



## 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 : 8645

**To cite this version :**

Cloet, Julia. *Identification de nouveaux lagovirus non pathogènes apparentés au virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV), isolés dans les populations de lapins sauvages de l'archipel des Kerguelen*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2012, 141 p. .

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

ANNEE 2012 THESE : 2012 – TOU 3 - 4085

---

**IDENTIFICATION DE NOUVEAUX LAGOVIRUS NON  
PATHOGENES APPARENTES AU VIRUS DE LA  
MALADIE HEMORRAGIQUE VIRALE DU LAPIN  
(RHDV), ISOLES DANS LES POPULATIONS DE LAPINS  
SAUVAGES DE L'ARCHIPEL DES KERGUELEN.**

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**CLOET Julia**  
Née le 20 Juin 1986 à Soissons (02)

---

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

---

**JURY**

PRESIDENT :  
**M. Christophe PASQUIER** Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Stéphane BERTAGNOLI** Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
**M. Jean-Luc GUERIN** Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE 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. DORCHIES  
M. C. PAVAU M. EECKHOUTTE  
M. F. LESCURE M. A. GRIESS  
M. A. RICO M. CABANIE  
M. A. CAZIEUX M. DARRE  
Mme V. BURGAT M. HENROTEAUX

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*  
M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*  
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*  
M. SAUTET Jean, *Anatomie*  
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1<sup>o</sup> CLASSE**

M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*  
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2<sup>o</sup> CLASSE**

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*  
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. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
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*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
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 **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

## MAITRES DE CONFERENCE (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*  
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

**Á 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.

**Á Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI,**

Maître de Conférences 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.

**Á 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.

**Á 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.



Á **David**, présent chaque jour à mes côtés, sans qui je ne serais jamais allée aussi loin. Nous allons enfin pouvoir réaliser tous nos projets. Je t'aime.

Á **Maman et Papa**, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Votre amour, votre patience ont souvent été mis à rudes épreuves. Merci d'avoir continué à me soutenir malgré tout.

Á **ma sœur et mon beau frère**, qui me soutiennent pendant mes premiers pas dans la vie active.

Á **Delphine**, mon amie de toujours.

Á **Laure**, mon Wilson, toujours présente à mes côtés durant ces quelques années d'école et qui continuera à l'être longtemps.

Á **Antoine**, un ami précieux toujours près à m'apporter son aide durant mes premières gardes.

Á **Fred**, plus qu'un ami, le début d'une histoire.

Á **Kévin**, parti trop tôt... beaucoup trop tôt. Mes années prépa n'auraient pas été les mêmes sans toi. J'aurais tant aimé que tu sois présent aujourd'hui. Je ne t'oublierai jamais.

Á **mes beaux parents**, sur lesquels je peux compter.

Á **mes oncles et tantes** qui m'ont accompagnée lors du concours.

Á **mes ami(e)s de classes préparatoires** que j'ai souvent perdu de vue mais que je n'oublierai jamais.

Á **mes ami(e)s de l'école ou d'ailleurs**, qui ont partagé avec moi un morceau de vie. Toutes ces rencontres m'ont aidée à me construire.

Á **mes professeurs de prépa**, et tout particulièrement à **Anne-Julie** qui est restée une amie. Sans vous, je ne serais pas arrivée là où je suis.

Á mes premiers employeurs, **Anne-Laure, François, Jean-Charles et Rachel**, des patrons formidables qui ont su me donner ma chance.



## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RHD .....</b>	<b>19</b>
<b>I. Généralités sur la RHD.....</b>	<b>20</b>
A. Historique et répartition géographique .....	20
B. Synonymie .....	21
<b>II. Epidémiologie .....</b>	<b>21</b>
A. Population atteinte .....	21
1. Espèce cible.....	21
2. Réceptivité – sensibilité.....	22
B. Répartition et évolution dans le temps et dans l’espace.....	24
C. Sources virales .....	26
D. Transmission.....	26
<b>III. Tableau clinique .....</b>	<b>29</b>
A. Symptômes.....	29
B. Perturbations hématologiques et biochimiques.....	31
1. Modifications biochimiques .....	31
2. Modifications hématologiques .....	32
C. Lésions .....	33
1. Macroscopiques.....	33
2. Microscopiques .....	35
<b>IV. Virologie .....</b>	<b>37</b>
A. Généralités sur la famille des <i>Caliciviridae</i> .....	37
1. Historique .....	37
2. Classification .....	38
3. Caractéristiques principales.....	39

B.	Caractéristiques du RHDV.....	39
1.	Morphologie .....	39
2.	Structure et organisation génomique .....	42
3.	Synthèse protéique et maturation .....	43
4.	Organisation de la protéine de capsid VP60.....	45
5.	Propriétés.....	46
a.	Propriétés physico-chimiques.....	46
b.	Propriétés hémagglutinantes.....	47
c.	Pouvoir antigénique et immunogène .....	51
C.	Caractères cultureux.....	53
<b>V.</b>	<b>Pathogénie.....</b>	<b>54</b>
A.	Voie d'entrée et dissémination du virus.....	54
B.	Cellules cibles .....	55
C.	Mécanismes pathogéniques.....	56
D.	Survenue de la mort .....	57
<b>VI.</b>	<b>Diagnostic.....</b>	<b>58</b>
A.	Diagnostic de suspicion sur le terrain .....	58
B.	Diagnostic de certitude au laboratoire .....	59
1.	Mise en évidence de l'agent .....	59
a.	Prélèvement .....	59
b.	Les différentes méthodes.....	59
2.	Analyses sérologiques .....	64
<b>VII.</b>	<b>Prophylaxie .....</b>	<b>66</b>
A.	Prophylaxie sanitaire.....	66
1.	Prophylaxie sanitaire défensive.....	66
2.	Prophylaxie sanitaire offensive .....	67
B.	Prophylaxie médicale .....	68
1.	Nature et obtention des vaccins.....	68

2. Utilisation du vaccin.....	70
3. Sérum hyper-immun.....	70
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CALICIVIRUS</b>	
<b>APPARENTES AU RHDV.....</b>	<b>71</b>
<b>I. Preuves de l'existence de tels virus .....</b>	<b>72</b>
<b>II. Pouvoir pathogène.....</b>	<b>74</b>
<b>III. Caractéristiques des calicivirus apparentés au RHDV.....</b>	<b>75</b>
A. Séquences nucléotidiques et protidiques .....	75
B. Organisation du génome .....	77
C. Propriétés antigéniques et immunogènes .....	77
1. Propriétés antigéniques.....	77
2. Propriétés immunogènes .....	79
<b>IV. Epidémiologie des calicivirus apparentés au RHDV .....</b>	<b>81</b>
A. Population atteinte .....	81
1. Espèce cible.....	81
2. Facteurs de sensibilité .....	81
B. Répartition géographique et impact .....	82
C. Transmission et sources virales.....	83
<b>V. Origine supposée du RHDV et arbre phylogénétique.....</b>	<b>84</b>
<b>TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>89</b>
<b>I. Résultats des travaux antérieurs.....</b>	<b>91</b>
A. En France métropolitaine .....	91
1. Première étude : 2006.....	91
2. Deuxième étude : 2009.....	94
B. Sur l'archipel de Kerguelen .....	95
<b>II. Présentation de l'archipel des Kerguelen.....</b>	<b>97</b>
<b>III. Matériels et méthodes .....</b>	<b>99</b>
A. Origine des prélèvements.....	99

B. Recherche du virus par RT-PCR.....	100
1. Extraction de l'ARN.....	101
2. Nettoyage de l'ARN.....	102
3. Réalisation de la RT .....	103
4. PCR semi-nichées.....	104
5. Electrophorèse .....	106
<b>IV. Résultats .....</b>	<b>108</b>
A. Résultats de la recherche de virus .....	108
B. Résultats du séquençage des amplicons et analyse des séquences .....	113
<b>V. Discussion.....</b>	<b>120</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>123</b>
<b>TABLE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>129</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

<u>Figure 1</u> : Cycle épidémiologique de la RHD .....	28
<u>Figure 2</u> : Représentation schématique des ARNs génomiques et subgénomiques du RHDV .....	43
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique de la maturation des protéines du RHDV .....	45
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique de la séquence d'acides aminés de la protéine de capsid VP60 du RHDV organisée en 6 régions.....	46
<u>Figure 5</u> : Titres d'hémagglutination en fonction des organes, issus de lapins atteints de RHD. ....	50
<u>Figure 6</u> : Schéma pathogénique hypothétique lors de RHD. ....	56
<u>Figure 7</u> : Arbre phylogénétique (Neighbor joining, 1000 répliques) utilisant les séquences partielles de protéines de capsid 61 souches de RHDV ..	86
<u>Figure 8</u> : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining, 1000 répliques) utilisant les séquences nucléotidiques du gène de la VP60, isolées chez 124 lapins..	88
<u>Figure 9</u> : Alignement des séquences protéiques du gène codant pour la protéine de capsid VP60 de souches de RHDV pathogènes et apathogènes, incluant la souche 06-11. ....	93
<u>Figure 10</u> : Ordre d'utilisation des amorces et description de l'amplicon produit.....	106
<u>Figure 11</u> : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des 8 échantillons de notre étude et d'une souche de RHDV du groupe G1 (11976-Portugal)..	115
<u>Figure 12</u> : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des échantillons POC10/07-7, RAT07/07-1 et d'une souche de RHDV du groupe G1 (11976-Portugal)..	116
<u>Figure 13</u> : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des échantillons RAT04/07-2, RAT07/07-7, RAT04/07-8, RAT07/07-13, RAT07/08-2, SN12/08-6 et de la nouvelle souche de RHDV française (10-01).....	116
<u>Figure 14</u> : Figure 14 : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des échantillons RAT04/07-2 et de la nouvelle souche de RHDV française (10-01)..	117
<u>Figure 15</u> : Arbre phylogénétique sommaire (Neighbour-joining, 1000 répliques) basé sur les nucléotides 527 à 767 du gène codant pour la VP60 ((240pb) et enraciné avec la souche EBHSV « GD 89 ».....	118

<u>Figure 16</u> : Arbre phylogénétique sommaire (Neighbour-joining, 1000 réplicas) basé sur les nucléotides 171 à 768 du gène codant pour la VP60 (597pb) et enraciné avec la souche EBHSV « GD 89 ».....	119
--	-----

## ILLUSTRATIONS

<u>Illustration 1</u> : Microscopie électronique de virions de RHDV purifiés après coloration négative avec de l'acétate d'uranyl à 1% .....	40
<u>Illustration 2</u> : A. Cryo-microscopie électronique de RHDV purifié dans sa forme intacte (à gauche) et dans sa forme dégradée (CLP). B. Diagramme de densité en fonction du radian en Å pour le RHDV intact (en bleu) et pour le CLP.....	41
<u>Illustration 3</u> : Reconstruction tridimensionnelle d'une image obtenue en Cryo-electromicroscopie du RHDV intact et de sa forme CLP. ....	41
<u>Illustration 4</u> : Gel d'électrophorèse correspondant à la PCR semi-nichée (PCR2) réalisée sur les ADNc obtenus à partir d'intestins de lapins collectés dans les régions Rattmanoff et Port-Couvreux sur l'Archipel des Kerguelen, en 2007. ....	108
<u>Illustration 5</u> : Gel d'électrophorèse correspondant à la PCR1 réalisée avec la Taq Polymérase Phusion® sur les ADNc obtenus à partir d'intestins de lapins collectés dans les régions Rattmanoff et Port-Couvreux sur l'Archipel des Kerguelen, en 2007. ....	113

## TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Origine des prélèvements des tissus.....	99
<u>Tableau 2</u> : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA Clean-Up .....	102
<u>Tableau 3</u> : Séquences et positions des amorces utilisées pour la détection du virus. ....	104
<u>Tableau 4</u> : Ordre d'utilisation des amorces et description de l'amplicon produit. ....	104
<u>Tableau 5</u> : Résultats des PCRs semi-nichées sur les échantillons d'intestins des lapins de Port-Couvreux, Ratmanoff, Port-Jeanne-d'Arc et Sourcils Noirs sur l'Archipel des Kerguelen, prélevés entre 2004 et 2008.....	112

## CARTES

<u>Carte 1</u> : Origine des prélèvements sanguins. ....	96
<u>Carte 2</u> : Carte topographique de l'archipel de Kerguelen.....	97
<u>Carte 3</u> : Origine des prélèvements des tissus. ....	100

## INTRODUCTION

La maladie hémorragique virale du lapin, traduction de Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD), est une maladie virale extrêmement contagieuse évoluant le plus souvent de façon aiguë à suraiguë chez les lapins de l'espèce *Oryctolagus cuniculus* uniquement. Elle est souvent fatale pour les populations sauvages comme domestiques. Dans la majorité des cas, la mort survient dans les 72h chez les lapins de plus de deux mois, suite à une hépatite nécrosante et un syndrome hémorragique majeur. Les jeunes âgés de moins de 2 mois survivent la plupart du temps (Ohlinger et Thiel, 1991).

Les scientifiques rattachèrent d'abord cette maladie à la famille des Picornaviridae puis à celle des Parvoviridae. Ils eurent quelques difficultés à l'identifier du fait de nombreux échecs lors de la mise en culture du virus. Il fut identifié en 1990 à partir de foie de lapins infectés comme faisant parti de la famille des Caliciviridae et dénommé RHDV (Rabbit Haemorrhagic Disease Virus). Il s'agit d'un petit virus non-enveloppé à ARN monocaténaire non segmenté de polarité positive dont la capsid virale n'est constituée que d'une seule protéine structurale majeure, la VP60. Cette capsid possède une symétrie icosaédrique (Ohlinger et Thiel, 1991 ; Clarke et Lambden, 1997).

Les pertes occasionnées par la diffusion de cette maladie associée à la myxomatose sont non négligeables et engendrent à la fois un déséquilibre écologique et des pertes économiques très importantes pour la production cunicole. En France, la cuniculture reste une faible part de la production animale totale mais nous demeurons parmi les 4 premiers producteurs de lapins de chair au monde avec l'Italie, l'Espagne et la Chine.

En France, la production nationale de lapin serait estimée en 2009 à 57000 tonnes selon les statistiques agricoles annuelles de l'INSEE et à 92350 tonnes équivalent carcasses selon les statistiques de consommation de viande de lapin publiées par FranceAgriMer. L'autoconsommation est évaluée à 15000 tonnes d'après l'INSEE. L'ensemble de la filière cunicole a enregistré en 2009 une amélioration de son solde commercial à 19 M€ contre 18,6M€ en 2008 et 13,2M€ en 2007 (Lebas, 2010).

La RHD a été pour la première fois rapportée en Chine en 1984, suite à l'importation de lapin angora en provenance d'Allemagne de l'ouest. Elle décima en moins de 9 mois la grande majorité des élevages de lapins à 50000km<sup>2</sup> autour du foyer d'apparition. Seuls les jeunes lapereaux non encore sevrés survécurent en partie (Xu, 1991).

Lors de l'émergence de la RHD dans un lieu auparavant indemne, elle est souvent dévastatrice. Lors de son arrivée dans le Nord de l'Italie en 1986, on observa ainsi plus de 300 foyers de RHD occasionnant près de 80 à 100% de perte, principalement dans des fermes de petites tailles (Cancellotti et Renzi, 1991). En 1995, c'est en Australie que l'on constate l'effet dévastateur du RHDV. Après avoir échappé au local de quarantaine où il était étudié, le virus s'est répandu dans le Parc National de Flinders Ranges où la densité de population de lapin n'avait jamais été aussi élevée. Seul 5% des lapins survécurent (Mutze et *al.*, 1998). La même année en France, l'étude de Marchandeau et *al.*, 1998, montra un taux annuel de mortalité de 88% des adultes et de 99% des juvéniles, en partie dû à la RHD mais aussi à la myxomatose.

Cependant, en 1997, des lapins cliniquement sains, provenant d'un élevage industriel de lapins n'ayant présenté aucun signe clinique de RHD depuis plus de 4 ans, ont été testés séropositifs pour la RHD. L'étude de Capucci et *al.*, 1997, démontra alors l'existence d'une souche de virus apparentée au RHDV mais dépourvue de sa pathogénicité. Par la suite, des résultats similaires ont été observés chez des lapins de garennes, au Royaume-Uni, en France et Australie (Bruce et Twigg, 2004 ; Forrester et *al.*, 2006 ; Marchandeau et *al.*, 2005).

Depuis, de nombreuses études ont été menées afin d'identifier et de caractériser ces virus non pathogènes apparentés au RHDV, appelés d'abord Rabbit Calicivirus (RCV) puis Non-Pathogen Lagovirus (NP-LV). Plusieurs souches ont ainsi été isolées dans différents pays chez des lapins sauvages.

Deux études ont notamment été menées en France pour identifier d'éventuels NP-LV. Une première étude a ainsi permis d'identifier et de séquencer une première souche française de NP-LV chez des lapins d'élevage, initialement destinés à servir de sentinelles auprès de lapins de Garenne. Ces lapins sentinelles étant testés séropositifs dès le début de l'étude, l'équipe a procédé à l'isolement par RT-PCR de la souche dont ils étaient porteurs. Ce travail a permis d'obtenir la séquence intégrale du gène codant pour la protéine de capsid de cette souche de NP-LV (Le Gall-Reculé et *al.*, 2011). Une deuxième étude a été réalisée, cette fois sur des populations de lapins sauvages localisées en 9 lieux géographiques distincts. Les prélèvements de lapins se sont fait principalement au cours de la saison de chasse 2007/2008. Ajoutés à ces échantillons, 19 autres issus de lapins vivants sur l'île de Beniguet, en Bretagne, ont été analysés. Cette étude a permis d'isoler 6 variants apathogènes présentant une diversité génétique importante. Certaines souches se sont cependant révélées très proches des souches pathogènes de RHDV, suggérant que la virulence du RHDV n'est pas portée uniquement par le gène de la VP60 (Martin, 2010).

La présente étude a pour objectif d'isoler et de caractériser une ou plusieurs souches de NP-LV dans les populations de lapins sauvages vivant à priori en total isolement sur l'Archipel des Kerguelen, depuis près de 50 ans. Alors que la RHD n'a jamais été observée, une récente étude a permis de mettre en évidence qu'environ 35% des lapins vivant sur cet archipel sont séropositifs (Marchandea et *al.*, 2011).

Pour cela, nous avons réalisé une recherche de virus par RT-PCR semi-nichée sur des prélèvements d'intestins provenant de lapins issus de la chasse. Les prélèvements ont été réalisés en 4 lieux distincts de l'Archipel des Kerguelen, entre 2004 et 2008. La RT-PCR a été réalisée sur les ARN totaux extraits à partir de l'intestin, en utilisant des amorces spécifiques du gène de la VP60.

Préalablement à la description de nos travaux, nous commencerons par deux parties bibliographiques, la première constituée de rappels sur la RHD et la seconde constituée d'un rappel des données actuelles sur les calicivirus apparentés au RHDV. 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**

##### **A. Historique et répartition géographique**

La maladie hémorragique virale du lapin est une maladie très contagieuse et hautement pathogène dont la première description remonte à 1984 en République populaire de Chine dans la province de Jiangsu. Des lapins avaient été importés d'Allemagne de l'ouest. La maladie s'était alors propagée rapidement sur tout le continent asiatique, jusqu'en Europe.

Les premiers cas européens survinrent en Italie entre 1986 et 1988, années durant lesquelles l'agent pathogène responsable fut identifié. Entre 1988 et 1989, de nombreux élevages italiens furent touchés et connurent des pertes de dizaines de millions de lapins d'élevage (Cancelloti et Ranzi, 1991). La maladie s'étendit ensuite à la Tchécoslovaquie puis à la Pologne en 1987 avant de toucher la France en 1988. La maladie se répandit sur l'ensemble du territoire, tant dans les populations de lapins sauvages que de lapins d'élevage.

La maladie a été décrite sur le continent africain, en Arabie Saoudite, mais aussi sur le continent américain. Le RHDV fut ainsi introduit au Mexique en 1989, probablement suite à l'importation de viande de lapin en provenance de Chine. La maladie fut éliminée du pays, après s'être propagée autour du foyer d'infection, par la mise en œuvre de mesures drastiques d'éradication (Gregg et *al.*, 1991). Entre 2000 et 2001, trois épizooties ont été enregistrées aux Etats-Unis, ainsi qu'une autre en 2005. Toujours sur le continent américain, une épizootie a été déclarée fin 2004 (Lavazza et Capucci, 2009). Il est cependant plus facile de contenir les épizooties sur le continent américain, les lagomorphes sauvages qui y vivent n'étant pas sensibles au virus.

On la retrouve aussi en Australie et en Nouvelle-Zélande, où le virus fut cette fois introduit volontairement en 1995 pour tenter de décimer les populations de lapins, eux-aussi importés quelques années plus tôt. La maladie tua en 8 semaines plus de trente millions de lapins sauvages (Mutze et *al.*, 1998).

Elle est aujourd'hui endémique dans de nombreux pays, notamment en Europe, en Asie et en Océanie.

La maladie hémorragique virale du lapin semble être originaire d'Europe, où le RHDV existe depuis longtemps, sous forme de variants apathogènes dont nous parlerons en deuxième partie.

## **B. Synonymie**

La maladie hémorragique virale du lapin ne s'est pas toujours appelée ainsi. Lors de son apparition, elle fut d'abord appelée « fièvre hémorragique virale » ou « pneumonie hémorragique virale » en Chine. En Corée, elle reçut le nom de « mort virale subite ». Lors de son émergence en Italie, on l'appela « maladie X ». D'autres noms ont été utilisés telles que septicémie hémorragique, peste du lapin, hépatite nécrosante, ... (Mitro and Krauss, 1993)

Par la suite, sa pathogénie fut étudiée et l'Office Internationale des Epizooties (OIE) lui donna son nom définitif Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). En France, cela fut traduit par Maladie Hémorragique Virale du lapin.

## **II. Epidémiologie**

### **A. Population atteinte**

#### **1. Espèce cible (Merchan et al., 2011)**

Le RHDV, comme l'intégralité des Lagovirus excepté le EBHSV, est spécifique des lagomorphes de l'espèce *Oryctolagus cuniculus* qui comprend l'ensemble des lapins domestiques et sauvages européens. Cette espèce est dite sensible au virus car elle peut être infectée et déclarer la maladie.

Les autres espèces de lagomorphes sauvages telles que *Lepus californicus* (lièvre à queue noire), *Sylvilagus floridanus* (lapins américains), *Lepus americanus* (lièvre américain), *Romerolagus diazzy* (lapin des volcans) ainsi que *Lepus europeaus* (lièvre européen) ne sont pas sensibles à ce virus.

Le lièvre européen est par contre touché par une autre maladie dont l'agent pathogène est aussi un calicivirus du genre *Lagovirus* auquel appartient le RHDV, appelée European Brown Hare Syndrom (EBHS). Cette maladie est apparue chez le lièvre dans les années 80. Le tableau clinique et lésionnel est similaire à celui rencontré dans la RHD.

De nombreuses études ont porté sur l'infection expérimentale par le RHDV de diverses espèces animales et n'ont pas permis de produire chez ces espèces les signes cliniques de la RHD. Deux études australiennes et Néo-zélandaise ont montré la séroconversion suite à l'inoculation du virus chez des souris d'une part, et chez le Kiwi d'autre part, suite à leur exposition à du matériel contaminé (Buddle et al., 1997, Gould et al., 1997). Il en fut de même sur une étude menée sur des renards montrant un titre d'anticorps anti-RHDV décelable sans pour autant mettre en évidence de répllication du virus (Leighton et al., 1995). Aucune étude n'avait jusqu'à présent montré l'existence d'une contamination naturelle d'une autre espèce que l'*Oryctolagus cuniculus*.

Une récente étude espagnole est parvenue pour la première fois à démontrer l'existence de plusieurs souches de RHDV à l'état naturel chez des rongeurs (*Apodemus sylvaticus* et *Mus spretus*) vivant sur le même territoire que les lapins (*O. cuniculus*) (Merchan et al., 2011). En tout, 29 *M. spretus* et 22 *A. Sylvaticus* ont été capturés pour cette étude ainsi que 31 lapins. Tout ces animaux étaient apparemment sains cliniquement lors de leur capture et avant leur euthanasie. Des RT-PCR ont été réalisées sur une partie ou le foie entier de chacun d'eux.

Le résultat s'avéra positif chez deux *A. sylvaticus* et un *M. spretus* ainsi que chez sept lapins dont six pour lesquels la séquence de la VP60 a pu être analysée. L'une des souches a été retrouvée sur les 3 espèces et toutes correspondent à des souches déjà isolées sur des lapins vivants sur ce territoire. Il n'a pas été mis en évidence de signes cliniques associés au portage du virus chez ces deux espèces de rongeurs.

D'autre part, aucune étude ne rapporte la contamination de l'homme par le RHDV que ce soit par la manipulation ou la consommation de lapins infectés. Il ne s'agit donc pas d'une zoonose (Xu, 1991).

## 2. Réceptivité – sensibilité (Olhinger et al., 1993)

Plusieurs facteurs environnementaux ou liés à l'individu, peuvent modifier la sensibilité des lapins au sein de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Parmi ces facteurs, on trouve :

**Sexe** : Aucune différence de sensibilité n'a été mise en évidence entre les mâles et les femelles (Marchandau et al., 1998).

**Race :** Tous les lapins de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*, qu'ils soient sauvages ou domestiques, sont sensibles au RHDV. Mais il semblerait que les lapins sauvages aient une sensibilité accrue vis-à-vis du virus (Manté, 1989).

D'autre part, parmi les lapins domestiques, aucune différence de sensibilité significative n'a été mise en évidence. Morbidité et mortalité sont identiques quelle que soit la race (angora, rex, chinchilla, blanc du Japon et hybride). L'observation de ce qui se passe lors d'épizootie naturelle suggère toutefois que les races à fourrure caractéristiques, type race angora, sont plus sensibles que les races à viande et à fourrure (Xu, 1991).

