre 24 et 72 heures même si certains individus peuvent survivre jusqu'à 6 jours après l'infection. Si la maladie persiste et devient chronique, l'ictère est le symptôme majeur, mais les signes cliniques (une hyperthermie, dépression et anorexie passagères) restent légers ; dans tous les cas, les animaux présentent une séroconversion détectable 5-6 jours post-infection (Capucci *et al*, 1991), (Lavazza and Capucci, 2004).

L'infection expérimentale n'est pas pratiquée en routine mais elle peut s'avérer utile en cas de résultats non interprétables avec les autres tests ou pour le diagnostic initial de la maladie dans un pays indemne.

- Le test d'hémagglutination

Il est fondé sur la capacité du RHDV à agglutiner les hématies humaines. On le réalise avec des hématies de groupe sanguin O fraîchement collectées. Ce fut le premier test utilisé pour le diagnostic de laboratoire de la RHD. Mais actuellement, il a été remplacé par l'ELISA à cause de sa faible sensibilité et spécificité, des difficultés de standardisation et d'approvisionnement en hématies et du risque lié à la manipulation de globules rouges humains. Une comparaison du test d'hémagglutination (HA), de la microscopie électronique (ME) et de l'ELISA a été réalisée sur 1 000 prélèvements traités en parallèle avec les 3 techniques. Les résultats ont montré 8 % de faux positifs avec l'HA ce qui peut s'expliquer

par la présence de facteurs d'hémagglutination non spécifiques tels que des pasteurelles ou des parvovirus. De même, le taux de faux négatif est de 9 %, ce qui s'explique pour 5 % d'entre eux par la présence de formes dégradées de la capsid virale, et par un trop faible taux d'antigène pour les 4 % restants (Capucci *et al*, 1991), (Chasey *et al*, 1995), (Lavazza and Capucci, 2004).

- La microscopie électronique

Elle se réalise après coloration négative. On cherche à identifier des particules virales selon leurs caractéristiques morphologiques.

Néanmoins, on utilise plus fréquemment, pour le diagnostic l'immuno-électro microscopie (IEM). Des sérums hyper immuns anti-RHDV ou des anticorps monoclonaux spécifiques sont incubés avec l'échantillon puis centrifugés. La réaction immunologique qui se produit induit la formation d'agrégats de particules virales qui sont alors plus facilement et rapidement identifiées par ME. L'IEM a une sensibilité et une spécificité supérieures à l'HA et à peu près équivalentes à l'ELISA. Les limites de cette technique sont son coût et le temps qu'elle nécessite. C'est pourquoi, elle n'est utilisée que dans les cas où un doute persiste après l'utilisation d'autres méthodes plus rapides (Capucci *et al*, 1991), (Lavazza and Capucci, 2004).

- L'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

L'ELISA permet la détection des antigènes viraux. La détection par technique ELISA est basée sur des méthodes « sandwich » ; il existe plusieurs variations dans la technique, différant par le système enzymatique et les réactifs immunologiques utilisés. Dans tous les cas, un sérum hyper immun anti-RHDV de lapin est directement adsorbé sur une phase solide, tandis que différents traceurs peuvent être utilisés (anticorps couplés à une enzyme, type peroxydase, phosphatase..., pour reconnaître l'antigène capturé. Pour bien caractériser l'antigénicité du virus, il est préférable de tester chaque échantillon avec un sérum poly-clonal anti-RHDV (qui pourrait identifier un potentiel nouveau variant ou un calicivirus apparenté) et aussi deux types d'anticorps monoclonaux. Le premier type d'anticorps reconnaît des déterminants antigéniques présents à la surface du virus qui sont exprimés par la forme classique et également par le variant RHDVa. Le second type d'anticorps reconnaît les épitopes internes, ce qui permet de détecter les particules lisses, dégradées et également

l'EBHSV. On utilise un sérum de lapin normal pour pouvoir exclure des réactions non spécifiques.

L'ELISA est une technique avec une bonne sensibilité et spécificité qui peut être facilement utilisée en pratique (avec les anticorps monoclonaux, la sensibilité est la même que pour l'IEM) (Capucci *et al*, 1991), (Ohlinger *et al*, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004). Les particules virales généralement recherchées sont classiquement obtenues, à partir de foie infecté, par broyage, homogénéisation et centrifugation. Mais, dans les dernières années, il a été montré que pour simplifier la préparation de l'échantillon, il était possible d'utiliser directement l'exsudat qui se forme après décongélation de l'organe (Le Gall-Recule *et al*, 2001).

- L'immunocoloration

Cette technique est utilisée pour la détection d'antigènes viraux sur des coupes d'organes. Une coloration intense du noyau ainsi qu'une coloration plus diffuse du cytoplasme des cellules hépatiques nécrotiques, en particulier dans les zones périportales sont caractéristiques et spécifiques. Une coloration des macrophages et des cellules de Kupffer, mais aussi dans les macrophages alvéolaires, de la rate, et des nœuds lymphatiques et enfin dans les cellules mésangiales rénales, peut également être observée (Lavazza and Capucci, 2004).

- La technique de Western blot

Cette technique est utilisée quand l'hémagglutination ou l'ELISA donnent des résultats douteux (de faible positivité) ou lorsque l'on suspecte la présence de particules lisses. Les protéines peuvent être détectées par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Si les anticorps monoclonaux sont utilisés, ils peuvent reconnaître des épitopes contigus. Les anticorps monoclonaux sont plus efficaces que les sérums hyper immuns anti-RHDV de lapin pour reconnaître une même bande. Pour les échantillons positifs et les témoins positifs, on détecte des protéines de différents poids moléculaire : certaines de 60 kDa correspondant à la protéine structurale majeure et d'autres, plus petites allant de 41 à 28 kDa correspondant aux fragments de VP60 (associées à la transition entre les particules RHDV et les particules lisses) (Lavazza and Capucci, 2004).

- La RT-PCR (reverse transcriptase-polymérase chain reaction)

Cette technique permet la détection de l'acide nucléique du RHDV. Elle peut être réalisée à partir d'échantillons d'organes, de sérum, d'urine ou de fèces. Les ADNc sont obtenus par une réaction de reverse transcription et sont, ensuite, amplifiés par différentes amorces d'oligonucléotides. Pour révéler les produits PCR, on fait une électrophorèse, le mélange d'ADN amplifié est mis à migrer sur un gel d'agarose. Si besoin, la spécificité des produits PCR peut être déterminé par séquençage ou par transfert sur un filtre de nylon qui peut être hybridé avec un marqueur interne et examiné par autoradiographie. Une méthode de RT-PCR similaire peut être utilisée pour identifier des calicivirus de lapins non pathogènes.

La RT-PCR est une méthode très sensible pour la détection du RHDV (10^4 fois plus que l'ELISA) mais il n'est pas réellement nécessaire de la pratiquer pour le diagnostic de routine. Son utilisation est plus appropriée pour les études d'épidémiologie moléculaire ou pour les recherches portant par exemple sur la pathogénie, la détection de virus chez des hôtes non spécifiques ou des vecteurs (Lavazza and Capucci, 2004).

Une RT-PCR avec immunocapture a également été décrite, utilisant directement l'exsudat de foies décongelés. Des anticorps adsorbés sur une phase solide permettent la capture des virus ; la réaction de RT est ensuite réalisée directement à partir de l'ARN viral sans qu'une étape de purification ou d'extraction ne soit nécessaire. Cette méthode est donc plus simple et plus rapide qu'une RT-PCR classique (Le Gall-Recule *et al*, 2001).

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

Une infection par le RHDV peut, également, être diagnostiquée par la détection d'anticorps spécifiques. La réponse humorale ayant une grande importance dans la protection des animaux, la détermination du titre en anticorps spécifiques après la vaccination ou sur des animaux convalescents a une valeur prédictive sur la capacité des lapins à résister à une infection par le RHDV. Néanmoins des données épidémiologiques suggèrent l'existence d'une forme non pathogène antigéniquement liée au RHDV mais sans réactions humorales croisées protectrice.

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

ces méthodes a des avantages et des inconvénients. En ce qui concerne la disponibilité des réactifs et la complexité technique du test, l'hémagglutination est la méthode la plus commode, suivie, respectivement, par l'ELISA indirecte et l'ELISA compétition. D'autre part, les tests ELISA sont plus rapides et plus faciles que l'hémagglutination, particulièrement quand un grand nombre d'échantillons est à évaluer. La spécificité de l'ELISA de compétition est, manifestement, plus haute que celles des deux autres méthodes. Pour améliorer l'interprétation sérologique et pour correctement classifier le statut immunologique des lapins, une combinaison de techniques ELISA distinguant IgA, IgM et des réponses d'anticorps IgG est aussi disponible.

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

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

- ELISA compétition : le sérum est incubé avec une concentration connue d'antigènes de RHDV puis les anticorps spécifiques présents dans le sérum sont indirectement quantifiés par la liaison entre l'antigène et des anticorps anti-RHDV conjugués à une enzyme ajoutée à la réaction. On peut utiliser du sérum contenant un haut titre en anticorps anti-RHDV (sérum de lapins convalescents ou sérum de chèvre ou de mouton immunisés par du RHDV purifié) ou bien des anticorps monoclonaux. Le titre du sérum correspond à la dilution qui réduit de 50 % l'absorbance du contrôle négatif.

VII. Prophylaxie

La RHD étant une affection virale, aucun traitement spécifique n'est disponible à l'heure actuelle. De plus, étant donné la rapidité d'évolution de la maladie et la courte durée d'incubation, la mise en place d'un traitement ne serait pas réalisable en pratique. Toute lutte contre la RHD repose donc sur la prophylaxie. Pour cela, nous disposons de moyens sanitaires ou médicaux.

1. Prophylaxie sanitaire

a. Prophylaxie sanitaire défensive

Pour éviter l'entrée du virus dans un territoire ou dans une exploitation, il faut mettre en place des mesures sanitaires défensives (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993):

- Les lapins qui sont introduits dans un élevage doivent provenir d'élevages indemnes ou être testés sérologiquement pour le RHDV et doivent être placés en quarantaine pendant une période d'environ 2 semaines. On peut mettre des lapins sentinelles, avec les nouveaux lapins introduits.

- Il faut éviter, au maximum, le contact des lapins domestiques avec les lapins de garenne et les lièvres. De même, l'entrée de visiteurs, en particulier d'autres éleveurs de lapins, les foires, les expositions doivent être proscrits.

- Les aliments préparés (foin, granulés) doivent être préférés aux fourrages verts

- Il faut prendre des mesures d'hygiène strictes (désinfection du matériel, changement de vêtements ...).

- Il faut mettre en place une lutte efficace contre les vecteurs potentiels (dératisation, grillage contre les oiseaux...).

La prophylaxie sanitaire est également importante pour éviter la diffusion du RHDV d'un pays à l'autre. C'est pourquoi, à l'échelle nationale et internationale, des mesures défensives portent sur les échanges commerciaux qui sont strictement réglementés. Les normes sont précisément définies dans le chapitre 13.2 du code sanitaire pour les animaux terrestres (OIE. Code sanitaire pour les animaux terrestres. 15^{ème} édition. 2008). Des normes différentes sont décrites pour tous les types de marchandises (lapins domestiques ou lapereaux d'un jour destinés à la reproduction, lapins domestiques destinés à l'abattage immédiat, semence, viandes, peaux non traitées) en provenance d'un pays indemne ou considéré comme infecté. Le certificat vétérinaire international qui doit accompagner les animaux et qui est exigé par les administrations vétérinaires des pays importateurs atteste que les conditions sont bien remplies. Par exemple, les recommandations concernant les importations en provenance de pays indemnes de maladie hémorragique du lapin, de lapins domestiques destinés à la reproduction stipulent que les Autorités vétérinaires des pays importateurs doivent exiger la présentation d'un certificat vétérinaire international attestant que les animaux :

- ne présentaient aucun signe clinique de maladie hémorragique du lapin le jour de leur chargement ;

- ont été entretenus depuis leur naissance, ou au moins durant les 60 derniers jours, dans un pays indemne de maladie hémorragique du lapin.

b. Prophylaxie sanitaire offensive

La prophylaxie sanitaire offensive sert à éliminer le virus d'une zone, lorsque la maladie s'y est déclarée. Les mesures sanitaires offensives consistent en :

- un abattage des animaux malades et suspects
- une destruction efficace des carcasses (incinération)
- une désinfection des locaux et du matériel en utilisant des procédures efficaces et recommandées contre les virus non enveloppés, par exemple du formol à 10 %, de la soude à 2 %.
- la réalisation d'un vide sanitaire (6 semaines).

Il est recommandé d'associer la vaccination à ces mesures sanitaires, en particulier dans les élevages industriels (Ohlinger *et al*, 1993), (Mitro and Krauss, 1993).

2. Prophylaxie médicale

Il n'existe pas de traitement contre la RHD, la seule prophylaxie médicale possible est donc la vaccination. Attention tout de même, on ne peut pas vacciner les animaux destinés à être exportés avec un statut séronégatif, car les anticorps induits par la vaccination sont identiques à ceux induits par une infection. Dans tous les cas, la prophylaxie sanitaire reste le point essentiel. C'est la seule possible pour les exploitations souhaitant exporter des animaux séronégatifs et, dans les exploitations où l'on vaccine, elle reste importante car il existe un réservoir sauvage du virus, sur lequel il est difficile d'agir.

a. Nature et obtention du vaccin

La vaccination, usuellement réalisée, se fait avec un vaccin à virus inactivé et adjuvé et ne concerne que les lapins domestiques. C'est le moyen le plus efficace, pour contrôler la RHD. Tous les vaccins sont dérivés d'homogénats d'organes préparés à partir de lapins infectés avec des suspensions de RHDV partiellement purifiées. Les foies sont prélevés sur les lapins mourant dans les 24 et 72 heures qui suivent l'inoculation puis ils sont broyés. Le virus est inactivés par différentes méthodes telles que des traitements au formaldéhyde, à la beta-propiolactone... Quant aux adjuvants utilisés, il s'agit de l'hydroxyde d'alumine ou d'adjuvants huileux. Les vaccins à virus inactivés et adjuvés sont les seuls commercialisés.

Ces dernières années, de nombreuses études, de nouvelles stratégies vaccinales, utilisant des vaccins recombinés exprimant la protéine de capsid VP60 du RHDV, ont été élaborées. L'expression de la VP60 se fait dans divers systèmes selon les protocoles expérimentaux : virus de la myxomatose recombinés, plants de patates transgéniques, système baculovirus... (Laurent *et al*, 1994), (Bertagnoli *et al*, 1996), (Castanon *et al*, 1999), (Barcena *et al*, 2000), (Torres *et al*, 2001), (Martin-Alonso *et al*, 2003). Les résultats des études présentant des vaccins recombinants sont concluants. En effet, ceux-ci induisent des niveaux d'anticorps assez élevés chez les lapins inoculés.

Les perspectives envisagées avec les vaccins recombinants sont importantes. En effet, certains permettent de vacciner contre plusieurs maladies en même temps : la plupart du temps, ils associent la VP60 recombinante à une souche de virus de la myxomatose (Bertagnoli *et al*, 1996), (Torres *et al*, 2001) (Barcena *et al*, 2000). D'autres part, l'amélioration apportée par les vaccins recombinants doit permettre la vaccination des lapins de garenne. En effet, plusieurs recombinants ont des voies d'administration compatibles avec la vaccination des populations sauvages : administration par voie orale, dont des travaux portant sur des plantes transgéniques (plants de pommes de terre) (Castanon *et al*, 1999), (Barcena *et al*, 2000), (Martin-Alonso *et al*, 2003). Enfin, certains recombinants ont permis une transmission horizontale, certes limitée, mais présente, de l'immunisation. Le vaccin recombinant réalisé dans l'expérimentation de Barcena *et al* (2000), montre une capacité de transmission horizontale limitée soit par contact direct, soit par l'intermédiaire de puces, induisant l'immunisation des lapins non inoculés. Le vaccin recombinant mis en place par Torres *et al* (2001), quant à lui, permet une séroconversion par contact d'environ 50 % de la population de lapins.

b. Utilisation du vaccin

Le protocole usuel d'administration des vaccins à virus inactivés consiste en deux administrations à deux semaines d'intervalle. Normalement, on inocule une dose de 1 ml en sous-cutanée dans la région du cou. Après vaccination, les anticorps apparaissent dans un délai de 4 à 14 jours, et persistent au moins 6 mois et jusqu'à plus d'un an. La protection est maximale à partir de 3 semaines, et ceci jusqu'au sixième mois. Dans des populations où il n'y a aucun antécédent de RHD, il est recommandé de vacciner seulement les reproducteurs ; la première injection doit se faire à l'âge de 2-3 mois. Les animaux doivent être vaccinés annuellement, afin d'assurer un bon niveau de protection. La vaccination des animaux destinés

à la production de viande n'est pas nécessaire si la maladie n'est pas arrivée dans l'élevage. Après une épidémie de RHD, on recommande fortement de vacciner les animaux de boucherie à l'âge de 40 jours, même si on adopte des mesures sanitaires tels que le nettoyage, la désinfection, l'incinération des carcasses et un vide sanitaire avant le réapprovisionnement, parce que l'incidence de réinfection est très élevée. C'est seulement après plusieurs cycles de production qu'on peut envisager d'arrêter la vaccination des lapins à viande, en commençant par un petit groupe de lapins sentinelles afin de vérifier l'absence de RHDV au sein de l'unité (Lavazza and Capucci, 2004).

Les lapins ayant survécu à un épisode de RHD, doivent être vaccinés le plus rapidement possible, dès que la RHD a été confirmée sur les cadavres ou les animaux malades. Les pertes sont diminuées dès les 5 ou 6 jours qui suivent la vaccination (Mitro and Krauss, 1993), (Ohlinger *et al*, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004).

Le vaccin devrait être stocké à 2-8°C et il ne doit pas être congelé, ou exposé à des hautes températures ou à un éclairage trop important (Lavazza and Capucci, 2004).

c. Sérum hyper immun :

En cas d'épidémie déclarée, l'administration de sérum hyper immun est efficace dans la constitution rapide d'une protection contre l'infection à RHDV mais ces sérums sont de conservation limitée. Après l'administration, la mortalité diminue drastiquement en deux jours (Mitro and Krauss, 1993), (Lavazza and Capucci, 2004).

DEUXIEME PARTIE :

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CALICIVIRUS
APPARENTES AU RHDV**

DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CALICIVIRUS APPARENTES AU RHDV

I. Preuves de l'existence de tels virus

Le RHDV est un virus qui est défini comme extrêmement pathogène avec chez plus de 80% des animaux infectés une forte morbidité, un taux de mortalité élevée, des lésions histopathologiques étendues. De plus, le faible nombre de lapins survivants au RHDV développent, au moins pendant un an après l'infection, un fort titre d'anticorps anti-RHDV. Or durant la dernière décennie, plusieurs études sérologiques réalisées dans différents pays sur des lapins ne présentant pas de signes cliniques de RHD ont montré des lapins RHDV séropositifs. L'existence de virus proches du RHDV non pathogènes, capables d'entraîner une séroconversion des animaux infectés même en l'absence de signes cliniques a donc été suspectée.

En effet, une étude rétrospective réalisée sur des sera collectés sur des lapins de laboratoire ne présentant aucun signe clinique, entre 1975 et 1985, en république tchèque, a montré la présence d'anticorps qui ont des réactions croisées avec le RHDV. De même, en Italie, une étude sérologique a montré que la fréquence de séropositivité des lapins était élevée sans qu'elle soit corrélée aux signes cliniques sévères normalement associés à une infection par le RHDV (Capucci *et al*, 1996). Une autre étude sérologique recherchant des anticorps anti-RHDV, a été réalisée sur 238 lapins issus d'élevages industriels où aucun signe clinique de la RHD n'a été identifié depuis 4 ans. Cette étude a permis de détecter de façon répétable des séroconversions, dues à un calicivirus proche antigéniquement au RHDV mais sans sa pathogénicité (Capucci *et al*, 1997).