**La gestion de l'élevage :** Les cas de RHDV ainsi que le taux de morbidité et de mortalité semblent être influencés par la gestion de l'élevage, en ce qui concerne la concentration des animaux ainsi que l'hygiène au sein de l'élevage. La morbidité passe ainsi de 30% à 80% selon que les lapins sont parqués en faible concentration ou en surpopulation. De même la mortalité peut passer de quelques lapins à 90% selon qu'ils vivent en cages individuelles ou sur une litière standard en groupe. Ainsi, l'insuffisance d'hygiène, la promiscuité et le stress engendrés par les conditions d'élevage sont des facteurs déterminants dans l'apparition de la maladie et la diffusion du virus au sein d'un élevage (Mitro et Krauss, 1993).

**Maladies concomitantes et baisse de l'état général :** Le stress dû aux conditions d'élevage, le parasitisme et toute baisse d'état général facilite l'apparition et la diffusion de maladies dont la RHD.

Une étude portant sur une possible interaction entre le virus de la myxomatose et le RHDV suggère que le premier, par son action immunosuppressive, pourrait faciliter les infections opportunistes quelles soient bactériennes ou virales comme la RHD. Cependant, il existe peu de données précises sur une corrélation entre la myxomatose et la RHD (Marchandea et *al.*, 2004).

**L'âge :** Il s'agit du principal facteur influençant la sensibilité des lapins au RHDV. Les lapins âgés de moins d'un mois ne sont pas sensibles. On n'observe pas de séroconversion des lapereaux, ni de signes cliniques (Xu, 1991). Ils ne survivent cependant que rarement lors d'épidémies de RHD chez les populations sauvages, du fait d'une mortalité très élevée des adultes. Cela engendre une diminution des naissances et un sevrage précoce souvent fatal (Marchandea et *al.*, 1998 ; Ruvoën et *al.*, 2000 ; Mutze et *al.*, 1998). La sensibilité au RHDV augmente ensuite entre 1 et 3 mois pour devenir maximale chez les

jeunes et adultes âgés de plus de 3 mois (Ruvoën et *al.*; Xu, 1991). La première hypothèse formulée pour expliquer ce défaut de sensibilité au RHDV des plus jeunes fut la présence d'anticorps d'origine maternelle qui les protégeraient. Une étude a montré l'existence de ces anticorps d'origine maternelle chez les très jeunes lapereaux issus de mères ayant survécu à la RHD. Ces lapereaux présentaient des anticorps d'isotype IgG d'origine maternelle dont le titre diminuait au fur et à mesure du temps et de l'augmentation du poids jusqu'à devenir nul après 8 semaines ou 1-2kg. Ces AOM semblent être protecteur contre l'infection dans la majorité des cas et réduisent fortement l'expression clinique lorsqu'ils sont présents à faible dose (Cooke et *al.*, 2000). Une étude menée lors de l'apparition du RHDV en République Tchèque tendrait à démontrer que la résistance des jeunes lapins n'est pas due à ces AOM, puisque de jeunes lapereaux infectés expérimentalement survivent malgré l'absence apparente d'AOM (Rodak et *al.*, 1991). Il est donc difficile de faire la part des choses entre l'absence d'infection des lapereaux grâce aux AOM et leur incapacité à être infectés du fait de l'absence de récepteurs au RHDV chez les lapereaux.

Une étude portant sur l'importance des antigènes de groupe sanguin ABO dans la fixation du RHDV aux muqueuses de l'appareil respiratoire supérieur et du tractus digestif révèle ainsi que le nombre de récepteurs au RHDV augmente progressivement entre 1 mois et 3 mois. Les antigènes A et O de type 2 sont présents au niveau des cellules épithéliales du tractus digestif et des voies aériennes supérieures des lapins. Au niveau des cellules épithéliales buccales, l'antigène O de type 2 apparaît à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de vie et atteint son niveau maximal d'expression à 10 semaines. L'antigène A apparaît plus tard, à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine et atteint son expression maximale à 12 semaines (Ruvoën et *al.*, 2000). Parallèlement, l'expression clinique de la RHD augmente entre 1 et 3 mois, avec une sensibilité des lapins entre 1 et 2 mois assez faible (Xu, 1991).

## **B. Répartition et évolution dans le temps et dans l'espace**

La RHD est une maladie récente qui apparut la première fois en Chine en 1984. Son apparition fut reliée à l'importation de lapin angora en provenance de l'ancienne République Fédérale d'Allemagne. Par la suite, elle apparue en Corée puis se répandit rapidement à travers les pays asiatiques et européens. La première apparition de la RHD en Europe date de 1986 en Italie, puis on la détecta en Tchécoslovaquie et en Pologne dès 1987 et l'année d'après en Espagne. A cette période, la RHD toucha la Russie, le Moyen-Orient, l'Afrique, l'Amérique et l'Inde (Mitro et Krauss, 1993 ; Alda, 2010). La RHD est actuellement endémique sur tous les continents.

Il semblerait que les cas de RHD au sein des populations sauvages aient lieu préférentiellement dans des zones forestières ou en bordure des forêts, en milieu humide proche d'un point d'eau (Mitro et Krauss, 1993).

La plupart des cas de RHD ont un caractère saisonnier et semblent corrélés à la densité de population des lapins en milieu sauvage, elle-même corrélée au climat, en particulier à la pluviométrie accrue en automne qui correspond au début de la saison de reproduction. La densité de lapin augmente alors jusqu'à atteindre un maximum à la fin de la saison de reproduction en mai-juin. La RHD apparaît principalement de novembre à mai en pleine période de reproduction lorsque le plus haut pourcentage de femelles gravides est observé (Mitro et Krauss, 1993 ; Calvetes et *al.*, 2002). Un pic de RHD est observé en Janvier/Février, juste avant l'augmentation du nombre de lapins. Cela est vérifié en 1996 lorsque le retard des pluies d'automne de 2-3 mois est associé à un délai équivalent dans l'augmentation de la population et l'apparition du pic de RHD. (Calvetes et *al.*, 2002).

Dans une région vierge de RHD, la première épidémie de RHD engendre une mortalité très élevée dans la population de lapins pouvant avoisiner les 100%. Les épidémies suivantes engendrent des mortalités significativement plus faibles.

Cependant, l'exemple du Royaume-Uni suggère déjà l'existence de souches de RHDV de pathogénicité différente. En effet, la première épidémie anglaise ne toucha que deux élevages en relation et engendra de 15 à 75% de mortalité seulement au sein de l'élevage (Fuller et *al.*, 1993)

Une étude menée en Espagne en 1993-1994, soit 6 ans après l'apparition de la RHD, révèle un taux de mortalité d'environ 30%. Ce dernier était estimé à 55-75% selon la région lors de la première épidémie de RHD en Espagne (Villafuerte et *al.*, 1995).

Cette différence de morbidité et de mortalité au sein des régions enzootiques pourrait s'expliquer par une augmentation du nombre d'individus possédant des anticorps anti-RHDV (Ohlinger et *al.*, 1993).

Le retour à l'effectif de lapins initial (avant l'apparition de RHD) peut être retrouvé si les conditions telles que l'accès à la nourriture, une faible pression de prédation et de chasse, le temps ainsi que la qualité des sols sont réunis. Plusieurs localités ont ainsi recouvré leur

densité de lapins initiale. Cependant, cela reste rare et peu de régions retrouvent leur effectif de départ (Villafuerte et *al.*, 1995)

### **C. Sources virales**

Les sources virales sont multiples, le RHDV étant très résistant dans le milieu extérieur. Les animaux malades ainsi que les éventuels infectés ne présentant pas de symptômes sont des sources de virus via leur sang, leurs sécrétions et excréments, leur peau et leurs muqueuses où l'on peut détecter du virus particulièrement en fin d'évolution de la maladie. Les fèces des animaux survivants à la RHD sont par exemple infectieuses plus de 4 semaines pour les animaux sensibles ce qui explique que la voie fécale-orale joue un rôle majeure dans la transmission de la maladie (Olhinger et *al.*, 1993). Les cadavres d'animaux ayant succombé à la RHD semblent être infectieux plus de 3 mois après leur mort et jouent un rôle important de vecteur de la maladie ainsi que dans la persistance de l'infection après un pic épidémique (Henning et *al.*, 2005). Une étude similaire montre que le RHD résiste expérimentalement 225 jours dans un organe en suspension à 4°C (Smid et *al.*, 1991).

Les vecteurs passifs tels que les équipements, habits, animaux non sensibles ainsi que l'homme représentent une autre source non négligeable de contamination virale. Une étude montre ainsi que le RHDV reste infectieux 105 jours sur un habit (Smid et *al.*, 1991). Une autre étude évaluant l'infectiosité du virus imprégné sur une boule de coton inerte limite cependant cette durée entre 10 et 44 jours (Henning et *al.*, 2005). Le fourrage constitue aussi une source de contamination puisqu'il peut lui-même avoir été contaminé par les excréments, cadavres et sécrétions des populations de lapins sauvages infectés (Mitro et Krauss, 1993).

Les jeunes lapereaux de moins de 2 mois, non sensibles au RHDV, ne sont pas des sources de contamination. Ceci a été démontré par la mise en contact prolongé durant 4 semaines de lapins adultes avec de jeunes lapereaux ayant rencontré le virus. Aucun n'a présenté de symptômes ni de séroconversion (Olhinger et *al.*, 1993).

### **D. Transmission**

Expérimentalement, la transmission peut se faire par voie aérienne, oral ou intramusculaire. Naturellement, les voies d'entrée sont donc l'appareil respiratoire supérieur, le tractus digestif et les lésions cutanées par lesquelles le virus peut pénétrer puis se propager dans l'organisme (Mitro et Krauss, 1993). Selon une étude menée sur des groupes de lapins entreposés dans une même pièce mais sans contact, il semblerait que la voie aérogène sans contact direct entre les lapins ne soit pas contaminante (Henning et *al.*, 2005).

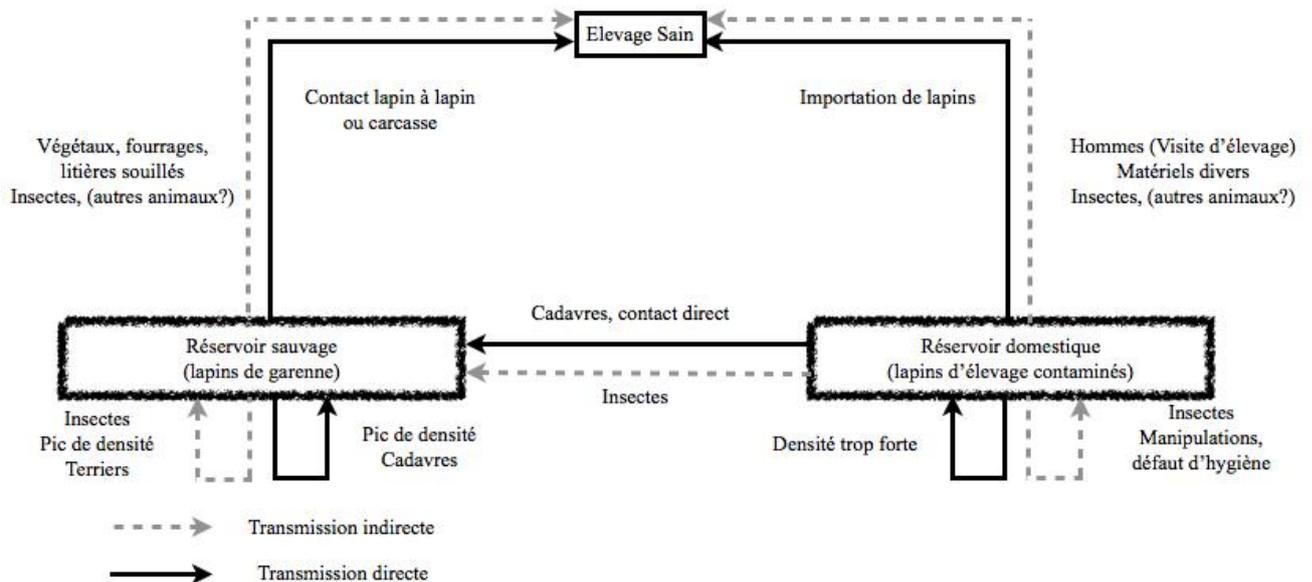
La transmission du virus est exclusivement horizontale et peut se faire de manière directe ou indirecte (cf. figure 1). On peut distinguer 2 configurations distinctes : la transmission entre lapins au sein d'un même groupe (élevage ou population sauvage) et la transmission entre groupes.

Dans le premier cas, la transmission est à la fois directe et indirecte. On parle de transmission directe lorsque celle-ci se fait par contact direct entre un lapin sain et un lapin infecté ou un cadavre de lapin mort de RHDV. Que ce soit en milieu sauvage ou en élevage, la transmission directe doit avoir un rôle important dans la dissémination de la maladie lors d'une épidémie. La forte densité en élevage intensif ou l'augmentation des rapports et de la densité lors de la saison de reproduction des lapins sauvages facilitent en effet ces contacts directs. D'autre part, en milieu naturel, il semblerait qu'une majorité de lapins infectés meurent dans les terriers et constituent ainsi des sources de contamination non négligeable (Mutze et *al.*, 1998). La période de reproduction étant une période propice au fouissage et à une surfréquentation des terriers, cela pourrait expliquer en partie l'épidémie hivernale annuelle (Calvete et *al.*, 2002).

Cependant, il est probable que la transmission fécale-orale joue un rôle aussi prépondérant. Il pourrait même s'agir de la principale voie de contamination dans certains cas. Les lapins sont caecotrophes et nous avons vu précédemment que les fèces des animaux ayant survécu à la RHD restent infectants 4 semaines après l'infection (Ohlinger et *al.*, 1993). Il est aussi apparu que les élevages présentant un manque d'hygiène et une forte densité de population étaient plus sensibles que les élevages avec une densité moindre (Mitro et Krauss, 1993).

Dans le second cas, la transmission entre un groupe de lapins infectés et un groupe de lapins sains est essentiellement indirecte. Elle peut se faire via des vecteurs inanimés (matériels divers, moyens de transports, végétaux frais ou fourrages, cages) mais aussi par des vecteurs animés (hommes, petits mammifères, oiseaux, insectes). Une étude a montré le rôle des insectes dans la diffusion de la RHD en Australie en 1995. Introduit expérimentalement sur Wardang Island, le RHDV parvint à se répandre tout d'abord autour du laboratoire puis en Australie. L'étude démontra en utilisant deux lapins infectés expérimentalement ainsi qu'un lapin témoin que les insectes de type mouches des buissons (Bushflies) maintenues d'abord en contact de ces lapins puis déplacées sur des lapins sains sensibles peuvent transmettre le RHDV (McCull, 2002). Le rôle d'autres animaux tels que des oiseaux ou de petits rongeurs demeure flou, bien qu'on ait vu précédemment que des rongeurs tels que *A.*

*sylvaticus* ou *M. spretus* puissent être porteurs du RHDV et puissent potentiellement jouer un rôle de vecteurs passifs (Merchan et *al.*, 2011). Les hommes jouent probablement un rôle important dans la diffusion du virus au sein de l'élevage comme entre les élevages. Ils peuvent contaminer des lapins sains lors de manipulation ou lors de visite d'élevage. Les lapins sauvages peuvent aussi contaminer les lapins d'élevage, soit par contact direct, ce qui reste rare, soit de façon indirecte par contamination des fourrages ou de la litière par exemple. Plusieurs éleveurs ont ainsi noté une corrélation temporelle entre le déclin des populations de lapins de Garenne et les épizooties au sein de l'élevage (Mitro et Krauss, 1993).



**Figure 1** : Cycle épidémiologique de la RHD (Thèse Martin, 2010, Mutze et *al.*, 1998, Kovaliski, 1998, Merchan et *al.*, 2011).

Ce second cas correspond aussi à la transmission du virus d'un pays infecté vers un pays sain. Dans ce cas, le mode de transmission peut-être direct ou indirect et consiste en l'importation ou exportation de lapins vivants, morts ou de leurs produits dérivés. En 1989, la première épidémie de RHD au Mexique fut imputée à l'import de viande de lapin de République Populaire de Chine. Elle se répandit rapidement à travers le pays avant d'être éradiquée par des mesures drastiques (Gregg et *al.*, 1991). Ce fut probablement la même chose pour la France et l'Italie qui importaient traditionnellement beaucoup de viande de lapin de République Populaire de Chine. Ainsi, entre 1987 et 1988, l'Italie augmenta ses importations de lapins et viande de lapin en provenance de République Populaire de Chine de 18,4%. C'est à cette période que la RHD apparut. L'Italie n'exporta qu'en Suisse. La RHD fut observé dans ce pays dès l'automne suivant en 1988. De même, la France augmenta son importation de viande de lapin en 1988-1988 dont 60% en provenance de Chine, époque à laquelle fut observée la première épidémie. Les pays importateurs de viande de lapin en

provenance de France, tels que la Belgique, l'Allemagne, le Portugal, etc, virent l'incidence de la RHD augmenter entre 1988 et 1989 (Mitro et Krauss, 1993).

Dans le cas de l'Australie l'histoire est un peu différente. Une souche issue de République tchèque fut importée dans le laboratoire de santé animale australien du CSIRO pour étudier la spécificité d'hôte du virus. Suite à la validation des résultats, le virus fut introduit dans une enceinte de quarantaine sur Wardang Island. Le RHDV diffusa ensuite autour de l'île puis au-delà, sur le continent australien. Comme nous l'avons vu précédemment, une des hypothèses avancées est la dissémination du virus par les insectes, d'une part parce que nous avons vu que les insectes peuvent être porteurs du RHDV et permettre la contamination de lapins sains sensibles, mais aussi parce que la présence de cadavre ainsi que la pullulation des insectes sur l'île à cette époque rend ce scénario possible. D'autres hypothèses ont cependant été envisagées tels que l'intervention de l'homme ou les oiseaux migrateurs, mais sont restées sans fondement (Kovaliski, 1998). L'introduction du RHDV en Nouvelle-Zélande est aussi volontaire et fit suite à un mécontentement d'un groupe de fermiers devant l'absence de réponse à leur problème de contrôle des populations de lapins.

### **III. Tableau clinique**

La clinique de la RHD est assez variable. Après une période d'incubation de 24 à 72h, l'évolution est le plus souvent aiguë à suraiguë et aboutit à la mort de l'animal dans les 12 à 36h après l'infection. Une étude portant sur 37 lapins de 9 semaines infectés expérimentalement rapporte une mortalité de 85% entre 36 et 54h, avec une mortalité de 15% à 36h, 38% à 42h et 69% à 48h (Tanon et *al.*, 2003).

#### **A. Symptômes** (Mitro et Krauss, 1993 ; OIE, 2007 ; Abrantes et *al.*, 2012 ; Ohlinger, 1993)

Les symptômes n'apparaissent que sur les lapins âgés de plus de 8 semaines environ. On peut distinguer 3 grandes formes cliniques : la forme suraiguë, la forme aiguë et la forme subaiguë. Une dernière forme, chronique, est envisagée mais reste rare.

Une étude portant sur 20 lapins ZIKA-hybrides sensibles, âgés de 14 semaines a permis d'observer les différentes formes de la RHD. Ces lapins ont été divisés en 5 sous-groupes de 4 lapins recevant respectivement 1, 10, 100, 1000 ou 10000 unités d'hémagglutination (UHA) de RHDV, par voie intramusculaire. Durant les 3 premiers jours

post-infection, 12 lapins provenant de tous les groupes sont morts (3 de chacun des groupes ayant reçu 10, 1000 et 10000 UHA, 2 ayant reçu 100 UHA et 1 ayant reçu 1 UHA). Le quatrième jour, 4 lapins qui ne présentaient jusqu'alors aucun symptôme (2 ayant reçu 100 UHA, et 2 respectivement des groupes ayant reçu 1000 et 10000 UHA), sont devenus anorexiques, léthargiques et ont développé un ictère. Ils ont finalement été euthanasiés à 10 jours post-infection, en même temps que les lapins restés cliniquement sains (Teifke et *al.*, 2002).

**Forme suraiguë** : Cette forme se caractérise par une hyperthermie soudaine et la mort des lapins 12 à 36h après. Les seuls symptômes peuvent être les cris d'agonie terminaux puis la syncope et la mort. Elle est la principale forme lors de l'apparition pour la première fois de la RHDV.

**Forme aiguë** : Cette forme est la forme la plus fréquente en milieu et fin d'épidémie. Elle se caractérise par des signes cliniques inconstants et variés.

*Symptômes généraux* : douleur, hyperthermie, abattement, rare avortement.

*Symptômes cutanés et oculaires* : congestion de la conjonctive palpébrale, épiphora, hémorragie oculaire, pétéchies.

*Symptômes digestifs* : anorexie, amaigrissement, ictère. Juste avant la mort : diarrhée, constipation et dilatation abdominale.

*Symptômes respiratoires* : dyspnée, cyanose, trachéite, jetage mousseux, épistaxis

*Symptômes nerveux* : excitation, ataxie, parésie, convulsions, pédalage, opisthotonos, léthargie.

**Forme subaiguë** : Les signes cliniques observés dans cette forme sont ceux décrit ci-dessus en moins prononcés. Les lapins peuvent alors développer un ictère au niveau des muqueuses et mourir plusieurs semaines après l'infection ou survivre et développer des anticorps protecteurs vis-à-vis d'une réinfection.

**Forme chronique** : Cette forme est très rare et dite asymptomatique. Les lapins peuvent alors avoir une persistance de l'infection durant quelques semaines et servir de réservoir à la maladie. Ils présentent ensuite une séroconversion.

## **B. Perturbations hématologiques et biochimiques**

### 1. Modifications biochimiques (Tunon et *al.*, 2002, Garcia-Lastra et *al.*, 2010)

Divers paramètres biochimiques sont modifiés lors d'une infection des lapins sensibles avec le RHDV :

**Marqueurs de cytolysse hépatique** : Après 36h post-infection, les ASAT (Aspartate transaminase) et les ALAT (Alanine transaminase) augmentent de manière significative, avec un pic de concentration à 42h post-infection. De même, l'activité de la LDH (lactate deshydrogenase) qui marque l'hémolyse lors de cytolysse hépatique, augmente.

**Marqueurs de cholestase** : Toujours à partir de 36h post-infection, on peut observer chez les lapins infectés une augmentation de la concentration de bilirubine.

**Marqueurs fonctionnels hépatiques** : On observe tout d'abord une augmentation de la bilirubinémie à partir de 36h. Le profil des acides aminés plasmatiques se trouve modifié avec une nette tendance à l'augmentation des acides aminés aromatiques (Phénylalanine, tyrosine) par rapport aux acides aminés à chaîne ramifiée (Leucine, Isoleucine). L'index de Fischer en est alors modifié. A l'approche de la mort, la concentration plasmatique de l'ammoniac augmente aussi.

Toutes ces modifications peuvent être responsables d'une encéphalose hépatique et d'une partie des signes neurologiques observés.

L'augmentation de ces marqueurs associés à des signes cliniques en faveur d'une insuffisance hépatique reflète une dysfonction sévère du foie dès 36h après l'infection.

Une récente étude a montré la modification de marqueurs d'apoptose et de mort cellulaire contribuant aux dommages hépatiques et à l'absence de sa régénération. On observe précocement une augmentation de l'expression de TNF (Tumor Necrosis Factor) à 12h post-infection. A partir de 36h post-infection, l'activité de la capsase-3, impliquée dans le clivage de l'ADN lors du processus apoptotique, augmente de façon marquée. Parallèlement, on observe une faible augmentation de l'Interleukine 6, une activation transitoire de la protéine STAT-1, et faible de la protéine STAT-3, ces protéines du groupe STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) étant impliquées dans les processus de régénération lors d'hépatite aiguë. Dans le cas d'une infection avec le RHDV chez le lapin, ils ne sont pas ou peu activés ce qui pourrait expliquer l'absence de régénération.

D'autres mécanismes sont décrits dans cette étude, confirmant la présence de mécanisme de détérioration du foie et de blocage des processus de régénération.

## 2. Modifications hématologiques

Une première étude porte sur 20 lapins de 11 semaines préalablement testés sérologiquement pour le RHDV et sains (Plassiart et *al.*, 1992). L'inoculation du virus se fait par voie intra-nasale et deux lapins sont sacrifiés à 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 et 60h post-infection, excepté pour un lapin mort spontanément à 42h post-infection. Des prises de sang intracardiaques sur tube EDTA et citraté ainsi qu'un prélèvement de tissu sont réalisés sur chaque lapin au moment de son sacrifice. Une deuxième étude (Ueda et *al.*, 1992) porte sur 7 lapins pour lesquels l'inoculation du virus se fait par voie intramusculaire. Quatre autres lapins servent de témoins sains. Des prises de sang sur tube citraté sont réalisées avant l'inoculation puis 12h après et enfin lors de la phase terminale sur chaque lapin (à 24h post infection dans le cas des lapins témoins). La mort survient entre 27 et 40h post-infection chez les lapins infectés. Les résultats pour cette étude sont donnés par rapport au groupe témoin.

Des modifications hématologiques importantes sont ainsi observées dans ces deux études :

**Lignées des cellules rouges :** seul le microhématocrite est mesuré. Il n'y a pas de modifications significatives en fonction du temps, les valeurs restant dans les valeurs usuelles.

**Lignées de cellules blanches :** le nombre total de leucocytes est mesuré dans les deux études et le nombre de neutrophiles et de lymphocytes uniquement dans la première. Dans la première, on note une leucopénie majeure dans environ 42% des cas mais inconstante sans modification significative du nombre d'éosinophiles. Une lymphopénie est par contre observée de manière quasiment systématique et de façon marquée. La deuxième étude montre une leucocytopenie modérée en phase terminale.

### **Facteurs de coagulation et plaquettes :**

Le nombre de plaquettes diminue pour les lapins infectés dans les deux études, à partir de 30h post-infection dans la première étude ; on note ainsi 73% de lapins avec une numération de plaquettes sous la valeur basse de référence. Dans la deuxième, le nombre de plaquettes chez les lapins infectés diminue de façon modérée à majeure lors de la phase terminale.

L'hémostase est évaluée dans les deux études et montre une augmentation des temps de céphaline activateur (TCA) et temps de Quick (TQ) dans les deux études, de manière modérée particulièrement après 30h ou en phase terminale, à majeure. Les deux études ne montrent pas de modification majeure du fibrinogène pour lequel les variations individuelles sont importantes.

Dans la première étude, on constate une diminution de l'activité des facteurs V, VII et X de manière inconstante, avec cependant une augmentation des produits de dégradation du fibrinogène (complexes solubles et D-Dimères) à partir de 30h post-infection. Dans la deuxième étude, l'antithrombine III qui été mesurée diminue en phase terminale chez les lapins infectés. Les produits de dégradation du fibrinogène augmentent de façon marquée en phase terminale.

Les modifications hématologiques et hémostatiques observées lors de ces deux études sont en faveur d'un processus à l'origine d'une coagulopathie de consommation ou coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

### **C. Lésions**

Le pattern lésionnel est majoritairement un pattern congestivo-hémorragique sur l'ensemble des organes cibles : foie, rate, reins, poumons, thymus et trachée. On fera une distinction entre les lésions macroscopiques et les lésions microscopiques.

#### **1. Macroscopiques**

Avant ouverture de l'animal, celui-ci présente le plus souvent le nez souillé par un écoulement sanguinolent. Une coloration ictérique est visible sur les pavillons auriculaires (Marcato et *al.*, 1991).

A l'ouverture du cadavre, on peut constater une coloration jaune de l'ensemble du tissu sous-cutané. Une dilatation vasculaire peut être présente particulièrement dans la cavité abdominale ainsi que des pétéchies sur l'ensemble des organes. Un hydrothorax peut parfois être présent. Tout ceci est associé à un défaut de coagulation important. On peut aussi observer chez les femelles gravides des fœtus présentant des hémorragies multi-organiques focales (Marcato et *al.*, 1991 ; Ohlinger et *al.*, 1993).

Ci-dessous le tableau lésionnel macroscopique organe par organe (Marcato et *al.*, 1991 ; Ueda et *al.*, 1992 ; Mitro et Krauss, 1993) :

### **Appareil respiratoire :**

**Trachée** : La muqueuse apparaît congestionnée, rouge à noirâtre, avec des pétéchies ou des hémorragies diffuses. Elle peut être remplie d'un abondant liquide mousseux hémorragique.

**Poumons** : On observe une congestion et œdème pulmonaire avec des plages hémorragiques multifocales allant de 1 à plusieurs centimètres de diamètre, intra-alvéolaires ou péri-vasculaires. Parfois, une bronchiolite catarrhale peut être observée.

Les poumons et la trachée sont les organes les plus atteints d'un point de vue macroscopique.

### **Organes lymphoïdes :**

**Rate** : On observe une splénomégalie associée à une congestion et la présence de pétéchies.

**Thymus** : Il peut être atrophié (Teifke et *al.*, 2002).

**Foie** : Il apparaît jaune pâle à grisâtre, de consistance friable associée à une accentuation de la lobulation. Ceci est associé à une hépatomégalie et parfois à une fine granulation en surface. Rarement, on peut déjà observer de la nécrose hépatique (Teifke et *al.*, 2002).

**Rein** : On peut observer une néphromégalie associée à une décoloration grisâtre, à la présence de pétéchies et à une hyperhémie. On peut aussi observer des hémorragies glomérulaires et médullaires, une dilatation des tubules et la présence de thrombi hyalin.

**Tractus digestif et cavité abdominale** : Le contenu digestif est le plus souvent normal. On peut observer une gastrite voire une entérite catarrhale parfois avec des érosions de la muqueuse ainsi que des hémorragies au niveau de la séreuse. Dans la cavité abdominale, on observe une hyperplasie des nœuds lymphatiques mésentérique, parfois un hémopéritoine.

**Muscles** : Au niveau de cœur, on peut observer une dilatation ventriculaire droite avec présence de pétéchies et parfois de foyer de nécrose sur le myocarde. Une anémie peut être observée au niveau des muscles de la cuisse.

**Système nerveux central** : On peut observer une congestion des vaisseaux du cortex, une dilatation des vaisseaux dans la zone de la pie-mère du cortex et du cervelet, une hyperhémie corticale et de petites hémorragies du cortex.

## 2. Microscopiques

Les organes apparaissant les plus touchés d'un point de vue macroscopique sont les poumons et la trachée. D'un point de vue microscopique cependant, c'est sur le foie que l'on trouve les lésions histologiques les plus importantes et les plus significatives.

Ci-dessous le tableau lésionnel microscopique organe par organe (Marcato et *al.*, 1991 ; Plassiart et *al.*, 1992 ; Fuchs et Weissenbock, 1992 ; Mitro et Krauss, 1993 ; Teifke et *al.*, 2002).

### **Appareil respiratoire :**

**Trachée** : Une infiltration leucocytaire peut être observée.

**Poumons** : On peut voir des microthrombi à partir de 30h post-infection mais cela devient vraiment significatif à partir de 48h post-infection. On observe alors une congestion généralisée associée à des hémorragies diffuses, le plus souvent observées de façon focales au niveau d'alvéoles, ainsi que dans la lumière des bronchioles proches. Parfois, on peut observer des hémorragies périvasculaires au niveau de l'interstitium interlobulaire et péribronchique. Au niveau de BALT, une caryorrhexie est parfois observée.

**Organes lymphoïdes** : Les lésions observées sur la rate et le thymus sont de même intensité, et ils peuvent être corrélés avec l'intensité des lésions hépatiques.

**Rate** : On peut parfois observer une hémosidérose splénique. Les lésions spléniques apparaissent à partir de 36h post-infection et consiste dans un premier temps en des foyers de macrophages contenant des corps tingibles et des cellules dégénérées. Les lésions suivantes apparaissent davantage à partir de 48h post-infection.

**Pulpe blanche** : On observe distinctement une déplétion lymphocytaire au niveau de la pulpe blanche associée à de la nécrose lymphocytaire et une diminution de taille des nodules spléniques contenant parfois un matériel éosinophilique homogène. Certains nodules atrophiés sont entourés par une accumulation de globules rouges. De nombreux lymphoblastes principalement situés dans la zone marginale et quelques lymphocytes

remaniés présentent une caryorrhexie et quelques fois une pycnose ou des noyaux de formes modifiées.

*Pulpe rouge* : Une congestion ainsi qu'une déplétion cellulaire diffuse sont parfois présentes. On peut aussi observer des dépôts hyalins eosinophiliques.

*Thymus* : Les lésions apparaissent à partir de 30h post-infection mais deviennent particulièrement marquées dès 42h post-infection. Ces lésions consistent en une nécrose des cellules lymphocytaires dans la corticale des lobules thymiques.

**Foie** : Les lésions hépatiques peuvent être observées dès 30h post-infection. Ce sont des lésions d'hépatite nécrosante apparaissant majoritairement à la périphérie des lobules et s'étendant vers la zone intermédiaires. De nombreux foyers de nécrose apparaissent et peuvent confluer. La région autour des espaces portes est souvent épargnée. Ces derniers ainsi que la zone intermédiaire peuvent être de tailles augmentées.

Les hépatocytes dégènèrent le plus souvent par nécrose de coagulation et apparaissent hyper-éosinophiles. Au fort grossissement, le cytoplasme apparaît légèrement spumeux du fait de minuscule gouttelette lipidique et paraît majoritairement basophile. Les hépatocytes de la zone intermédiaire peuvent contenir des gouttelettes de bilirubines. Une autre caractéristique observée est le rétrécissement associé à un arrondissement et à une hyalinisation des hépatocytes qui se détachent individuellement des travées hépatiques, devenant irrégulières, et passe dans les vaisseaux sinusoïdes. Des microthrombi sont aussi visibles dans la lumière de ces capillaires.

Les hépatocytes centrolobulaires présentent le plus souvent une hyperéosinophilie, une caryolyse à différents stades de développement ainsi qu'une pycnose ou une caryorrhexie. Plus rarement, le noyau peut apparaître rompu avec des fragments de chromatine de différentes formes et tailles visibles dans toute la cellule.

Les espaces interlobulaires présentent parfois de petites hémorragies et sont légèrement oedématiés. Ils peuvent être infiltrés par des lymphocytes, et plus rarement par des histiocytes et des plasmocytes.

Une étude montre, chez deux lapins infectés expérimentalement et présentant une forme subaiguë de la maladie, des hépatocytes en cours de régénération visibles dans les zones centrales et moyennes. Ils sont de tailles variables, avec un cytoplasme très basophile et un large noyau pâle souvent. De nombreuses figures de mitoses peuvent être observées. Parallèlement, d'autres signes de régénération sont visibles tels que la formation de pseudo-tubules et une prolifération des canaux biliaires.

**Rein :** Dès 42h post-infection, une congestion ainsi que de nombreux microthrombi peuvent être observés. Ces derniers sont principalement localisés au niveau des capillaires glomérulaires et souvent au niveau des artérioles corticales. A partir de 54h post-infection, on peut observer une dégénérescence hydropique de l'épithélium des tubules rénaux. Des thrombi hyalin au sein du flocculus glomérulaire et des petits vaisseaux sont fréquemment notés et plus rarement des thrombi blanchâtres au sein de gros vaisseaux.

**Système nerveux central :** Une infiltration modérée des leptoméninges par des lymphocytes, plasmocytes et macrophages peut être observée. Elle est parfois associée à une encéphalomyélite non suppurée. Plus rarement, on note aussi la présence de thrombi hyalin et de petites hémorragies focales.

D'autres lésions ont été rapportées telles qu'une nécrose des glandes surrénales, une congestion associée à une hémorragie de la paroi utérine, une dégénérescence des acini pancréatiques et des îlots de Langerhans, une nécrose focale des muqueuses biliaires.

#### **IV. Virologie**

D'abord classé parmi les picornavirus puis les parvovirus, le RHDV fut définitivement rattaché à la famille des *Caliciviridae*.

##### **A. Généralités sur la famille des *Caliciviridae* (Clarke et Lambden, 1997 ; Joubert, 2000 ; Pasquier et *al.*, 2005 ; Smith et *al.*, 1998)**

Les calicivirus doivent leur nom à la morphologie de certains virus de la famille qui se caractérisent par des dépressions en forme de calice à la surface de leur capsid lors de l'observation des virions en microscopie électronique en coloration négative. Leur taille est comprise entre 30 et 40 nm de diamètre et ils sont de symétrie icosaédrique.

##### **1. Historique**

Durant les années 1990, des recherches ont fait avancer la compréhension de la biologie moléculaire de cette famille de virus. Les calicivirus sont désormais décrits comme les agents pathogènes responsables de nombreuses maladies humaines, comme animales.

Parmi les plus anciens calicivirus isolés, on trouve le virus de l'exanthème vésiculeux du porc (Vesicular Exanthema Swine Virus ou VESV), le virus du lion de mer de San Miguel (San Miguel Sea lion Virus ou SMSV) et le calicivirus félin (Feline Calicivirus ou FCV) :

**Le VESV** a été isolé aux USA uniquement entre 1932 et 1956. Il se transmettait à la fois de porc à porc mais aussi à partir de mammifères marins. Bien qu'éradiqué aujourd'hui chez le porc, il subsisterait dans le réservoir que constituent les mammifères marins.

**Le SMSV** a été isolé la première fois en 1972 à partir d'un lion de mer californien (*Zalophus californianus*) et appelé de type 1 (SMSV-1). Il semble étroitement lié au VESV et a engendré une vague d'exanthème vésiculeux chez les porcs à cette période. Depuis, d'autres types de SMSV ont été isolés chez de nombreux mammifères marins avec toujours la possibilité d'infecter les porcs exposés et d'engendrer un exanthème vésiculeux.

**Le FCV** a été isolé la première fois en 1957. Il est responsable d'une majorité de maladies respiratoires et de stomatites du chat.

## 2. Classification

La famille des *Caliciviridae* est désormais subdivisée en 5 genres :

**Vesivirus** : Il comprend le VESV, le SMSV et le FCV ainsi que les calicivirus du singe, des reptiles et du putois.

**Lagovirus** : Il comprend les calicivirus de lagomorphes que sont le RHDV et l'EBHSV.

**Nebovirus** : Il comprend uniquement le Newbury-1 virus, un calicivirus entérique bovin.

**Norovirus** : Il comprend le virus Norwalk et diverses souches humaines apparentées ainsi que des virus animaux (bovins, murins et porcins).

**Sapovirus** : Il comprend le virus Sapporo, comprenant diverses souches, dont les souches Sapporo et Manchester, ainsi qu'un virus porcine et un virus du vison.

Ces deux derniers genres provoquent, chez l'homme en particulier, des symptômes gastro-intestinaux de types nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et syndrome fébrile.

Enfin, d'autres calicivirus ne sont pas encore rattachés à un genre. Il s'agit des calicivirus entériques bovins, porcins et des calicivirus du poulet, du lion, du vison, du morse et d'autres calicivirus aviaires.

### 3. Caractéristiques principales

On distingue 4 critères principaux permettant de caractériser la famille des *Caliciviridae* :

**Le génome** : Il est constitué d'un simple brin d'ARN de polarité positive d'environ 7,5kb. Ce brin d'ARN est polyadénylé en 3' et possède deux cadres de lectures (ORF : Open Reading Frame) dont une grande ORF codant notamment pour la protéine majeure de capsid, la VP60, et une petite ORF localisée à l'extrémité 3' codant pour une protéine basique dont la fonction n'est pas connue.

**La protéine VPg** : Il s'agit d'une polyprotéine non structurale de 10-15kDa présente à l'extrémité 5' du génome précédant le gène codant pour l'unique protéine structurale de la capsid. Elle pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la traduction et pourrait servir d'amorce à la polymérase pendant l'initiation de la synthèse d'ARN.

**La capsid** : elle est de symétrie icosaédrique et composée d'une seule protéine structurale majeure VP60.

**La phylogénie** : Tous les calicivirus doivent former un groupe monophylétique ayant un ancêtre commun.

#### **B. Caractéristiques du RHDV**

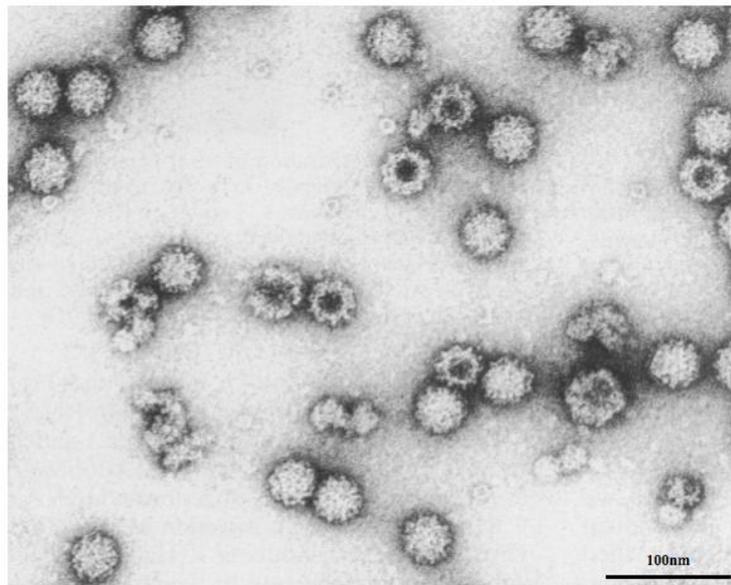
Le RHDV a été isolé pour la première fois en 1990 à partir de foies de lapins morts de la RHD en Espagne et Allemagne.

##### 1. Morphologie (Ohlinger et Thiel, 1991 ; Joubert, 2000 ; Hu, 2010)

Toutes les études concernant les caractéristiques du RHDV ne s'accordent pas exactement sur les détails de la description morphologique du RHDV. Il s'agit d'un virus non-enveloppé, dont la forme intacte mesure entre 32 et 41nm de diamètre (illustration 1). Le virion intact se compose de 180 molécules de la protéine de capsid VP60 organisées en 90 capsomères dimériques en forme d'arches. Ces capsomères sont arrangés en un maillage de symétrie icosaédrique T=3. On peut distinguer 3 sous-unités distinctes, A, B et C. Les sous-unités A et B s'assemblent en capsomères dimériques AB et les sous-unités C s'assemblent en capsomères dimériques CC. Autour des axes 3, on trouve 3 capsomères AB et 3 capsomère CC en alternance, alors qu'on ne trouve que des capsomères AB autour des axes 5. La structure de l'icosaèdre montre des protubérances constituées des capsomères CC sur les axes

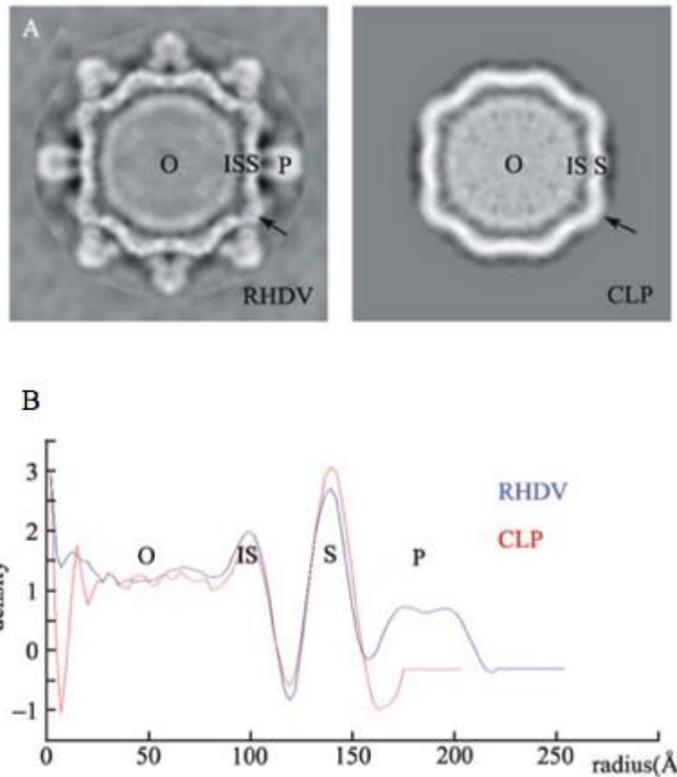
2 et des dépressions sur les axes 3 et 5. Les dépressions sur les axes 3 sont plus profondes que celles sur les axes 5, conséquences de reliefs plus prononcés sur les axes 5 (cf illustration 3).

Le virus est aussi présent sous forme de Core-Like Protein (CLP) correspondant à une capsid virale dégradée. En microscopie électronique, le virion apparaît de plus petite taille, entre 23 et 32nm. Bien qu'ayant conservé la symétrie icosaédrique du virion intact, les capsomères ne sont plus visibles ce qui donne au CLP un aspect lisse. Ce virion conserve les reliefs sur les axes 3 et 5, ceux des axes 5 restant plus prononcés (cf illustration 3).

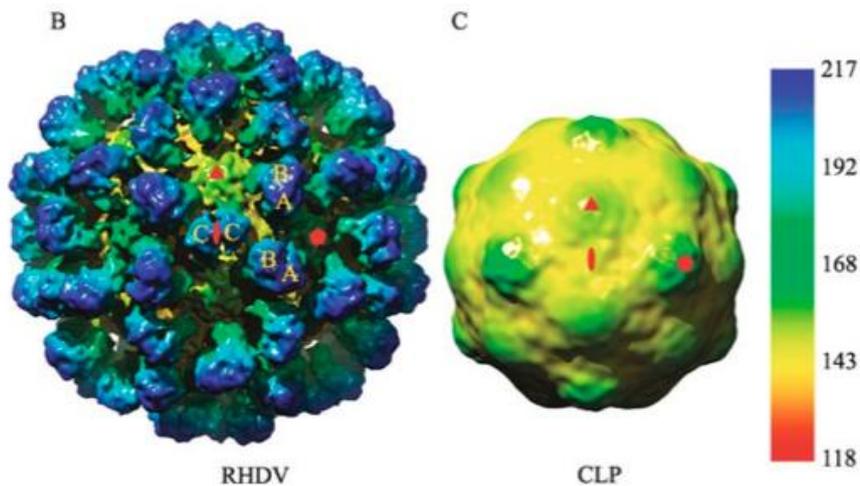


**Illustration 1** : Microscopie électronique de virions de RHDV purifiés après coloration négative avec de l'acétate d'uranyl à 1% (D'après Ohlinger *et al.*, 1990).

Récemment, la cryo-microscopie électronique a permis l'obtention d'un diagramme de densité ainsi qu'une reconstruction tridimensionnelle des particules virales du RHDV sauvage purifié dans sa forme intacte ainsi que dans sa forme dégradée (CLP). On visualise ainsi parfaitement les différents capsomères ainsi que les différences entre la forme intacte et le CLP (Illustration 2 et 3).



**Illustration 2** : A. Cryo-microscopie électronique de RHDV purifié dans sa forme intacte (à gauche) et dans sa forme dégradée (CLP). B. Diagramme de densité en fonction du rayon en Å pour le RHDV intact (en bleu) et pour le CLP. O : core, IS : inner shell, S : capsid protrusion (D'après Hu *et al.*, 2010).



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

2. Structure et organisation génomique (Meyers et *al.*, 1991 ; Meyers et *al.*, 1991 ; Rasschaert, 1994 ; Clarke et Lambden, 1997 ; Joubert, 2000 ; Hansman et *al.*, 2010)

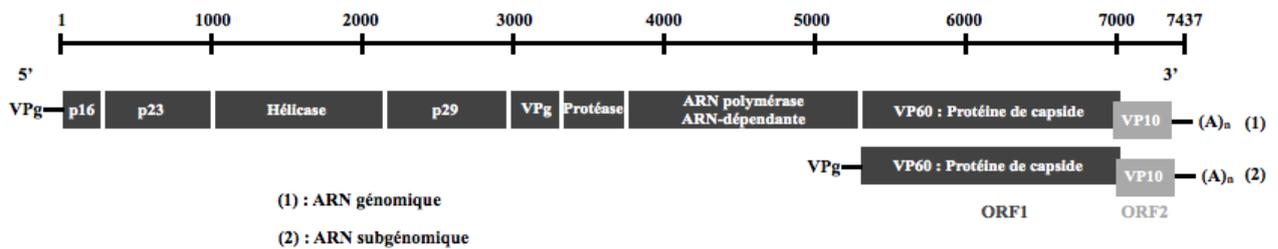
Comme l'ensemble des virus appartenant à la famille des *Caliciviridae*, le génome du RHDV est constitué d'un ARN génomique d'environ 7,5kb. De la même façon, la présence d'un ARN subgénomique d'une taille de 2,2kb à 2,7kb a été mise en évidence chez plusieurs calicivirus animaux et se retrouve chez le RHDV. Les deux ARN, génomique et subgénomique, sont simples brins, de polarité positive, polyadénylés en 3' et liés covalamment en 5' à une protéine de 10 à 15kDa, la protéine VPg. Ils possèdent une région non codante à chaque extrémité, qui est retrouvée chez tous les calicivirus mais est de taille variable, entre 4 et 19 nucléotides pour la région non codante en 5' et entre 46 et 108 nucléotides pour celle en 3'. Pour le RHDV, ces régions non codantes font 9 et 59 nucléotides respectivement en 5' et 3'.

Le brin d'ARN génomique possède deux cadres de lecture (ORF : Open Reading Frame). Tout comme l'ESBHV et les virus appartenant au genre Sapovirus. Dans le cas du FCV par exemple, le génome possède 3 cadres de lecture dont l'un ne code que pour la protéine de capsid.

Après isolement et purification à partir de foies de lapins infectés, les virions du RHDV contiennent un ARN génomique de 7437 nucléotides contenant un premier cadre de lecture (ORF1) de 7030kb soit 2343 codons entre le codon ATG en position 10-12 et le codon TGA en position 7042-7044. Cet ORF1 code pour une polyprotéine de 257kDa, composée de protéines non structurales telles qu'une hélicase (protéase 2C-like), une protéase 3C-like ainsi que de l'ARN polymérase ARN-dépendante, et pour la protéine structurale majeure (VP60). Le deuxième cadre de lecture (ORF2) se situe entre le nucléotide 7025 et le nucléotide 7378 et code pour une seule protéine de 118 acides aminés, la VP10 de poids moléculaire 12kDa. L'ORF2 chevauche en partie l'ORF1 sur 17 nucléotides. On retrouve cela chez un certain nombre de calicivirus, avec un chevauchement de l'ORF2 sur l'ORF1 de 1 à 20 nucléotides, alors que d'autres présentent un espace entre les 2 ORF.

L'ARN subgénomique du RHDV fait 2141 nucléotides (2,2kb) et s'étend du nucléotide 5296 au nucléotide 7437. De fait, il recouvre la fin de l'ORF1 et inclus ainsi l'intégralité de la séquence nucléotidique codant pour la protéine de capsid VP60. L'étude de Parra *et al.*, 1993, a ainsi montrée que l'ARN subgénomique pourrait être à l'origine de la

plus grande partie de la synthèse de la protéine de capside. Ceci n'exclut pas qu'une infime partie de la synthèse de la protéine de capside provienne de l'ARN génomique, mais celle-ci pourrait être légèrement différente (Wirblich *et al.*, 1994).



**Figure 2 :** Représentation schématique des ARNs génomiques et subgénomiques du RHDV. En haut est représentée la taille du génome à l'échelle (D'après Joubert, 2000).

### 3. Synthèse protéique et maturation (Boniotti *et al.*, 1994 ; Wirblich *et al.*, 1995 ; Wirblich *et al.*, 1996 ; Clarke et Lambden, 1997 ; König *et al.*, 1998, Meyers *et al.*, 2000)

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ORF1 code pour une polyprotéine alors que l'ORF2 code pour une seule protéine, la VP10 qui est une protéine structurale mineure. De récentes études montrent que d'une part, cette protéine augmente le niveau de répllication du virus et favorise l'apoptose cellulaire (Liu *et al.*, 2008 ; Tian *et al.*, 2011) et d'autre part permet une régulation de l'expression de la protéine VP60 (Chen, 2009). Concernant la régulation, celle-ci intervient au moment de la transcription en diminuant celle de la VP60. Elle pourrait aussi agir à d'autres niveaux, par exemple au moment de la transcription ou en post-transcription. Ceci suggère que la VP10 pourrait jouer un rôle important dans le cycle. De même, il semblerait qu'elle interagisse avec la protéine de capside VP60 et l'ARN dans le phénomène d'encapsidation (Wirblich *et al.*, 1996). La protéine n'apparaît cependant pas indispensable au RHDV, que ce soit au niveau structurel ou fonctionnel (Wirblich *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 2008).