L'existence de telles souches non pathogènes a aussi été soupçonnée en Australie et en Nouvelle-Zélande, avant leur introduction en 1995 et 1997. En effet, avant la dispersion de la souche tchèque / australienne de RHDV en Nouvelle-Zélande, ce pays était considéré comme indemne de RHDV. Cependant, des tests sérologiques ELISA rétrospectifs ont permis de mettre en évidence qu'un virus semblable au RHDV était présent sur le territoire néozélandais avant août 1997 : les niveaux d'anticorps qui ont été trouvés dans les sérums pré-RHDV étaient inattendus. Huit échantillons avaient un titre de 1 : 40 et un d'entre eux a même donné un résultat positif avec une dilution de 1 : 80. Ces échantillons n'ont pas été limités à un secteur géographique particulier. Ces hauts titres d'anticorps peuvent être expliqués par la

présence d'un virus précédemment inconnu lié au RHDV, présent en Nouvelle-Zélande avant août 1997 (O'Keefe *et al*, 1999), (Moss *et al*, 2002), (Forrester *et al*, 2003).

L'ARN spécifique du RHDV a également été détecté dans des sérums de lapins sains échantillonnés au Royaume Unis à partir de 1955, soit bien avant que les premiers cas de RHD ne se déclarent, par la méthode de RT-PCR nichée (Moss *et al*, 2002) (White *et al*, 2004). Enfin, la découverte sur l'île Lambay d'anticorps anti-RHDV sur des lapins sains, alors que la maladie ne s'est jamais manifestée sur ce territoire, amène la preuve que ce virus peut survivre à long terme dans des populations de lapins de Garenne sans causer de maladie manifeste. Le RHDV semble avoir circulé en tant qu'infection persistante/latente ou sous une forme avirulente dans les populations de lapins de Garenne (Forrester *et al*, 2007).

Ces résultats suggèrent donc que des lapins européens mais aussi australiens et néozélandais, ont été infectés par un ou plusieurs calicivirus apparentés au RHDV, présentant une virulence plus faible et ne causant pas de troubles majeurs, plusieurs années avant que le RHDV ne soit identifié en Chine.

II. Pouvoir pathogène

De nombreuses études sérologiques ont démontré l'existence de souches de RHDV non pathogènes. Les animaux séropositifs ne présentaient aucun signe clinique, ni lésion à l'autopsie.

La lignée de virus apparenté au RHDV isolée sur l'île de Lambay est, apparemment, également non virulente pour les lapins. Néanmoins, ceci n'a jamais été testé expérimentalement depuis leur isolement sur des lapins en bonne santé sur cette île (Forrester *et al*, 2007).

Prenons l'exemple du RCV. Le RCV est un calicivirus non pathogène qui a été identifié en Italie en 1996 sur des lapins provenant d'un élevage où le taux de séropositivité était important sans que la maladie n'ait jamais été rapportée (Capucci *et al*, 1996)

Nous savons que la réplication du RHDV se fait principalement dans le foie et une accumulation virale massive est observée dans le foie et la rate. Il provoque alors une hépatite sévère et d'autres complications telle une CIVD par nécrose du foie. Sur ce point, le RCV

diffère clairement du RHDV. En effet, de grandes quantités de RCV sont invariablement trouvées dans l'intestin. On retrouve sur quelques lapins de très faibles quantités de RCV dans le foie et la rate. Cet événement est relativement rare, puisqu'il est arrivé chez seulement 3 des 13 animaux (5 naturellement infectés, 6 expérimentalement infectés et 2 infectés par contact) de l'étude. Cette différence de tropisme peut expliquer le caractère non pathogène du RCV (Capucci *et al*, 1996), (Marchandeu *et al*, 2005).

III. Caractéristiques des calicivirus apparentés au RHDV

1. Séquences nucléotidiques et protidiques

De petites différences de la séquence primaire des protéines virales peuvent provoquer des changements profonds de tropisme viral et de pathogénie. L'étude de Capucci *et al* (1996) a permis de déterminer la séquence complète du gène de la protéine structurale majeure du RCV.

La séquence d'acide aminé de la protéine de capsid du RCV a été comparée avec les séquences de VP60 de RHDV isolés à des périodes et dans des lieux différents, ainsi qu'avec la séquence de la protéine de capsid de l'EBHSV. Le RCV et les différents RHDV isolés montrent une identité moyenne d'acides aminés de 91,5 %. Cependant, ce haut degré d'identité est significativement plus bas que l'identité moyenne (98 %) observée entre les différentes souches de RHDV isolées. L'identité entre le RCV et l'EBHSV (75 %) est comparable avec la valeur moyenne d'identité détectée entre les séquences d'acides aminés de l'EBHSV et des membres du groupe des RHDV (76,4 %). Dans la moitié C-terminale de la protéine de capsid allant des acides aminés 301 à 434, la séquence protéique du RCV, en comparaison avec le RHDV, a une homologie moindre (83,4%). Cela souligne les différences entre le RCV et le RHDV. Cette région correspond aux domaines c, d, e de la protéine de capsid selon la nomenclature présentée par Neill sur la base des études de comparaison de séquences entre différents calicivirus. Dans le RCV, le domaine c (allant des acides aminés 301 à 324) présente une délétion de 3 acides aminés, correspondant à N-308, A-309 et T-310 de la séquence du RHDV. Cette délétion représente la caractéristique distinctive principale de la protéine de capsid du RCV. On peut noter que 31 acides aminés parmi les 46 (67 %) qui diffèrent entre le RCV et le RHDV sont placés aux mêmes positions que les parties des séquences protéiques qui distinguent l'EBHSV du RHDV (Capucci *et al*, 1996).

Le résidu cystéine à la position 274 de la séquence du RHDV est conservé dans le RCV. Mais ce dernier contient deux résidus cystéine supplémentaires aux positions 259 et 329. Ces résidus pourraient participer à la formation de ponts disulfure ayant une fonction structurale dans l'assemblage de la capsid. La protéine de capsid du RCV contient deux sites fermés, constitués par des acides aminés chargés négativement (E-473 et D-477) qui sont absents dans la protéine VP60 du RHDV. De part ces domaines, le point isoélectrique calculé pour la protéine de capsid du RCV est relativement bas (4,54) (Capucci *et al*, 1996).

Contrairement à ce qui a été observé pour le RCV, la séquence nucléotidique des ARN du gène de capsid de calicivirus apparentés au RHDV isolés en Angleterre et en Nouvelle-Zélande sur des lapins sains, n'est pas facilement distinguable de l'ARN détecté dans le foie de lapins mortellement infectés par le RHDV. L'analyse phylogénique de ces isolats a révélé qu'ils occupaient la même branche que les virus isolés à partir de cadavres apparemment atteints par la RHD prélevés sur les mêmes sites d'étude, et également que les différents virus isolés connus pour être pathogènes (Moss *et al*, 2002) (Forrester *et al*, 2003). La comparaison des séquences génomiques du RCV et des souches pathogènes connues permet donc de différencier facilement ces 2 types de virus : le RCV a une réelle identité génétique, contrairement à d'autres virus apparentés au RHDV.

L'arbre phylogénique réalisé par Forrester *et al* (2006), révèle des divergences entre les différentes séquences ARN des virus apparentés aux RHDV. Par exemple, la séquence d'ARN obtenue à partir de sérums de lapins de l'île de Lambay est fortement distincte de celle des groupes 2 à 8 de l'arbre phylogénique du RHDV, et diverge de la souche Ashington (84,9 % d'identité nucléotidique) et du RCV (81 % d'identité nucléotidique) appartenant au groupe 1. De plus, la séquence de l'ARN de Lambay partage seulement 82,8 % d'homologie avec la séquence du virus européen typique du groupe 2 (l'isolat de Francfort). Il est important de noter que la souche Ashington a été isolée à partir de lapins morts et montrant les symptômes habituels de la RHD, alors que la souche de Lambay Island est apparemment non virulente pour les lapins, tout comme le RCV (Forrester *et al*, 2007).

2. Organisation génomique

Le RCV conserve une des caractéristiques les plus importantes de l'organisation génomique des lagovirus : la présence de seulement deux ORFs, à la différence des autres calicivirus qui en ont 3. La séquence nucléotidique entre le gène de l'ARN polymérase et celui de la VP60 est strictement identique entre le RHDV et le RCV, ce qui suggère que la continuité du cadre de lecture est conservée chez le RCV (Capucci *et al*, 1996).

Le site de clivage par la protéase de type 3C, glutamate à la position P1 et Glycine à la position P1', est aussi présent sur le RCV. Par conséquent, il est probable que la maturation de la polyprotéine soit identique pour le RHDV et le RCV (Capucci *et al*, 1996).

On note une différence dans l'organisation génomique au niveau du codon d'initiation de l'ORF2 initialement identifié sur le RHDV. Le codon suivant dans le cadre de lecture du RHDV (AUG) apparaît comme étant le codon d'initiation de l'ORF2 chez le RCV. L'ORF2 du RCV code pour une polyprotéine de 112 acides aminés. Si on ne tient pas compte des quatre premiers acides aminés de l'ORF2 du RHDV, alors les ORF2 du RCV et du RHDV-B589 montrent 92% d'identité (Capucci *et al*, 1996).

Ces informations démontrent que l'organisation génomique du RCV, et d'autres calicivirus apparentés au RHDV, est à peu près la même que celle du RHDV.

3. Propriétés antigéniques et immunogènes

a. Propriétés antigéniques

Une étude a été réalisée en 2006 sur des lapins de l'île de Lambay où aucun lapin atteint de RHD n'a été détecté ; elle a montré qu'une souche de virus apparentée au RHDV a circulé. Les tests sérologiques ELISA ont montré la présence d'anticorps anti-RHDV détectables dans 10 sérums sur 11 sera, avec 9 ayant des titres d'anticorps supérieurs à 1 : 1280, confirmant que le RHDV ou un virus proche circulait efficacement et largement parmi les lapins de l'île Lambay sans causer de maladie clinique (Forrester *and al*, 2006).

Le degré de relation antigénique du virus non pathogène identifié en Italie (appelé RCV) avec le RHDV et le EBHSV a été évalué par des tests ELISA compétition. Les anticorps sérique de sept animaux infectés par le RCV ont été testés en compétition avec à la

fois des sera polyclonaux de référence ou des anticorps monoclonaux (Mabs) contre le RHDV et le EBHSV. Pour la comparaison, des réactions semblables ont également été exécutées avec des sera d'animaux qui avaient réchappé au RHDV ou à l'infection par l'EBHSV. Le sérum des lapins infectés par le RCV a été capable de rivaliser avec les anticorps monoclonaux 1H8, 3H2 et 6F9 et avec le sérum polyclonal IgG-RS du RHDV. Par ailleurs, la compétition avec les anticorps anti-EBHSV (IgG-HS, MAB 5F5), pour se lier au EBHSV, a démontré des titres quasi nuls. Ce modèle de réactivité a été comparé parallèlement à la réactivité du sérum de lapins convalescents de RHD. Les titres d'anticorps chez ces animaux étaient 10 à 20 fois plus hauts que chez les infectés par le RCV, ceci s'expliquant probablement par la réplication beaucoup plus importante du RHDV et/ou par son tropisme différent (Capucci *et al*, 1996).

Le RCV partage un grand nombre d'épitopes avec le RHDV et présente probablement peu d'épitopes communs avec ceux de l'EBHSV, mais les profils antigéniques généraux de ces deux virus sont clairement très différents.

Dans un élevage industriel italien ne présentant aucun symptôme de RHD, des séroconversions se sont produites et ont été reproductibles. Cet élevage a servi de modèle pour mieux comprendre la réponse immunitaire due au RCV. La totalité des reproducteurs étaient séropositifs avec de hauts titres d'anticorps. Pour les lapins au sevrage et à l'engraissement, les choses sont différentes. Au sevrage, 33% des lapins étaient séropositifs puis le taux de séropositivité augmente fortement jusqu'à un mois après le sevrage où la totalité des lapins était séropositif. Pour les jeunes lapins à l'engraissement, le taux de séropositivité et les titres en anticorps étaient corrélés à l'âge des animaux. Ils passent de 56% 13 jours après le sevrage à 90% après 20 jours.

Chez les lapins sevrés, on a principalement des Ig G et on observe une corrélation entre les titres en anticorps des mères et de leurs petits, puis, sur des lapins isolés après le sevrage, une baisse rapide des titres est constatée. Ceci penche en faveur d'une origine maternelle, par transmission passive des anticorps aux lapins sevrés. La contamination des lapins par le RCV a lieu principalement à l'engraissement, où les animaux sont fortement concentrés et dans des conditions stressantes. C'est pour cela qu'à l'engraissement, une forte augmentation du nombre de séropositifs peut être observée en l'espace de quelques jours, avec de forts taux d'Ig M et d'Ig A. Par la suite, les titres croissent avec le temps, en particulier les Ig G qui persistent après 6 mois (Capucci *et al*, 1997).

Les virus apparentés au RHDV induisent chez les lapins infectés des anticorps avec des titres beaucoup plus faibles que ceux induits par le RHDV. Une méthode sérologique utilisant l'ELISA compétition et l'iso ELISA permet de détecter et de doser les différents isotypes d'anticorps Ig G, Ig A, Ig M et, ainsi, de distinguer les anticorps produits contre le RHDV et ceux produits contre les calicivirus apparentés. Les animaux présentant des titres à l'ELISA compétition supérieurs à 10 sont considérés comme infectés par le RHDV, la présence d'Ig A confirme alors une infection passée alors que la présence d'Ig M indique que les lapins ont récemment guéri de la RHD. Quant aux lapins présentant des titres importants d'Ig G, mais pas d'Ig A ou d'Ig M, et des titres en anticorps à l'ELISA compétition inférieurs ou égaux à 10, ils sont considérés comme infectés par un virus apparenté au RHDV (Cooke *et al*, 2002).

b. Propriétés immunogènes

Sachant que les virus apparentés au RHDV sont très proches antigéniquement du virus parental virulent, plusieurs études ont évalué la propriété de ces virus à induire une réponse immunitaire qui serait protectrice contre la RHD. Cependant, les résultats diffèrent d'une étude à l'autre.

L'étude de 1996 sur le RCV a montré expérimentalement (épreuve virulente) que ce dernier présentait la capacité d'induire une réponse immunitaire protectrice contre la RHD (Capucci *et al*, 1996).

Néanmoins, d'autres études réalisées sur des calicivirus apparentés au RHDV ont prouvé qu'ils n'étaient pas forcément protecteurs contre la RHD. L'existence d'anticorps non protecteurs contre la RHD, due à l'infection par un virus de type RHDV, a été envisagée suite à une étude réalisée sur des lapins pendant une épidémie en 2001. 21 échantillons de sang et 22 échantillons de foie prélevés sur 26 cadavres de lapins trouvés morts ont été analysés. Un premier dépistage d'anticorps anti-RHDV a été effectué par méthode ELISA utilisant l'antigène VP60-RHDV et a montré que 20 lapins étaient séropositifs. De plus, les titres en anticorps pour 13 des 20 échantillons séropositifs ont été déterminés et étaient égaux à 1/400. Un tel titre correspond normalement à un niveau d'anticorps suffisant pour conférer une protection contre tous les RHDV connus. Pour 16 échantillons, il a été montré que les lapins sont morts de formes aiguës de la maladie, qui tue généralement en 2-3 jours. Or les anticorps détectés par le test VP60-RHDV ELISA sont connus pour apparaître 5 à 6 jours après

l'infection. Il a donc été supposé que les anticorps détectés étaient présents avant l'exposition au RHDV. Une deuxième analyse a été faite par ELISA compétition avec des anticorps monoclonaux spécifiques du RHDV. Les résultats ont été négatifs : les anticorps détectés avec le test VP60 ELISA n'étaient donc pas spécifiques au RHDV, mais étaient probablement liés à un virus apparenté au RHDV qui ne confère pas de protection contre la RHD (Marchandeau *et al*, 2005). La même observation a été faite en Australie pour un autre calicivirus non pathogène relié sérologiquement au RHDV mais qui ne protégeait pas les lapins d'une infection naturelle par le RHDV (Robinson *et al*, 2002).

Les différentes études présentées montrent donc des résultats contradictoires. Mais il apparaîtrait néanmoins que généralement les virus apparentés au RHDV puissent conférer au moins une protection partielle, qui est fonction des titres en anticorps, vis-à-vis de la RHD, la mortalité due à la RHD baissant quand les titres en anticorps contre les virus apparentés au RHDV (Ig G) augmentent (Cooke *et al*, 2002).

IV. Epidémiologie des calicivirus apparentés aux RHDV

Le calicivirus apparenté au RHDV le mieux documenté est le RCV, il nous servira donc majoritairement d'exemple.

Nous allons tout d'abord nous intéresser au mode de transmission de ce virus. Huit lapins ont été infectés expérimentalement par voie oro-nasal avec du RCV (groupe A). Ces lapins ont été placés dans 4 cages contenant chacune également un lapin séronégatif. Ces 4 lapins séronégatifs, mis en contact étroit avec des lapins infectés, constituent le groupe B. Enfin, d'autres lapins séronégatifs ont été placés dans une cage mise à distance suffisante de celles contenant les lapins infectés pour qu'aucune contamination directe par les liquides corporels des lapins infectés ne puisse avoir lieu (groupe C). Comme cela était attendu, 5 jours post inoculation, tous les lapins du groupe A étaient séropositifs avec des anticorps anti-RHDV dont les titres ont augmenté les jours suivants. Les animaux du groupe B sont également devenus séropositifs 1 à 2 jours après le groupe A et avec des titres en anticorps inférieurs. Le groupe C est par contre resté séronégatif tout le temps de l'expérience. Pour étendre ces résultats, la présence d'ARN et de protéines virales a été évaluée dans divers organes de lapins du groupe A et du groupe B. Six lapins du groupe A ont été sacrifiés à 3, 5 et 6 jours post infection, tandis que pour le groupe B, les 2 lapins tués l'ont été 7 jours post

infection. Chez tous les animaux, les RT-PCR réalisées ont indiqué la présence de virus dans l'intestin. Par contre, aucun foie ni rate ne contenaient de constituants viraux (Capucci *et al*, 1996). Cette expérience montre que le RCV a une transmission horizontale par contact.

On l'a vu dans la première partie, le RHDV et L'EBHSV sont deux virus ayant une gamme d'hôtes extrêmement limitée. Une expérience a été menée pour savoir si les lièvres pouvaient être des hôtes du RCV. Pour se faire, 6 lièvres séronégatifs, ainsi que 6 lapins séronégatifs, ont été inoculés expérimentalement par voie oronasale par du RCV. Des tests sérologiques ont été réalisés 5 jours post inoculation. Les lapins étaient bien séropositifs, mais par contre les lièvres sont restés. De plus, cela a été confirmé par des résultats négatifs en RT PCR, réalisées sur des organes de 2 lièvres sacrifiés 5 jours après l'inoculation. On peut donc conclure, que comme le RHDV, le RCV a une spécificité d'hôte. Les lièvres n'y sont ni sensibles ni réceptifs, il n'est pas possible de les infecter expérimentalement (Capucci *et al*, 1996).

De nombreuses études montrent que les virus apparentés au RHDV sont présents dans de nombreuses populations de lapins de Garennes et de lapins domestiques, en Europe (RCV en Italie, Lambay virus en Irlande, d'autres en France, au Royaume-Uni...), en Australie et en Nouvelle-Zélande (Capucci *et al*, 1996), (Marchandeau *et al*, 1998), (White *et al*, 2001), (Cooke *et al*, 2002), (White *et al*, 2004), (Forrester *et al*, 2007). La présence de ces virus et, surtout, les anticorps qu'ils induisent, modifient l'épidémiologie de la RHD, en conférant potentiellement une protection partielle vis-à-vis de la maladie aux lapins. Par exemple, en Australie, dans les zones où l'on retrouve des titres importants en anticorps anti-virus apparentés aux RHDV, c'est-à-dire les régions humides avec de fortes précipitations, la mortalité liée aux épizooties de RHD est inférieure à celle observée dans les régions sèches et chaudes (Cooke *et al*, 2002). De la même manière, l'étude White *et al* (2001), a montré que, lorsqu'une souche non pathogène de virus apparenté au RHDV circule avec un taux de réplication important, les épizooties liées au RHDV pathogène sont passagères et avec une mortalité moindre.