L'organisation complète de la polyprotéine a été entièrement déterminée et montre que son clivage donne 8 protéines (Wirblich *et al.*, 1996) : 2 protéines structurales que sont la protéine de capside VP60 et la protéine VPg, et 7 protéines non structurales. L'ordre de ces protéines au sein de la polyprotéine est le suivant : NH<sub>2</sub>-p16-p23-hélicase-p29-VPg-protéase-polymérase-capside-COOH. Parmi ces protéines non-structurales, on trouve ainsi 3 protéines

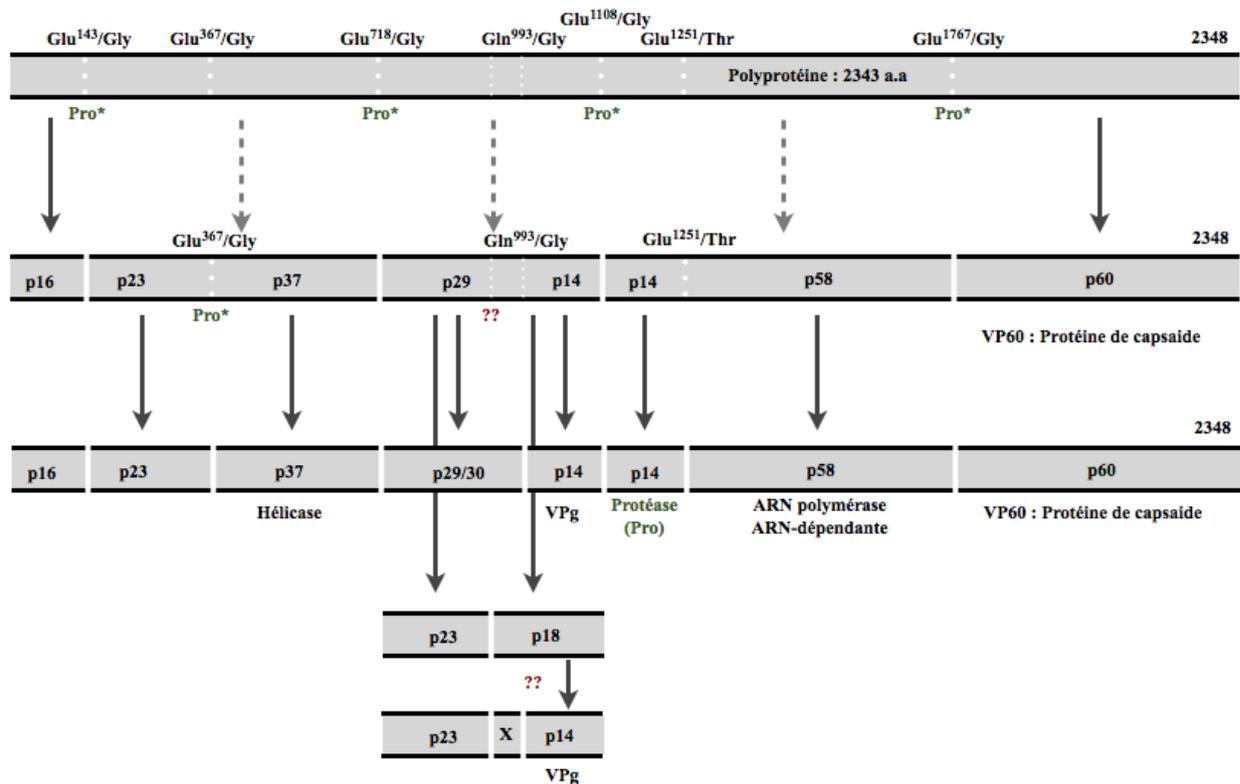
dont le rôle n'a pas encore été mis en évidence, ainsi qu'une hélicase (2C-protéase), la protéase (3C-like protéase) à l'origine d'une majorité voire de tous les clivages, et la polymérase.

L'obtention de ces 8 protéines se fait par une cascade enzymatique auto-catalytique au cœur de laquelle on trouve la 3C-like protéase. Il s'agit d'un Trypsine-like Cystéine Protéase (TCP) ayant pour triade catalytique : His-1135, Asp-1152 (site nucléophile) et Cys-1212 (site électrophile). Elle est similaire à la 3C-protéase retrouvée chez les picornavirus en ce qui concerne sa fonction et sa spécificité. Cependant, elle se rapproche davantage d'une 2A-protéase au regard de sa taille et éventuellement de sa structure (Boniotti *et al.*, 1994). Le site de reconnaissance de cette protéase possède une histidine (His-1227) qui reconnaît l'acide glutamique comme substrat préférentiel en position P1. Cependant, d'autres clivages ont été observés uniquement après une glutamine ou un acide aspartique, qui sont les deux seules autres substrats acceptés en position P1 (Wirblich *et al.*, 1995). Ainsi 7 sites de clivages ont été identifiés (Wirblich *et al.*, 1996 ; Clarke et Lambden, 2000) *in vitro* aux positions 1 : 143(Glu)-(Gly)144, 2 : 367(Glu)-(Gly)368, 3 : 718(Glu)-(Gly)719, 4 : 993(Gln)-(Gly)994, 5 : 1108(Glu)-(Gly)1109, 6 : 1251(Glu)-(Thr)1252, 7 : 1767(Glu)-(Gly)1768. Le clivage complet des sites 1, 3 et 7 a été montré *in vitro* et, est donc considéré comme intégralement réalisé par la 3C-like protéase. En revanche, dans cette étude, les clivages aux sites 2, 4 et 5 se sont révélés incomplet. Cela suggère la réalisation du clivage par la 3C-like protéase, avec toutefois l'intervention de cofacteurs indisponibles en milieu *in vitro*. Enfin, le clivage 6 n'est pas ou peu détecté ce qui peut suggérer la nécessité d'une autre protéase présent *in vivo*, ou l'influence d'un clivage au niveau d'un précédent site sur la 3C-like protéase (Wirblich *et al.*, 1996 ; Meyers *et al.*, 2000).

Par ailleurs, des études montrent l'existence de fragment de poids moléculaire p13, p18 et p23/2 issu du fragment initial p41 (p29+p13). Le fragment p23/2 pourrait être issu d'un clivage secondaire de la protéine p29 en p23/2 + X, X n'ayant jamais pu être retrouvé et identifié. Ce petit fragment d'environ 5kDa pourrait alors s'associer à la protéine VPG de poids moléculaire 13kDa pour donner la protéine p18 (Konig *et al.*, 1998 ; Meyers *et al.*, 2000). Le clivage de la protéine initial p41 semble cependant être majoritairement celui donnant p29 + p13.

Enfin, concernant les protéines non structurales dont on ne connaît pas l'utilité, un parallèle avec les protéines non structurales de picornavirus suggère qu'elles ont les mêmes fonctions que les protéines 2A (hélicase) et 3D (polymérase) de ces derniers. Elles possèdent en effet des hélices amphiphiles retrouvées sur les protéines 2A et 3B des picornavirus qui sont toxiques pour les bactéries, en interagissant avec les membranes de celles-ci. La protéine

p16 quant-à elle, ne présenterait aucune activité protéolytique, ce qui renforce l'idée selon laquelle l'intégralité des clivages serait réalisé par la 3C-like protéase (Wirblich *et al.*, 1996).



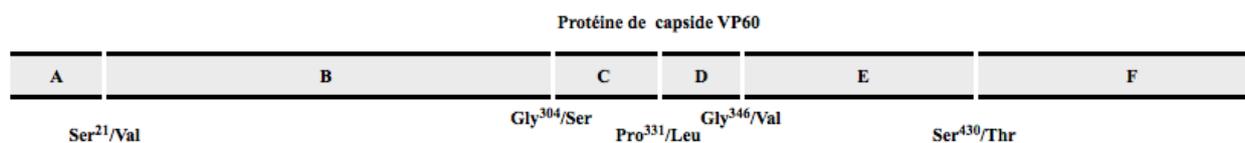
**Figure 3 :** Représentation schématique de la maturation des protéines du RHDV. Les sites de clivages identifiés comme étant dû à l'activité de la protéase trypsin-like du RHDV sont notés avec l'inscription Pro\* en vert. Le dernier site de clivage pour lequel on ne connaît pas encore l'enzyme est noté avec ?? en rouge (D'après Joubert, 2000 ; Meyers *et al.*, 2000 ; Hansman *et al.*, 2010).

#### 4. Organisation de la protéine de capsid VP60 (Neill, 1992)

L'étude de Neill, 1992, a permis d'identifier 6 régions distinctes à partir de l'analyse de la séquence d'acides aminés du précurseur de la protéine de capsid VP60 des sérotypes 1 et 4 du SMSV, comparée à celle du FCV et du RHDV. Globalement, les sérotypes 1 et 4 du SMSV présentent une homologie de 73% entre eux. Ils présentent respectivement une homologie de 47,7 et 48,6% avec le FCV, tandis qu'ils ne présentent qu'une faible homologie avec le RHDV, respectivement de 29,4 et 27,8%. Le RHDV présente aussi une faible homologie de 28,3% avec le FCV. Cependant, cette faible homologie du RHDV avec les autres calicivirus est en grande partie dûe à la région A qui est tronquée.

Selon la région de la protéine de capsid VP60 considérée, on observe des différences notables d'homologie entre les calicivirus. Ainsi, les régions B, D et F présentent un degré élevé d'homologie entre les 4 virus alors que la région E n'en présente aucune, même entre deux sérotypes d'un même virus (ici dans le cas du SMSV). Cette région apparait à la surface

du virus et pourrait jouer un rôle dans l'adaptation du virus afin d'entraîner sa non-détection par le système immunitaire de l'hôte.



**Figure 4** : Représentation schématique de la séquence d'acides aminés de la protéine de capsid VP60 du RHDV organisée en 6 régions (D'après Neill, 1992).

## 5. Propriétés

### a. Propriétés physico-chimiques

Le RHDV, comme tous les virus non-enveloppés, est stable et résistant dans l'environnement. Il reste ainsi infectieux après 225 jours à 4°C dans une suspension d'organe infecté, après 560 et 413 jours respectivement à - 5°C et -20°C. Il en est de même après lyophilisation et conservation 4,5 ans à -75°C (Smid et *al.*, 1991 ; Xu et *al.*, 1991). Sur un élément inerte tel que les vêtements, il peut résister 105 jours à température ambiante ou 2 jours à 60°C (Smid et *al.*, 1991). Plus récemment une étude de Henning et *al.*, 2005, a montré que le virus peut résister au moins 91 jours dans un élément organique (ici du foie de bovin) et entre 10 et 44 jours dans du coton imprégné d'une suspension de virus laissé à l'air libre. Il conserve aussi son infectiosité lorsqu'il est conservé à des températures basses (plusieurs mois à 4°C) ainsi que lors de congélation et décongélation. Il en est de même suite à un traitement avec de l'éther, du chloroforme, de la trypsine, une exposition à un pH 3,0 pendant 30 min ou un chauffage à 50°C pendant 1 heure (Xu et *al.*, 1991 ; OIE, 2009).

Il est cependant inactivé par l'eau de javel à 10%, l'hydroxyde de soude à 1% et tout autre agent qui permet d'augmenter le pH jusque 12 et ainsi de dénaturer les protéines virales. La désinfection des locaux et du matériel doit être suivi d'un vide sanitaire. Le traitement avec du formaldéhyde à 1-1,4%, avec de la bêta-propiolactone à 0,2-0,5% inactive le virus sans réduire son immunogénicité ce qui est utilisé dans la fabrication des vaccins (Xu, 1991 ; OIE, 2009).

En milieu naturel, la persistance du virus est dépendante de nombreux facteurs telles que les variations d'humidité, de températures et l'exposition aux UV (Henning et *al.*, 2005). L'étude de Moss et *al.*, 2002, montre la persistance du virus sur une longue période dans la moelle osseuse contenue dans les os longs (fémur et tibia). Des os longs de lapins connus pour être morts de RHD ont été récoltés sur l'île de Ramsey au Royaume-Uni. Ils ont été

placés dans un endroit protégé en milieu naturel et laissés exposés aux contraintes environnementales naturelles. Chaque semaine pendant 7 semaines, la moelle osseuse d'un de ces os a été analysée par RT-PCR pour rechercher la présence de RHDV. Les résultats furent positifs pour chacune des analyses. Cela suggère que de façon totalement naturelle, le virus est capable de résister au moins 7 semaines dans la moelle osseuse des os longs des lapins morts de RHD. Les cadavres, et plus encore le squelette qui résiste davantage que les tissus mous à la putréfaction, peuvent ainsi servir de réservoir au virus et permettre la diffusion du virus dans un zone géographique donnée grâce aux transports des os par d'autres animaux, des charognards, etc.

Par ailleurs, le RHDV présente des propriétés physico-chimiques particulières que l'on peut utiliser dans la détection et la quantification du virus dans un échantillon. Ainsi, une préparation fraîche de particules virales absorbe les UV à une longueur d'onde optimale de 260nm. Le ratio  $A_{260}/A_{280}$ , utilisé comme indicateur du contenu des particules virales en ARN, est de 1,44 (Parra et Prieto, 1991). Le virus extrait et purifié à partir de foies de lapins infectés par le RHDV, présente une bande visible de densité en gradient de centrifugation utilisant le chlorure de césium entre 1,31 et 1,36g/cm<sup>3</sup>. La centrifugation en gradient de densité dans le sucrose permet la visualisation de trois bandes distinctes ayant un coefficient de sédimentation de 100S, 136S et 175S. Des bandes de densité et de coefficient de sédimentation similaires à ceux du RHDV ont été retrouvés pour les autres calicivirus. Cette hétérogénéité dans les coefficients de sédimentation correspond à une perte ou non du matériel génétique des particules virales selon les conditions de stockage ou la valeur de pH. Enfin, l'observation en microscopie électronique après coloration négative des différentes bandes obtenues révèlent une certaine homogénéité dans la taille des virions observés. Cependant, le maximum d'homogénéité et de pureté est obtenu avec la bande de 175S (Ohlinger et *al.*, 1993).

*b. Propriétés hémagglutinantes* (Xu et *al.*, 1991 ; Capucci et *al.*, 1991 ; Ruoven-Clouet et *al.*, 1995 ; Ruoven-Clouet et *al.*, 2000 ; Nystrom et *al.*, 2011)

Une importante propriété du RHDV est sa faculté à agglutiner les érythrocytes humains, quelque soit le groupe sanguin A, B ou O du donneur. Cela signifie que l'hémagglutination a lieu même à des dilutions importante. Les érythrocytes de poulet, d'oie et de mouton sont aussi agglutinés mais à des titres d'hémagglutination beaucoup plus faible,

alors que les érythrocytes de vache, cochon, chèvre, canard, caille, lapin, cochon d'inde, rat et souris ne sont pas agglutinés (Xu et *al.*, 1991 ; Capucci et *al.*, 1991).

La capacité d'héماغglutination du virus n'est pas affectée par des températures allant de 4 à 37°C. Un traitement du virus à des températures allant de 50 à 56°C pendant respectivement 60 et 15 min (voire 24h) ne détruit pas ses capacités d'agglutination mais les diminue. Il en est de même lors du stockage d'organes infectés à des températures de 4 ou 15°C pendant plusieurs mois. Cependant, des congélations et décongélations répétées semblent délétères. Le pH optimal donnant le titre d'héماغglutination le plus élevé est de 6,0 mais des valeurs de pH comprises entre 4 et 7,2 donnent des titres d'héماغglutination très proches. L'activité héماغglutinante peut être inhibée par l'utilisation de trypsine à 0,5%, de borohydrure de sodium à 2% , de chloramine T à 2%. Elle reste cependant stable si l'on utilise du RDE (Receptor destroying Enzyme), du metabisulfite de sodium, du periodate de potassium, de l'éther ou du chloroforme.

Concernant les récepteurs du RHDV présents à la surface des érythrocytes humains, ils sont fortement résistants à la chaleur puisqu'un chauffage à 95°C pendant 15 min n'affecte pas la capacité des érythrocytes à être agglutinés. Il en est de même avec un traitement des érythrocytes par de la trypsine, du periodate de potassium, du RDE et du borohydrure de sodium. L'activité héماغglutinante est par contre altérée si les érythrocytes sont traités avec de l'éther ou du chloroforme. Cette dernière observation est en faveur de la nature en partie lipidique du récepteur du RHDV.

Etant donné le fait que les titres d'héماغglutination observés sont indépendants des groupes sanguins A, B ou O, la première hypothèse émise quant à la nature du récepteur présent à la surface des érythrocytes humains, fut que celui-ci ne correspondait pas aux antigènes de groupe sanguin A, B ou O.

Dans un premier temps, plusieurs tests ont été réalisés afin d'identifier les caractéristiques du récepteur spécifique du RHDV présent à la surface des érythrocytes humains. Les érythrocytes humains ont été traités avec des enzymes protéolytiques, telles que la papaïne, la trypsine, la chymotrypsine, ainsi qu'avec des enzymes glycosidiques telles que la neuraminidase ou l'endo-β-galactosidase. Aucun de ces traitements n'a modifié l'héماغglutination par le RHDV, ni le titre d'héماغglutination moyen par rapport aux érythrocytes non traités.

Les glycolipides et glycoprotéines extraits de membranes érythrocytaires d'individus adultes montraient une activité inhibitrice marquée. En revanche, issus de membranes érythrocytaires de fœtus, cette activité était mineure. Les glycolipides et glycoprotéines ont été isolés et identifiés par extraction avec du chloroforme-méthanol ou du butanol. Dans la phase aqueuse,

c'est précisément les polyglycosylceramides qui ont montré un effet inhibiteur très important alors que les sialoglycoprotéines purifiés ou délipidés n'en montraient aucun. En revanche, une faible mais significative activité inhibitrice a été obtenue avec la phase organique obtenue par extraction avec du butanol. Parallèlement, les polyglycosylceramides extraits de membrane érythrocytaire de mouton ont montré une faible activité inhibitrice.

Ces premiers résultats suggèrent que le récepteur du RHDV présent à la surface des érythrocytes humains, est constitué d'un antigène de surface porté par un glycolipide membranaire. Un composé similaire semble être présent à la surface des érythrocytes de mouton (Ruvoen-Clouet et *al.*, 1995).

Cependant, des études plus récentes ont montré que la capacité du RHDV à agglutiner les érythrocytes humains dépend effectivement des antigènes de groupe sanguin ABO. En effet, les érythrocytes issus de cordons ombilicaux ou d'individu du phénotype O<sub>h</sub> (Bombay) très rare n'exprimant respectivement peu et pas les antigènes de groupe sanguin à leur surface ne sont pas agglutinés. De plus, une activité inhibitrice est obtenue avec l'utilisation de salive d'individu sécréteur, et pas avec de la salive d'individu non sécréteur.

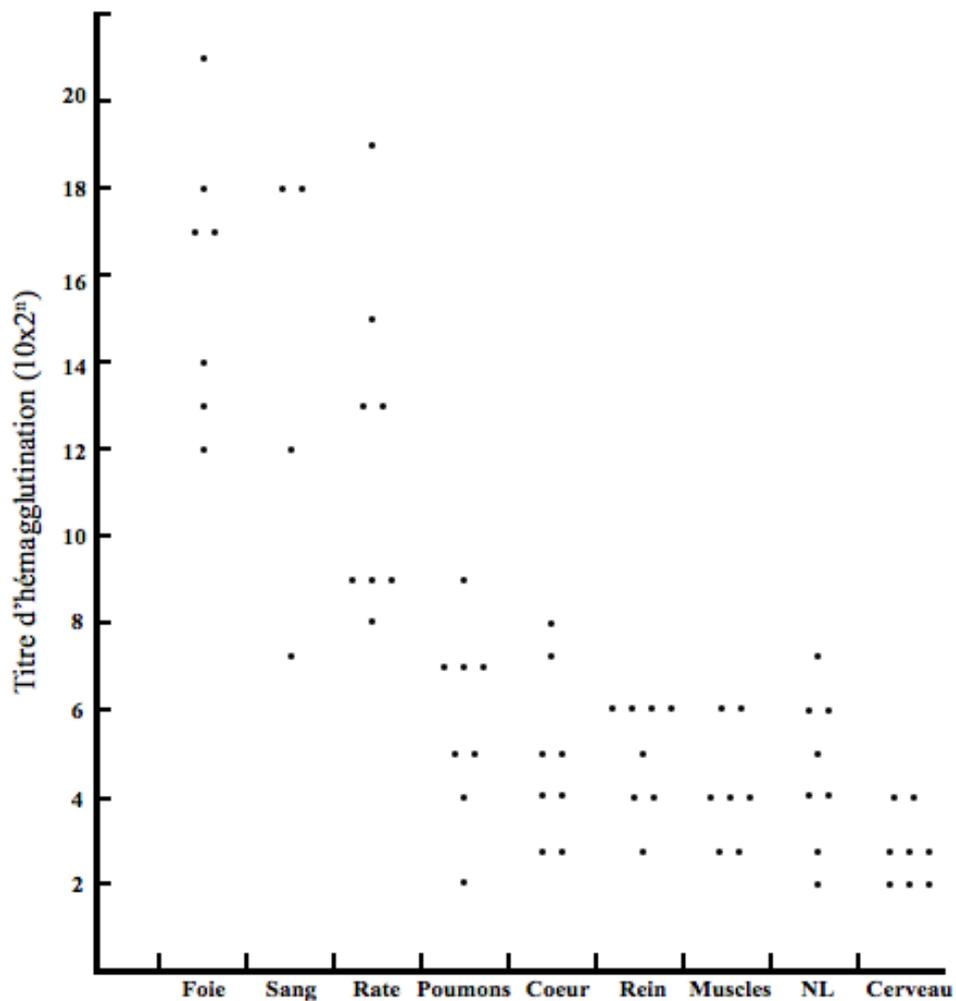
En utilisant des oligosaccharides synthétiques, l'étude de Ruvoen-Clouet et *al.*, 2000 montre la capacité du RHDV ainsi que des particules apparentés aux virus (VLP : Virus-Like Particles) à se fixer précisément aux oligosaccharides de type A et O de type 2. Bien que non prouvé dans cette étude, il est fort probable qu'il en serait de même pour l'oligosaccharide de type B, les érythrocytes du groupe B étant tout aussi bien agglutinés que les autres.

Ces antigènes de groupes sanguins ne sont pas exclusifs aux érythrocytes humains mais se retrouvent à la surface des cellules épithéliales du tractus digestif de nombreux vertébrés et au sein de nombreux tissus. Il a ainsi été établi que la capacité du RHDV, tout comme des VLPs, à se fixer aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur (trachée, bronches) et de l'appareil digestif dépend de la reconnaissance des antigènes de type A ou H de type 2. De la même façon, l'absence de sensibilité des jeunes lapereaux apparaît corrélée à l'absence d'expression des antigènes A avant l'âge de 8 semaines avec une augmentation jusqu'à 12 semaines, et à l'expression très modérée des antigènes H de type 2 à partir de 3 semaines avec une augmentation jusqu'à 10 semaines (Ruvoen-Clouet et *al.*, 2000).

Une étude très récente montre la capacité du RHDV à se fixer aux épitopes de groupes sanguins A, B et O avec de subtiles différences selon la souche de RHDV utilisée. Cette étude s'est basée sur la classification des souches de RHDV française en 6 groupes génétiques établie par Le Gall et *al.*, 2003. Par exemple, les souches de RHDV impliquées dans la

première épidémie de RHDV (groupe G1) n'étaient pas capables de se fixer à l'antigène A, alors que les souches suivantes ont acquis cette capacité. Cette étude suggère ainsi que chaque souche de RHDV reconnaît de manière un peu plus spécifique certains sous-groupes dans la population de lapins. Le polymorphisme de l'expression des antigènes de groupes sanguins ABO pourrait ainsi générer une résistance génétique à une souche de RHDV donnée à l'échelle de la population (Nystrom et *al.*, 2011).

Enfin, le virus existe dans tous les tissus et fluides des animaux infectés. Les titres d'hémagglutination varient beaucoup allant de  $10 \times 2^2$  pour les poumons et les nœuds lymphatiques par exemple, à  $10 \times 2^{21}$  pour le foie (figure 5). Les plus forts titres d'hémagglutination sont ainsi observés pour le foie, la rate et le sérum ce qui pourrait être lié à l'importance du contenu sanguin de ces organes.



**Figure 5** : Titres d'hémagglutination en fonction des organes, issus de lapins atteints de RHD (D'après Xu et *al.*, 1991).

### c. Pouvoir antigénique et immunogène

Les lapins sensibles qui survivent à la RHD ainsi que les jeunes lapereaux non sensibles infectés développent des anticorps qui sont décelables 5 jours post-infection, atteignant un plateau de concentration 7 jours post-infection et persistant environ 8 mois. Ces anticorps sont protecteurs vis-à-vis d'une nouvelle infection par le RHDV. Une étude portant sur des lapins de plus de deux mois issus de fermes apparemment indemnes de RHD montre la présence d'anticorps anti-RHDV naturellement acquis chez 19,4% des lapins (283/1461). Le résultat est douteux chez 19,7% des lapins (288/1461) et négatif chez la majorité des lapins soit 60,9% (890/1461). Infectés expérimentalement, on observe un taux de mortalité de 4,3% dans le groupe de lapins porteurs d'anticorps, de 22,2% dans le groupe de lapins dits douteux (ou faiblement positifs) et de 97,2% dans le groupe ne présentant pas d'anticorps. Cela valide l'effet protecteur des anticorps anti-RHDV acquis naturellement (Rodak et *al.*, 1990). De plus, ces anticorps sont transmis durant les derniers jours de gestation via un transport actif au niveau de la vésicule ombilicale, pour les isotypes IgG uniquement. Ces anticorps d'origine maternelles semblent être protecteurs et réduire la mortalité lorsque leurs titres deviennent faibles (Cooke et *al.*, 2000).

L'acquisition de l'immunité contre le RHDV est principalement due à la séroconversion vis-à-vis de la protéine de capsid VP60 (Parra et Prieto, 1990). L'utilisation de vaccin recombinant exprimant la protéine de capsid VP60 a ainsi montré son efficacité contre une infection avec le RHDV (Nagesha et *al.*, 1995).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux (Mabs) a permis d'étudier plus précisément les épitopes à l'origine de la réaction immunitaire. Capucci et *al.*, 1991, ont ainsi caractérisé 8 Mabs distincts sur 50 Mabs dirigés contre le RHDV produits. Parmi ces 8 Mabs, 2 seulement ne réagissaient qu'avec le RHDV (Mabs 1H8 et 3H2) alors que les 6 autres présentaient des réactions croisées avec l'EBHSV. Par Western blot, l'épitope correspondant au Mab 1H8 a été localisé au niveau de la protéine de capsid VP60 (Ohlinger et *al.*, 1993) et plus précisément entre l'acide aminé 340 et 370 (Capucci et *al.*, 1998). Une autre étude montra que les épitopes des Mabs 1H8, 3H2, 6H6, 3H6 et 6F9 se situeraient à la surface de la capsid virale, bien que les Mabs 3H6 et 6F9 présentent une réaction croisée avec l'EHSBV. Cependant, il semblerait que les Mabs présentant une réaction croisée avec l'EBHSV reconnaissent davantage des épitopes internes, alors que les mabs spécifiques reconnaissent des épitopes externes (Laurent et *al.*, 1997). De plus, l'ensemble de ces épitopes sont capables d'inhiber l'hémagglutination, 1H8 et 6F9 permettant l'inhibition la plus forte. Cela suggère que les épitopes de ces derniers sont proches du site d'interaction avec le récepteur au RHDV

des érythrocytes (Capucci et *al.*, 1995). Ces épitopes ont de plus montré leur capacité protectrice lors d'une épreuve infectieuse *in vivo*, alors que le 3H2 présente une capacité protectrice faible et les autres n'en présente aucune.

Par ailleurs, l'équipe de Capucci et *al.*, 1998, identifia en Italie un variant du RHDV tout aussi pathogène, nommé RHDVa. Ce variant présente la particularité de ne pas réagir avec le Mab 1H8, pourtant un des anticorps les plus protecteurs vis à vis du RHDV. Cependant, la vaccination standard protège les lapins sensibles du RHDVa. Ce variant comporte des modifications dans la séquence d'acides aminés de la protéine de capsid VP60 au niveau de 2 régions (entre les acides aminés 344-370 et 398-434). Cette étude suggère ainsi que les déterminants antigéniques autres que 1H8 sont tout aussi importants dans la protection contre le RHDV.

Enfin, il est possible d'obtenir les mêmes propriétés antigéniques et immunogènes que le RHDV avec des particules similaires au virus (VLPs) ayant la particularité de ne pas contenir le génome. La protéine de capsid a par exemple était synthétisée dans des systèmes baculovirus (culture cellulaire à base de cellules d'insectes). L'examen du surnageant de la culture cellulaire en microscopie électronique a permis la visualisation de VLPs, qui correspondent à l'auto-assemblage de protéines de capsid, similaires au RHDV natif. Les anticorps monoclonaux utilisés ont tous fortement réagi avec les VLPs ce qui confirme la similarité avec le RHDV natif. De même, les VLPs permettent l'hémagglutination des érythrocytes humains. Enfin, dix jours après injection de VLPs purifiés, des anticorps spécifiques anti-VLPs et anti-RHDV sont détectés chez les lapins. Ces mêmes lapins, soumis à une épreuve virulente, survivent au RHDV (Laurent et *al.*, 1994 ; Nagesha et *al.*, 1995).

La production de protéines de capsid du RHDV recombinant offre ainsi une méthode sûre pour obtenir la production d'antigènes viraux quasiment identiques aux antigènes viraux obtenus avec des préparations virales issus de foies de lapins infectés par le RHDV. Ces protéines de capsid s'auto-assemblent seules pour former des VLPs structurellement et immunologiquement indistinctes du RHDV natif. Les perspectives pour la production de vaccins ne présentant aucun risque sont importantes (Laurent et *al.*, 1994 ; Nagesha et *al.*, 1995). D'autres systèmes peuvent être utilisés tels que les tubercules transgéniques de pomme de terre, le virus myxomateux recombinant ou les adénovirus (Bertagnoli et *al.*, 1996 ; Castanon et *al.*, 1999 ; Wang et *al.*, 2012).

### C. Caractères cultureux

Depuis 1984, plusieurs tentatives de culture de RHDV ont été réalisées sur différents systèmes de cultures cellulaires et sur des cellules primaires de différents organes de lapins (foie, reins, poumons et testicules) et avec différentes méthodes d'inoculation (après adsorption sur une surface en verre, en phase S1 de la division cellulaire, en traitant avec de la trypsine et en ajoutant de la trypsine au milieu cellulaire ou encore en remplaçant le sérum de lapin par du sérum de veau). Toutes ces tentatives ont échoué (Xu et *al.*, 1991 ; Ahmad et *al.*, 2011). Des essais de culture du virus ont été réalisés sur œufs embryonnés et se sont révélés infructueux (Mitro et Krauss, 1993).

En 1991, une équipe chinoise a réussi à cultiver du virus issu de foie de lapin mort de VHD sur une lignée de cellules de type épithéliale appelée DJRK (Du and Ji Rabbit Kidney) puis des RK-13. Plusieurs passages du virus sur cette culture cellulaire ont été effectués. Des lapins inoculés avec la culture cellulaire du 5<sup>ème</sup> passage sont morts après quelques jours de la VHD, et des lapins inoculés avec la culture cellulaire du 11<sup>ème</sup> passage préalablement inactivé avec du formaldéhyde ont survécu à une épreuve virulente réalisée 4 jours plus tard. La mise en culture du RHDV permet la visualisation d'effets cytopathiques sur les cellules (Ji et *al.*, 1991). Ces effets cytopathiques ont été observés en culture cellulaire sur cette lignée cellulaire à plusieurs reprises (Liu et *al.*, 2006 ; Ahmad, 2011). Néanmoins, en l'absence de confirmation définitive, la culture *in vitro* du RHDV est toujours considérée comme quasi impossible.

Avant l'arrivée des nouvelles générations de vaccins recombinants, une grande partie des vaccins contre le RHDV étaient fabriqués en utilisant du virus issu d'organes infectés (le plus souvent du foie) de lapins sains et sensibles inoculés avec une souche de RHDV par voie intramusculaire, intraveineuse, respiratoire, orale ou sous-cutanée. La mort est alors observée après 24 à 72h.

La plupart des études menées pour connaître les caractéristiques morphologiques, protéiques et génomiques du RHDV ont été réalisées *in vitro*, en utilisant divers systèmes. Parmi ces systèmes, on trouve les systèmes bactériens utilisant *Escherichia coli* (Boniotto et *al.*, 1994 ; Martin Alonso, 1996), les systèmes eucaryotes acellulaires comme les réticulocytes de lapins lysés (Martin Alonso et *al.*, 1996), ou encore des cellules infectées comme des hépatocytes de lapins (Konig et *al.*, 1998).

## V. Pathogénie

### A. Voie d'entrée et dissémination du virus

Les voies d'entrée naturelles du virus sont l'appareil respiratoire supérieur, l'appareil digestif, par ingestion de fèces de lapins infectés par exemple, par voie conjonctivale ainsi que la voie transcutanée, au niveau de lésions cutanées (Marcato et *al.*, 1991).

Au niveau cellulaire, nous avons vu précédemment que le RHDV, capable d'agglutiner les érythrocytes d'humains adultes, est capable de se fixer aux cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur (trachée, bronches) et du tractus digestif (intestin grêle en particulier) par l'intermédiaire des antigènes de groupe sanguin ABO. Les jeunes lapereaux, n'exprimant pas ou peu ces antigènes, ne sont que peu voire pas sensibles au RHDV. Leur sensibilité augmente entre 4 et 12 semaines, parallèlement à l'apparition au niveau de leur muqueuse digestive et respiratoire des antigènes d'abord H de type 2 puis A. Cette observation suggère que le processus infectieux ainsi que l'entrée du virus dans l'organisme sont liés à cette capacité de fixation aux antigènes de groupe sanguin ABO.

La dissémination virale au sein de l'organisme a été étudiée par immunohistochimie en utilisant des anticorps monoclonaux. Cette étude a montré qu'après inoculation par voie orale (ce qui correspond à la contamination naturelle la plus fréquente par voie fécale-orale), des antigènes viraux sont observés 12h après au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse nasale, du nasopharynx et des conduits salivaires. Après 48h, ces antigènes sont retrouvés au niveau du noyau et du cytoplasme des hépatocytes. Enfin, entre 72 et 106h, ils sont détectés dans un très grand nombre de phagocytes mononuclés dans le sang et les tissus. Les antigènes viraux ne sont cependant pas détectables au niveau des cellules lymphoïdes (Moussa et *al.*, 1992). Une étude plus récente de Jung et *al.*, 2000, a étudié, avec la même méthode, la dissémination du virus au sein du foie après inoculation intramusculaire du RHDV. Après 12h post inoculation, des antigènes viraux sont détectés dans quelques hépatocytes, principalement dans la zone centroacinaire. Après 24h, ces antigènes viraux sont détectés dans de nombreux hépatocytes centroacinaires mais aussi quelques hépatocytes périacinaires. Enfin, chez les derniers lapins morts à 30-31h post-inoculation, les antigènes viraux étaient toujours détectés majoritairement dans les hépatocytes centroacinaires, malgré leur présence dans tous les hépatocytes. Parallèlement, peu d'antigènes viraux sont détectés dans les zones où les hépatocytes sont infiltrés par des éosinophiles.

## B. Cellules cibles

L'étude de Gelmetti et *al.*, 1998, utilise 3 techniques, l'immunohistochimie, l'ELISA sandwich et l'hybridation in-situ, pour suivre la dissémination du virus après inoculation par voie oro-nasale du RHDV. Le foie et la rate sont collectés toutes les 4h jusqu'à 44h post-inoculation. La méthode d'hybridation in-situ utilisant une sonde sens et une sonde anti-sens correspondant à une partie de la séquence codante de la protéine de capsid VP60, montre la présence du virus dans le cytoplasme des hépatocytes après 8h. Concernant le foie, la présence du virus est détectée après 32h avec les deux autres méthodes. En revanche, la présence du virus n'est détectée dans la rate qu'après 32h et seulement avec la méthode ELISA.

Cette étude suggère que d'une part, la réplication virale est quasiment instantanée après inoculation par voie oro-nasale (voie de contamination naturelle), et d'autre part que le foie est le principal siège de la réplication virale.

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment dans la dissémination du virus, celui-ci se réplique à d'autres endroits. Ainsi, on le retrouve au niveau des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures (muqueuses nasales, naso-pharynx) qui représentent une des voies d'entrée du virus. D'autre part, l'hybridation par northern et slot blot montre la présence du virus dans la rate, les reins et les poumons des animaux infectés (Moussa et *al.*, 1992) alors que la technique d'hybridation in-situ ne le permettait pas (Teifke et *al.*, 2002).

L'étude de Ramiro-Ibanez et *al.*, 1999, montre le tropisme particulier du RHDV pour la lignée phagocytaire mononuclée. Cette étude utilise une méthode de double immunomarquage qui permet l'identification simultanée des protéines virales et des antigènes de surface des cellules infectées. Après 12 heures post-inoculation, l'immunodétection montre le tropisme du RHDV pour les macrophages alvéolaires et interstitiels ainsi que les monocytes intravasculaires au niveau des poumons. Les antigènes viraux sont retrouvés aussi bien dans le cytoplasme que le noyau des macrophages. Les autres cellules cibles ainsi identifiées sont les cellules spléniques au niveau des sinus dilatés et de la pulpe rouge, mais pas les cellules lymphoïdes. Enfin, au niveau du foie, les principales cellules cibles sont les hépatocytes mais aussi les cellules de Kupffer ainsi que les monocytes circulants. Ces résultats suggèrent que le tropisme du RHDV pour la lignée phagocytaire mononuclée ainsi que pour les hépatocytes pourrait être à l'origine de son pouvoir pathogène particulier et de ses manifestations cliniques de type hémorragico-congestives. L'étude de Capucci et *al.*, 1996, semble aussi aller dans ce sens. En effet, cette étude a permis la caractérisation d'un

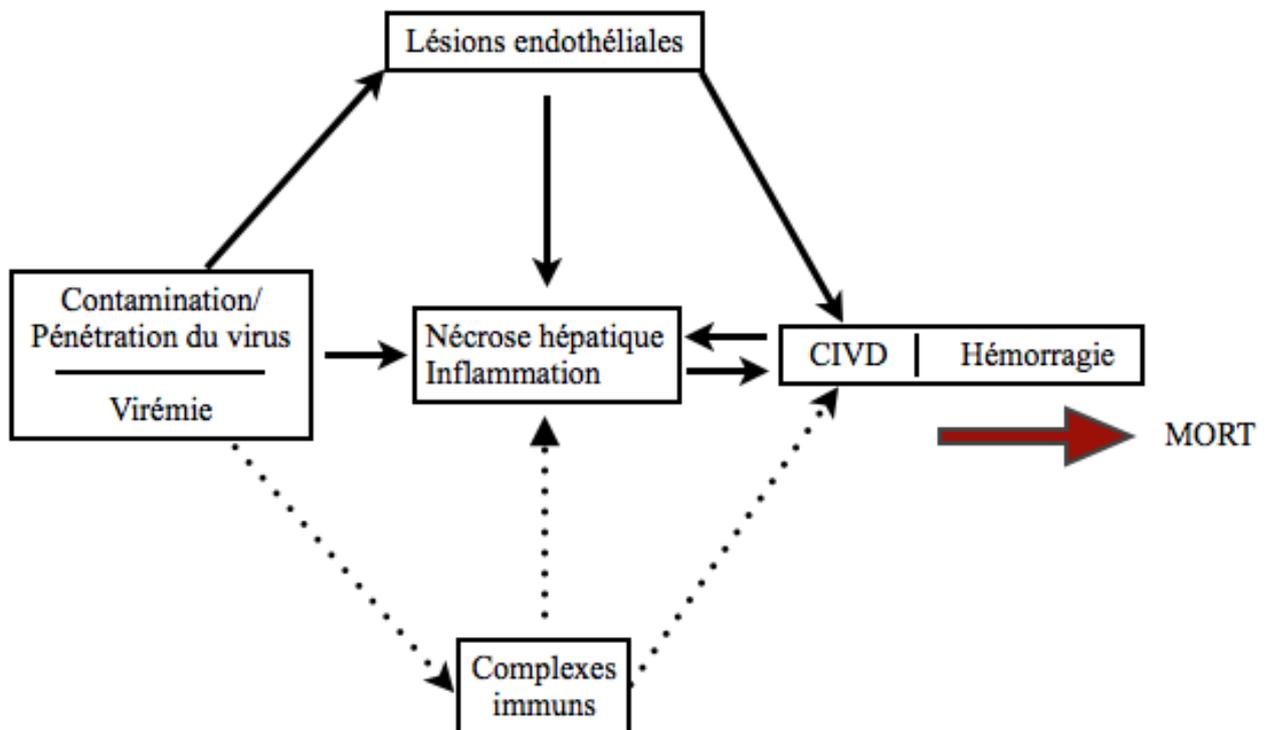
variant apathogène du RHDV qui, malgré les similarités avec le RHDV pathogène, n'engendre pas de signes cliniques et présente un tropisme intestinal, distinct de celui présenté ici.

### C. Mécanismes pathogéniques

Précédemment, nous avons vu qu'après une contamination quasi naturelle, inoculation du RHDV par voie oro-nasale, des particules virales sont retrouvées très précocement au niveau du foie (8h post-inoculation). Cette constatation, associée aux lésions hépatiques histopathologiques retrouvées chez les lapins infectés par le RHDV et présentant une forme aiguë à suraiguë de la RHD, suggère que les lésions inflammatoires et nécrotiques du foie sont les éléments centraux du schéma pathogénique.

De façon concomitante à l'apparition des lésions de nécrose hépatique (30h post-inoculation), on observe l'apparition de microthrombi hyalin d'abord au niveau des poumons puis au niveau des reins. De même, l'exploration de l'hémostase montre une prolongation des temps de coagulation ainsi qu'une diminution du nombre de plaquettes à partir de ce moment. Ces observations sont en faveur d'une coagulopathie de consommation (ou CIVD) occasionnant par la suite des dysfonctions organiques multiples et des hémorragies multifocales.

Le schéma pathogénique envisagé est le suivant (figure 6) :



**Figure 6** : Schéma pathogénique hypothétique lors de RHD (D'après Marcato et *al.*, 1991). En pointillés est représentée l'hypothèse non privilégiée d'une pathogénie liée aux immuns complexes.

Plusieurs origines peuvent être envisagées pour expliquer la coagulopathie de consommation, observée dans une grande partie des cas :

**Origine hépatique :** Des lésions de nécrose sont retrouvées in-vivo lors de l'observation histologique des foies de lapins infectés par le RHDV. Cette nécrose hépatique engendrée par la virémie est une des causes possible de la CIVD. En effet, le foie est responsable entre autre de la synthèse des facteurs de coagulations et de la clairance des facteurs activés. De plus, il pourrait être à l'origine de l'activation des facteurs extrinsèques de la coagulation et de la libération massive de thromboplasmine (Marcato et *al.*, 1991).

**Origine endothéliale :** Dans l'étude de Plassiart et *al.*, 1992, un des lapins sacrifiés 36h post-inoculation du RHDV ne montrait aucune lésion hépatique. En revanche, il présentait une élévation importante de sa concentration en complexes solubles et en D-dimères. Cela suggère l'intervention d'un autre mécanisme dans la mise en place de la coagulopathie de consommation. Il n'est pas exclu que le virus puisse engendrer des lésions endothéliales par lyse cellulaire, du virus ayant été retrouvé à ce niveau (Plassiart et *al.*, 1992). Par ailleurs, l'observation du tropisme du RHDV pour la lignée phagocytaire mononuclée comprenant les monocytes circulant mais aussi les macrophages intravasculaires au niveau pulmonaire par exemple, pourrait expliquer les lésions endothéliales. En effet, les monocytes peuvent s'agréger au niveau de l'endothélium et libérer des cytokines intervenant dans la cascade de coagulation. Ils vont aussi être à l'origine de la libération de facteurs pro-coagulants.

**Origine immunitaire :** Cette dernière hypothèse n'est pas privilégiée par rapport aux deux précédentes. Les complexes immuns constitués de l'interaction anticorps-antigènes pourraient causer des lésions endothéliales. Mais la mise en place de ce processus est plus long et ne correspond pas à l'évolution de la maladie. Il n'est cependant pas exclu que ce mécanisme intervienne dans les formes subaiguës d'évolution plus lente.

#### **D. Survenue de la mort**

Lors de forme aiguë et suraiguë de la maladie hémorragique virale du lapin, il se met en place un syndrome de dysfonction organique multiple (MODS) engendré par la CIVD et les hémorragies multifocales, conduisant à la mort. Les signes neurologiques observés en phase terminale de la maladie pourraient être attribués aux microthrombi retrouvés au niveau de l'encéphale.

## **VI. Diagnostic**

### **A. Diagnostic de suspicion sur le terrain**

Le diagnostic de suspicion se fonde sur l'épidémiologie caractéristique du RHDV ainsi que sur l'évolution et les signes cliniques observés chez les animaux atteints. La suspicion en cas d'épidémie est généralement très forte mais doit tout de même être confirmée en laboratoire. De façon schématique, les principales caractéristiques faisant penser à la RHD sur le terrain sont les suivantes (Mitro et Krauss, 1993):

**Epidémiologie** : les épidémies ont lieu en général au moment de la saison de reproduction, en hiver et au printemps. Les élevages avec un niveau d'hygiène moindre et une densité importante sont les plus souvent touchés. De même, des élevages permettant une proximité de la faune sauvage sont plus sensibles. Enfin, l'atteinte d'individus en bon état général, de plus de 2 mois exclusivement est aussi en faveur de la RHDV.

**Morbidité et mortalité** : la morbidité est de 30 à 80%, associée à une létalité pouvant régulièrement atteindre les 100%.

**Signes cliniques** : L'évolution jusqu'à la mort est souvent très rapide, entre 24 et 72h. Les signes cliniques les plus communément observés sont une mort soudaine (dans les cas suraigus), ainsi qu'un syndrome fébrile, hémorragique associé en fin d'évolution à des symptômes neurologiques s'achevant par la mort en position d'opistothonos.

L'autopsie permet de renforcer la suspicion sans pour autant la confirmer. Les lésions observées macroscopiquement sont de type congestivo-hémorragique avec une atteinte des voies aériennes supérieures et des organes abdominaux, particulièrement le foie. Cependant, une analyse histopathologique sera nécessaire pour confirmer cette suspicion.

Bien que la suspicion soit généralement très forte concernant la RHD, les analyses de laboratoire sont indispensables pour confirmer ou infirmer cette suspicion. Le diagnostic différentiel comprend en effet d'autres causes telles qu'une septicémie à Pasteurelles ou à Staphylocoque, une mort soudaine due à un coup de chaleur, un traumatisme ou une intoxication (Mitro et Krauss, 1993).

## B. Diagnostic de certitude au laboratoire (Lavazza et Capucci, 2010)

### 1. Mise en évidence de l'agent

#### a. *Prélèvement*

En général, les analyses de laboratoire réalisées afin de mettre en évidence l'agent infectieux sont effectuées sur des échantillons de foie. En effet, c'est dans le foie que le titre viral est le plus élevé (entre  $10^3$  et  $10^{6,5}$  LD<sub>50</sub> /mL d'homogénat à 10%). Cependant, il est possible d'utiliser d'autres organes, telles que la rate, dont le contenu en particules virales est proportionnel à sa vascularisation. Le sang peut aussi être utilisé.

Le traitement de l'échantillon sera le même quel qu'il soit (excepté pour l'immunocoloration) :

- Homogénéisation mécanique après dans une solution tampon PBS (phosphate Buffer Saline) à 5-20% à pH 7,2-7,4,
- Filtration
- Centrifugation 15min à 5000g
  - ⇒ Prêt pour le test d'hémagglutination ou l'ELISA.
- Centrifugation 15min à 12000g
  - ⇒ Prêt pour l'observation en microscopie électronique (« Drop Method » et IEM).
- Ultracentrifugation à 100000g
  - ⇒ Pendant 30min pour l'observation en microscopie électronique, après mise en suspension du culot dans du PBS ou de l'eau distillée.
  - ⇒ Pendant 90min pour le Western blotting, sur coussin de sucrose à 20%.

#### b. *Les différentes méthodes*

##### **Isolement in vitro**

Ce n'est pas une technique utilisée car le RHDV est jusqu'ici non cultivable en routine sur culture cellulaire. Seule la lignée cellulaire RK-13 a été décrite comme permissive avec un effet cytopathique visible (Ahmad et *al.*, 2011). En absence de confirmation et d'études plus approfondies, l'isolement reste impossible.

### **Infection expérimentale de lapin (*Oryctolagus cuniculus*)**

Elle reste la seule méthode permettant l'isolement, la propagation et le titrage de l'infectiosité du virus, disponible en laboratoire. Elle n'est cependant pas pratiquée en routine et est réservée au cas où les autres méthodes ne donnent aucun résultat conclusif.

Les lapins utilisés doivent être sensibles (> 2 mois) et ne présenter aucun anticorps anti-RHDV. L'inoculation du virus est réalisée avec une suspension de foie infecté par le RHDV (issu des lapins dont on veut établir le diagnostic), préalablement traitée avec des antibiotiques. L'inoculation peut se faire par voie intramusculaire, intraveineuse ou oro-nasale. Lorsque la RHD se déclare cliniquement, les signes cliniques et les lésions macro et microscopiques sont similaires à celles observées lors d'infection naturelle. Une hyperthermie est généralement détectée entre 18 et 24h post-inoculation. La mort survient alors dans 70 à 90% des cas après 24 à 48h post-infection. Il arrive que certains individus survivent entre 6 et 8 jours post-infection.

La maladie peut aussi se présenter sous forme subaiguë ou chronique. On observe alors la mise en place d'un ictère, les autres symptômes restant très modérés. Les animaux qui survivent ne présentent qu'une hyperthermie transitoire associée à un abattement et une anorexie. Une séroconversion peut être observée chez ces individus après 3 à 4 jours post-inoculation.

Après autopsie, on pourra alors réaliser les différents tests présentés par la suite pour confirmer et isoler le virus chez les lapins présentant les signes cliniques les plus marqués.

### **Test d'Hémagglutination**

Ce fut le premier test de diagnostic de la RHD de laboratoire utilisé en routine. Cependant, devant les difficultés logistiques d'approvisionnement, de standardisation et les risques à la manipulation de sang humains pour les laborantins, cette méthode est aujourd'hui remplacée par le test ELISA qui présente une sensibilité et une spécificité plus grande.

Bien que le RHDV soit capable d'agglutiner les érythrocytes humains de tout groupe sans différence notable entre les groupes A, B, AB et O, il est réalisé de façon standardisée avec des érythrocytes humains de groupe O, fraîchement collectés. Le surnageant d'un homogénat de foie ou de rate à 10% est incubé avec un volume égale d'érythrocytes sur une plaque de microtitration à fond rond, de préférence à 4°C, pour obtenir une positivité même avec des souches de type « Rainham » non hémagglutinante (Capucci et *al.*, 1996a). Après environ une heure, l'observation d'une agglutination dans les puits suivant celui de dilution 1/160 signifie que le test est positif.

On constate qu'environ 10% des échantillons trouvés positifs avec d'autres méthodes (Microscopie électronique ou ELISA) sont trouvés négatifs avec ce test. L'étude de Capucci et *al.*, 1991, compare le test d'hémagglutination avec l'ELISA et la microscopie électronique. Cette étude menée sur 1000 échantillons donne un taux de faux positifs de 8%, probablement dû à la présence d'autres agents hémagglutinants (Pasteurelles ou parvovirus). Le taux de faux négatifs est de 9%, dont 4% associés à un titre antigénique faible, et 5% associés à la présence de particules virales dégradées ou de particules similaires au virus (VLPs). Une autre étude suggère que certaines souches virales pourraient ne pas être hémagglutinantes sans que l'on sache vraiment l'expliquer (Chasey et *al.*, 1995).