Au Royaume-Uni, les populations de lapins sauvages ont montré une haute séroprévalence pour le RHDV en l'absence de mortalité associée, ce qui suggère la présence d'une souche non pathogène endémique. Une enquête épidémiologique détaillée révèle que le RHDV cause au Royaume-Uni une infection persistante très répandue en l'absence de symptômes et de mortalité. La souche de virus responsable de cette infection persistante n'a

pas pu être différenciée phylogéniquement du virus pathogène connu et apparaît très différente de la seule souche non pathogène de RHDV identifiée. Cela pourrait suggérer que les souches de RHDV peuvent être propagées selon deux modes de transmission : un mode pathogène et un mode non – pathogène. La survenue de l’infection dépendrait de la taille de l’inoculum, de fortes doses entraînant une forme aiguë de la maladie alors que de faibles doses causeraient une infection chronique (White *et al*, 2004). Néanmoins, on ne peut pas exclure que l’on ait à faire à deux types de souches différentes, certaines pathogènes et d’autres non – pathogènes. En effet, on ne peut pas différencier phylogénétiquement les deux types de souches, mais les différences génomiques entre les RHDV pathogènes et les non – pathogènes se situent peut être dans les régions du génome qui n’ont pas encore été analysées. On peut donc avoir deux types de virus qui cohabitent en même temps. Dans une population où le virus pathogène serait majoritaire, on aura des épizooties de RHD répétées. Mais inversement, si une souche non – pathogène domine, la mortalité liée à la RHD sera beaucoup plus faible et les épizooties seront passagères (White *et al*, 2001).

V. Origine probable du RHDV et arbre phylogénique

Des études phylogénétiques ont identifié huit groupes de RHDV sur la base des sérologies et des informations concernant les séquences représentant le gène de la protéine de capside VP60, démontrant une hétérogénéité génétique significative parmi ces virus. L’arbre est monophylétique, mais il montre néanmoins une grande variation des souches de RHDV. Il peut être divisé en huit groupes majeurs, dont six contiennent des virus isolés en Grande-Bretagne. Les groupes 2 à 5 contiennent des virus d’origine européenne, plus une souche de virus provenant de Bahreïn. Les groupes 6 à 8 contiennent la lignée à l’origine de l’épidémie chinoise de 1984 et des souches de RHDV isolées en Europe, Amérique, Australie, Nouvelle-Zélande. Le groupe 1 contient deux virus étroitement liés antigéniquement mais génétiquement distincts : le RCV, le virus italien non virulent annoncé par Capucci *et al*, (1996) et le virus Ashington, qui a été extrait d’un lapin de Garenne quelques heures après sa mort. Il a été montré que le virus Ashington est génétiquement distinct de tous les autres virus, y compris du RCV. En 2007, une souche virale a été identifiée sur l’île de Lambay en Irlande, et semblerait appartenir au groupe 1 (Forrester *et al*, 2007). Cette souche est très différente des virus des groupes 2 à 8, et diverge des virus du groupe 1 : de 84,9% d’identité nucléotidique avec le virus Ashington et 81% d’identité nucléotidique avec le RCV (Forrester

et al, 2007). Le groupe 2 contient le virus Rainham isolé en Grande-Bretagne, ainsi que des virus allemands et italiens. Le groupe 3 contient des virus trouvés exclusivement en Grande-Bretagne. La toute première souche isolée dans ce groupe l'a été à partir du sérum d'un lapin domestique sain, dont le sérum avait été stocké à 4 °C depuis 1959. L'isolat le plus récent de ce groupe provient, quant à lui, d'un lapin sauvage mort pendant l'année 2000. Des virus virulents et non virulents n'étaient donc pas facilement distinguables par l'analyse phylogénétique partielle des séquences nucléotidiques de la protéine de capsid. Même si les virus du groupe 3 ont tous été isolés en Grande-Bretagne, ils ont, ensuite, été largement dispersés dans de nombreux pays. Le groupe 4 contient des virus isolés à partir de lapins de Garenne collectés sur l'île Ramsey, à Sandscale, sur la côte ouest de la Grande-Bretagne et, enfin, à Frensham en Angleterre du sud. Ils sont très proches génétiquement du virus Wreizen isolé en Allemagne en 1993. Le genogroupe 5 est un nouveau groupe indépendant, dans lequel on trouve le tout premier RHDV britannique isolé à partir du sérum d'un lapin domestique sain (en 1955). Les souches isolées en France depuis 1998, ainsi que les souches, a priori non virulentes et non protectrices, découvertes sur des sérums de lapins collectés en France en 2000, appartiennent également au génogroupe 5 (Marchandea *et al*, 2005) (Le Gall *et al*, 2003). Les virus anglais regroupés dans le groupe 6 proviennent d'échantillons de sérum de lapins sains, rassemblés en 1958, 1974 et 1976. Ils ont été rapprochés phylogénétiquement du virus virulent isolé sur des lapins de Garenne espagnols et français collectés en 1989. Le groupe 7 contient des virus provenant de la Nouvelle-Zélande et de la Tchécoslovaquie, le virus de la Nouvelle-Zélande étant issu d'un virus tchécoslovaque. Le groupe 8 contient deux virus collectés en Allemagne et un virus qui a été obtenu pendant l'épizootie de 2000 aux Etats-Unis (Moss *et al*, 2002). L'arbre phylogénétique est présenté dans la figure 6.

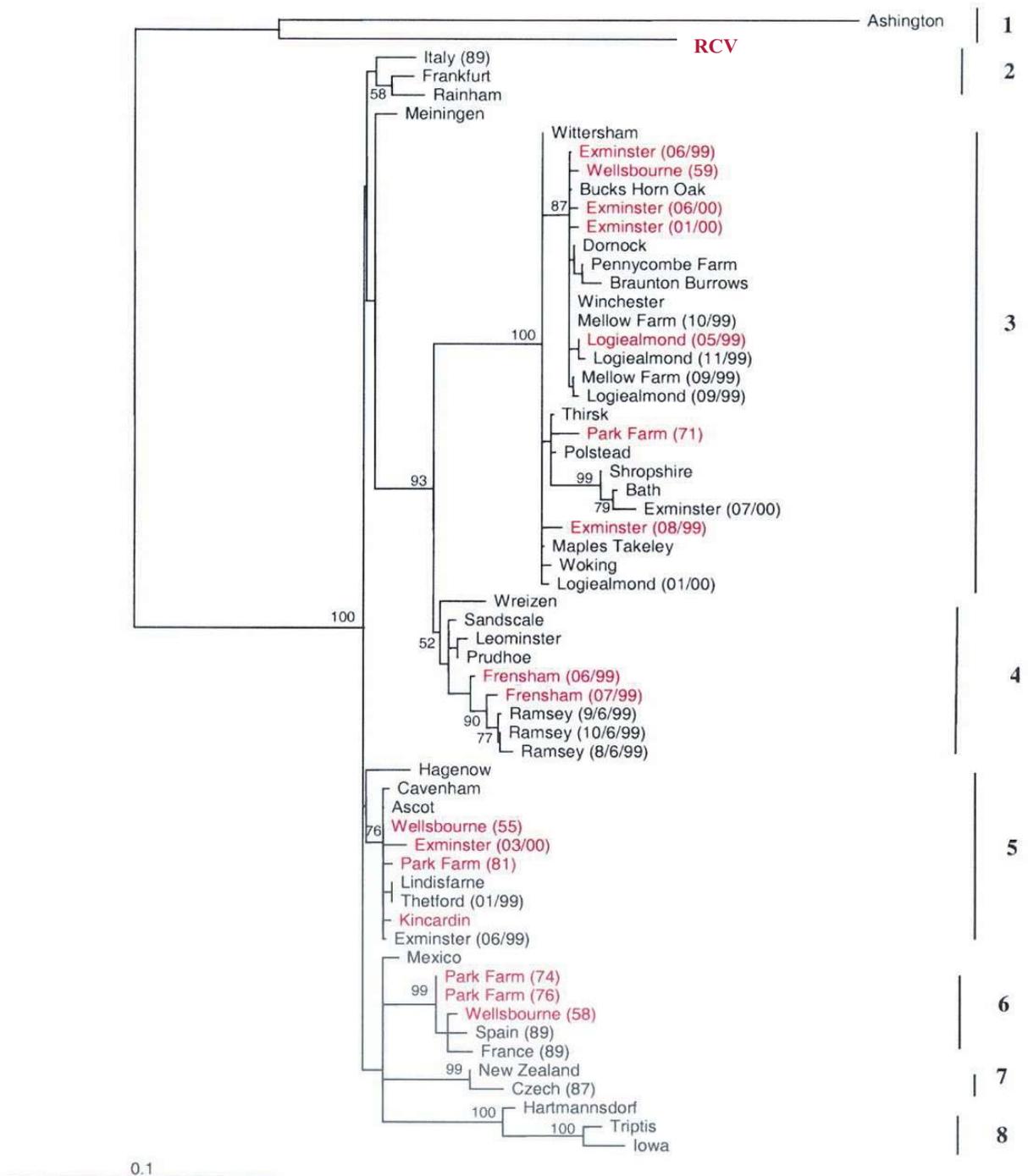


Figure 6 : Analyse phylogénétique utilisant les séquences partielles de protéines de capsid de 61 souches de RHDV. Le nombre entre parenthèse indique l'année d'isolement du virus. Les séquences virales obtenues à partir de lapins sains sont mises en évidence en rouge (Moss *et al*, 2002).

La distance génétique entre les virus du groupe 3 et les virus Ashington et RCV appartenant au groupe 1 semble importante. Cette observation tend à prouver que les groupes 1 et 3 ont divergé il y a relativement longtemps, a priori plus de 40 ans (Moss *et al*, 2002). La topologie de l'arbre phylogénique implique que les lignées Ashington et Lambay Island ont émergé après la divergence avec la lignée RCV, probablement au moment où les virus ont été respectivement introduits en Angleterre et en Irlande. La découverte du virus isolé sur l'île Lambay suggère que ce virus a circulé en Irlande des années avant que la souche européenne typique n'y soit identifiée en 1995. L'arbre phylogénique montre enfin que la lignée de Lambay Island a émergé il y a plusieurs décennies voire siècles avant la diffusion des virus du groupe 2 à 5 (Forrester *et al*, 2007).

A l'intérieur des groupes les divergences entre les virus sont plus ou moins importantes. Par exemple, les virus appartenant aux groupes 3 et 5 ont divergé de façon plus importante que les virus du groupe 4. De tels résultats suggèrent que les pressions sélectives environnementales subies par les virus sont différentes d'un groupe à l'autre. L'analyse phylogénétique apporte une autre observation intéressante. En effet, des virus européens isolés à partir de lapins de Garenne ou de lapins domestiques morts ou vivants, au moment de la collecte des échantillons, sont situés sur des embranchements très proches, indiquant qu'il n'y a aucune distinction claire entre des virus apparemment non virulents et des virus virulents, dans la région du génome analysée. Bien que le RHDV soit normalement associé à des épidémies sévères, il a probablement circulé inoffensivement partout en Europe et probablement en Afrique et en Asie pendant des siècles, voire des millénaires avant de provoquer les épisodes récents de RHD. Les facteurs qui ont déterminé les modifications de phénotype n'ont pas encore été identifiés.

TROISIEME PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE

TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

L'objectif du programme d'étude est de rechercher des calicivirus apparentés au RHDV et non pathogènes afin de caractériser leurs différences antigéniques et génomiques avec le RHDV. Les résultats de cette étude serviront, dans un second temps, à tenter de mettre au point des tests sérologiques spécifiques et à mieux comprendre l'interaction entre les formes non pathogènes et pathogènes des virus RHDV.

Ces travaux appartiennent à un projet de recherche, qui a démarré en juin 2006 pour une durée de 3 ans, piloté par Stéphane Marchandeau de l'ONCFS-Nantes, associant L'AFSSA-Ploufragan (Ghislaine Le Gall) et l'ENV de Toulouse (Stéphane Bertagnoli). Il fait partie du projet ANR SEST coordonné par Dominique Pontier de l'UMR 5466 CNRS-Université de Lyon I "Pathocénose et émergence des maladies transmissibles : un concept unificateur mis à l'épreuve sur des pathologies exemplaires" qui consiste notamment à comprendre comment les circulations de plusieurs virus pathogènes ou non peuvent s'influencer mutuellement au sein d'une population animale en interaction avec son environnement éco-épidémiologique. Les données recueillies permettront de mettre en place des modèles mathématiques pouvant servir à prédire l'émergence ou la réémergence des maladies infectieuses. Six systèmes hôte(s)/pathogène(s) ont été sélectionnés : nos travaux portent sur le système "Lapin/Myxomatose et RHDV".

Depuis une dizaine d'années, divers travaux ont montré qu'il existait des calicivirus apparentés au RHDV susceptibles de circuler au sein des populations de lapins domestiques et sauvages en l'absence de maladie caractérisée. Cependant, en 2006, au départ du projet d'étude des calicivirus apparentés au RHDV, aucune de ces souches n'avait été isolée et leur absence de virulence pour des lapins naïfs n'avait pas été prouvée. Les anticorps qu'ils induisent sont détectés par les tests sérologiques utilisés habituellement pour le diagnostic de la RHD et fondés sur l'utilisation, comme antigène, de virus inactivé ou de la protéine de capsid. Il s'est avéré que ces tests ne sont pas uniquement spécifiques des souches pathogènes de RHDV, mais également des souches non pathogènes apparentées au RHDV. Ainsi, des résultats sérologiques positifs ne traduisent pas forcément une circulation dans une population de lapins du RHDV, mais peut-être une circulation de souches non pathogènes. L'étude de telles souches est fondamentale pour la compréhension du système lapin/RHDV et la gestion de la maladie. En effet, il est important de connaître l'impact de la circulation de ces souches sur la sensibilité des populations de lapins vis-à-vis de la RHD. De précédentes

études ont montré que certaines souches induisent une immunité croisée protégeant plus ou moins partiellement les lapins contre les souches pathogènes. Par ailleurs lors de travaux antérieurs publiés, des résultats sérologiques nous ont suggéré l'existence d'une souche non pathogène chez des lapins sauvages et non protectrice vis-à-vis d'une infection naturelle de RHDV, sans réussir à la caractériser. Ces différents résultats posent la question de la compétition entre les souches pathogènes de RHDV et celles non pathogènes.

Afin de faire progresser les connaissances sur ces virus non pathogènes, nous avons réalisé des recherches visant à isoler des souches virales susceptibles de circuler dans des populations animales sauvages et à caractériser leurs différences génomiques avec le RHDV.

Nous allons, tout d'abord, présenter les résultats antérieurs sur l'étude des calicivirus apparentés au RHDV (projet de recherche ONCFS, AFSSA Ploufragan et l'ENVT). Puis nous présenterons nos travaux consistant à rechercher des virus non pathogènes apparentés au RHDV circulant dans les populations sauvages de lapins français. Les prélèvements de tissus étudiés proviennent de lapins collectés sur l'île de Beniguet en 1997 ainsi que sur des lapins prélevés à la chasse au cours de la saison 2007-2008 dans différents sites géographiques français.

I. Résultats des travaux antérieurs

Initialement, il avait été choisi de surveiller au niveau sérologique et virologique des lapins domestiques sentinelles mis au contact des populations de lapins sauvages sur deux territoires d'étude différents (Cerizay dans les Deux Sèvres et St-Benoist dans les Yvelines). En cas de séroconversion sans mortalité, les lapins seraient sacrifiés et une recherche de calicivirus apparenté au RHDV serait entreprise dans différents organes. Les lapins devant servir de sentinelles seraient originaires de l'élevage conventionnel de l'AFSSA sans incident sanitaire depuis plusieurs années et non vaccinés contre de la myxomatose et la RHD.

En janvier 2006, 60 lapins ont été transportés depuis l'animalerie jusqu'aux 2 sites d'étude avec une phase de quarantaine en clapiers pour 15 jours, avant leur mise au contact des lapins de garenne. Le protocole de départ a finalement dû être modifié car dès le premier contrôle sérologique réalisé à leur arrivée, 30% d'entre eux se sont révélés être séropositifs alors qu'aucune mortalité n'était enregistrée, puis 80% d'entre eux une semaine plus tard, suggérant une infection par un virus RHDV apparemment non pathogène au sein de l'élevage

d'origine. Nous avons alors décidé de poursuivre l'expérimentation et d'essayer d'isoler et de caractériser cette ou ces souches circulant dans l'élevage. En effet, même si l'objectif initial était d'isoler des souches circulant en nature, cette décision a été motivée par le fait qu'il est probable que les animaux d'élevage et sauvages sont affectés par les mêmes souches, comme c'est le cas pour les souches pathogènes de RHDV. En outre, il était attendu que ces investigations sur les souches "d'élevage" permettent de mettre au point les outils méthodologiques en vue de l'étude des souches "sauvages". Les lapins n'ont donc pas été placés dans des cages au contact des populations sauvages et le protocole a été poursuivi comme si les lapins avaient été contaminés dans la nature. Ils ont ainsi été sacrifiés au fur et à mesure de leur séroconversion, et les prélèvements et manipulations en laboratoire ont été réalisés comme prévu dans le protocole initial.

1. Caractérisation moléculaire du (des) virus

Afin de rechercher les virus responsables des séroconversions observées, de nombreuses analyses par RT-PCR permettant de mettre en évidence la présence d'ARN codant pour la protéine de capsid du virus (protéine VP60) ou pour une protéine non structurale ont été réalisées sur les prélèvements d'intestin grêle, foie et rate de 20 lapins séronégatifs ou légèrement séropositifs, à Cerizay et St-Benoist. Des ARN de virus apparenté au RHDV ont été détectés chez 2/3 des lapins. Ce nombre est comparable entre les lapins provenant de Cerizay ou de St Benoist et il n'y a pas de différence au niveau moléculaire, suggérant bien une infection des lapins dans l'élevage d'origine. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur les lapins séronégatifs.

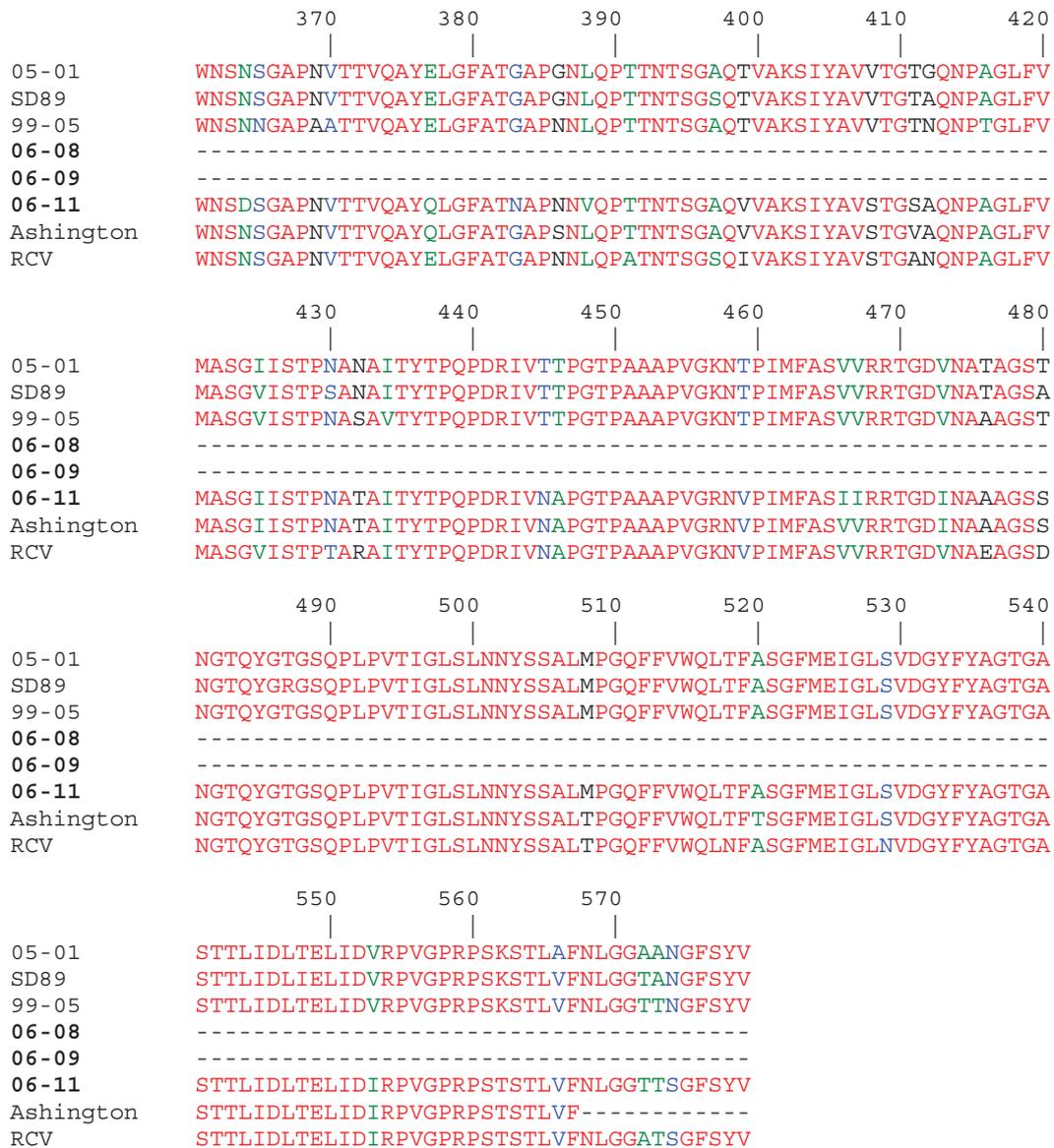
Les premières RT-PCR réalisées à l'aide du protocole habituellement utilisé pour détecter le RHDV ont été négatives. Il a été nécessaire d'amplifier une seconde fois l'amplifiat issu de la 1ère PCR ou de réaliser des RT-PCR nichées pour obtenir de l'ADN en quantité suffisante pour pouvoir être séquencé. Il en a été de même avec d'autres analyses réalisées à partir du sérum des lapins. Ces résultats soulignent la très faible quantité de particules virales présentes chez les animaux.