### **Microscopie électronique**

Il existe plusieurs méthodes d'observation en microscopie électronique. La première à avoir été utilisée est l'observation après coloration négative, appelée « Drop method ». Pour cela, on place une grille recouverte d'un film de « formvar-carbon » sur une goutte de suspension obtenue comme décrit précédemment. La grille est laissée 5 min puis déposée sur une goutte de sodium de phosphotungstate pendant 90s à pH 6,8. On observe ensuite au grossissement x25000. Du fait de sa faible sensibilité, les autres méthodes lui sont désormais préférées.

La seconde méthode est très similaire à la précédente, mais la coloration est précédée d'une ultracentrifugation.

Ces deux techniques permettent alors d'observer les virions natifs ainsi que les formes dégradées, dites « lisses ». On peut ainsi identifier les particules virales d'après des critères morphologiques.

Enfin, la dernière méthode est l'immuno-électro-microscopie (IEM). Pour cela, la suspension d'échantillon est incubée une heure à 37°C avec un volume équivalent de sérum hyperimmun anti-RHDV de lapin ou d'autres animaux, ou encore avec des anticorps monoclonaux spécifiques du RHDV. Cela engendre l'agrégation des particules virales qui sont alors plus facilement visibles en microscopie électronique. Cette méthode a une sensibilité et une spécificité supérieure au test d'hémagglutination, qui se rapprochent de celles de l'ELISA. Elle reste longue à réaliser et n'est donc utilisée qu'en cas de résultats douteux après des tests plus rapides (Capucci et *al.*, 1991).

## **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

La méthode ELISA permet la détection des antigènes viraux. Elle utilise une technique dite « en sandwich » qui peut être déclinée en plusieurs variations selon le système enzymatique et les réactifs immunologiques utilisés (Capucci et *al.*, 1991). Dans tous les cas cependant, un sérum hyperimmun anti-RHDV est directement adsorbé sur une phase solide constituée de nombreux puits (la plaque ELISA). Ensuite, plusieurs traceurs peuvent être utilisés, constitués d'un anticorps couplé avec une enzyme type peroxydase ou phosphatase. Pour caractériser de façon plus sensible l'antigénicité du virus isolé, il est conseillé d'utiliser 4 traceurs différents : deux Mabs reconnaissant le même antigène présent en surface mais exprimé par la souche classique ou par le variant RHDVa, un sérum hyperimmun polyclonal et un pool de Mabs reconnaissant des épitopes internes. Dans l'idéal, il faudrait donc utiliser 8 puits distincts afin d'utiliser chacun de ces traceurs avec les deux dilutions de suspension de foie préconisées à 1/5 et 1/30, plus 8 puits « témoins ». Enfin, la révélation est réalisée et la lecture de l'absorbance se fait à 492nm. Les échantillons seront donnés positifs si l'absorbance entre les puits témoins et les échantillons est supérieure à 0,3. Généralement, l'absorbance est supérieure à 0,8 pour la dilution 1/30 alors qu'elle est comprise entre 0,1 et 0,25 pour le témoin négatif pour la dilution à 1/5.

La sensibilité, la spécificité, la rapidité de la mise en œuvre et la standardisation de ce test en font un test de choix (Capucci et *al.*, 1991). Bien que ce ne soit pas communément utilisé, l'étude de Le Gall-Reculé et *al.*, 2001, a montré qu'on pouvait simplement utiliser l'exsudat à la surface du foie qui se forme lors de la décongélation comme échantillon. Cela simplifie encore la réalisation de ce test.

## **Immunohistochimie**

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

On observe alors une coloration intense du noyau et plus diffuse du cytoplasme des hépatocytes nécrotiques, principalement localisée en région périportale. Une coloration est aussi observée au niveau des cellules de Kupffer, ainsi qu'au niveau des macrophages alvéolaires, spléniques et au sein des nœuds lymphatiques. Une coloration des cellules rénales mésangiales peut aussi être observée. En utilisant une technique similaire, une étude a montré

une répartition similaire de la coloration avec une accumulation du virus dans le noyau des hépatocytes et macrophages morphologiquement préservés, alors qu'il est présent dans tout le cytoplasme dès lors que la cellule dégénère (Alexandrov et *al.*, 1992).

### **Technique de Western Blot**

Ce test est particulièrement utile lorsque d'autres tests tels que les tests d'hémagglutination et l'ELISA donnent des résultats douteux ou que l'échantillon contient potentiellement des particules virales lisses. Le surnageant ainsi que le culot peuvent être examinés pour détecter respectivement les sous-unités 6S et la protéine de capsid VP60 dénaturée ou ses fragments d'un poids moléculaire allant de 28 à 50kDa, correspondant à la transition entre la forme native et la forme lisse.

Les protéines peuvent être mises en évidence avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, ces derniers pouvant reconnaître des épitopes contigus. De plus, le sérum hyperimmun du RHDV est moins efficace que les anticorps monoclonaux dans la reconnaissance d'une même bande. Lorsque le test est positif, on détecte des protéines de différents poids moléculaires : certaines de 60kDa, correspondant à la protéine structurale majeure, et d'autres plus petites de 28 à 41 kDa, correspondant aux fragments de VP60 (Lavazza & Capucci, 2010).

### **Reverse Transcription – Polymerase Chain reaction (RT-PCR)**

La RT-PCR est une méthode de détection de l'acide nucléique qui peut être appliquée à la recherche spécifique de l'ARN viral du RHDV puisqu'on n'observe que très peu de variations parmi les souches virales isolées. C'est une méthode rapide et très sensible,  $10^4$  fois plus sensible que la méthode ELISA (Guittre et *al.*, 1995) qui peut être réalisée sur échantillons d'organes (le foie étant l'optimum), urine, fèces ou sérum. Elle n'est pas nécessaire en routine, bien qu'elle soit plus pratique, rapide et sensible que les autres méthodes diagnostiques. Elle pourrait cependant permettre un diagnostic de masse et permettre ainsi la détection et l'étude des stades précoces de la RHD (Guittre et *al.*, 1995). Elle est par contre très utilisée pour les études épidémiologiques, la recherche de nouveaux variants, de variants apathogènes (Cappucci et *al.*, 1998) ainsi que pour la détection du RHDV chez d'autres espèces animales pouvant servir de vecteur de la maladie (Merchan et *al.*, 2011).

Cette méthode se compose de 3 étapes :

- La reverse-transcription qui produit l'ADNc à partir de l'ARN et pour laquelle il est possible d'utiliser différentes amorces nucléotidiques spécifiques de la VP60,
- L'amplification de l'ADNc par la PCR, avec utilisation là aussi de plusieurs amorces
- La révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose.

Si cela est nécessaire, la spécificité des produits de PCR peut être déterminée par séquençage ou Southern Blot associé à une hybridation in-situ utilisant des sondes radioactives.

L'étude de Le Gall et *al.*, 2001 a montré l'efficacité d'une méthode de RT-PCR associée à une immunocapture. Cette méthode combine en fait les avantages de rapidité de mise en oeuvre du test ELISA avec l'immunocapture, et ceux de la RT-PCR avec la sensibilité. Le principe allie l'adsorption d'anticorps anti-RHDV sur une phase solide, à la RT-PCR réalisée sans nécessité de purification ou d'extraction de l'ARN viral.

Une méthode diagnostique de RT-PCR quantitative en temps réel utilisant la technique TaqMan® a récemment été développée ; elle présente une spécificité de 100% associée à une très bonne sensibilité de 10 copies/puits et une linéarité sur la gamme de 101 à 1010 copies.

## 2. Analyses sérologiques (Lavazza et Capucci, 2010)

Le diagnostic de laboratoire de la RHD peut aussi être réalisé de façon indirecte par la réaction immunitaire spécifique contre le RHDV. Etant donné que la réponse humorale joue un rôle très important dans la protection des lapins contre une infection par le RHDV, connaître le titre d'anticorps anti-RHDV d'un individu convalescent ou après une vaccination a une valeur prédictive sur sa capacité à résister. Cependant, l'étude de Marchandau et *al.*, 2005, suggère l'existence de virus RHDV-like induisant la production d'anticorps détectables par les méthodes sérologiques usuelles (ELISA), à des titres élevés conférant normalement une protection, mais non protecteurs. Cela pose un réel problème dans l'établissement de la séropositivité des lapins testés qui peuvent ne pas être protégés.

Il existe 3 techniques de base pour le diagnostic sérologique du RHDV, chacune présentant des avantages et des inconvénients : l'inhibition de l'hémagglutination (IH), l'ELISA indirect (I-ELISA) et l'ELISA de compétition (c-ELISA). D'un point de vue

commodité de mise en œuvre, l'IH arrive en tête, suivi de l'I-ELISA et de la c-ELISA. Cependant, les techniques ELISA sont plus faciles et plus rapides à réaliser, principalement quand un grand nombre d'échantillons sont à traiter. D'autre part, l'étude de Capucci *et al.*, 1991, suggère que les deux méthodes ELISA ont une sensibilité équivalente, mais que la c-ELISA est plus spécifique. Cependant, un des avantages de l'ELISA indirecte est de permettre une semi-quantification des anticorps.

Enfin, pour améliorer l'interprétation sérologique et déterminer de façon plus précise le statut immunologique des lapins testés, une combinaison de techniques ELISA distinguant les immunoglobulines de type A, G ou M est aussi disponible (IsoELISA).

### **Test d'inhibition de l'hémagglutination**

Ce test présente les mêmes contraintes et difficultés de mise en œuvre que le test d'hémagglutination. On lui préférera donc les tests ELISA.

Des antigènes de RHDV sont préparés à partir de foie de lapin infecté, fraîchement prélevé à la mort de l'animal. L'échantillon est homogénéisé dans une solution tampon PBS à 10% puis centrifugé. Le surnageant est alors filtré, titré par hémagglutination et prêt à l'emploi. L'échantillon à tester consiste en un prélèvement de sérum qui est inactivé par incubation à 56°C pendant 30min. Il est ensuite traité et adjuvé d'érythrocytes humains de groupe O, traités eux-aussi spécifiquement. Pour réaliser le test, on mélange le sérum avec les antigènes du RHDV qu'on laisse incuber à température ambiante (25°C) pendant 30 à 60min, avant d'ajouter des érythrocytes humains de groupe O qu'on laisse de nouveau incuber. Le titre sérique en anticorps correspond à la dilution maximale pour laquelle on observe une inhibition de l'hémagglutination. Il est généralement compris entre 1/20 et 1/80.

### **Elisa indirecte**

Le principe est similaire à l'ELISA sandwich présenté précédemment. Dans la technique de l'ELISA indirecte, l'antigène est fixé sur la microplaque ELISA, tandis que le sérum à tester va être déposé dans les puits. Un anticorps anti-anticorps conjugué à une enzyme est ensuite déposé après lavage de la plaque à ELISA. On peut ensuite procéder à la révélation et lire l'absorbance afin de déterminer si le résultat est positif ou non.

### **Elisa de compétition**

Le principe est là encore similaire. Les antigènes anti-RHDV sont adsorbés sur une microplaque ELISA à un titre prédéterminé en quantité limitante. Ensuite, le sérum est mélangé et mis à incuber dans le puits avec un sérum polyclonal dont les anticorps sont

conjugués à une enzyme pour permettre leur révélation et la lecture du résultat par la mesure de l'absorbance. Le sérum polyclonal peut être remplacé par des anticorps monoclonaux anti-RHDV. Le titre sérique correspond à la dilution donnant une valeur de l'absorbance égale à 50% de la valeur de l'absorbance du témoin négatif à la dilution 1/160. Le titrage est indirect.

## **VII. Prophylaxie**

Les mesures prophylactiques ne peuvent s'entendre qu'à propos des populations de lapins domestiques et d'élevage. Puisqu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique de la maladie hémorragique virale du lapin et que la vitesse d'incubation et d'évolution est majoritairement très rapide, seules des mesures de prophylaxie, sanitaires et médicales, peuvent éviter à ces populations de lapins d'être décimées.

### **A. Prophylaxie sanitaire**

#### **1. Prophylaxie sanitaire défensive**

La prophylaxie sanitaire défensive a pour but d'empêcher le virus d'entrer sur un territoire ou une exploitation et de diffuser. Pour cela, nous disposons des mesures suivantes (Ohlinger *et al.*, 1993 ; Mitro et Krauss, 1993 ; OIE, 2007 ; OIE, 2011):

**Lapins introduits dans l'élevage** : Ils doivent provenir d'élevage indemne ou être testés séronégatifs pour le RHDV et être placés en quarantaine pendant environ 2 semaines. Des lapins sentinelles, sensibles au RHDV, peuvent être placés avec le groupe de lapins en quarantaine.

**Contact** : Il est nécessaire d'éviter tout contact entre les lapins de l'élevage et les populations de lapins ou de lièvres sauvages. De même il faut éviter les contacts avec des lapins d'un autre élevage ainsi qu'avec d'autres éleveurs de lapins. Les manifestations type foires ou expositions doivent être proscrites.

**Alimentation** : Il faut éviter l'utilisation de fourrages verts et préférer les aliments préparés.

**Hygiène** : Il faut des mesures d'hygiène strictes telles que des douches ainsi que le changement de vêtements obligatoires à l'entrée et la sortie de l'élevage, le nettoyage et la désinfection des cages, du matériel, etc.

**Nuisible** : Une politique d'élimination des nuisibles tels que les insectes, rongeurs, charognards doit être mise en place pour éviter la transmission du virus par ce biais.

Cette prophylaxie sanitaire s'étend à l'échelle nationale et internationale pour éviter la propagation du virus d'un pays à un autre. Les règles qui régissent les échanges commerciaux de lapins vivants, de viandes de lapins ou autres produits issus du lapin sont définies dans le code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE. Ce code définit la notion de pays ou d'exploitation indemne et régit de manière spécifique les importations de lapins destinés à la reproduction, de lapereaux d'un jour, de viande de lapins ou de peaux de lapin. Parallèlement pour chaque type de produits importés, les règles diffèrent selon que le pays exportateur est indemne ou considéré infecté par la RHD.

On peut donner comme exemple les recommandations pour l'importation de viandes de lapin en provenance de pays considérés comme infectés par la RHD qui stipulent que les Autorités vétérinaires des pays importateurs doivent exiger la présentation d'un certificat vétérinaire international attestant que les animaux :

- ont séjourné dans des exploitations dans lesquelles aucun cas de RHD n'a été signalé pendant les 60 jours précédant leur acheminement vers l'abattoir agréé ;
- ont présenté des résultats satisfaisants à l'inspection ante-mortem à laquelle ils ont été soumis en vue d'écarter la présence de la RHD
- ne présentaient pas de lésions provoquées par la RHD lors de l'inspection post-mortem

## 2. Prophylaxie sanitaire offensive

Les mesures de prophylaxie sanitaire offensive consistent en l'éradication du virus d'un élevage ou d'une zone géographique lorsque la maladie s'est déclarée. Au Mexique, ces mesures avaient été radicales et les exploitations infectées avaient été supprimées. Ceci avait permis de contenir la maladie et de l'éradiquer. La plupart du temps cela n'est pas possible du fait des interactions avec les populations de lapins de Garenne. Dans la majorité des cas, les mesures sont donc les suivantes (Rodak et *al.*, 1991 ; Ohlinger et *al.*, 1993 ; OIE, 2007):

**Abattage** : Après avoir identifiées toutes les sources potentielles d'infection, tous les lapins infectés ou suspects de l'être doivent être abattus.

**Destruction des carcasses :** Elle doit se faire de façon soignée et sûre (par exemple en les incinérant ou en les aspergeant de désinfectant puis en les enterrant à au moins 40cm de profondeur).

**Nettoyage et désinfection :** Les locaux et le matériel doivent être nettoyés puis désinfectés selon des procédures efficaces et recommandées contre les virus non-enveloppés, par exemple avec une solution d'hydroxyde de sodium à 10% ou du formaldéhyde à 1-2%. D'autres désinfectants à base de phénols (One-Stroke Environ, PRO-AG Products) ou d'hypochlorite de sodium à 0,5% peuvent être utilisés. Le virus étant résistant à l'éther et au chloroforme, il convient de ne pas utiliser ces produits.

**Vide sanitaire :** Aucune reprise de l'élevage de lapin ne doit être autorisée dans ces locaux avant d'être certain de l'éradication du virus. Pour cela, des lapins sentinelles peuvent être utilisés.

**Vaccination :** Il est recommandé d'associer la vaccination à ces mesures sanitaires dans les zones limitrophes du foyer d'infection identifié. Etant donné que la vaccination pourrait interférer avec l'éradication en masquant les symptômes, des lapins sentinelles peuvent être utilisés pour s'assurer de l'absence de circulation du virus dans les élevages vaccinés.

## **B. Prophylaxie médicale**

La prophylaxie médicale passe majoritairement par l'utilisation de vaccins pouvant être de différents types, et sporadiquement par l'utilisation de sérum hyper-immun. Cependant, les exploitations et plus largement les pays désirant acquérir le statut d'indemne, ou les exploitations tournées vers l'exportation ne peuvent vacciner leurs lapins. C'est pourquoi, encore plus que pour les élevages autorisés à vacciner, la prophylaxie sanitaire tient une place essentielle dans la prévention de la maladie hémorragique virale du lapin.

### 1. Nature et obtention des vaccins (Lavazza et Capucci, 2010)

Les vaccins utilisés et autorisés sont des vaccins à virus inactivés et adjuvés, utilisés uniquement sur les populations de lapins domestiques (qu'ils soient d'élevage ou de compagnie). La méthode de fabrication est la suivante :

- Inoculation du RHDV à des lapins sensibles
- Collecte des foies des lapins qui meurent entre 24 et 72h. Au-delà, ils ne sont pas utilisés.

- Broyage et homogénéisation des foies pendant 10 minutes en environnement réfrigéré après ajout de PBS stérile à 10% et de pH compris entre 7,2 et 7,4.
- Traitement de la mixture ainsi obtenue ensuite avec du chloroforme à 2% puis centrifugation. Récupération du surnageant qui est ensuite testé par hémagglutination et ELISA. Cela permet d'obtenir une concentration de 640 à 1280 unités d'hémagglutination/mL dans le produit commercialisé.
- Inactivation du virus avec du formaldéhyde et/ou de la bêta-propiolactone utilisable à différentes températures et concentrations. Ce sont les produits les plus utilisés.
- Ajout de l'adjuvant, qui peut être de l'hydroxyde d'aluminium, de l'adjuvant complet de Freund ou une autre émulsion huileuse.
- Ajout de thiomersal, qui est un agent conservateur.

De nombreuses études sont réalisées en particulier sur l'élaboration de vaccins recombinants exprimant la protéine de capsid VP60 du RHDV. Divers systèmes peuvent être utilisés tels que : virus de la myxomatose recombinant (Bertagnoli, 1996 ; Barcena et *al.*, 2000 ; Spibey, 2012), parapoxvirus (Orf virus) (Rohde et *al.*, 2011), adenovirus (Wang, 2012), système baculovirus (Fischer, 1997), plants de pomme de terre transgénique (Castanon, 1999). La protéine VP60 recombinante peut par la suite être assemblée dans des pseudos-virions (VLP) qui permettent l'obtention d'un recombinant structurellement et antigéniquement identique aux virions du RHDV. Les études sont concluantes et de nouveaux vaccins sont mis sur le marché.

D'autre part, ces vaccins recombinants permettent de nouvelles perspectives. Ils peuvent par exemple vacciner contre plusieurs virus en même temps, le plus souvent contre la myxomatose et la maladie hémorragique virale du lapin. Pour cela, une souche de virus de la myxomatose qui exprime la protéine de capsid VP60 du RHDV est utilisée. On trouve par exemple le nouveau vaccin Nobivac Myxo-RHD. Pour fabriquer ce dernier, le gène codant pour la protéine de capsid VP60 du RHDV est inséré au niveau du locus MGF/M11L du génome du virus myxomateux (Spibey, 2012). D'autres études se penchent sur la possibilité de vacciner les populations sauvages, soit en permettant l'administration du vaccin par voie orale (Wang, 2012) soit en permettant une diffusion horizontale du virus recombinant par contact entre lapins (Barcena et *al.*, 2000).

## 2. Utilisation du vaccin (Lavazza et Capucci, 2010)

La plupart des fabricants de ces vaccins recommande une primo-vaccination en une injection entre 2 et 3 mois d'âge suivi d'un rappel annuel. Cette vaccination consiste en l'inoculation sous-cutanée au niveau de la nuque d'une dose d'1mL. Suite à cette injection, les anticorps apparaissent après 7 à 10 jours et persistent au moins 1 an.

Concernant les élevages indemnes, il peut être envisagé de ne vacciner que les lapins destinés à la reproduction. Le protocole vaccinal doit cependant être adapté au fort taux de repeuplement des élevages industriels. Ainsi, on vaccinera tous les reproducteurs tous les 6 mois quelque soit leur âge pour s'assurer que tous l'auront été au moins une fois dans l'année.

Concernant les élevages de lapins destinés à la boucherie, abattu à environ 80 jours et possédant une résistance naturelle jusqu'à l'âge de 35-45 jours, il n'est pas nécessaire de les vacciner. Ceci s'entend si la situation de l'élevage est standard, c'est-à-dire qui applique de bonnes mesures de prophylaxie sanitaire et autour duquel il n'y a pas eu de cas de RHD. Cependant, si l'élevage a connu un épisode de RHD et malgré des mesures de prophylaxie sanitaire offensive stricte (comme décrite précédemment), il est fortement recommandé de vacciner les lapins à 40 jours d'âge durant plusieurs cycles, jusqu'à ne plus avoir de lapins sentinelles infectés par exemple.

Concernant la vaccination d'urgence, elle peut être réalisée dans les élevages possédant des hangars séparés qui connaissent une épidémie de RHD malgré l'application de bonnes mesures sanitaires.

Enfin, le vaccin devra être stocké à l'abri de la lumière et de la chaleur et conservé entre 2 et 8°C.

## 3. Sérum hyper-immun

L'immunité passive acquise lors d'injection de sérum hyperimmun est intéressante en cas d'urgence car elle est rapidement acquise. Elle a montré son efficacité sur des lapins ne présentant aucun symptôme mais vivant en milieu infecté, ou présentant une forme subclinique. Cette immunité n'est cependant efficace qu'à très court terme. Le sérum hyperimmun est donc utilisé en cas d'épidémie pour limiter les pertes et endiguer la diffusion du virus au sein de l'élevage.

**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**

De nombreux isolats de RHDV, provenant de différentes localisations géographiques et à différentes dates, ont été séquencés de façon complète ou partielle. La variabilité génétique s'est révélée faible, même au niveau de la séquence du gène codant pour la protéine de capsid VP60, qui pourtant est sujet à de nombreuses mutations chez d'autres calicivirus comme le FCV ou le SMSV.

La RHD est d'autre part une maladie pour laquelle la morbidité ainsi que la mortalité sont élevées, pouvant atteindre plus de 90%, avec un pattern lésionnel étendu. Le peu de lapins qui survivent à la maladie développent des anticorps anti-RHDV protecteurs envers une nouvelle infection pendant au moins 1 an. La présence de ces anticorps est d'ailleurs utilisée dans le diagnostic et a une valeur pronostique. Cependant, l'étude de Rodak *et al.*, 1990, a mis en évidence la présence d'anticorps détectés par le test ELISA chez des lapins provenant de fermes apparemment indemnes de RHD en République Tchèque, ainsi que sur des prélèvements de sérum collectés entre 1975 et 1985, avant la première épidémie de RHD en Chine. De plus, ils se sont révélés protecteurs suite à une épreuve virulente.

En 1996, c'est en Italie que la première souche de RHDV non pathogène fut identifiée sur des lapins issus d'un élevage où la RHD n'a jamais été observée mais où la séropositivité est importante. Les femelles reproductrices ont ainsi des titres élevés d'anticorps et leurs progénitures bénéficient d'anticorps d'origine maternelle à des titres détectables. L'équipe de chercheurs l'appelle alors RCV (Rabbit CaliciVirus) pour le différencier des souches pathogènes du RHDV jusque là connues (Capucci *et al.*, 1996b).

Par ailleurs, de l'ARN viral a été identifié par RT-PCR nichée dans des échantillons de sérum de lapins d'élevage, sains de RHD, collectés en Angleterre entre 1955 et 1964 soit près de 30 ans avant l'émergence de la RHD (Moss *et al.*, 2002). De même, l'ARN a été isolé par RT-PCR et des anticorps anti-RHDV à un titre élevé ont été détectés dans le sérum de lapins sauvages sur l'île Lambay, alors que la maladie n'y a jamais été observée. Cela suggère qu'un virus apparenté au RHDV peut circuler de nombreuses années au sein d'une population isolée de lapins sauvages de manière non-pathogène ou sous la forme d'une infection latente ou persistance (Forrester *et al.*, 2007).

En Nouvelle-Zélande et en Australie, la présence d'une souche de RHDV non pathogène a aussi été suspectée. Le sérum de lapins de la région de Kojaneerup dans le sud de l'état de l'Ouest Australien a été collecté avant et après l'émergence de RHD dans cette région, suite à la dissémination volontaire du virus. Pour environ ¼ des prélèvements pré-RHD, le résultat du test cELISA fut douteux et un isoELISA fut réalisé sur ces échantillons. Ce deuxième test révéla la présence d'IgG à des titres inférieurs à 1 :10 suggérant l'exposition des lapins à une souche apathogène de RHDV avant que l'épidémie volontaire ne les atteigne (Bruce et Twigg, 2004).

Plus récemment, une souche de NP-LV (Non-Pathogen LagoVirus), le RCV-A1, a été isolée en Australie et une autre, la souche 06-11, a été isolé en France. Contrairement aux autres souches de NP-LV isolées depuis 1996, ces souches sont infectieuses, non pathogènes mais n'engendrent pas la production d'anticorps protecteurs. Cela suggère l'existence de souches de NP-LV dont le pouvoir immunogène diffère de non protecteur à protecteur (Strive et *al.*, 2010, Le Gall et *al.*, 2011).

L'étude de O'Keefe et *al.*, 1999, aboutit à la même conclusion en Nouvelle-Zélande après la mise en évidence de titre d'anticorps étrangement élevés juste avant la première épidémie en 1997.

Enfin, une étude a été menée récemment sur l'Archipel des Kerguelen, où la RHD n'a jamais été observée et sur lequel les lapins vivent de façon totalement isolée sans introduction de nouveaux individus depuis plus d'un siècle. Entre 2003 et 2004, une étude sérologique a été réalisée sur 113 lapins vivant en 4 sites distincts de l'archipel: 35% des lapins se sont révélés positifs, avec de grandes différences selon le site. Sur deux sites, le pourcentage de séropositifs atteignait ainsi 74 à 88% (Marchandeau et *al.*, 2010) .