Les premiers séquençages ont confirmé la présence de calicivirus apparentés au RHDV. L'analyse de ces séquences partielles a montré qu'elles différaient de celles des souches pathogènes de RHDV présentes actuellement en France, mais aussi du calicivirus du lapin (RCV), seule souche de lagovirus non pathogène caractérisée à ce jour sur des lapins

domestiques. Par contre, et contre toute attente, deux types de séquences très différentes ont été mis en évidence pour un même échantillon et/ou selon la PCR réalisée. Le premier type (souche 06-11) s'est avéré proche de la séquence de la souche divergente "Ashington", caractérisée en Angleterre en 1998 sur un lapin mort avec des signes cliniques de RHD mais sans que les auteurs n'aient apporté la preuve que cette souche était seule responsable de la mort de l'animal. La séquence de la souche "Ashington" est très distante de celles des souches de virus RHDV pathogènes et plus proche de celle de la souche non pathogène RCV. A l'inverse, le second type de séquence (souche 06-08) se rapproche plus des séquences des souches pathogènes de RHDV. Ces données tendent à confirmer celles publiées par des auteurs anglais en 2001, lesquels ont caractérisé partiellement de tels ARN à partir d'échantillons de lapins sains ou de lapins domestiques avant l'apparition de la RHD. Par contre, la présence simultanée de 2 types de virus apparentés au RHDV au sein d'un même animal n'a pas été jusqu'à présent publiée dans la littérature concernant les lagovirus. Enfin, une 3^{ème} catégorie d'ARN a été détectée (souche 06-09), qui, bien qu'ayant une séquence nucléotidique différente de celle de la souche 06-11, est beaucoup plus proche de cette dernière (mêmes acides aminés) et de la souche "Ashington", que des souches de RHDV.

Les travaux de recherche se sont focalisés sur les prélèvements ayant donné des résultats positifs pour tenter de compléter les données de séquence acquises. De nouvelles PCR ont été élaborées parmi lesquelles une PCR permettant d'amplifier le gène entier codant pour la protéine de capsid VP60. Après plusieurs essais de PCR, la séquence entière du gène codant pour la protéine de capsid de la souche 06-11 a été définitivement établie. Concernant les autres souches non pathogènes mises en évidence, les 2/3 de la séquence de la souche 06-08 (proche des souches de RHDV) et la moitié de la séquence du gène de la VP60 de la souche 06-09 (proche de l'"Ashington") ont été obtenues (parties N-terminale). La figure 7 présente l'alignement des séquences protéiques du gène codant pour la protéine VP60 de souches de RHDV pathogènes et non pathogènes, incluant les séquences confirmées dans cette étude des souches "06-11", "06-08" et "06-09".

	10	20	30	40	50	60
05-01						
SD89						
99-05						
06-08						
06-09						
06-11						
Ashingtgon						
RCV						
	70	80	90	100	110	120
05-01						
SD89						
99-05						
06-08						
06-09						
06-11						
Ashingtgon						
RCV						
	130	140	150	160	170	180
05-01						
SD89						
99-05						
06-08						
06-09						
06-11						
Ashington						
RCV						
	190	200	210	220	230	240
05-01						
SD89						
99-05						
06-08						
06-09						
06-11						
Ashington						
RCV						
	250	260	270	280	290	300
05-01						
SD89						
99-05						
06-08						
06-09						
06-11						
Ashington						
RCV						
	310	320	330	340	350	360
05-01						
SD89						
99-05						
06-08						
06-09						
06-11						
Ashington						
RCV						



05-01 = souche RHDV française caractérisée en 2005 appartenant au génotype présent actuellement.
SD89 = souche RHDV française caractérisée en 1989 et appartenant à un génotype éteint.
99-05 = souche française du variant antigénique de sous-type a "RHDVa" caractérisée en 1999.
06-08 = souche non pathogène apparentée au RHDV, proche des souches RHDV (aa 1-338).
06-09 = souche non pathogène apparentée au RHDV, proche de la souche « Ashington » (aa 1-297).
06-11 = souche non pathogène apparentée au RHDV, proche de la souche « Ashington ».
Ashington = souche anglaise, a priori pathogène, trouvée sur un lapin de garenne mort (1998).
RCV = souche italienne de lagovirus non pathogène caractérisée en 1995 sur des lapins domestiques sains.

Figure 7 : Alignement des séquences protéiques du gène codant pour la protéine VP60 de souches de RHDV pathogènes et non pathogènes, incluant les séquences confirmées dans cette étude des souches "06-11", "06-08" et "06-09".

a. Souche 06-11 :

Comparé au gène codant pour la VP60 des virus RHDV, le gène de la souche 06-11 possède 1734 nucléotides (578 acides aminés) et présente une délétion de 6 nucléotides (position en nt de 925 à 930, acides aminés 309 et 310). Une délétion similaire existe chez les virus "Ashington" et le RCV, à ceci près que pour ce dernier, une autre délétion de 3 nt (1 aa) est présente en amont (aa 301). Ces délétions sont toutes localisées dans la zone hypervariable C (aa 301 à 310) telle que définie chez les calicivirus félins. La souche 06-11 présente une plus forte homologie de séquence avec la souche anglaise "Ashington" qu'avec les souches de RHDV pathogènes et le RCV non pathogène.

	RHDV pathogènes	RCV	"Ashington"
% en nucléotides	83,0*	85,0	93,8
% en acides aminés	90,8*	92,9	97,6

Tableau 1 : Pourcentage d'homologie nucléotidique et protéique entre la séquence du gène de la VP60 de la souche non pathogène apparentée au RHDV 06-11 et les séquences des RHDV pathogènes, du calicivirus non pathogène RCV, et de la souche anglaise "Ashington".
* pourcentage moyen entre les souches RHDV et RHDV de sous-type "a".

Les relations phylogéniques au niveau du gène codant pour la VP60 entre la souche 06-11 et les différentes souches de RHDV pathogènes représentatives du génotype actuel et des génotypes éteints du variant antigénique pathogène RHDVa, du RCV et de la souche "Ashington", ont été établies (cf. figure 8).

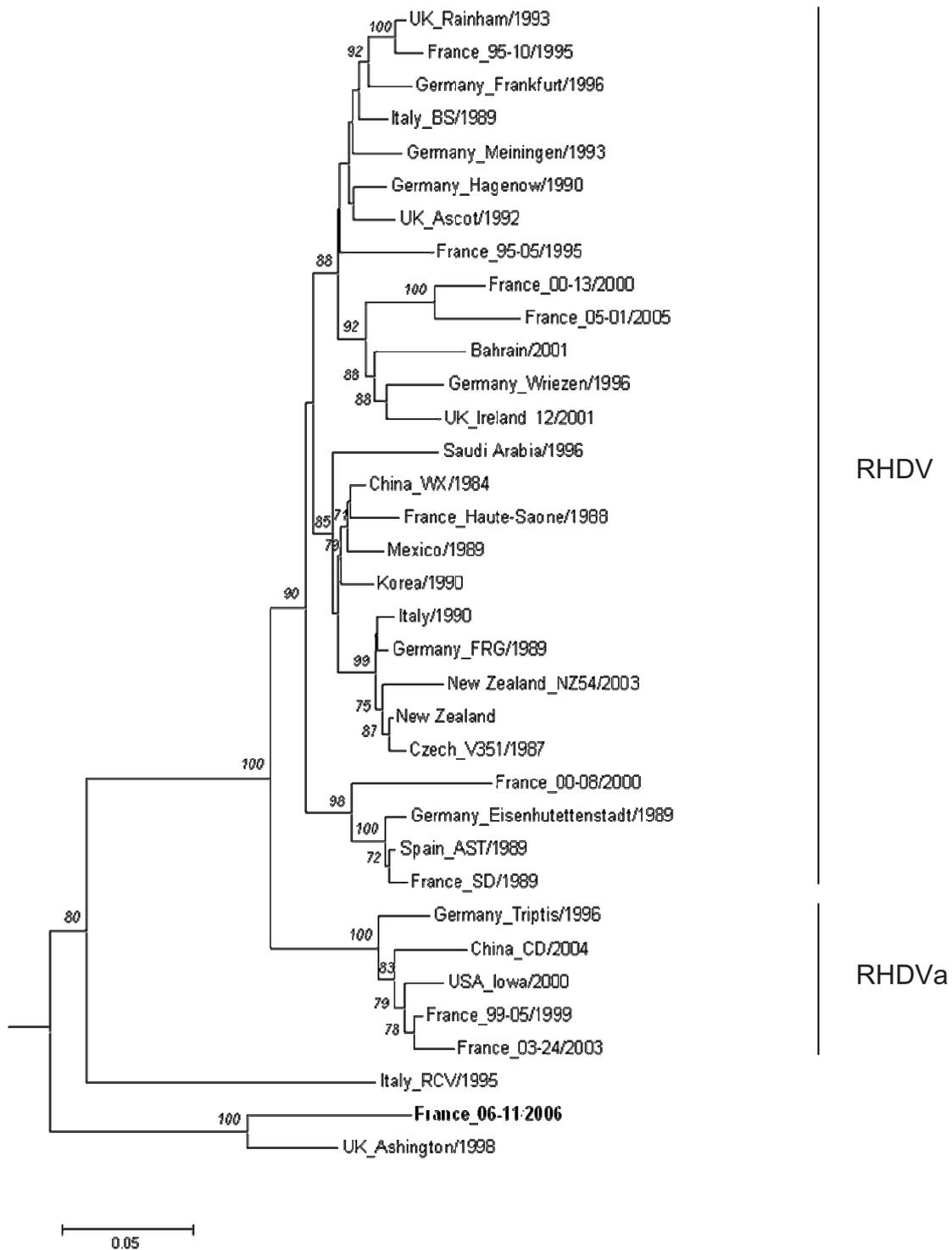


Figure 8 : Arbre phylogénique (nt 54 à 1703) réalisé selon la méthode du neighbor-joining avec 34 souches de RHDV représentatives des différents génogroupes mis en évidence à ce jour, ainsi que les souches RCV et "Ashington". Les valeurs de bootstrap > à 70% (pour 1.000 répliques) sont données en italique avant chaque nœud. La souche australienne RCV-A1 enracine l'arbre.

La souche 06-11 est significativement regroupée avec la souche "Ashington" et forme un cluster fort, confirmant le lien de parenté existant entre les deux souches. Cette lignée est très distante des souches pathogènes de RHDV. Le niveau de divergence génétique entre la souche 06-11, la souche "Ashington" et le RCV est toutefois assez important et suggère que chacune de ces 3 souches a divergé depuis longtemps.

b. Souches 06-08 et 06-09 :

La souche 06-08 présente une séquence très différente de la séquence de la souche 06-11 (95,5 % d'homologie entre les séquences protéiques seulement), mais aussi de la séquence du RCV (95,5 %), et à moindre degré avec les souches de RHDV pathogènes actuelles (96,2 %). Une analyse phylogénique préliminaire montre qu'elle est plus proche des souches de RHDV pathogènes actuellement en circulation en France, tout en ayant un niveau de divergence nucléotidique assez élevé, et n'est pas regroupable avec la souche 06-11(cf. figure 9).

Par contre, nous confirmons que la souche 06-09 est dans sa partie séquencée (893 nt) très proche de la souche 06-11, puisqu'elle possède 98 % d'homologie en nucléotides et 100 % au niveau protéique (cf. figure 10).

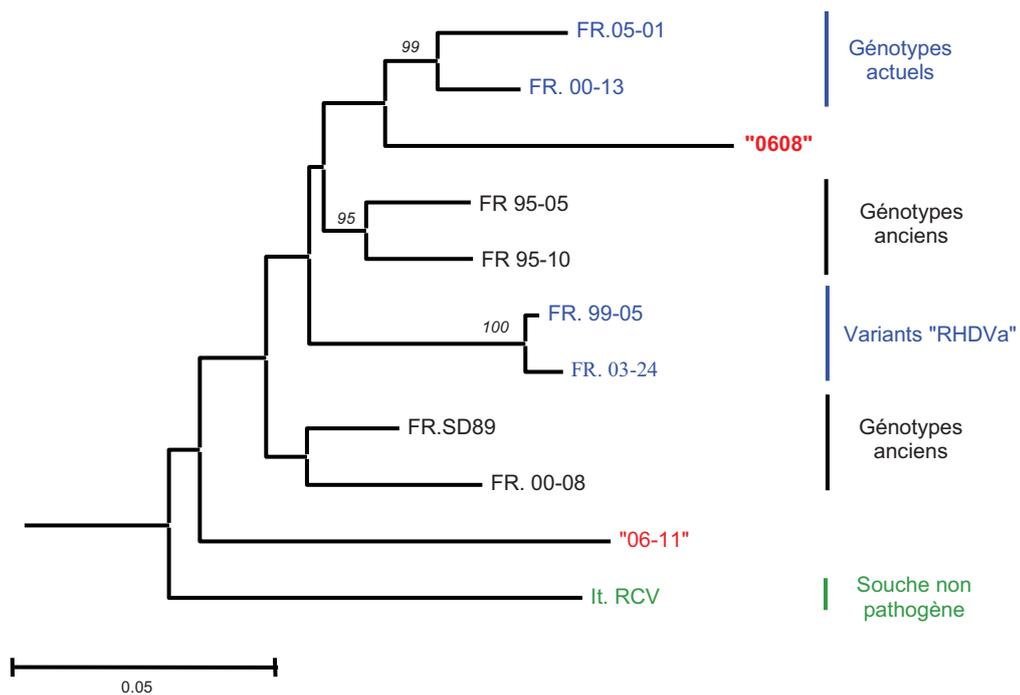


Figure 9 : Arbre phylogénique sommaire (Neighbor-joining, 1.000 répliques) basé sur les nucléotides 1 à 1015 et enraciné avec la souche EBHSV "GD 89". Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 % sont indiquées aux nœuds. FR = France, It = Italie.

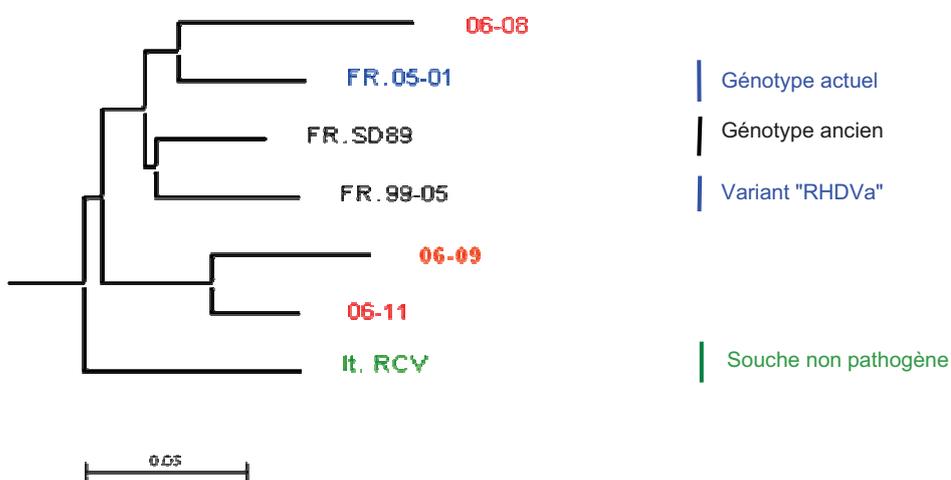


Figure 10 : Arbre phylogénique sommaire (Neighbor-joining, 1.000 répliques) basé sur les nucléotides 1 à 864 et enraciné avec la souche EBHSV "GD 89". Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 % sont indiquées aux nœuds. FR = France, It = Italie.

2. Propriétés des souches identifiées

Un essai expérimental en animalerie contrôlée a pu démontrer la transmission par voie naturelle à un lapin naïf des souches de lagovirus non pathogènes infectieuses caractérisées. Par ailleurs, il semble que la dose infectieuse soit très faible puisque les virus peuvent être transmis en moins de 5 jours par simple contact entre animaux, à l'instar de ce qui existe pour le RHDV.

Afin de déterminer si les anticorps détectés conféraient une protection croisée chez les lapins vis-à-vis d'une infection par une souche pathogène de RHDV, deux expériences d'infection virale ont été menées sur 15 lapins possédant des taux d'anticorps considérés comme étant protecteurs. L'ensemble de ces résultats démontrent l'absence de protection vis-à-vis du RHDV conférée par les anticorps induits par les souches non pathogènes.

II. Matériels et méthodes

1. Origine des prélèvements

Des prélèvements de tissus (intestin grêle, foie) ont été réalisés sur des lapins prélevés à la chasse au cours de la saison 2007-2008 provenant de huit sites géographiques différents : Cerizay, La Petite Boissière, Plouedern, Guisseny, Ploudaniel, Aubas, Terrasson, Notre Dame de Sanilhac. Ajoutés à ceux-ci, nous avons également analysé 19 prélèvements de foie collectés en 1997 sur des lapins sauvages morts à la chasse à Béniguet (cf. le tableau 2 récapitulatif des origines des différents prélèvements).

Commune	Département	Année	Codes	Nombre
Cerizay	79	2007/2008	JA1-32	32
La Petite Boissière	79	2007/2008	LMP 1-5 + LMP7	6
Plouedern	29	2007/2008	PLR41-57	17
Guisseny	29	2007/2008	GY11-20	10
Ploudaniel	29	2007/2008	PLD1-10	10
Aubas	24	2007/2008	AUB2	1
Terrasson	24	2007/2008	TER1-10	10
Notre Dame de Sanilhac	24	2007/2008	NDS1-10	10
Béniguet	29	1997	B1-7+B9-15+ B18-20 +B22 + B24	19

Tableau 2 : Origine des prélèvements de tissus

La figure 11 situe sur une carte de France les neuf sites géographiques de provenance des lapins.

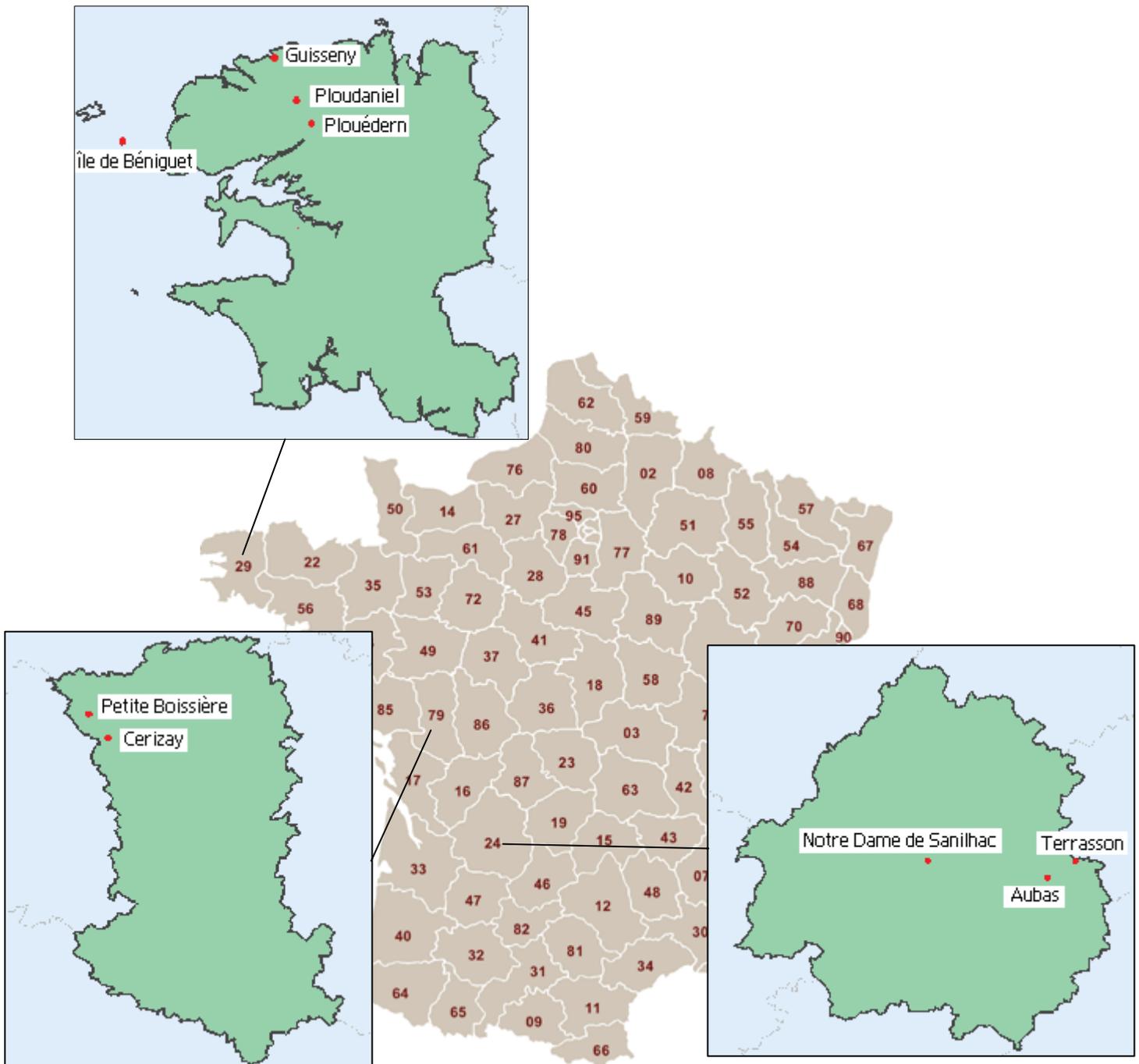


Figure 11 : Localisation des sites de provenance des lapins échantillonnés

Le foie et l'intestin grêle sont prélevés puis congelés en indiquant sur chaque prélèvement le numéro de l'animal. Tous les prélèvements sont réalisés en double exemplaire, et après congélation, ils sont envoyés préservés par le froid à l'ENVT et à l'AFSSA de Ploufragan.

La nature des prélèvements est variable. Les échantillons provenant de Beniguet sont exclusivement issus de foies, mais ceux collectés dans les autres communes françaises sont soit des échantillons de foie, soit des échantillons d'intestin. Le tableau 3 donne la nature du prélèvement en fonction de leur code.

Numéro	Type échantillon	Numéro	Type échantillon
NDS 1	intestin	JA 11	intestin
NDS 2	foie	JA 12	Foie
NDS 3	foie	JA 13	intestin
NDS 4	foie	JA 14	intestin
NDS 5	intestin	JA 15	Foie
NDS 6	foie	JA 16	intestin
NDS 7	intestin	JA 17	Foie
NDS 8	foie	JA 18	Foie
NDS 9	foie	JA 19	intestin
NDS 10	foie	JA 20	intestin
		JA 21	intestin
AUB 2	foie	JA 22	Foie
		JA 23	Foie
LMP 1	foie	JA 24	intestin
LMP 2	foie	JA 25	intestin
LMP 3	intestin	JA 26	intestin
LMP 4	foie	JA 27	intestin
LMP 5	foie	JA 28	Foie
LMP 7	foie	JA 29	Foie
TER 1	foie	JA 30	intestin
TER 2	intestin	JA 31	intestin
TER 3	intestin	JA 32	Foie
TER 4	intestin		
TER 5	foie	PLR 41	intestin
TER 6	foie	PLR 42	intestin
TER 7	foie	PLR 43	Foie
TER 8	intestin	PLR 44	Foie
TER 9	foie	PLR 45	Foie
TER 10	intestin	PLR 46	foie
		PLR 47	intestin
PL 1	intestin	PLR 48	foie
PL 2	intestin	PLR 49	foie
PL 3	foie	PLR 50	foie
PL 4	intestin	PLR 51	foie
PL 5	intestin	PLR 52	intestin
PL 6	intestin	PLR 53	intestin
PL 7	foie	PLR 54	intestin
PL 8	foie	PLR 55	intestin
PL 9	foie	PLR 56	intestin
PL 10	intestin	PLR 57	foie
JA 1	foie	GY 12	intestin
JA 2	intestin	GY 13	foie
JA 3	intestin	GY 14	intestin
JA 4	intestin	GY 15	intestin
JA 5	foie	GY 16	intestin
JA 6	foie	GY 17	foie
JA 7	intestin	GY 18	foie
JA 8	intestin	GY 19	intestin
JA 9	foie	GY 20	intestin
JA 10	foie		

Tableau 3 : Nature du tissu prélevé en fonction des échantillons

Par la suite, nous allons nous intéresser à la recherche de virus qui débute par une extraction des ARN totaux à partir des différents prélèvements d'organes, suivie d'une RT-PCR avec des amorces spécifiques du gène codant pour la VP60. Ces manipulations sont réalisées au laboratoire IHVV au sein de l'UMR 1225 INRA-ENVT.

2. Recherche du virus par RT-PCR

L'extraction des ARN totaux, à partir des organes est réalisée au Trizol®. Ensuite, une reverse-transcription est réalisée à partir des ARN extraits, ce qui permet d'obtenir l'ADNc. Cet ADNc subit par la suite des PCR utilisant des amorces spécifiques du gène codant pour la VP60.

a. Extraction d'ARN à partir d'organes :

L'extraction d'ARN des prélèvements congelés proviennent de différents organes : foie pour les lapins provenant de l'île de Beniguet et foie ou intestin grêle pour les autres prélèvements. Les étapes d'extraction et de nettoyage sont réalisées en portant des gants, en utilisant des tubes stériles et des pipettes réservées au travail sur ARN afin d'éviter des contaminations par des RNases.

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

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

Les échantillons sont traités 10 par 10, en suivant le protocole suivant :

- Homogénéisation : On prélève un fragment d'organe encore congelé d'environ 5mm x 5mm de côté, puis on met les fragments dans de petits tubes à centrifugation de 1,5ml dans

lesquels on ajoute 1ml de Trizol. On broie ensuite les fragments d'organe avec le broyeur mécanique de façon à obtenir un mélange homogène. On centrifuge les tubes 10 minutes à 4°C, à 12000 g. Cette centrifugation permet de faire se déposer, en culot au fond du tube, le matériel insoluble du fragment d'organe (membranes extracellulaires, polysaccharides, ADN de haut poids moléculaire). On transfère le surnageant contenant les ARN dans un nouveau tube à centrifugation et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante, pour que les complexes nucléoprotéiques se dissocient en totalité.

- Séparation des phases : On ajoute 200µl de chloroforme, avant de fermer les capuchons des tubes et de les agiter vigoureusement à la main durant 15 secondes. On incube les tubes à température ambiante durant 10 minutes, puis on les centrifuge 15 minutes à 4°C à 12000 g. On obtient alors un mélange triphasé : une phase inférieure constituée de phénol-chloroforme rouge, une phase intermédiaire, et une phase aqueuse supérieure incolore contenant l'ARN.

- Précipitation de l'ARN : on transfère la phase aqueuse dans un nouveau tube de 1,5ml contenant 600µl d'isopropanol. On mélange par renversement et on incube 10 minutes à température ambiante. L'isopropanol permet de faire précipiter l'ARN, mais ceci est invisible. On centrifuge 10 minutes à 4°C à 12000 g. Le précipité d'ARN invisible avant la centrifugation forme alors un culot gélatineux au fond du tube.

- Lavage de l'ARN : On retire le surnageant, on lave le culot d'ARN avec 1ml d'éthanol à 75% puis on centrifuge 5 minutes à 4°C à 9000 g.

- Dissolution de l'ARN : On retire le maximum de surnageant (faire remonter les gouttes sur le bord du tube) puis on sèche le culot d'ARN en laissant le tube ouvert à l'air ambiant durant 2 heures environ. Enfin, on dissout l'ARN dans 200µl d'eau stérile dépourvue de RNase.

b. Nettoyage de l'ARN :

L'ARN isolé va alors subir une étape de nettoyage qui est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Clean-up. En effet, les inhibiteurs de RT-PCR sont toujours présents après un isolement de l'ARN avec des méthodes fondées sur le phénol-chloroforme. Ce nettoyage permet d'éliminer les inhibiteurs de RT-PCR, et donc d'obtenir une stabilité maximale. Avec ce kit, les échantillons contenant l'ARN sont mélangés à une solution

inactivant immédiatement les RNases et créant des conditions favorisant l'adsorption de l'ARN à la membrane de silice des colonnes fournies dans le kit. Des étapes de lavage permettent ensuite de retirer les sels, métabolites et composés organiques, puis l'ARN est finalement élué avec de l'eau dépourvue de RNase.

Le kit est utilisé en respectant les recommandations du fabricant ; le protocole est décrit dans la figure 12.

<p>1. Préparation de l'échantillon</p>  <p>Pré-mélange : 300µl RA1 300µl éthanol +100µl d'ARN. <u>mélanger</u></p>	<p>3. Lavages de la membrane</p>  <p>1^{er} lavage : 700µl RA2 2nd lavage : 350µl RA3</p>  <p>1^{er} : 30 <u>sec</u> à 8000g 2nd : 2 min à 8000g 3 min à température ambiante</p>
<p>2. Fixation de l'ARN à la membrane</p>  <p>Charger les 700µl</p>  <p>Centrifuger 30s à 8000g</p>	<p>4. Elution de l'ARN</p>  <p>60µl H₂O</p>  <p>1 min à 8000g</p>

Figure 12 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA Clean-Up.

c. Réalisation de la RT :

La quantité d'ARN présente dans l'échantillon est évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.

On réalise ensuite la réaction de réverse-transcription (RT), pour ceci, on utilise des amorces aléatoires (Random primers, Invitrogen). La RT est réalisée avec la SuperScript® II RT (Invitrogen), qui est une version améliorée de la reverse transcriptase du M-ML virus avec une baisse de l'activité RNase et une augmentation de la stabilité thermique. Elle peut générer des ADNc de plus de 12,3 kb.

Le protocole de la RT est le suivant :

- On ajoute dans un tube à centrifugation 250ng de random primers (ce qui correspond à 1µl par tube de random primers dilué à 1/12 ème), 1µl de mélange de dNTP à 10 mM chacun, 1µg environ d'ARN : au début des manipulations, la quantité d'ARN était ajustée en fonction de la densité optique en mettant un volume arrondi se rapprochant de 1µg. Néanmoins, les différentes mesures de la densité optique montrent que l'on a une concentration en ARN après la RT comprise entre 500µg/ml à 1000µg/ml, il a donc été décidé de mettre un volume fixe de 2µl d'ARN dans chaque tube. Enfin, on complète avec de l'eau stérile jusqu'à obtenir un volume de 12µl (on ajoute donc 8µl d'eau dépourvue de RNase).

- On incube 5 minutes à 65°C puis on refroidi dans la glace rapidement. On ajoute 4µl de tampon 5X First-Strand, 2µl de 0,1 M DTT et 1µl de RNase OUT (40 unités/µl).

- On mélange doucement puis on incube 2 minutes à 25°C.

- On ajoute 1µl (200 unités) de SuperScript II RT, on mélange en pipetant doucement puis on incube 10 minutes à 25°C, suivi de 50 minutes à 42°C.

- On inactive la réaction en chauffant 15 minutes à 70°C avant de plonger les tubes dans la glace.

d. PCR nichées :

Toutes les étapes précédentes ne sont pas spécifiques aux virus apparentés au RHDV, la reverse transcription a été effectuée sur l'ensemble des ARN contenus dans le prélèvement. C'est la dernière étape de la recherche du virus : les réactions de PCR ne vont concerner que les ADNc obtenus à partir du génome viral. Pour ce faire, on utilise des amorces spécifiques de la VP60. Si un virus apparenté au RHVD est présent dans l'échantillon, la séquence codante pour la VP60 au sein des ADNc va être amplifiée, ce qui pourra être mis en évidence par électrophorèse.

Amorces

La séquence connue du gène de la VP60 du RHDV pathogène a permis de choisir les amorces utilisées pour la PCR. .

Les caractéristiques de ces amorces sont indiquées dans le tableau 4 :

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

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

Tableau 4 : Séquence et position des amorces utilisées pour la détection du virus.

L'amplification de la séquence codante pour la VP60 a été réalisée par une technique de PCR nichées. Cette technique donne des amplicons de petites tailles et permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité du test. La première PCR utilise les amorces externes et la deuxième les amorces internes. C'est le produit de la 2^{ème} PCR que nous recherchons par électrophorèse de façon à déterminer la présence de virus.

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

T_H: Température d'hybridation.

Tableau 5 : Utilisation des amorces et description des amplicons produits.

Réalisation de la PCR nichée

Pour les deux réactions de la PCR nichée, nous avons préparé des mélanges réactionnels contenant tout les composants nécessaires à l'amplification, puis nous avons réparti ce mélange dans des micro tubes à PCR contenant de l'ADNc provenant des échantillons. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 50µl/tube.

Les mélanges réactionnels contiennent :

- la Taq Polymérase (Qbiogene, 5U/µl), on l'utilise à 1U/tube
- Un tampon (MgCl₂), utilisé à 10X par rapport à la concentration finale
- Un mélange de dNTP (10mM chacun), utilisé à 50X par rapport à la concentration finale.
 - ⇒ Ces trois composants proviennent du même fabricant.
- Les amorces : on les utilise à la concentration de 10µM, soit 20X par rapport à la concentration finale.
- De l'eau pure, permettant d'atteindre un volume final de 50µl par tube.

Dans les deux réactions de PCR de la PCR nichée, nous avons réparti 45µl de mélange réactionnel par tube avant d'y ajouter 5µl d'ADNc. Pour améliorer la qualité des électrophorèses, les produits d'amplification obtenus après la première PCR ont parfois été dilués au dixième entre les 2 réactions de PCR nichées. Pour valider les résultats, nous avons inclus aux différentes étapes des témoins positifs et négatifs. Les témoins positifs étaient constitués de plasmide pBG3, qui contient le gène codant pour la protéine VP60, ou d'ADNc d'un échantillon ayant été positif aux réactions de PCR (échantillon B7). De l'eau pure a été utilisée en remplacement de l'ADNc dans les témoins négatifs.

Chaque réaction de PCR compte 35 cycles. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 40 secondes à 94°C suivie par une étape d'hybridation de 40 secondes s'effectuant à la température d'hybridation du couple d'amorces utilisé (soit 57°C pour la 1^{ère} réaction de PCR et 60°C pour la seconde réaction de PCR), et, pour terminer, une étape d'élongation de 1 minute à 72°C.

e. Electrophorèse :

Pour analyser les résultats de l'amplification, nous avons réalisé des électrophorèses en gel d'agarose. Ce gel est constitué de poudre d'agarose mise dans un tampon TBE (Tris Borate d'EDTA). Un gel à 1,5% d'agarose est utilisé, de façon à obtenir une migration correcte des amplicons. 3µl de SYBR®Safe sont ajoutés au gel, ce qui permet la révélation du gel. Dans le premier puits du gel, on dépose 3µl de marqueur de poids moléculaire (1 kb Gibco BRL). Les autres puits reçoivent un mélange de 8µl de produit de PCR et de 2µl de tampon de charge (bleu de bromophénol). Le gel est immergé dans le tampon TBE, puis mis à migrer environ 45 minutes sous une tension de 100 volts. La migration terminée, on examine le gel sous rayonnement UV ($\lambda = 312 \text{ nm}$), le SYBR®Safe permettant de voir la migration des amplicons. Nous recherchons des amplicons faisant 371 paires de bases.

f. Séquençage du gène de la VP60 :

Le séquençage du gène de la protéine VP60 des échantillons trouvés positifs après la PCR a été effectué par le laboratoire Millegen à Toulouse.

III. Résultats

1. Résultats de la recherche de virus

La révélation de l'amplification du fragment du gène de la VP60 se fait par électrophorèse. Les bandes obtenues sont comparées au marqueur de poids moléculaire afin de vérifier qu'elles correspondent à la taille attendue (371 paires de base). Le témoin positif nous permet de vérifier que la PCR a bien fonctionné et le témoin négatif qu'il n'y a pas eu de contamination (voir illustration 2).

M B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B10 T+ T-

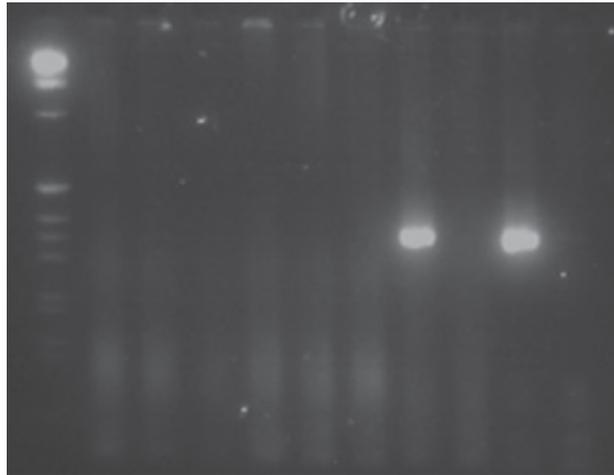


Illustration 2 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR réalisées sur les ADNc obtenus à partir de foies des lapins collectés à Beniguet, en 1997.

M : Marqueur de poids moléculaire
T- : Témoin négatif

T+ : Témoin positif
B1-10 : résultats pour les échantillons B1-

7 et B10

L'extrait de foie du lapin B7 est positif sur cette PCR.

Pour chaque échantillon, une PCR nichée a été réalisée, à l'ENVT, en utilisant les amorces présentées précédemment. Quand une PCR est positive, cela signifie que le gène de la VP60 est présent parmi les ADNc et donc qu'un virus apparenté au RHDV infectait l'échantillon correspondant. L'ensemble des résultats des PCR réalisées, à l'ENVT, sur les organes prélevés (foie ou intestin) dans les 9 sites géographiques sont résumés dans le tableau 5.