Parallèlement, l'étude de Capucci et *al.*, 1994, sur la contagion de ces souches montre chez des lapins séronégatifs, mis en présence de lapins séropositifs ne présentant aucun symptôme, séroconvertissent en l'absence de signes cliniques détectés. De même, l'étude de Capucci et *al.*, 1997, portant sur 238 lapins suivis sérologiquement et ne présentant pas de signes cliniques de RHD, a permis d'observer des séroconversions de façon répétées dans le temps au gré des saisons de reproductions. Ainsi, parmi les lapins issus des portées de l'année, le taux de séropositifs ne cesse d'augmenter à partir du sevrage jusqu'à atteindre 100% de séropositifs à 33 jours post-sevrage, sans aucun signe clinique.

## II. Pouvoir pathogène

Les études citées précédemment ont permis d'identifier de nombreuses souches de virus apparentés au RHDV chez des animaux parfaitement sains au sein d'élevages ou de populations sauvages « indemnes » de RHD. Ces souches sont donc considérées comme apathogènes, dans le sens où elles n'engendrent pas de signes cliniques compatibles avec la RHD et n'affectent pas les animaux porteurs. La vérification par inoculation des virus isolés à des lapins sensibles non séropositifs n'a pas toujours été réalisée, comme par exemple pour la souche identifiée sur l'île Lambay, mais l'absence de RHD clinique suggère leur non pathogénicité.

Dans le cas du RCV isolé en Italie par Capucci et *al.*, 1996, le virus a été isolé chez des lapins sains. Une recherche des cellules cibles a été effectuée. Seuls les lapins nouvellement infectés et présentant donc une séroconversion avec prédominance des IgM ont été sélectionnés pour la réalisation des tests. Les résultats révèlent un tropisme essentiellement digestif, intestinal. Une faible quantité d'ARN viral a été retrouvée chez 3 des 13 animaux soumis aux expérimentations (5 naturellement infectés, 6 infectés expérimentalement et 2 infectés par contact). De plus, aucun signe clinique n'a été observé chez ces animaux.

Une récente étude concernant le RCV-A1 isolé en Australie révèle des résultats similaires, avec un tropisme digestif au niveau des intestins, du caecum, des plaques de Peyer et des nœuds lymphatiques mésentériques. Ce virus n'est, là encore, pas pathogène et permet une protection modérée envers une infection par le RHDV (Strive et *al.*, 2010).

Enfin, l'étude de Le Gall-Reculé et *al.*, 2011, démontre l'existence d'une nouvelle souche de NP-LV, la souche 06-11, qui présente le même tropisme que les autres NP-LV identifiés pour l'intestin grêle, mais ne confère aucune protection contre une infection par le RHDV. Cette souche a été isolée chez des lapins blanc Néo-Zélandais ne présentant aucun symptôme de RHD et provenant d'un élevage de lapins indemne de RHDV.

Ces résultats sont très différents de ceux rencontrés avec les souches de RHDV virulentes connues, qui ont pour cellules cibles essentiellement les hépatocytes et les leucocytes mononuclés, tels que les cellules de kuppfer et les macrophages spléniques et pulmonaires. Cette différence de tropisme est fortement suspectée comme origine de la

variation de pathogénicité entre les différentes souches de RHDV et les différentes souches de RCV.

### **III. Caractéristiques des calicivirus apparentés au RHDV**

#### **A. Séquences nucléotidiques et protidiques**

L'alignement des séquences d'acide aminé de la protéine de capsid des calicivirus des lagomorphes que sont l'EBHSV, le RHDV et le RCV a mis en évidence une très faible différence dans les séquences du RCV et du RHDV. Cependant, il apparaît que cette séquence est très conservée parmi les différentes souches de RHDV isolées ce qui suggère que même d'infimes modifications au niveau de la séquence d'acide aminé peut avoir des conséquences et pourrait expliquer la différence de pathogénicité et de tropisme entre le RHDV et les calicivirus apparentés au RHDV que sont les NP-LV.

L'étude de Capucci et *al.*, 1996, a identifié et caractérisé le RCV italien en le comparant à des souches différentes de RHDV et à l'EBHSV. Le RCV et les différentes souches de RHDV isolées à des moments et à des endroits différents montrent une identité de séquence d'acide aminé d'environ 91,5%, légèrement plus basse qu'entre les souches virulentes de RHDV dont l'identité moyenne est de 98%. En revanche, l'identité moyenne des séquences entre le RCV et l'EBHSV (75%) et entre le RHDV et l'EBHSV (76,4%) est similaire. De plus, 31 des 46 acides aminés (67%) qui diffèrent entre le RHDV et le RCV sont localisés aux mêmes endroits que les substitutions détectés entre l'EBHSV et le RHDV.

En considérant uniquement la séquence comprise entre les acides aminés 301 et 434 de la portion C-terminal de la protéine de capsid, cette identité entre le RHDV et le RCV diminue à 83,4% ce qui suggère une accumulation des différences de séquence nucléotidique et protéique à ce niveau là. Cette séquence correspond aux domaines C, D et E de la protéine de capsid comprenant 5+ 1/2 domaines (domaine A tronqué, B, C, D, E, F) d'après la nomenclature formulée par Neill, 1992. Plus précisément, le domaine C du RCV (a.a. 301 à 324) présente une délétion de 3 acides aminés correspondant à Asn-308, Ala-309 et Thr-310, représentant la principale différence de la protéine de capsid du RCV. De plus, alors que le résidu cystéine à la position 274 de la protéine de capsid du RHDV est conservé chez le RCV, on note deux résidus cystéines supplémentaires chez le RCV aux positions 259 et 329, ces résidus étant susceptibles de participer à la formation de pont disulfure, et ainsi de participer à l'assemblage de la capsid.

Enfin, le RCV comporte 2 acides aminés chargés négativement aux positions Glu-473 et Asp-477, absents de la protéine de capsid du RHDV, pouvant contribuer à une légère diminution du point isoélectrique qui est de 4,54.

Concernant les virus apparentés aux RHDV de type NP-LV isolés en Angleterre, la séquence du gène codant pour la protéine de capsid n'est pas aisément distinguable de celle issue de virus isolés dans des foies de lapins morts de RHD. L'analyse phylogénétique montre que chacun des isolats se situe sur la même branche que les virus isolés dans la même zone géographique sur des cadavres de lapins probablement mort de RHD ou connus pour être pathogènes (Moss et *al.*, 2002). Il en est de même pour le virus apparenté au RHDV isolé en Nouvelle-Zélande qui s'apparente au deux souches disséminées sciemment, les souches Tchèque V351 et Espagnol 89 (Forrester et *al.*, 2003).

L'étude de Forrester et *al.*, 2007, caractérise en partie la séquence nucléotidique du NP-LV isolé sur l'île Lambay. Ce dernier apparait très différent des virus compris dans les groupes 2 à 8 selon la nomenclature de Moss et *al.*, 2002. En outre, il possède une identité nucléotidique de 84,9% avec la souche Ashington, et de 81% avec le RCV.

Enfin, L'étude de Le Gall-Reculé et *al.*, 2011 a permis la caractérisation de la séquence de nucléotides et d'acides aminés correspondant à protéine de capsid VP60 de la souche 06-11.

Concernant la séquence nucléotidique de la VP60 de la souche 06-11, l'identité nucléotidique moyenne avec le RHDV est de 83% alors qu'elle est de 85% avec le RCV et seulement de 79% avec le RCV-A1. En revanche, on observe une forte identité nucléotidique entre la souche 06-11 et la souche Ashington de RHDV qui est de 93,8%. On observe ainsi une délétion nucléotidique correspondant aux acides aminés 308 et 309 de la VP60 du RHDV, délétion observée sur la souche Ashington de RHDV. Une délétion similaire est observée au niveau des acides aminés 309 et 310 du RCV.

Concernant la séquence d'acides aminés de la VP60 prise dans son ensemble, la similarité est en moyenne de 90% avec les souches de RHDV, de 92,9% avec le RCV, de 87% avec le RCV-A1 et de 97,8% avec la souche Ashington de RHDV. Cependant, la similarité diminue encore entre la souche 06-11 et le RHDV, le RCV et le RCV-A1 lorsque l'on considère les séquences qui présentent le plus haut degré de variation (la région C entre les acides aminés 301 et 310 et la région E entre les acides aminés 344 et 434). Ainsi, la similarité entre ces séquences diminue respectivement à 81,2%, 79,2% et jusqu'à 63,4%.

Paradoxalement, la similarité entre la souche 06-11 et la souche Ashington augmente, passant à 95% voire même 100% si l'on ne prend que la portion de la région C hypervariable (301-310). Ainsi, la nouvelle souche 06-11 se rapproche davantage de la souche Ashington d'un point de vue phylogénétique.

## **B. Organisation du génome**

Une des caractéristiques majeures du RHDV par rapport aux autres calicivirus est la présence de seulement deux ORFs au lieu de trois ORFs. Le RCV conserve cette caractéristique, ainsi que le site de clivage spécifique de la RHDV 3C-like protéase comprenant un glutamate en position P1 et une glycine en position P1'. Ces données suggèrent que le processus de maturation de la polyprotéines du RCV est identique à celui de la polyprotéines des différents sérotypes de RHDV (Capucci *et al.*, 1996b).

La séquence génomique du RCV a été alignée avec la séquence homologue du RHDV-B589 italien. Cet alignement permet de constater une différence au niveau du codon d'initiation de l'ORF2. Ainsi, le codon initiateur supposé de l'ORF2 du sérotype italien est absent chez le RCV. En revanche, 9 nucléotides plus loin, un second codon initiateur AUG correspondant à un second cadre de lecture chez le RHDV correspondrait au codon initiateur du RCV. La polyprotéine codée par l'ORF2 du RCV est constituée de 112 acides aminés et présente une identité de 92% avec la polyprotéine du RHDV-B589, les 4 premiers acides-aminés mis à part (Capucci *et al.*, 1996b).

L'organisation génomique est globalement conservée entre le RHDV et le RCV. On peut légitimement penser que cette organisation est aussi conservée au sein des NP-LV en général.

## **C. Propriétés antigéniques et immunogènes**

### **1. Propriétés antigéniques**

Il n'existe pas de test sérologique spécifique aux NP-LV. Les tests utilisés pour connaître le statut sérologique des lapins testés sont les tests ELISA spécifiques du RHDV.

Dans l'étude de Capucci *et al.*, 1997, 242 échantillons de sérum de lapins ont été prélevés au sein d'un élevage commercial de lapins en Italie, majoritairement sur des lapins à l'engraissement (40 jour post-sevrage), mais aussi sur des lapins mâles reproducteurs ainsi que sur des lapines de reproduction, avec ou sans leurs progénitures. Au sein de cet élevage, la dernière vaccination anti-RHDV a eu lieu 2 ans auparavant, et aucun signe de RHDV n'a

jamais été détecté. Sur les 238 lapins prélevés (dont 4 prélevés à 2 reprises), 72,7% se sont révélés séropositifs. Ces résultats suggèrent donc que le RCV italien engendre une réponse antigénique. D'autre part, les lapins à l'engraissement présentent des anticorps à des degrés différents selon leur âge. Les lapins immédiatement en post-sevrage présentent un taux d'anticorps légèrement plus élevé que les lapins à 5-7 jours post-sevrage. Le taux d'anticorps augmente ensuite pour devenir maximal après 20 jours post-sevrage. De plus, les lapereaux issus de mères dont le titre d'anticorps est faible apparaissent séronégatifs, tandis que les lapereaux issus de mère avec un taux d'anticorps élevés sont séropositifs. Par ailleurs, la classe d'Immunoglobuline détectés par IsoELISA varie en fonction de l'âge. 13 à 14 jours post-sevrage, des IgM sont détectés en grande quantité, ainsi que des IgA et parfois des IgG. A 19-20 jours post-sevrage, on observe une augmentation des IgG et des IgA associé à une diminution des IgM qui disparaissent totalement après 30 jours. Seuls les IgG et IgA sont détectés par la suite, que ce soit chez les lapins d'engraissement ou les lapines reproductrices. Enfin, lorsque les lapins à l'engraissement sont déplacés dans des cages différentes avec des lapins séronégatifs, une séroconversion de 90% des lapins s'opère avec une prédominance d'IgM initialement.

Cette étude suggère ainsi la présence d'une séroconversion induite par le RCV, ainsi qu'une transmission de ces anticorps aux lapereaux qui présentent des anticorps d'origine maternelle. La prédominance d'IgM en premier lieu indique que l'infection par le RCV est nouvellement contractée.

Les relations antigéniques entre le RCV et les 2 autres virus spécifiques des lagomorphes que sont le RHDV et l'EBHSV, ont été évaluées dans l'étude de Capucci *et al.*, 1996b, par ELISA de compétition. Les lapins utilisés pour cette étude sont des lapins issus de l'élevage cité précédemment, provenant du pool de lapin nouvellement infectés suite à l'introduction de lapins séropositifs à l'engraissement. Les sérums de 7 lapins séropositifs pour le RCV ont ainsi été testés en compétition avec du sérum polyclonal ou des anticorps monoclonaux anti-RHDV et anti-EBHSV. Les sérums des 7 lapins ont été capables de rivaliser avec tous les anticorps monoclonaux et le sérum polyclonal anti-RHDV pour fixer le RHDV, de la même façon que des sérums de lapins en convalescence d'une infection par le RHDV. On observe cependant un titre en anticorps inférieur dans le cas des lapins infectés par le RCV, de 10 à 20 fois inférieur aux titres observés chez les lapins convalescents. Cela peut s'expliquer par une réplication du RHDV beaucoup plus active que pour le RCV et/ou par son tropisme différent. En revanche, la compétition pour la fixation de l'EBHSV avec les anticorps monoclonaux et le sérum polyclonal anti-EBHSV a révélé un titre en anticorps très

faible voire nul. Ceci confirme que les profils antigéniques du RHDV et du RCV sont proches, le RCV partageant probablement de nombreux épitopes avec le RHDV. En revanche, les profils antigéniques du RCV et de l'EBHSV sont bien distincts.

L'étude de Forrester *et al.*, 2007, concernant un autre virus apparenté au RHDV de type NP-LV mais distinct du RCV italien, a été menée sur l'île de Lambay. Sur 11 sérums collectés sur des lapins apparemment sains, 10 présentent des anticorps détectables par test ELISA spécifique du RHDV, dont 9 avec un titre d'anticorps supérieur à 1 :1280 confirmant la circulation massive et efficace du virus au sein de la population de lapin de l'île.

De la même façon, la récente étude de Strive *et al.*, 2010, à propos du RCV-A1 australien, a montré la présence d'anticorps anti-RCV en utilisant le test ELISA spécifique du RHDV. Là encore, l'utilisation de l'ELISA de compétition a permis la distinction entre les IgM, IgA et IgG. Ainsi, on observe chez les lapins traités avec le RCV-A1 une séroconversion au bout du 7<sup>ème</sup> jour post-infection avec production d'IgM et d'IgA dans un premier temps, puis disparition des IgM 2 à 3 semaines post-infection. Les IgG apparaissent à partir du 11<sup>ème</sup> jour.

Enfin, l'étude de Le Gall-Reculé *et al.*, 2011, sur la souche 06-11 isolée en France, a montré une séropositivité de 38% des lapins à J0, de 88% à J6 et de 94% à J13. Par ailleurs, 24 lapins séropositifs à J6 ont été testés avec un ELISA de compétition et un Iso-ELISA. Aucun lapin n'était positif pour le cELISA ainsi que pour les IgM et IgA (titre <10). La moitié des lapins testés se sont révélés positifs pour les IgG.

L'ensemble de ces études convergent donc vers l'idée que d'une part, les différents RCVs sont antigéniquement proches du RHDV, et d'autre part permettent une séroconversion rapide au sein des populations de lapins infectés. La séroconversion paraît cependant plus ou moins durable selon la souche de NP-LV considérée.

## 2. Propriétés immunogènes

Malgré une antigénicité proche entre le RHDV et le RCV, l'immunogénicité engendré par l'infection du RCV n'est pas évidente. Plusieurs études ont été menées afin de savoir si une infection par le RCV protège efficacement contre une infection par le RHDV, et on observe des résultats contradictoires.

L'étude de Capucci *et al.*, 1996b, montre expérimentalement l'induction d'une immunité protectrice contre le RHDV. Des lapins séroconvertis suite à l'infection par le RCV

ainsi que des lapins séronégatifs sont soumis à une épreuve virulente par inoculation intramusculaire de RHDV. L'intégralité des lapins séropositifs (4/8) survit à cette épreuve, tandis que les autres (4/8) sont sacrifiés après avoir présentés les symptômes typiques de la RHDV. Dans le cas du RCV italien, il semble donc qu'un titre d'anticorps assez faible (10 à 20 fois plus faible qu'après une infection par le RHDV) confère une protection suffisante contre le RHDV.

L'étude de Strive et *al.*, 2010, portant sur le RCV-1 australien montre des résultats plus mitigés concernant les propriétés immunogène du RCV. Quatre lapins inoculés par voie orale avec le RCV-1 et présentant une séroconversion sont inoculés avec du RHDV par voie orale. Sur ces 4 lapins, 2 (50%) ont survécu dont 1 après un court épisode d'hyperthermie, 1 a été euthanasié après avoir développé des signes cliniques d'hépatite aiguë (retrouvé dans les symptômes de la RHDV) et le dernier est mort de façon brutale après un pic d'hyperthermie sans autres signes cliniques. Il semblerait que le titre en anticorps influe directement sur les chances de survie. Ainsi, les deux lapins qui ont survécu présentaient les plus haut titres en anticorps, avec toutes les classes d'immunoglobulines représentés et précisément, les IgM non détectés chez les deux lapins qui ont succombé à l'infection. Le faible nombre de lapins utilisés ne permet pas de faire de conclusion générale mais permet de relativiser l'étude de Capucci et *al.*, 1996b.

Concernant le nouveau NP-LV 06-11, il apparait ne conférer aucune protection. En effet, sur 10 lapins présentant un titre en anticorps élevé, 90% sont morts suite à l'ingestion d'herbe provenant d'une zone contaminée par le RHDV (infection naturelle). Afin de valider cette non-protection, 3 lapins présentant un titre en anticorps élevé ont été inoculés par voie intramusculaire avec le RHDV et mis en contact avec 2 autres lapins, placés dans une cage distincte, présentant aussi un titre en anticorps élevé. Les 5 lapins sont morts dans un délai de 2 à 6 jours (Le Gall-Reculé et *al.*, 2011).

Les virus apparentés au RHDV de type RCV semblent pouvoir conférer une protection contre une infection par le RHDV mais de façon aléatoire, principalement lié à la réponse immunitaire post-infection par le RCV. Les différentes souches de RCVs semblent aussi ne pas être identiques au niveau de leur efficacité à engendrer une protection contre le RHDV.

#### IV. Epidémiologie des calicivirus apparentés au RHDV

##### A. Population atteinte

###### 1. Espèce cible

Le RHDV et l'EBHSV étant spécifique de leurs hôtes respectifs, on peut se demander s'il en est de même pour les virus non-pathogène apparentés au RHDV de type RCV.

Pour cela, 6 lapins de garenne et 6 lièvres initialement séronégatifs ont été inoculés avec le RCV par voie oronasale. Des tests sérologiques ELISA spécifiques du RHDV ont été réalisés 5 jours post-infection. Tous les lapins ont été testés séropositifs alors qu'aucun des lièvres n'a présenté de séroconversion. Pour confirmer cette absence de séroconversion, 2 lièvres ont été sacrifiés à 5 jours post-infection et des RT-PCR réalisés sur leurs organes sont ressorties négatives (Capucci et *al.*, 1996b). Par ailleurs, une épreuve virulente chez les lapins et les lièvres précédents avec respectivement le RHDV et l'EBHSV a été réalisée. On observe alors la survie de l'ensemble des lapins, alors que tous les lièvres présentent les symptômes typiques de l'EBHS (Capucci et *al.*, 1996b).

Cette étude suggère ainsi que le RCV est aussi spécifique que le RHDV pour les lagomorphes de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Cependant, aucune étude n'a été menée chez d'autres lagomorphes.

###### 2. Facteurs de sensibilité

Le principal facteur de sensibilité étudié est l'âge et comme pour le RHDV (cf. I/II.A.2.) il semble que ce soit le facteur déterminant pour qu'un lapin soit infecté par le RCV (et probablement plus largement par les NP-LV). En effet, pour le RCV, on observe initialement une prédominance des IgM, d'origine maternelle, chez les lapereaux, suivi par une diminution du titre en anticorps jusqu'à l'âge de 5 semaines environ. Par la suite, et au contact d'animaux séropositifs, on observe une séroconversion des jeunes lapins avec une augmentation du titre en anticorps avec au bout de 6 à 8 semaines, une prédominance d'IgG (Capucci et *al.*, 1996b).

Cela suggère, comme pour le RHDV, que les très jeunes lapereaux ne peuvent pas être infectés, soit par déficit des récepteurs au virus, soit par présence des anticorps d'origine maternelle, soit une combinaison des deux. Il ne semble pas y avoir de différence en fonction de la race, du sexe, etc.

## B. Répartition géographique et impact

De nombreuses études ont mis en évidence différentes souches de virus apparentés au RHDV, longtemps appelées génériquement RCV (Rabbit Calicivirus) et plus récemment regroupées sous le terme NP-LV (Non-Pathogen Lagovirus) (Le Gall-Reculé et *al.*, 2011). Il apparaît que de tels virus existent un peu partout dans le monde, notamment en Europe (Lambay virus, RCV, 06-11) et en Océanie (RCV-A1). (Capucci et *al.*, 1996b, Forrester et *al.*, 2007, Strive et *al.*, 2010, Le Gall-Reculé et *al.*, 2011).

Le premier NP-LV à avoir été identifié est le RCV italien. L'étude de Capucci et *Al* a ainsi montré l'existence du RCV et sa capacité à engendrer la production d'anticorps protecteurs contre le RHDV. Dans une population de lapins donnée, le RCV se transmet facilement par contact direct ou indirect.

Plus tard, l'étude de Bruce et Twigg, 2004, a montré l'existence d'un tel virus, le RCV-A1, en Australie. En effet, 2 mois avant l'arrivée connue du RHDV à Kojaneerup, des lapins ont été testés positifs au test IsoELISA pour les IgG, et négatifs (titre <10) avec le cELISA, indiquant une infection par un NP-LV. La réalisation de sérologie entre l'arrivée du RHDV en septembre 1996 et août 1999, date de réintroduction du RHDV délibérée, a montré la persistance du NP-LV chez ces lapins. Ce virus ne semblait conférer qu'une protection partielle au moment de l'émergence de la RHD en septembre 1996. Cependant, la population de lapins concernée n'a plus montré de signes cliniques de RHD avant août 1999. La mortalité des lapins exposés au RHDV à ce moment là est apparue corrélée avec le titre en IgG décelé par IsoELISA.

Ces deux études semblent suggérer que les NP-LV pourraient moduler l'impact de la RHD au sein des populations infectées.

Elles sont d'ailleurs corroborées par une étude de White et *al.*, 2001, qui propose un schéma mathématique pour expliquer l'impact de la cohabitation d'une souche pathogène et d'une souche apathogène de RHDV sur la survenue de la maladie. Ainsi, cette étude suggère que lorsqu'une souche apathogène de RHDV prédomine, le RHDV entraîne seulement une mortalité passagère alors que dans le cas contraire, on aura une répétition d'épizooties de RHDV, qui pourrait dans l'absolu conduire à l'extinction de l'espèce hôte.

D'autres études ont suspecté la présence d'un NP-LV sur le continent australien, démontrant que la mortalité liée au RHDV dans les régions plus fraîches et humides australiennes était plus faible. Cooke et *al.*, 2002, ont ainsi établi une relation linéaire entre la

diminution de la mortalité liée au RHDV et l'augmentation des pluies annuelles, propice au RCV-A1 identifié plus précisément par Strive et *al.*, 2009. Cette étude suggère que le RHDV pourrait engendrer une pression de sélection positive sur le RCV-A1, qui pourrait alors subir des mutations lui permettant de conférer une immunité protectrice envers le RHDV. De plus, une recombinaison entre le RCV-A1 et le RHDV ne peut être écartée.

Dans une autre étude menée au Royaume-Uni, les populations de lapins sauvages présentent une séroprévalence pour la RHDV élevée en l'absence de signes cliniques. Il semblerait qu'une souche de RHDV à priori non-pathogène entraîne une infection persistante sans mortalité associée. Ne pouvant être distinguée de la souche virulente par analyse phylogénétique, l'étude de White et *al.*, 2004, émet la possibilité d'une circulation d'une souche de RHDV sous deux formes, l'une pathogène, l'autre apathogène. Elle suggère aussi que la différence de pathogénicité pourrait être liée à la taille de l'inoculum.

### **C. Transmission et sources virales**

Toujours dans l'étude de Capucci et *al.*, 1996b, différentes voies de transmission ont été testées en milieu expérimental. Pour cela, 8 lapins de garenne sont inoculés par voie oronasale avec un homogénat intestinal d'animaux infectés. Ces 8 lapins sont divisés en 4 lots dans 4 cages distinctes avec un lapin séronégatif. Une 5<sup>ème</sup> cage contenant deux lapins séronégatifs est disposée dans la même salle à une distance suffisante pour éviter une éventuelle contamination par contact direct ou par les fluides corporels des autres lapins.

Les lapins sont testés sérologiquement avec un test ELISA spécifique du RHDV après 5 jours post-infection. Les lapins inoculés par voie oro-nasale se révèlent être séropositifs, tout comme les lapins placés en contact direct avec ces derniers, mais 1 à 2 jours plus tard. Enfin, les lapins placés à distance restent séronégatifs jusqu'à la fin de la période d'observation de 24 jours. Des RT-PCR sur organes de lapins sacrifiés ont aussi été réalisées, confirmant la présence du virus principalement, voire exclusivement au niveau intestinal.