Lapins	organes	Dates d'échantillonnage	Résultats PCR
B1	foie	1997	négatif
B2	foie	1997	négatif
B3	foie	1997	négatif
B4	foie	1997	négatif
B5	foie	1997	négatif
B6	foie	1997	négatif
B7	foie	1997	positif
B8	foie	1997	négatif
B9	foie	1997	positif
B11	foie	1997	positif
B12	foie	1997	négatif
B13	foie	1997	négatif
B14	foie	1997	négatif
B15	foie	1997	négatif
B16	foie	1997	négatif

B17	foie	1997	négatif
B18	foie	1997	négatif
B19	foie	1997	négatif
NDS 1	intestin	2007/2008	négatif
NDS 2	foie	2007/2008	négatif
NDS 3	foie	2007/2008	négatif
NDS 4	foie	2007/2008	négatif
NDS 5	intestin	2007/2008	négatif
NDS 6	foie	2007/2008	négatif
NDS 7	intestin	2007/2008	négatif
NDS 8	foie	2007/2008	négatif
NDS 9	foie	2007/2008	négatif
NDS 10	foie	2007/2008	négatif
AUB 2	foie	2007/2008	négatif
LMP 1	foie	2007/2008	négatif
LMP 2	foie	2007/2008	négatif
LMP 3	intestin	2007/2008	négatif
LMP 4	foie	2007/2008	négatif
LMP 5	foie	2007/2008	négatif
LMP 7	foie	2007/2008	négatif
TER 1	foie	2007/2008	négatif
TER 2	intestin	2007/2008	négatif
TER 3	intestin	2007/2008	négatif
TER 4	intestin	2007/2008	négatif
TER 5	foie	2007/2008	négatif
TER 6	foie	2007/2008	négatif
TER 7	foie	2007/2008	négatif
TER 8	intestin	2007/2008	négatif
TER 9	foie	2007/2008	négatif
TER 10	intestin	2007/2008	négatif
PL 1	intestin	2007/2008	négatif
PL 2	intestin	2007/2008	négatif
PL 3	foie	2007/2008	négatif
PL 4	intestin	2007/2008	négatif
PL 5	intestin	2007/2008	négatif
PL 6	intestin	2007/2008	négatif
PL 7	foie	2007/2008	négatif
PL 8	foie	2007/2008	négatif
PL 9	foie	2007/2008	négatif
PL 10	intestin	2007/2008	négatif
JA 1	foie	2007/2008	négatif
JA 2	intestin	2007/2008	négatif
JA 3	intestin	2007/2008	négatif
JA 4	intestin	2007/2008	négatif
JA 5	foie	2007/2008	négatif
JA 6	foie	2007/2008	négatif
JA 7	intestin	2007/2008	négatif
JA 8	intestin	2007/2008	négatif
JA 9	foie	2007/2008	négatif
JA 10	foie	2007/2008	négatif
JA 11	intestin	2007/2008	négatif
JA 12	foie	2007/2008	négatif
JA 13	intestin	2007/2008	négatif
JA 14	intestin	2007/2008	négatif

JA 15	foie	2007/2008	négatif
JA 16	intestin	2007/2008	négatif
JA 17	foie	2007/2008	négatif
JA 18	foie	2007/2008	négatif
JA 19	intestin	2007/2008	négatif
JA 20	intestin	2007/2008	négatif
JA 21	intestin	2007/2008	négatif
JA 22	foie	2007/2008	négatif
JA 23	foie	2007/2008	négatif
JA 24	intestin	2007/2008	négatif
JA 25	intestin	2007/2008	négatif
JA 26	intestin	2007/2008	négatif
JA 27	intestin	2007/2008	négatif
JA 28	foie	2007/2008	négatif
JA 29	foie	2007/2008	négatif
JA 30	intestin	2007/2008	négatif
JA 31	intestin	2007/2008	négatif
JA 32	foie	2007/2008	négatif
PLR 41	intestin	2007/2008	négatif
PLR 42	intestin	2007/2008	négatif
PLR 43	foie	2007/2008	négatif
PLR 44	foie	2007/2008	négatif
PLR 45	foie	2007/2008	négatif
PLR 46	foie	2007/2008	positif
PLR 47	intestin	2007/2008	négatif
PLR 48	foie	2007/2008	négatif
PLR 49	foie	2007/2008	négatif
PLR 50	foie	2007/2008	négatif
PLR 51	foie	2007/2008	positif
PLR 52	intestin	2007/2008	négatif
PLR 53	intestin	2007/2008	négatif
PLR 54	intestin	2007/2008	négatif
PLR 55	intestin	2007/2008	négatif
PLR 56	intestin	2007/2008	négatif
PLR 57	foie	2007/2008	négatif
GY 11	foie	2007/2008	négatif
GY 12	intestin	2007/2008	négatif
GY 13	foie	2007/2008	négatif
GY 14	intestin	2007/2008	négatif
GY 15	intestin	2007/2008	négatif
GY 16	intestin	2007/2008	négatif
GY 17	foie	2007/2008	négatif
GY 18	foie	2007/2008	négatif
GY 19	intestin	2007/2008	négatif
GY 20	intestin	2007/2008	négatif

Tableau 6 : Résultats des PCR sur les organes (intestin, foie) des lapins de Cerizay, La Petite Boissière, Plouedern, Guisseny, Ploudaniel, Aubas, Terrasson, Notre Dame de Sanilhac et Beniguet.

Les lapins infectés par un virus apparenté au RHDV ont été trouvés dans 2 sites différents, sur l'île de Beniguet (B7, B9, B11) et sur la commune de Plouédern (PLR 46, PLR51).

Quelques exemples d'électrophorèses obtenues :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 T+T-M

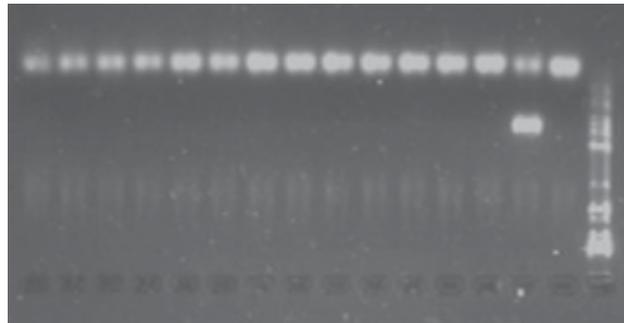


Illustration 3 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR réalisées sur les ADNc obtenus à partir d'organes (foie ou intestin) de lapins collectés à Cerizay, en 2007/2008.

M : Marqueur de poids moléculaire
T- : Témoin négatif

T+ : Témoin positif
1-13 : résultats pour les échantillons JA15-26

Aucun prélèvement n'est positif sur cette PCR.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 T- T+ M



Illustration 4 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR réalisées sur les ADNc obtenus à partir d'organes (foie ou intestin) de lapins collectés à Plouédern, en 2007/2008.

M : Marqueur de poids moléculaire
T- : Témoin négatif

T+ : Témoin positif
1-12 : résultats pour les échantillons PLR75-86

Les prélèvements PLR 46 et PLR 51 sont positifs.

Les ADNc des 3 échantillons de foie de lapins provenant de l'île de Beniguet trouvés positifs en RT-double PCR à l'ENVT (B7, B9 et B11), ainsi que les foies correspondants, ont

été adressés début 2008 à l'AFSSA Ploufragan. Ils ont été testés avec différentes PCR pour tenter d'obtenir d'autres informations de séquence. L'AFSSA Ploufragan a réalisé plusieurs PCR nichée et semi-nichée qui donnent des amplicons de petites tailles. Les amorces utilisées permettent d'accéder à la partie interne de la séquence codant pour la VP60, puis ils ont réalisé de nouvelles PCR qui ont permis d'optimiser la détection des ARN viraux :

- une PCR transmise par le Dr Tanja Strive (avant sa publication en 2009) a été testée sur les échantillons. Cette PCR permet d'amplifier une zone conservée des gènes de la VP60 du RHDV et du calicivirus du lièvre l'EBHSV. En particulier la séquence du gène de la VP60 du nucléotide 38 au nucléotide 337. Elle a notamment permis au CSIRO de détecter une souche non pathogène chez les lapins sauvages d'Australie, proche du RHDV mais aussi de l'EBHSV (lagovirus du lièvre) et génétiquement éloignée de toutes les souches connues à ce jour dont la souche anglaise "Ashington".

- Une nouvelle PCR permettant d'amplifier la totalité du gène codant pour la VP60 a été mise au point en utilisant l'amorce sens du couple PCR 12U/12L située au niveau du codon d'initiation et l'amorce anti-sens du couple PCR 15U/15L située au niveau du codon stop (PCR 12U/15L).

Les différentes PCR ont toutes été infructueuses (un seul échantillon a donné un fragment PCR trop faible pour être séquencé et qui n'a pas pu être obtenu à nouveau). A l'ENVT, nous n'avons pas réussi à confirmer ces résultats positifs (en refaisant une PCR à partir du même ADNc ou de nouveaux ADNc), soulignant ainsi la difficulté de ces analyses.

L'AFSSA Ploufragan a également réalisé pour chaque échantillon collecté à la saison de chasse 2007/2008 des PCR nichées, afin de rechercher le virus. Les PCR réalisées sont les mêmes que présentées précédemment : les double-PCR nichées et semi-nichées donnant des amplicons de petites tailles, puis les PCR nouvellement mises au point (PCR de Tanja Strive et la PCR permettant d'amplifier le gène codant pour la VP60).

Les résultats obtenus par l'AFSSA pour les échantillons collectés à la saison de chasse 2007/2008 sont légèrement différents de ceux obtenus à l'ENVT, ils concernent également des échantillons provenant de lapins tués à Plouedern dans le Finistère (PLR), mais aussi un échantillon provenant de Cerizay dans les Deux-Sèvres (JA 10). Avec leurs amorces, des

résultats positifs ont été obtenus pour les échantillons PLR46, PLR 54 et PLR 56 ; par contre, l'AFSSA Ploufragan n'a pas réussi à amplifier l'échantillon PLR 51 que nous avons trouvé positif à l'ENVT. De la même manière, à l'ENVT, avec nos amorces, nous n'avons pas réussi à amplifier les échantillons PLR 54, 56 et JA 10. L'échantillon JA 10 avait été testé par l'AFSSA Ploufragan en début de projet en 2006, sans succès avec les premiers couples d'amorces, mais suite à la mise au point de nouvelles PCR et à l'optimisation des conditions d'extraction et de rétrotranscription, il s'est révélé positif, quelles que soient les PCR utilisées en seconde intention.

2. Résultats du séquençage des amplicons et analyse des séquences

a. Séquençage des amplicons obtenus à partir de foie de Beniguet :

Selon le protocole méthodologique décrit précédemment et avec la PCR élaborée à l'ENVT, une souche issue de prélèvements de foie (B7, B11) réalisés sur l'île de Beniguet en 1997 a été partiellement caractérisée, l'échantillon B9 n'ayant pas donné de séquences interprétables.

Le séquençage d'environ 350 paires de bases au milieu du gène codant pour la VP60 a montré que la souche identifiée est génétiquement proche des souches actuelles de RHDV. Elles ne présentent notamment pas de délétion dans la zone hypervariable C. La séquence complète du gène de la VP60 a été obtenue afin de préciser les relations phylogéniques entrevues.

Le séquençage des 2 produits de PCR (B7, B11) a révélé des séquences quasi identiques.

Séquence obtenue à partir de l'échantillon B7 en utilisant l'amorce VP60bs

```
NNNNNNNNTCGNNNNNTNNGCAGACCGTTGACTCAATTTNCCTGCAGGCCTCCTCACAACCCAGTTCTCACTG
GGGTTCGGCAATGACAACAGGTGGAACGGCCAAATAGTGGGGCTGCAACCAGTACCCGGAGGGTTTTCTACGTGCA
ACAGGCATTGGAACCTGAACGGCAGCACGTATGGCTGGTCAAGCCCTCGGTTTGCTGACATTGACCATCGAAGTG
GCAGTGCAAGTTACCCTGGGAACAACGCAACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTATGCCAATGCTGGGTCTGCGGTTG
ACAACCCCATCTCCAGGTTGCACCAGATGGCTTTTCTGACANN
```

Séquence obtenue à partir de l'échantillon B11 en utilisant l'amorce VP60bs

```
NNNNNNNNTCGNNNNNTCNGCAGACCGTTGACTCNATTTNCCTGCAGGCCTCCTCACAACCCAGTTCTCACTG
GGGTTCGGCAATGACAACAGGTGGAACGGCCAAATAGTGGGGCTGCAACCAGTACCCGGAGGGTTTTCTACGTGCA
ACAGGCATTGGAACCTGAACGGCAGCACGTATGGCTGGTCAAGCCCTCGGTTTGCTGACATTGACCATCGAAGTG
GCAGTGCAAGTTACCCTGGGAACAACGCAACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTATGCCAATGCTGGGTCTGCGGTTG
ACAACCCCATCTCCAGGTTGCACCAGATGGNTNCCTGACANN
```

Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenue pour les échantillons B7et B11, montrant que ces séquences sont pratiquement identiques. Les nucléotides et les acides aminés communs aux 3 séquences sont marqués en rouge avec une étoile rose dessous

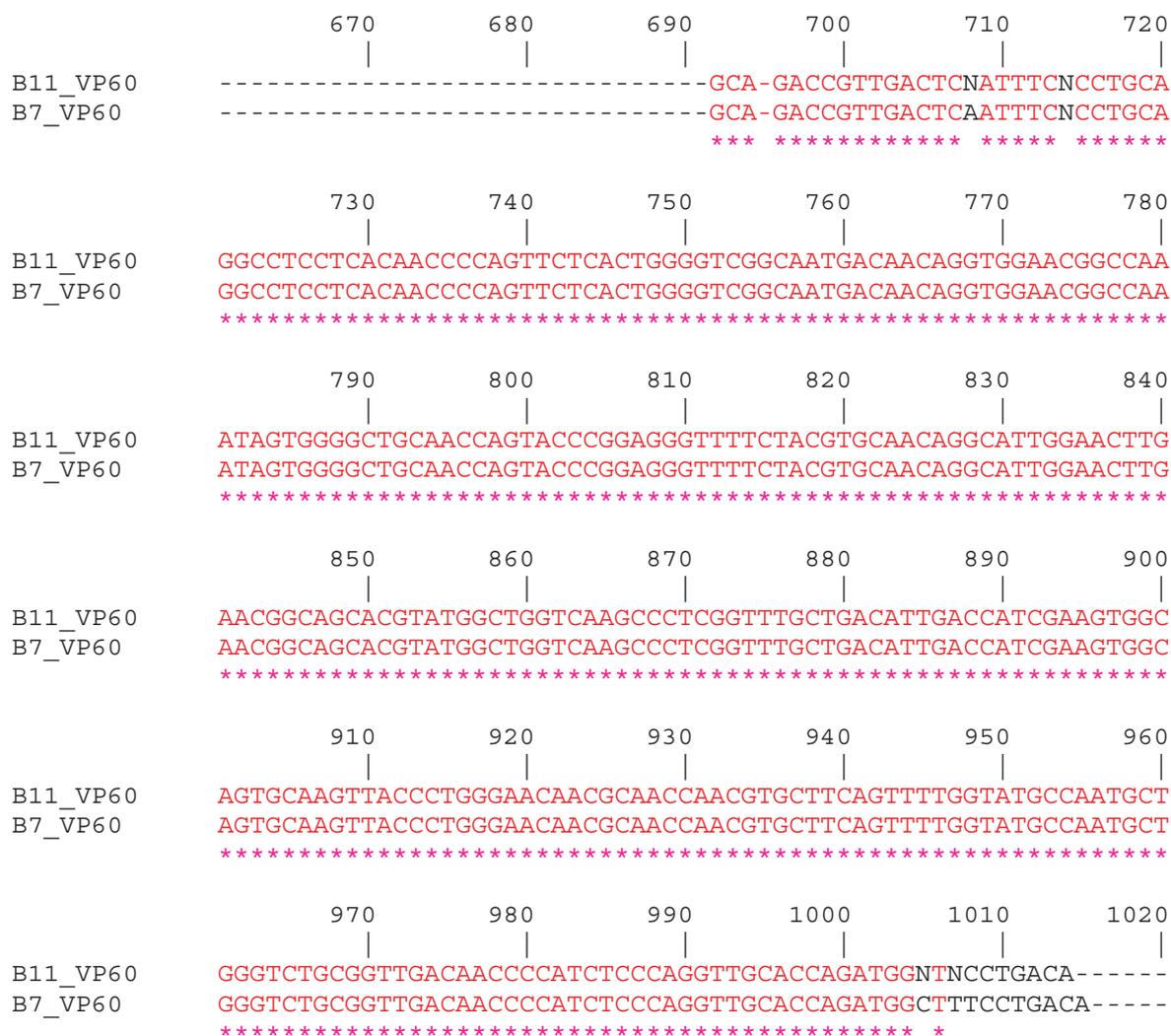


Figure 13 : Séquence partielle du gène de la protéine de capsid du calicivirus apparenté au RHDV isolé dans cette étude sur l’île de Beniguet et alignement de la séquence du gène de la VP60 obtenue pour l’échantillon B7 et pour l’échantillon B11.

La souche non pathogène isolée à partir d’échantillons prélevés en 1997 à Beniguet se trouve dans le même cluster que plusieurs souches pathogènes ou non isolées récemment :

- La souche Jena : une souche allemande séquencée dans la publication de *Forrester et al.* (2008).
- Des souches irlandaises (*Forrester et al.* 2007)

- Une souche allemande Wriezen
- Plusieurs souches pathogènes ou non mentionnées dans la publication de *Moss et al* (2002)
- La souche pathogène 05-01 isolée par l'équipe de Ghislaine Le Gall-Reculé (AFSSA Ploufragan)

b. Séquençage des amplicons obtenus à partir des échantillons de Plouédern :

Les séquences obtenues à partir d'amplicons d'échantillons de Plouédern à l'ENVT (PLR 46) ou à l'AFSSA Ploufragan (PLR 54 et 56) sont différentes entre elles et sont apparemment assez proches, respectivement, des souches pathogènes actuelles de RHDV (dont certaines récemment isolées, par exemple : 00-13), du variant antigénique RHDVa et de la souche 06-11, mais non de la séquence de la souche australienne RCV-A1. De plus, la souche PLR 46 est très proche de la souche Béniguet 1997. La séquence protéique disponible de la souche PRL46 a été alignée avec celle de la souche de Béniguet B7 (toutes deux apparentées au RHDV) et avec une séquence française RHDV de 2000 (00-13) : les 3 séquences sont identiques, en tous cas dans la zone séquencée et amplifiée avec les amorces PCR de l'ENVT. Même si la région séquencée du gène est assez conservée, ce résultat suggère bien que des souches non pathogènes génétiquement proches des souches pathogènes de RHDV existent. (cf. Figure 14 et 15).

PLR 46 séquence nucléotidique :

```
NCTGTTGACTCAATTTACCTGCAGGCCTCCTCACAAACCCAGTCTCTACTGGGGTCGGCAATGACAACAGGTGG
AACGGCCAAATAGTGGGGCTGCAACCAGTACCCGGGGGGTTTTCCACGTGCAACAGGCATTGGAAC TTGAATGGC
AGCACGTATGGCTGGTCGAGCCCTCGGTTTGCTGACATTGACCATCGAAGTGCCAGTGCAAGTTACCC TGGGAAC
AACGCAACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTATGCCAATGCTGGGTCTGCGGTTGACAACCCCATCTCCAGGTTGCA
CCAGATGGNTNNCCTGACANNNN
```

PLR 46 séquence protéique :

```
VDSISPAGLLTTPVLTGVGNDNRWNGQIVGLQPVPGGFSTCNRHWNLNGSTYGWSSPRFA
DIDHRSGSASYPGNNATNVLQFWYANAGSAVDNPI SQVAPD
```

Figure 14 : Séquences nucléotidique et protéique du gène de la VP60 obtenues pour l'amplicon de l'échantillon PLR 46, à partir de la PCR de l'ENVT utilisant l'amorce VP60bs

Comparaison des séquences nucléotidiques :

```

          670      680      690      700      710      720
00_13      TTTGAGTTTCGTGATGGTTCGAGCCCCTTCCAGCAAGACTGTTGACTCAATTTACCTGCA
B7_VP60    -----GCA-GACCGTTGACTCAATTTNCCTGCA
PLR46      -----NCTGTTGACTCAATTTACCTGCA
                                     * * * * *

          730      740      750      760      770      780
00_13      GGCCTCCTCACAACCCAGTTCTCACTGGGGTCGGCAATGACAACAGGTGGAACGGCCAA
B7_VP60    GGCCTCCTCACAACCCAGTTCTCACTGGGGTCGGCAATGACAACAGGTGGAACGGCCAA
PLR46      GGCCTCCTCACAACCCAGTCCTCACTGGGGTCGGCAATGACAACAGGTGGAACGGCCAA
                                     * * * * *

          790      800      810      820      830      840
00_13      ATAGTGGGGCTGCAACCAGTACCCGAGGGTTTTCTACGTGCAACAGGCATTGGAACTTG
B7_VP60    ATAGTGGGGCTGCAACCAGTACCCGAGGGTTTTCTACGTGCAACAGGCATTGGAACTTG
PLR46      ATAGTGGGGCTGCAACCAGTACCCGGGGGTTTTCCACGTGCAACAGGCATTGGAACTTG
                                     * * * * *

          850      860      870      880      890      900
00_13      AACGGCAGCACGTATGGCTGGTCAAAGCCCTCGGTTTGCTGACATTGACCATCGGAGTGGC
B7_VP60    AACGGCAGCACGTATGGCTGGTCAAAGCCCTCGGTTTGCTGACATTGACCATCGAAGTGGC
PLR46      AATGGCAGCACGTATGGCTGGTCGAGCCCTCGGTTTGCTGACATTGACCATCGAAGTGGC
                                     * * * * *

          910      920      930      940      950      960
00_13      AGTGCAAGTTACCCTGGGAACAACGCAACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTATGCCAATGCT
B7_VP60    AGTGCAAGTTACCCTGGGAACAACGCAACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTATGCCAATGCT
PLR46      AGTGCAAGTTACCCTGGGAACAACGCAACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTATGCCAATGCT
                                     * * * * *

          970      980      990      1000      1010      1020
00_13      GGGTCTGCGGTTGACAACCCCATCTCCAGGTTGCACCGGATGGCTTCCCTGACATGTCG
B7_VP60    GGGTCTGCGGTTGACAACCCCATCTCCAGGTTGCACAGATGGCTTCCCTGACA-----
PLR46      GGGTCTGCGGTTGACAACCCCATCTCCAGGTTGCACAGATGG-----
                                     * * * * *

```

Comparaison des séquences protéiques :

```

          190      200      210      220      230      240
B7_VP60    -----QTVDSISPA
00_13      TGDPGLVPTLVLSVYNNLINPFGGSTSAIQVTVETRPSEDFEFVMVRAPSSKTVDSISPA
PLR46      -----TVDSISPA
                                     * * * * *

          250      260      270      280      290      300
B7_VP60    GLLTTPVLTGVGNDNRWNGQIVGLQVPVGGFSTCNRHWNLNGSTYGWSSPRFADIDHRSG
00_13      GLLTTPVLTGVGNDNRWNGQIVGLQVPVGGFSTCNRHWNLNGSTYGWSSPRFADIDHRSG
PLR46      GLLTTPVLTGVGNDNRWNGQIVGLQVPVGGFSTCNRHWNLNGSTYGWSSPRFADIDHRSG
                                     * * * * *

```

	310	320	330	340	350	360
B7_VP60	SASYPGNNATNVLQFWYANAGSAVDNPI SQVAPDGFDP-----					
00_13	SASYPGNNATNVLQFWYANAGSAVDNPI SQVAPDGFDPMSFVFPNGPGI PAAGWVGF GAI					
PLR46	SASYPGNNATNVLQFWYANAGSAVDNPI SQVAPD-----					

Figure 15 : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques du gène de la VP60 obtenue pour les échantillons B7, PLR46 et pour la souche RHDV pathogène 00-13. Les nucléotides et les acides aminés communs aux 3 séquences sont marqués en rouge avec une étoile rose dessous.

L'échantillon PLR 51 n'a pas été amplifié à Ploufragan, mais il a quand même été envoyé au séquençage. La séquence obtenue (cf. figure 16) est très intéressante. En effet, bien que cette séquence ait été obtenue à partir d'un extrait de foie de lapin tué au cours de la saison de chasse 2007/2008 et ne présentant pas de signes cliniques de RHD, elle est néanmoins proche d'anciennes souches de RHDV pathogènes isolées en 1989 (SD89 française, AST89 et la souche espagnole MC89).

PLR 51 séquence nucléotidique :

GANTGTTGACTCNATTTACCCCGCAGGCCTCCTCACGACCCCAAGTCCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGGTG
 GAATGGCCAAATAGTGGGACTGCAACCAGTACCTGGAGGGTTCTCTACGTGCAATAGGCATTGGAACTTGAATGG
 CAGCACATATGGCTGGTCAAGCCCCGGTTTGCCGACATTGACCATCGAAGAGGCAGTGCAAGTTACCCCTGGGAA
 CAACGCAACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTATGCCAATGCTGGGTCTGCAATCGATAATCCCATCTCCAGGTTGC
 ACCAGATGNNNNNCCTGACANN

PLR 51 séquence protéique :

VDSISPAGLLTTPVLTGVGNDNRWNGQIVGLQPVPGGFSTCNRHWNLNGSTYGWSSPRFA
 DIDHRRGSASYPGNNATNVLQFWYANAGSAIDNPI SQVAPD

Figure 16 : Séquences nucléotidique et protéique du gène de la VP60 obtenues pour l'amplicon de l'échantillon PLR 51, à partir de la PCR de l'ENVT utilisant l'amorce VP60bs

c. Séquençage de l'amplicon obtenu à partir de l'échantillon de Cerizay (JA 10) :

La séquence obtenue à partir de l'échantillon JA 10 de Cerizay à l'AFSSA Ploufragan présente une homologie de 98 % en nucléotide et diffère seulement de 2 acides aminés de la souche 06-11. Ce résultat pourrait suggérer que le type de souche non pathogène qui a été caractérisé, en 2006, dans un élevage circule aussi dans la faune sauvage.

IV. Discussion

L'objectif de cette étude est d'isoler et de caractériser des souches non pathogènes du RHDV, circulant dans les populations sauvages de lapins français, afin de les comparer aux souches pathogènes classiques et ainsi de permettre de préciser leurs différences antigéniques et génomiques avec le RHDV. De nombreuses études sérologiques ont mis en évidence l'existence de calicivirus non pathogènes apparentés au RHDV dans les populations sauvages de lapins de différents pays sans qu'aucun n'ait pu être isolé à ce jour. Leur pouvoir protecteur vis à vis du RHDV et ainsi leur influence sur l'épidémiologie de la RHD sont parfois discutés. Les résultats de cette étude serviront, dans un second temps, à mettre au point des tests sérologiques spécifiques et à mieux comprendre l'interaction entre les formes non pathogènes et pathogènes des virus RHDV.

Pour atteindre ces objectifs, il avait été initialement décidé d'utiliser des lapins sentinelles séronégatifs placés au contact des populations sauvages, et de suivre leur statut sérologique vis à vis du RHDV par ELISA. Les lapins devant servir de sentinelles seraient originaires de l'élevage conventionnel de l'AFSSA sans incident sanitaire depuis plusieurs années et non vaccinés vis-à-vis de la myxomatose et de la RHD. Le protocole d'expérimentation sur le terrain défini au départ a finalement dû être modifié compte tenu de la séroconversion des lapins avant qu'ils ne soient placés dans la nature ; le virus non pathogène est apparu plus tôt. Ce travail a permis de caractériser chez des lapins domestiques une souche non pathogène apparentée au RHDV, de déterminer la séquence entière du gène codant pour la protéine de capsid VP60, et d'établir ainsi les relations phylogéniques de cette souche avec les autres souches de lagovirus caractérisées à ce jour. Il a aussi été démontré expérimentalement le pouvoir non pathogène mais infectieux de la souche caractérisée dans l'élevage de l'AFSSA Ploufragan, ce qui constitue des données tout à fait originales. A la différence du RCV, la souche qui a été isolée induit la production d'anticorps qui ne protègent pas contre une infection par le RHDV.

Pour caractériser des souches non pathogènes du RHDV circulant dans les populations sauvages de lapins français, un nouveau protocole expérimental a été mis en place.

Notre travail a consisté en la recherche de virus apparentés au RHDV dans des échantillons d'organes prélevés sur des cadavres de lapins tués au cours de différentes saisons de chasse. Pour cela, des RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN totaux extraits des

différents prélèvements d'organes (intestin, foie). Chaque prélèvement a subi une PCR nichée utilisant des amorces spécifiques du gène de la VP60 du RHDV pathogène. Des études, réalisées auparavant, ont montré que les RHDV – like ont une séquence nucléotidique qui diffère relativement peu par rapport au virus classique pathogène (Moss *et al*, 2002). De plus, le diagnostic sérologique de la RHD a donné des résultats positifs avec les virus apparentés au RHDV ; or, il se fait classiquement par une réaction ELISA qui utilise la VP60 comme antigène. Nous avons donc utilisé des amorces spécifiques du gène de la VP60 du RHDV pathogène en supposant que les séquences des virus recherchés étaient proches du virus pathogène.

L'étude antérieure réalisée par la même équipe de travail, a identifié un virus de type RHDV non pathogène sur des lapins d'élevage. Le virus se trouvait majoritairement dans la rate, puis l'intestin, et enfin le foie ; par contre, la virémie ne semblait pas importante, du moins sous la forme de virions libres. En partant de ce constat, nous avons concentré nos recherches de virus non pathogènes apparentés au RHDV dans certains organes des lapins prélevés (foie et Intestin). Nous n'avons pas vérifié la présence de virus dans le sérum ni dans les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell).

Nos résultats montrent l'importance des techniques d'extraction, de retrotranscription et d'amplification dans l'identification des calicivirus apparentés au RHDV. En effet, à l'ENVT, nous avons nettement amélioré la sensibilité de notre extraction d'ARN en utilisant un broyeur mécanique. De la même manière, l'AFSSA Ploufragan a modifié sa technique d'extraction d'ARN pour utiliser celle de l'ENVT, c'est à dire qu'ils ont ajouté une étape d'extraction au phénol-chloroforme-trizol avant celle de la colonne Qiagen. Ils ont aussi changé leur protocole de rétrotranscription en employant la transcriptase inverse « Superscript II » (Invitrogen) utilisée à l'ENVT. Les échantillons de Cerizay ont été analysés sans succès avant l'amélioration des techniques, alors qu'après l'optimisation des conditions d'extraction et de reverse transcription, l'échantillon JA 10 s'est révélé positif.

Le choix des amorces utilisées dans les PCR permettant l'identification des calicivirus apparentés au RHDV est également fondamental. En effet, nous avons pu voir en comparant les résultats obtenus à l'ENVT et ceux obtenus à l'AFSSA de Ploufragan, que selon les amorces utilisées, les échantillons montrent des résultats positifs différents. Pour le foie de l'échantillon PLR 51, à l'ENVT, les résultats ont été positifs, alors qu'à l'AFSSA Ploufragan, l'amplification n'a pas fonctionné et l'échantillon PLR51 a donc donné un résultat négatif.

Inversement, les échantillons PLR54 et 56 ont été négatifs à l'ENVT mais positifs à l'AFSSA Ploufragan. Les amorces utilisées dans les deux centres de recherche sont différentes.

Les amorces de l'ENVT amplifient le gène de la VP60 du nucléotide 647 à 1018, alors qu'à l'AFSSA Ploufragan de nouvelles PCR ont été mise au point :

- La PCR transmise par le Dr Tanja Strive amplifie le gène de la VP60 du nucléotide 38 au 337.

- Une nouvelle PCR permettant d'amplifier le gène codant pour la VP60 a été mise au point en utilisant l'amorce sens du couple PCR 12U/12L situé au niveau du codon d'initiation et l'amorce anti-sens du couple PCR 15U/15L situé au niveau du codon stop. Ces amorces ont été initialement développées pour obtenir la séquence du génome entier de la souche 06-11.

L'utilisation de plusieurs PCR avec des amorces n'amplifiant pas les mêmes zones du gène de la VP60 est complémentaire et a permis d'élargir le spectre de détection des RHDV-like. Des recherches ont permis d'augmenter la sensibilité de détection des ARN viraux et de caractériser des virus présents en très petite quantité chez les animaux, ce qui a ainsi rendu l'analyse des échantillons plus fructueuse.

Durant nos manipulations, nous nous sommes confrontés, à plusieurs reprises, à des difficultés d'analyses pour les prélèvements en provenance de Béniguet. En effet, à l'AFSSA Ploufragan, malgré l'optimisation des techniques d'extraction, de rétrotranscription et l'utilisation de diverses PCR, les 3 échantillons positifs à l'ENVT (B7, B9, B11) n'ont jamais été amplifiés avec succès, que se soit à partir des foies de départ ou des ADNc transmis par l'ENVT. De plus, à l'ENVT, nous n'avons pas toujours réussi à confirmer nos résultats positifs concernant ces échantillons. Chronologiquement, nous avons débuté nos expérimentations par les échantillons provenant de l'île de Beniguet. Par conséquent, l'échantillon B7 a rapidement été identifié comme positif. Nous avons donc décidé par la suite de faire de l'ADNc obtenu à partir de B7 le témoin positif des PCR suivantes. L'ADNc de B7 était conservé à une température de -30°C. Malgré cette conservation au froid, à plusieurs reprises, l'ADNc de B7, utilisé comme témoins positifs des PCR des autres échantillons, a montré un résultat négatif. Peut être est ce dû à l'ancienneté des échantillons, qui, contrairement aux autres prélèvements à notre disposition, ont été prélevés il y a une dizaine d'années. Quoi qu'il en soit, nos ADNc de B7 ont une durée de conservation limitée au froid. Cette durée n'a pas été identifiée, mais néanmoins, les PCR utilisant comme témoins positifs

de l'ADNc B7 obtenu dans les 72h ont fonctionné. Suite à ce constat, nous avons toujours réalisé nos PCR dans les 72h suivant la réaction de reverse transcription, les ADNc étant conservés à -30°C entre les 2 étapes.

Nous avons isolé dans notre étude 6 calicivirus apparentés aux RHDV. L'analyse phylogénétique de ces virus nous a apporté de nombreuses informations. L'identification de plusieurs types de souches non pathogènes circulant au sein de la faune sauvage confirme d'une part leur diversité, mais aussi d'autre part, pour certaines, leur ressemblance moléculaire avec les souches pathogènes de RHDV, tout au moins au niveau de la région de la séquence génomique étudiée (le gène de la VP60). Par exemple, nous avons montré qu'un virus apparemment non pathogène isolé sur un lapin mort au cours de la chasse en 2007/2008 (PL51) est très proche d'un RHDV pathogène isolé en 1989. D'autres virus isolés sur des échantillons français datant de 2007/2008 (PLR 46, 54 et 56) sont proches de souches plus récemment isolées. De plus, le séquençage et l'analyse phylogénétique des échantillons PLR 46 et B7 ont révélé une proximité importante de ces 2 virus. Or, ces 2 échantillons ont été collectés à 10 ans d'intervalle. De plus, ces 2 virus sont également proches, identiques en tous cas dans la zone séquencée et amplifiée avec les amorces PCR de l'ENVT d'un RHDV pathogène (00-13) isolé en France. On a donc une grande proximité des virus pathogènes et non pathogènes. Ce dernier point tend à confirmer que la virulence du RHDV n'est pas portée uniquement par le gène de la VP60, en accord avec ce que suggèrent les travaux d'une équipe anglaise. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a permis de démontrer l'impact possible des recombinaisons au niveau du génome entier sur la virulence du RHDV. De plus, la proximité génétique de B7 et PLR 46 montre une conservation dans le temps très importante de la séquence des acides aminés des calicivirus apparentés au RHDV.

Enfin, les séquences obtenues à partir des échantillons JA 10 de Cerizay et PLR 56 présentent une homologie importante en nucléotides et en acides aminés de la souche 06-11, qui a été caractérisée sur des lapins d'élevages. Ce résultat suggère que le type de souche non pathogène qui a été caractérisée en 2006 dans un élevage, circule aussi dans la faune sauvage. Or, il a été démontré expérimentalement le pouvoir non pathogène mais infectieux de la souche caractérisée dans l'élevage de l'AFSSA Ploufragan, la souche qui a été isolée induit la production d'anticorps qui ne protègent pas contre une infection par le RHDV. Les données moléculaires acquises sur les lapins de garenne au cours de ce travail confirment la circulation de ce type de souche dans la faune sauvage.

CONCLUSION

L'objectif de notre étude a été atteint puisque nous sommes parvenus à isoler et caractériser plusieurs virus apparentés au RHDV qui soient non pathogènes et différents génétiquement les uns des autres et dont certains sont proches de souches pathogènes, soulignant la diversité des souches virales apparentées au RHDV.

Ces virus ont été isolés à partir de foie ou d'intestin de lapins ne présentant aucun symptôme de RHD, les virus isolés sont donc non pathogènes. Des PCR nichées, ainsi que la mise au point de nouvelles PCR, augmentant la sensibilité du test ont été nécessaires pour permettre la détection de ces virus, ceux-ci étant en très faible quantité chez les animaux.

L'identification de plusieurs types de souche non pathogènes circulant au sein de la faune sauvage confirme d'une part leur diversité, mais aussi d'autre part pour certaines, leur ressemblance moléculaire avec les souches pathogènes de RHDV, tout au moins au niveau de la région de la séquence génomique étudiée (le gène de la VP60). Ce dernier point tend à confirmer que la virulence du RHDV n'est pas portée uniquement par le gène de la VP60, en accord avec ce que suggèrent les travaux d'une équipe anglaise.

Lors d'une collaboration antérieure entre nos équipes, l'existence d'une souche non pathogène et non protectrice vis-à-vis du RHDV a été mise en évidence sur des lapins domestiques (06-11). Au cours de notre étude, des virus très proches de cette souche ont été isolés (échantillon PLR 56 et JA 10). Ainsi, les données moléculaires acquises au cours de ce travail, confirment la proximité génétique de diverses souches circulant dans les populations de lapins domestiques ainsi que dans la faune sauvage. Il a été démontré expérimentalement le pouvoir non pathogène mais infectieux de la souche caractérisée chez les lapins domestiques, ce qui constitue des données tout à fait originales. A la différence du RCV, la souche isolée induit la production d'anticorps qui ne protègent pas contre une infection par le RHDV. La présence de souches non protectrices est un élément à prendre en compte dans l'épidémiologie de la RHD. En effet, l'approche classique de la diversité des souches apparentées au RHDV est que les souches non pathogènes peuvent jouer un rôle protecteur contre une infection par le RHDV. La circulation de souches non protectrices est un élément nouveau, les interactions entre différentes souches s'avérant plus complexes que ce qui était considéré jusqu'alors.

Des recherches plus approfondies restent à être mener dans le domaine des calicivirus apparentés au RHDV. A ce jour, aucune étude n'a permis de démontrer l'impact possible des recombinaisons au niveau du génome entier sur la virulence du RHDV. L'obtention de la séquence des génomes entiers pourrait permettre de répondre à cette problématique. Enfin, il reste beaucoup de questions en suspend sur l'interaction entre les différentes souches pathogènes ou non. Par conséquent, des recherches restent à être mener afin de progresser dans la compréhension de l'interaction des souches de virus apparentés aux RHDV avec les formes pathogènes du RHDV et dans la mise au point de tests sérologiques capables de différencier les infections à calicivirus chez les lapins de garenne.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle MARTIN Valérie, Elisabeth, Renée

a été admis(e) sur concours en : 2004

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 juin 2009

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle MARTIN Valérie, Elisabeth, Renée

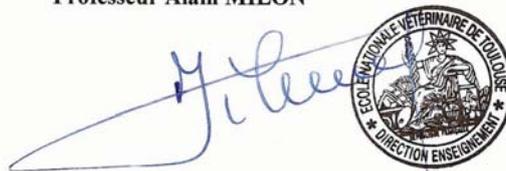
intitulée :

« Identification de nouveaux variants apathogènes apparentes au virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV), isolés dans des populations de lapins de garennes, en France. »

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



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



- 6 JAN. 2010

**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Christophe PASQUIER**



**Vu le :
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**



TABLE DES ILLUSTRATIONS

ILLUSTRATIONS

- Illustration 1 : Microscopie électronique de virions de RHDV purifiés, après coloration négative avec 1% d'uranyl acétate. **Page 33**
- Illustration 2 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR réalisées sur les ADNc obtenus à partir de foies des lapins collectés à Beniguet, en 1997. **Page 94**
- Illustration 3 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR réalisées sur les ADNc obtenus à partir d'organes (foie ou intestin) de lapins collectés à Cerizay, en 2007/2008. **Page 97**
- Illustration 4 : Gel d'électrophorèse correspondant aux PCR réalisées sur les ADNc obtenus à partir d'organes (foie ou intestin) de lapins collectés à Plouédern, en 2007/2008. **Page 97**

FIGURES

- Figure 1 : Cycle épidémiologique de la RHD. **Page 23**
- Figure 2 : Organisation génomique du RHDV. **Page 35**
- Figure 3 : Représentation schématique du processus de maturation de la polyprotéine du RHDV. **Page 37**
- Figure 4 : Titres d'hémagglutination en fonction des organes, de lapins RHDV positifs, testés. **Page 39**
- Figure 5 : Pathogénie hypothétique de la nécrose hépatique lors de RHD. **Page 47**
- Figure 6 : Analyse phylogénétique utilisant les séquences partielles de protéines de capsid de 61 souches de RHDV. **Page 70**
- Figure 7 : Alignement des séquences protéiques du gène codant pour la protéine VP60 de souches de RHDV pathogènes et non pathogènes, incluant les séquences confirmées dans cette étude des souches "06-11", "06-08" et "06-09". **Page 78**
- Figure 8 : Arbre phylogénique (nt 54 à 1703) réalisé selon la méthode du neighbor-joining avec 34 souches de RHDV représentatives des différents génogroupes mis en évidence à ce jour, ainsi que les souches RCV et "Ashington". **Page 80**
- Figure 9 : Arbre phylogénique sommaire (Neighbor-joining, 1.000 répliques) basé sur les nucléotides 1 à 1015 et enraciné avec la souche EBHSV "GD 89". **Page 82**
- Figure 10 : Arbre phylogénique sommaire (Neighbor-joining, 1.000 répliques) basé sur les nucléotides 1 à 864 et enraciné avec la souche EBHSV "GD 89". **Page 82**
- Figure 11 : Localisation des sites de provenance des lapins échantillonnés. **Page 84**

Figure 12 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA Clean-Up. **Page 89**

Figure 13 : Séquence complète du gène de la protéine de capsid du calicivirus apparenté au RHDV isolé dans cette étude sur l'île de Beniguet et alignement de la séquence du gène de la VP60 obtenue pour l'échantillon B7 et pour l'échantillon B11. **Page 100**

Figure 14 : Séquences nucléotidique et protéique du gène de VP60 obtenues pour l'amplicon de l'échantillon PLR 46, à partir de la PCR de l'ENVT utilisant l'amorce VP60bs. **Page 101**

Figure 15 : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques du gène de la VP60 obtenue pour les échantillons B7, PLR46 et pour la souche RHDV pathogène 00-13 **Page 103**

Figure 16 : Séquences nucléotidique et protéique du gène de VP60 obtenues pour l'amplicon de l'échantillon PLR 51, à partir de la PCR de l'ENVT utilisant l'amorce VP60bs. **Page 103**

TABLEAUX

Tableau 1 : Pourcentage d'homologie nucléotidique et protéique entre la séquence du gène de la VP60 de la souche non pathogène apparentée au RHDV 06-11 et les séquences des RHDV pathogènes, du calicivirus non pathogène RCV, et de la souche anglaise "Ashington".

Page 79

Tableau 2 : Origine des prélèvements de tissus.

Page 83

Tableau 3 : Nature du tissu prélevé en fonction des échantillons.

Page 86

Tableau 4 : Séquence et position des amorces utilisées pour la détection du virus.

Page 91

Tableau 5 : Utilisation des amorces et description des amplicons produits.

Page 91

Tableau 6 : Résultats des PCR sur les organes intestin, foie des lapins de Cerizay, La Petite Boissière, Plouedern, Guisseny, Ploudaniel, Aubas, Terrasson, Notre Dame de Sanilhac et Beniguet.

Page 96

TABLE DES ABREVIATIONS

A260 : Absorbance à la longueur d'onde 260 nm

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ADNc : Acide Désoxyribo-Nucléique complémentaire

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ALT : Alanine Transaminase

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNm : Acide Ribo-Nucléique messenger

ASP : Aspartate

AST : Aspartate Transaminase

BCV : Bovine Calicivirus

BEV : Bovine Enteric Calicivirus

CaCV : Canine Calicivirus

CIVD : Coagulation Intra Vasculaire Disséminée

cm³ : centimètre cube

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

COOH : groupement acide carbonique

CSIRO : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

Cys : Cystéine

°C : degré Celsius

DL50 : dose letale 50

dNTP : désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphate

DTT :

EBHS : European Brown Hare Syndrome

EBHSV : European Brown Hare Syndrome Virus

EG : Site de clivage situé entre l'acide glutamique et la glycine lors de la maturation de la polyprotéine du RHDV

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

ET : Site de clivage situé entre l'acide glutamique et la thréonine lors de la maturation de la polyprotéine du RHDV

FCV : Feline Calicivirus

h : heure

HA : Hémagglutination
HAU : Unité d'hémagglutination
HGF : Hepatocyte Growth Factor
His : Histidine
IEM : Immuno-Electromicroscopie
Ig : Immunoglobuline (Ig A, Ig G, Ig M)
Ig G -RS : Sérum polyclonal
IHVV : Interaction Hôtes-Virus et Vaccinologie
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
kb : kilobase
kDa : kilo Dalton
LDH : Lactate Déshydrogénase
Mabs : Anticorps monoclonaux
ME : Microscopie Electronique
min : minutes
ml : millilitre
mm : millimètre
µg : microgramme
µl : microlitre
µM : micromolaire
ng : nanogrammes
NH₂ : groupement amine
nm : nanomètre
nt : nucléotide
OIE : Office International des Epizooties
ONCFS : Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage
ORF : Open Reading Frame
Pb : Paire de bases
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCV : Primate Calicivirus
PEC : Porcine Enteric Calicivirus
RA (RA1, RA2, RA3) : Réactifs du kit NucleoSpin® RNA Clean-Up

RCV : Rabbit calicivirus
RDE : Receptor Destroying Enzyme
RHD : Rabbit Haemorrhagic Disease
RHDV : Rabbit Haemorrhagic Disease Virus
RKD : Rabbit kidney cells 13
RNases : Enzymes qui détruisent l'ARN
RT : Reverse Transcriptase
RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
S : Svedberg
sec : seconde
SMSV : San Miguel Sea lion Virus
TGEV : gastroentérite virale
TBE : Tris Borate d'EDTA
T_H : Température d'Hybridation
U : unité
UMR : Unité Mixte de Recherche
USA : United States of America
UV : Ultra Violet
VESV : Vesicular Exanthema of Swine Virus
VLP_S : Virus Like Particules
VP_g : Viral Protein linked to the genome
VP10 : Viral Protein of 10 kDa
VP60 : Viral Protein of 60 kDa

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barcena, J., M. Morales, B. Vazquez, JA. Boga, F. Parra, J. Lucientes, A. Pages-Mante, JM. Sanchez-Vizcaino, R. Blasco, JM. Torres. 2000. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J Virol*, **74** (3) : 1114:23.
- Bertagnoli S, J. Gelfi, G. Le Gall, E. Boilletot, JF. Vautherot, D. Rasschaert, S. Laurent, F. Petit, C. Boucraut-Baralon, A. Milon. 1996. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol*, **70**(8) : 5061-6.
- Bertagnoli S, J. Gelfi, F. Petit, JF. Vautherot, D. Rasschaert, S. Laurent, G. Le Gall, E. Boilletot, J. Chantal, C. Boucraut-Baralon. 1996b. Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine*, **14**(6) : 506-10.
- Boniotti, B., C. Wirblich, M. Sibilial, G. Meyers, H. J. Thiel, and C. Rossi. 1994. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol*, **68** : 6487-95.
- Braine, A. 2008. Le point sur le marché français du lapin en 2007 - 2008 : Une filière en crise. *Cuniculture magazine*, **35** : 60-97.
- Calvete, C., R. Estrada, R. Villafuerte, J. J. Osacar, and J. Lucientes. 2002. Epidemiology of viral haemorrhagic disease and myxomatosis in a free-living population of wild rabbits. *Vet Rec*, **150** : 776-82.
- Capucci, L., M. T. Scicluna, and A. Lavazza. 1991. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech*, **10** : 347-70.
- Capucci, L., P. Fusi, A. Lavazza, M. L. Pacciarini, and C. Rossi. 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol*, **70** : 8614-23.
- Capucci, L., A. Nardin, and A. Lavazza. 1997. Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet Rec*, **140** : 647-50.
- Capucci, L., F. Fallacara, S. Grazioli, A. Lavazza, M. L. Pacciarini, and E. Brocchi. 1998. A further step in the evolution of rabbit haemorrhagic disease virus : the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res*, **58** : 115-126.
- Castanon, S., M. S. Marin, J. M. Martin-Alonso, J. A. Boga, R. Casais, J. M. Humara, R. J. Ordas, and F. Parra. 1999. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, **73** : 4452-5.
- Chasey, D., M. H. Lucas, D. G. Westcott, G. Sharp, A. Kitching, and S. K. Hughes. 1995. Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. *Vet Rec*, **137** : 158-60.

- Clarke, I. N., and P. R. Lambden. 1997. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* **78** (Pt 2) : 291-301.
- Cooke, B., S. McPhee, A. J. Robinson, and L. Capucci. 2002. Rabbit haemorrhagic disease : does a pre-existing RHDV-like virus reduce the effectiveness of RHD as a biological control in Australia? *Wildlife Research* **29** : 673-682.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. Virus Taxonomy. 8th edition. London : Elsevier Academic Press, 2005, 1259 p.
- Fages, M.P. 2007. Identification d'un nouveau variant apathogène du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV). Thèse med.vet. : Toulouse : 07 – TOU 3 – 4022.
- Forrester, NL., B. Boag, S. R. Moss, S. L. Turner, R. C. Trout, P. J. White, P. J. Hudson, and E. A. Gould. 2003. Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis. *J Gen Virol*, **84** : 3079-86.
- Forrester, NL., R.C. Trout, and E. A. Gould. 2007. Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology*, **358** : 18-22.
- Forrester NL, S. R. Moss, S. L. Turner, H. Schirrmeyer, and E. A. Gould. 2008. Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: possible impact on evolution and epidemiology. *Virology*, **376** : 396-6.
- Gelmetti, D., V. Grieco, C. Rossi, L. Capucci, and A. Lavazza. 1998. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. *J Virol Methods*, **72** : 219-26.
- Henning, J., J. Meers, P. R. Davies, and R. S. Morris. 2005. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiol Infect*, **133** : 719-30.
- Ji, C. Y., N. X. Du, and W. Y. Xu. 1991. Adaptation of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits to the DJRK cell strain. *Rev Sci Tech*, **10** : 337-45.
- Joubert, P., C. Pautigny, M. F. Madelaine, and D. Rasschaert. 2000. Identification of a new cleavage site of the 3C-like protease of rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, **81** : 481-8.
- Joubert, P. 2000. Etude des mécanismes de maturation de la polyprotéine du virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV). Thèse : INRA Tours 4959.
- Konig, M., H. J. Thiel, and G. Meyers. 1998. Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, **72** : 4492-7.
- Laurent, S., J. F. Vautherot, M. F. Madelaine, G. Le Gall and D. Rasschaert. 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into virus like particles and induces protection. *J Virol*, **68**(10) : 6794-8.

- Laurent, S., J. F. Vautherot, G. Le Gall, M. F. Madelaine, and D. Rasschaert. 1997. Structural, antigenic and immunogenic relationships between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, **78** (Pt 11) : 2803-11.
- Lavazza, A. and Capucci, L. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th edition. OIE, 2004. 2 volumes, 1178p.
- Leighton, F.A., M. Artois, L. Capucci, D. Gavier-Widén, J.P. Morisse. 1995. Antibody response to rabbit viral hemorrhagic disease virus in red foxes (*Vulpes vulpes*) consuming livers of infected rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Wildl Dis*, 31(4) : 541-4.
- Le Gall-Recule, G., F. Zwingelstein, Y. Portejoie, and G. Le Gall. 2001. Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic Disease and European Brown Hare Syndrome viruses. *J Virol Methods*, **97** : 49-57.
- Le Gall-Recule, G., F. Zwingelstein, S. Laurent, C. de Boisséson, Y. Portejoie, D. Rasschaert. 2003. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol*, **148**(1) : 65-81.
- Le Gall-Recule, G., F. Zwingelstein. 2009. Etude du système Hôte-parasite Myxomatose et maladie virale hémorragique (RHD) chez le lapin. *Rapport final, Convention P7677-P5675, ONCFS/AFSSA, 01/06/2006-31/05/2009*.
- Marcato, P. S., C. Benazzi, G. Vecchi, M. Galeotti, L. Della Salda, G. Sarli, and P. Lucidi. 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech*, **10** : 371-92.
- Marchandeau, S., J. Chantal, Y. Portejoie, S. Barraud, and Y. Chaval. 1998. Impact of viral hemorrhagic disease on a wild population of European rabbits in France. *J Wildl Dis*, **34** : 429-35.
- Marchandeau, S., J. C. Ricci, and J. Chantal. 1998. Taux de prévalence sérologique du virus de la maladie virale hémorragique (RHD) du lapin de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) et de ses formes apparentées au sein de différentes populations sauvages en France. *Mammalia*, **62** : 95-103.
- Marchandeau, S., G. Le Gall-Recule, S. Bertagnoli, J. Aubineau, G. Botti, and A. Lavazza. 2005. Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet Res*, **36** : 53-62.
- Marcus S. 1996. Vaccination contre la maladie hémorragique virale du lapin : utilisation d'un virus recombinant vaccine-RHDV. Thèse. : med.vet. : Toulouse : 1996-TOU-4008.
- Martin Alonso, J. M., R. Casais, J. A. Boga, and F. Parra. 1996. Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J Virol*, **70** : 1261-5.
- Martin-Alonso, J. M., S. Castanon, P. Alonso, F. Parra, and R. Ordas. 2003. Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res*, **12** : 127-30.

- Mitro, S., and H. Krauss. 1993. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol*, **9** : 70-8.
- Moss, S. R., S. L. Turner, R. C. Trout, P. J. White, P. J. Hudson, A. Desai, M. Armesto, N. L. Forrester, and E. A. Gould. 2002. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, **83** : 2461-7.
- Moussa, A., D. Chasey, A. Lavazza, L. Capucci, B. Smid, G. Meyers, C. Rossi, H. J. Thiel, R. Vlasak, L. Ronsholt, and et al. 1992. Haemorrhagic disease of lagomorphs: evidence for a calicivirus. *Vet Microbiol*, **33** : 375-81.
- Mutze, G., B. Cooke, and P. Alexander. 1998. The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia. *J Wildl Dis*, **34** : 221-7.
- Nagesha, H. S., L. F. Wang, A. D. Hyatt, C. J. Morrissy, C. Lenghaus, and H. A. Westbury. 1995. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol*, **140** : 1095-1108.
- Ohlinger, V. F., B. Haas, G. Meyers, F. Weiland, and H. J. Thiel. 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol*, **64** : 3331-6.
- Ohlinger, V. F., B. Haas, and H. J. Thiel. 1993. Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet Res*, **24** : 103-16.
- OIE. Code sanitaire pour les animaux terrestres. 15^{ème} édition. 2006
- OIE. Rapport sanitaire. 2005
- O'Keefe, J. S., J. E. Tempero, M. X. Motha, M. F. Hansen, and P. H. Atkinson. 1999. Serology of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits before and after release of the virus in New Zealand. *Vet Microbiol*, **66** : 29-40.
- Parra, F., and M. Prieto. 1990. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*, **64** : 4013-5.
- Plassiart, G., J. F. Guelfi, J. P. Ganiere, B. Wang, G. Andre-Fontaine, and M. Wyers. 1992. Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic disease. *J. Vet. Med.B*, **39** : 443-53.
- Robinson, A. J., P. D. Kirkland, R. Forrester, I. L. Cappuci, B. Cooke, and A. W. Philbey. 2002. Serological evidence for the presence of a calicivirus in Australian wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, before the introduction of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) : its potential influence on the specificity of a competitive ELISA for RHDV. *Wildlife Research*, **29** : 655-662.
- Rodak, L., B. Smid, L. Valicek, T. Vesely, J. Stepanek, J. Hampl, E. Jurak. 1990. Enzyme - linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J Gen Virol*, **71** : 1075-80.

- Ruvoen-Clouet, N., D. Blanchard, G. Andre-Fontaine, and J. P. Ganiere. 1995. Partial characterization of the human erythrocyte receptor for rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Virol*, **146** : 33-41.
- Ruvoen-Clouet, N., J. P. Ganiere, G. Andre-Fontaine, D. Blanchard, and J. Le Pendu. 2000. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol*, **74** : 11950-4.
- Teifke, J. P., I. Reimann, and H. Schirrmeier. 2002. Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J Comp Pathol*, **126** : 231-4.
- Torres JM., C. Sánchez, MA. Ramírez, M. Morales, J. Bárcena, J. Ferrer, E. Espuña, A. Pagès-Manté, JM. Sánchez-Vizcaíno. 2001. First field trial of a transmissible recombinant vaccine against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease. *Vaccine*, 19(31) : 4536-43.
- Tunon, M. J., S. Sanchez-Campos, J. Garcia-Ferreras, M. Alvarez, F. Jorquera, and J. Gonzalez-Gallego. 2003. Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med*, **141** : 272-8.
- Villafuerte, R., C. Calvete, J. C. Blanco, and J. Lucientes. 1995. Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain. *Mammalia*, **59** : 651-659.
- White, P. J., R. A. Norman, R. C. Trout, E. A. Gould, and P. J. Hudson. 2001. The emergence of rabbit haemorrhagic disease virus: will a non-pathogenic strain protect the UK? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356** : 1087-95.
- White, P. J., R. C. Trout, S. R. Moss, A. Desai, M. Armesto, N. L. Forrester, E. A. Gould, and P. J. Hudson. 2004. Epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the United Kingdom: evidence for seasonal transmission by both virulent and avirulent modes of infection. *Epidemiol Infect*, **132** : 555-67.
- Wirblich, C., G. Meyers, V. F. Ohlinger, L. Capucci, U. Eskens, B. Haas, and H. J. Thiel. 1994. European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J Virol*, **68** : 5164-73.
- Wirblich, C., M. Sibilia, M. B. Boniotti, C. Rossi, H. J. Thiel, and G. Meyers. 1995. 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J Virol*, **69** : 7159-68.
- Wirblich, C., H. J. Thiel, and G. Meyers. 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol*, **70** : 7974-83
- Xu, W. Y. 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech*, **10** : 393-408.

Toulouse, 2010

NOM : MARTIN

PRENOM : Valérie

TITRE :

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX VARIANTS APATHOGENES APPARENTES AU VIRUS DE LA MALADIE HEMORRAGIQUE VIRALE DU LAPIN (RHDV), ISOLES DANS DES POPULATIONS DE LAPINS DE GARENNES, EN FRANCE.

RESUME :

La maladie hémorragique du lapin est une maladie infectieuse aiguë, très contagieuse, souvent fatales, qui atteint les lapins. Elle est causée par un virus de la famille des *Caliciviridae*, le RHDV, considéré comme hautement pathogène. Néanmoins, des virus non pathogènes, apparentés au RHDV, ont été mis en évidence. Aucun virus semblable n'a été isolé, en France, dans des populations sauvages de lapins. L'objectif de cette étude est de rechercher des calicivirus apparentés au RHDV, non pathogènes, circulant dans des populations de lapins de garennes, en France, afin de caractériser leurs différences antigéniques et génomiques avec les souches connues de RHDV. Pour cela, nous avons recherché par RT-PCR, la présence d'ARN de virus apparentés au RHDV dans du foie et de l'intestin de lapins sains collectés lors d'épisodes de chasse, sur l'île de Béniguet en 1997 et dans 8 sites en France métropolitaine au cours de la saison 2007-2008. Nous avons identifiés 6 variants apathogènes apparentés au RHDV, circulant au sein de la faune sauvage. Ces variants montrent une diversité génétique importante. Certains sont proches de souches pathogènes, tendant à prouver que la virulence du RHDV n'est pas portée uniquement par le gène de la VP60. D'autres sont proches de souches jusqu'ici isolées, uniquement de lapins domestiques. La circulation de souches non pathogènes est à prendre en compte dans l'épidémiologie de la RHD, les interactions entre les différentes souches de RHDV étant plus complexes que ce qui était considéré jusqu'alors.

MOTS-CLES :

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

ENGLISH TITLE :

IDENTIFICATION OF NEW NON PATHOGENIC STRAINS OF RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS, ISOLATED IN POPULATIONS OF WILD RABBITS, IN FRANCE.

ABSTRACT :

Rabbit haemorrhagic disease is an acute, very contagious infectious disease, often fatal which affects the wild and domestic rabbits. It is caused by a virus belonging to the *Caliciviridae* family, RHDV, considered as highly pathogenic. Nevertheless, some non pathogenic RHDV-like viruses were identified. In France, no similar virus was isolated in wild populations of rabbit. The aim of this study was to isolate non pathogenic strains of RHDV, circulating in populations of wild rabbits, in France, and to characterize the antigenic and genomic differences with the previously known strains of RHDV. To that aim, we looked for RNA of RHDV-like viruses, by RT-PCR, in the liver and the bowel of healthy rabbits sampled during hunting, on the island of Beniguet in 1997 and in 8 sites in metropolitan France during the season 2007-2008. We identified 6 non pathogenic RHDV-like viruses, circulating within the wild populations. These variants show a high genetic diversity. Some are close to pathogenic strains of RHDV, showing that the virulence of the RHDV is not only determined by the VP60 gene. Others are close to strains previously isolated on domestic rabbits. The knowledge of circulation of non pathogenic strains is something new in the epidemiology of rabbit haemorrhagic disease, the interactions between the various strains of RHDV being more complex than what was considered until then.

KEY WORDS :

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