Cette étude suggère que la transmission peut se faire par contact direct, mais à priori pas par voie aérienne. Il a aussi été montré que l'excrétion virale pouvait se faire dans les fécès jusqu'à 7 jours post-infection pour le RCV-A1 et que le virus pouvait être détecté au moins jusqu'à 2 mois post-infection dans la bile (Strive et *al.*, 2010).

## V. Origine supposée du RHDV et arbre phylogénétique (Moss et *al.*, 2002)

De nombreuses études ont été réalisées, que ce soit au sujet de souches pathogène ou non-pathogène du RHDV, afin d'étudier la phylogénie du RHDV et de ses virus apparentés et d'en identifier l'origine.

Les études phylogénétiques se sont fondées sur la séquence du gène codant pour la protéine de capsid VP60 pour établir un arbre phylogénétique. Huit groupes de RHDV, comprenant les NP-LV, ont ainsi été identifiés et sont présentés dans la figure 7. Bien que l'arbre obtenu jusqu'à présent soit holophylétique (ou monophylétique selon la définition de Hening), les génomes viraux présentent des variations significatives. Cette différence est particulièrement importante concernant la souche virale Ashington.

Le groupe 1 contient deux virus proches d'un point de vue antigénique mais génétiquement distinct, le RCV, souche italienne de NP-LV, et le virus Ashington, souche pathogène de RHDV. Récemment, une souche de NP-LV, le virus Lambay, a été ajoutée à ce groupe, présentant une identité de 84,9% avec la souche Ashington et de 81% avec le RCV. Il semblerait que la lignée incluant les souches Ashington et Lambay ait émergé après la divergence de la lignée du RCV (Forrester et *al.*, 2007). Récemment, la souche 06-11 française a été rapprochée de la branche contenant la souche Ashington (Le Gall-Reculé et *al.*, 2011). Enfin, le NP-LV australien RCV-A1 forme une branche distincte de celle contenant les trois précédentes souches citées. Des analyses récentes des différentes souches de RCV-A1 isolées montrent qu'elles forment un groupe holophylétique (monophylétique) pouvant être subdivisé en 6 clades (Jahnke et *al.*, 2010). Le RCV-A1 pourrait ainsi former un 9<sup>ème</sup> groupe, distincts des 8 groupes identifiés.

Le groupe 2 contient les souches virales allemandes et italiennes, ainsi que le virus Rainham isolé en Grande-Bretagne et présentant la particularité de ne pas être hémagglutinant.

Le groupe 3 contient exclusivement des souches britanniques, qui se sont dispersées par la suite un peu partout, pathogènes et apathogènes. Il apparaît que ces deux types de souches ne sont pas facilement distinguables l'une de l'autre par analyse phylogénétique du gène codant pour la protéine de capsid VP60. La souche la plus ancienne de ce groupe est une souche isolée à partir du sérum d'un lapin d'élevage sain, prélevé en 1959. La plus récente date de l'année 2000, isolée à partir du sérum d'un lapin de garenne mort de RHD. Les souches Meiningen et Hagenow semblent assimilées à ce groupe (Le Gall-Reculé et *al.*, 2004).

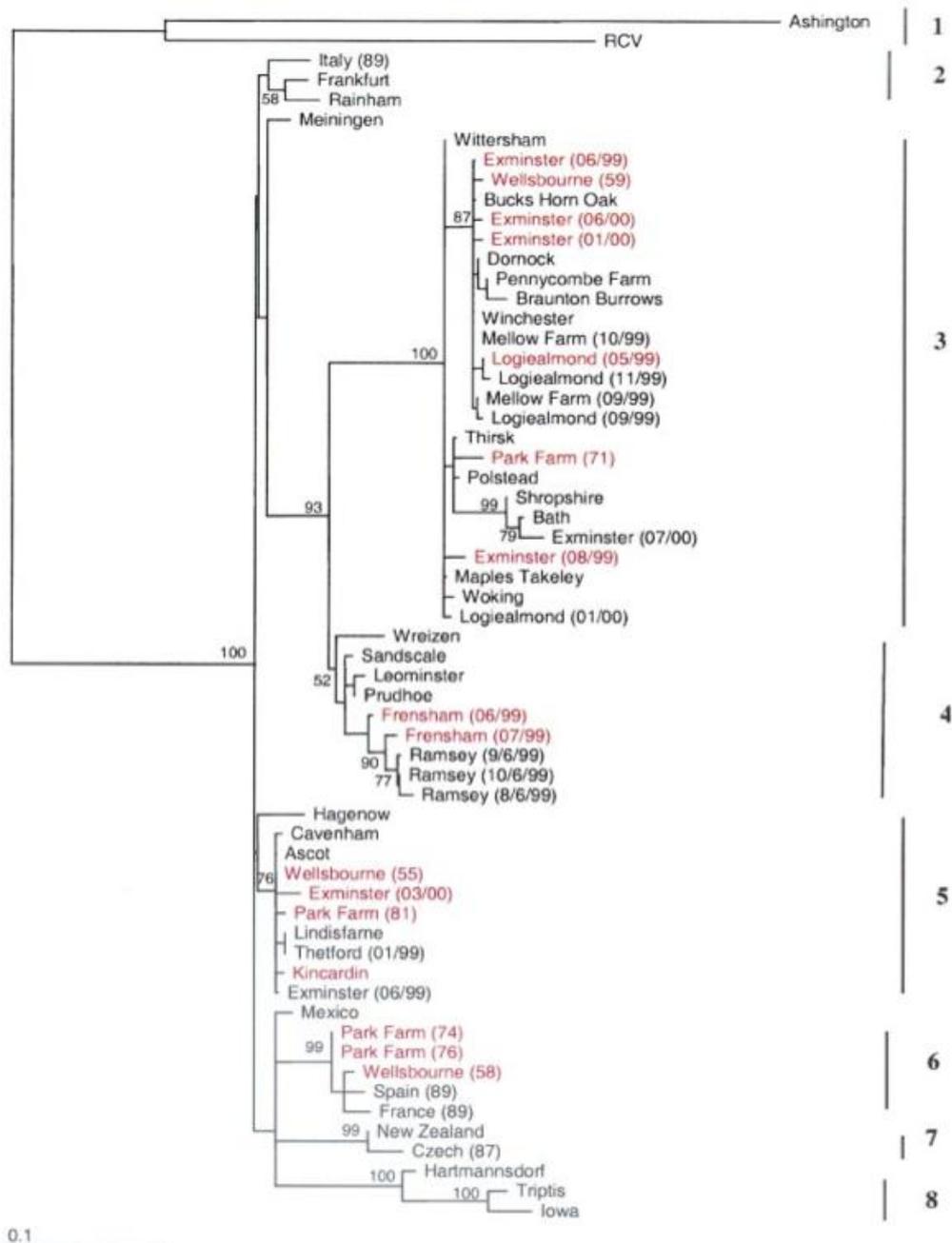
Le groupe 4 contient des souches isolées de lapins de garenne sur les îles Ramsey et Sandscale sur la côte ouest de la Grande-Bretagne, et à Frensham dans le sud de l'Angleterre. Les souches de ce groupe sont très proches du virus Wreizen, souche pathogène, isolée en Allemagne en 1993.

Le groupe 5 est indépendant et contient la première souche isolée en Grande-Bretagne en 1955, chez un lapin d'élevage sain à Littlehampton (souche Wellsbourne). Ce groupe contient aussi la grande majorité des souches isolées en France depuis 1998, ainsi que les souches, pathogènes et apathogènes, isolées en 2000 (Marchandeaudeau et *al.*, 2005) La souche Wreizen isolée en Allemagne en 1996 y est aussi incluse (Le Gall-reculé et *al.*, 2003).

Le groupe 6 contient majoritairement des souches issues de lapins d'élevage sains collectés entre 1974 et 1976 en Grande-Bretagne. On trouve cependant assimilées à ce groupe, deux souches pathogènes isolées en Espagne et en France en 1989.

Le groupe 7 contient des souches tchécoslovaques et néo-zélandaises, cette dernière dérivant du premier.

Enfin, le groupe 8 contient 2 souches allemandes ainsi qu'une souche isolée lors d'une épizootie de RHD aux USA en 2000.



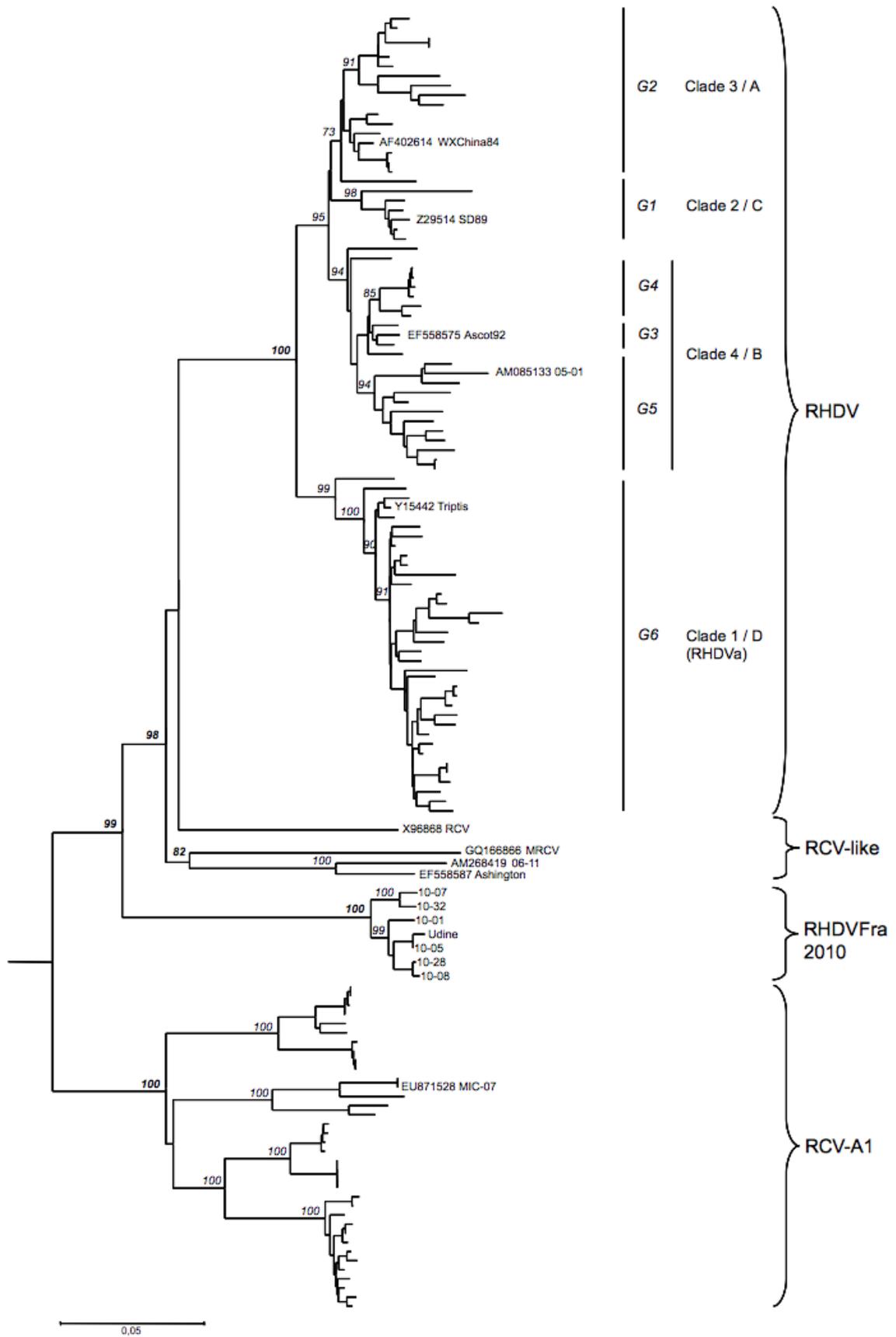
**Figure 7** : Arbre phylogénétique (Neighbor joining, 1000 répliques) utilisant les séquences partielles de protéines de capsid 61 souches de RHDV. Le nombre entre parenthèses indique l'année d'isolement du virus. Les séquences virales obtenues à partir de lapins sains sont mises en évidence en rouge. L'arbre a été obtenu avec le logiciel PAUP\* (d'après Moss et *al.*, 2002).

Les nouvelles études concernant les NP-LV ont permis l'obtention d'un autre arbre phylogénétique présenté dans la figure 8.

Sur cet arbre, la nomenclature utilisée pour identifier les différents groupes est différente. On distingue les souches de RHDV standard regroupées en groupes de 1 à 6 selon la nomenclature utilisée par Le Gall-Reculé et *al.*, 2003, et en clade de 1 à 4 ou A à D selon les nomenclatures respectives utilisées par Kerr et *al.* ; 2009, et Kinneart et *al.*, 2010.

On constate aussi que l'ensemble des NP-LV qui regroupe les RCV-like autour du RCV italien, et les RCV-A1 qui sont les souches non pathogènes australiennes se détachent de ces groupes.

Les nouvelles souches pathogènes françaises (RHDVFra 2010) sont bien distinctes des précédentes souches pathogènes isolées, et se retrouvent proche du groupe des NP-LV.



**Figure 8** : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining, 1000 répliques) utilisant les séquences nucléotidiques du gène de la VP60, isolées chez 124 lapins. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont indiquées aux nœuds en italique. Le EBHSV Z69620 est utilisé pour enracer l'arbre (Le Gall-Reculé, communication personnelle).

**TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

**TROISIEME PARTIE :**  
**ETUDE EXPERIMENTALE**

Notre étude fait suite à un programme de recherche, débuté en 2006, sur la caractérisation de souche apathogène du RHDV (NP-LV). Cette caractérisation ne devait pas seulement permettre d'isoler ces souches mais doit également aboutir à leur description précise, c'est-à-dire au séquençage et à la détermination précise de leur pathogénicité et de leur immunogénicité.

Le projet auquel appartient notre étude a débuté en 2008. Il s'agit du projet FNC « Comprendre la complexité des interactions entre les populations de lapins et les populations de lagovirus pour optimiser la gestion des populations de lapins ». Ce projet a pour but d'échantillonner et de caractériser des souches de NP-LV dans les populations de lapins de sauvages et de déterminer leur pathogénicité ainsi que la protection croisée induite ou non vis-à-vis d'une infection avec le RHDV. Il a aussi pour but d'étudier les relations phylogénétiques entre les différentes souches de RHDV et NP-LV. Enfin, il devrait permettre la mise au point de méthode simple de recherches de ces souches de NP-LV sur le terrain. Ce programme est piloté par Stéphane Marchandeau de l'ONCFS-Nantes et associe l'ANSES-Ploufragan (Ghislaine Le Gall) et l'INP-ENVT (Stéphane Bertagnoli).

Ces dernières années, les études concernant les souches de NP-LV se sont multipliées (cf. 2<sup>ème</sup> partie). Au départ, l'analyse sérologique a permis de suspecter leur existence par la mise en évidence de lapins séropositifs à la RHDV, en l'absence totale de signes cliniques. Il s'est ainsi avéré que les tests sérologiques utilisés pour la détection du RHDV n'étaient pas spécifiques de ce dernier. La présence de ces souches apathogènes, plus ou moins protectrices envers une infection avec le RHDV, pose la question de l'interaction entre l'hôte (*Oryctolagus cuniculus*) et les différentes souches de RHDV (pathogènes et apathogènes) ainsi que la question d'une compétition entre les souches pathogènes et apathogènes du virus.

Par la suite, de nombreuses études ont identifié et isolé plusieurs souches de NP-LV, en ont obtenu les séquences partielles, celle de la protéine majeure de capsid VP60, et ont pu procéder à des analyses phylogénétiques. Ces analyses permettent de mieux connaître et de tenter de comprendre l'évolution du RHDV et de ses variants. Elles posent aussi la question d'une recombinaison possible entre souches pathogènes et apathogènes. Ainsi, le virus Ashington, que l'on pensait pathogène, se rapproche beaucoup de souches apathogènes. Bien

qu'isolé à la base sur un lapin mort et présentant des signes cliniques de RHD, il pourrait finalement être apathogène.

Afin de faire progresser les connaissances sur l'origine et l'évolution du RHDV et de ses variants, nous nous sommes intéressés à une population de lapins sauvages isolée depuis 150 ans sur un archipel inaccessible au grand public, et donc normalement protégé de nouvelles introductions d'animaux sans autorisation. De plus, la RHD n'a jamais été observé sur cet archipel.

Nous débuterons par une présentation rapide des résultats des deux études françaises qui ont précédé la notre au sujet des calicivirus apparentés au RHDV (Projet de recherche ONCFS, ANSES Ploufragan, INP-ENVT). Nous présenterons ensuite nos travaux qui ont consisté à rechercher des virus apathogènes apparentés au RHDV circulant dans la population de lapins sauvages aux Îles Kerguelen.

## **I. Résultats des travaux antérieurs**

### **A. En France métropolitaine**

#### **1. Première étude : 2006 (Fages, 2007, Martin, 2010, Le Gall-Reculé et *al.*, 2011)**

Une première étude a été menée sur des lapins domestiques âgés de 10 à 12 semaines, fournis par l'ANSES. Le protocole initial voulait que ces lapins, indemnes de RHDV au début de l'expérience, servent de sentinelles mises en contact avec des populations de lapins sauvages, sur deux sites d'études distincts, à St-Benoist(78) et à Cerizay(79).

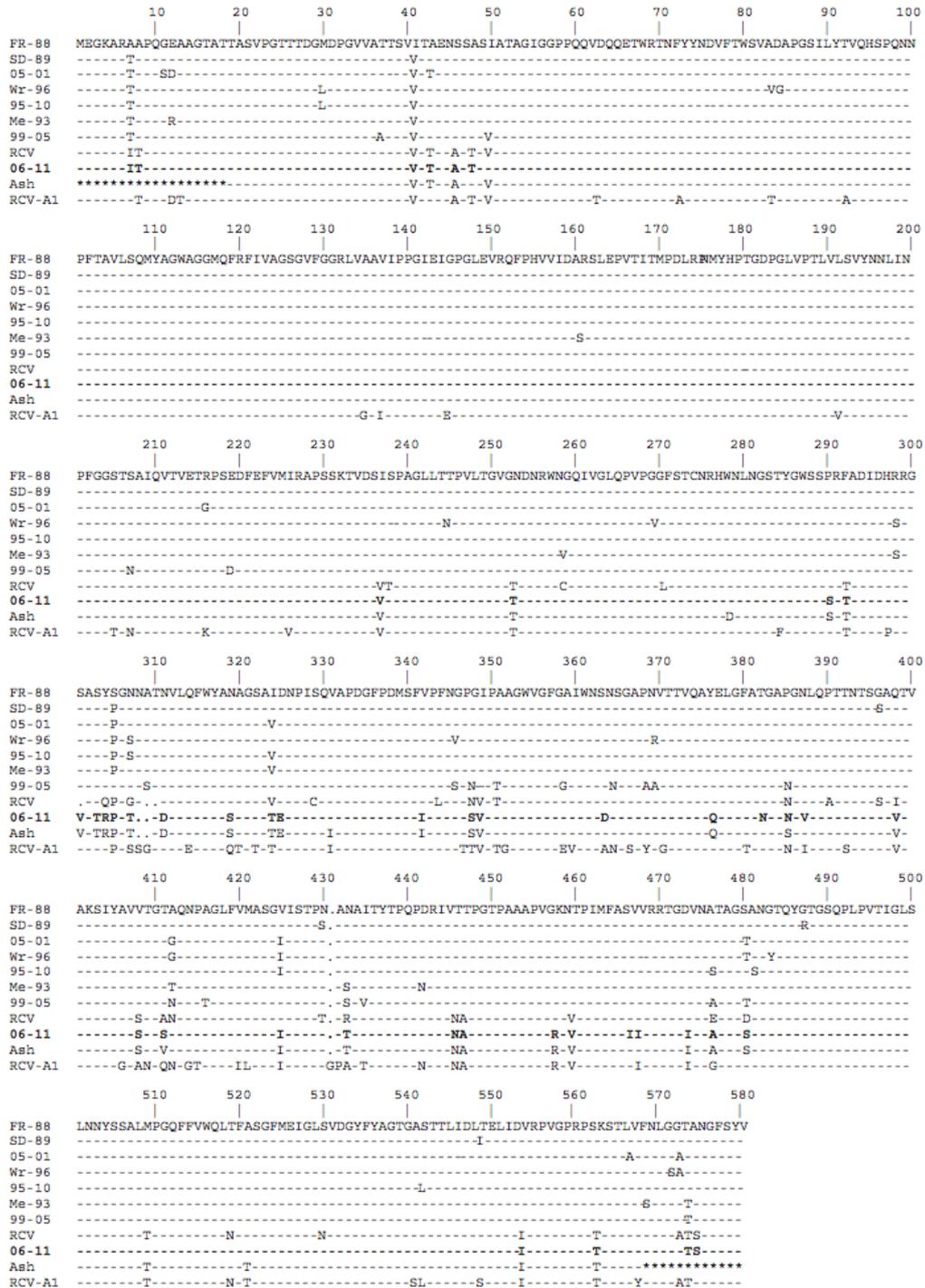
Un suivi sérologique et virologique devait avoir lieu toutes les semaines, les lapins séro-convertis étant alors sacrifiés pour effectuer des prélèvements d'organes afin de rechercher des calicivirus apparentés au RHDV.

Le 31 janvier 2006, 60 lapins ont été transportés depuis l'animalerie de l'ANSES vers les deux sites d'études. Le protocole a cependant été modifié dès le début, un nombre important d'individus (30% sur les deux sites) étant déjà séropositifs en l'absence de signes cliniques. Une semaine après, 83% des lapins étaient séropositifs, dont l'ensemble de ceux du site de St-Benoist. La semaine suivante, 30% des lapins du site Cerizay mourraient en montrant des signes cliniques compatibles avec une infection due au RHDV. Les 4 derniers

lapins restés séronégatifs ont finalement été sacrifiés le 20 février 2006. Les lapins ont été sacrifiés au fur et à mesure de leur séroconversion, comme le protocole initial le prévoyait.

Trois séries de RT-PCR nichées ou semi-nichées, utilisant des amorces distinctes, ont été effectuées sur les échantillons de foie, rate et intestin de 29 lapins sur les deux sites. Des ARN viraux ont été détectés chez 2/3 des lapins, en proportion comparables sur les deux sites, majoritairement dans la rate. Aucune PCR1 n'étant sortie positive, cela suggère que la quantité d'ARN présents dans les organes était très faible. Des séquençages partiels ont tout d'abord été réalisés permettant l'obtention de 3 séquences partielles, présentant deux types de séquence. L'une est proche des séquences « classique » de RHDV pathogène (souche 06-08), les deux autres sont « atypiques » et plus proches de la souche Ashington (souches 06-11 et 06-09). Les souches 06-08 et 06-11 ont été isolées à partir des échantillons d'organe d'un même lapin. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus dans l'étude de Forrester et *al.*, 2009, qui avait permis l'isolement de deux types de souches très distinctes, au sein d'une même population de lapins prélevés mensuellement pendant un an. Dans ce cas là, les deux types de souches n'avaient pas été isolées sur un même individu à un instant t, mais à différentes période de l'année.

De nouvelles PCR ont été mises au point permettant d'obtenir la séquence entière du gène de la VP60 de la souche atypique 06-11, ainsi que les séquences partielles des gènes de la VP60 des souches 06-08 et 06-09. La figure 8 présente l'alignement de la séquence de la VP60 de la souche 06-11 (souche atypique) avec d'autres séquences.



**Figure 9 : Alignement des séquences protéiques du gène codant pour la protéine de capside VP60 de souches de RHDV pathogènes et apathogènes, incluant la souche 06-11 (d'après Le Gall-Reculé *et al.*, 2011).**

FR-88 = souche RHDV française caractérisée en 1988 et appartenant à un génotype éteint.

SD89 = souche RHDV française caractérisée en 1989 et appartenant à un génotype éteint.

05-01 = souche RHDV française caractérisée en 2005 appartenant au génotype présent actuellement.

Wr-96 = souche RHDV allemande caractérisée en 1996 appartenant au génotype présent actuellement

95-10 = souche RHDV française caractérisée en 1995, proche de la souche britannique Rainham.

Me-93 = souche RHDV allemande caractérisée en 1993 et appartenant à un génotype éteint.

99-05 = souche française du variant antigénique de sous-type a "RHDVa" caractérisée en 1999.

RCV = souche italienne de NP-LV caractérisée en 1995 sur des lapins domestiques sains.

**06-11** = souche non pathogène apparentée au RHDV, proche de la souche « Ashington ».

Ashington = souche anglaise, dont la pathogénicité est désormais contestée, trouvée sur un lapin de garenne mort (1998).

RCV-A1 = souche australienne de NP-LV caractérisée en 2007.

Cette étude a ainsi permis d'obtenir l'arbre phylogénétique tel que nous l'avons présenté figure 7 (2<sup>ème</sup> partie, V) où l'on constate que la souche 06-11 est regroupée avec la souche Ashington et la souche Lambay.

La souche isolée 06-09 est dans sa partie séquencée quasiment identique à la souche 06-11, puisqu'elle possède 98% d'homologie au niveau nucléotidique et 100% d'homologie au niveau protéique. En revanche, cela n'est pas le cas de la souche 06-08 qui présente 95,5% d'homologie au niveau de la séquence protéique avec la souche 06-11 et le RCV. Elle présente une homologie plus importante avec les souches de RHDV pathogène (96,2%).

Enfin, concernant la souche 06-11, l'étude de Le Gall-Reculé et *al.*, 2011, a démontré qu'elle était très infectieuse, se transmettant rapidement, mais qu'elle n'engendrait pas d'immunité protectrice.

## 2. Deuxième étude : 2009 (Martin, 2010)

Pour cette deuxième étude, l'objectif était de caractériser des souches de variants apathogènes de RHDV au sein des populations sauvages de lapins de Garenne en France. Pour cela, des prélèvements de tissus (intestin grêle et foie) ont été effectués sur des lapins au cours de la saison de chasse 2007-2008 en huit sites distincts répartis dans 3 départements (Dordogne (24), Vienne (86), Finistère (29)). En plus de ces prélèvements, 19 autres ont été ajoutés provenant de lapins de garenne morts durant la saison de chasse 1997 sur l'île de Beniguet. En tout, 115 prélèvements ont été testés.

Le protocole d'étude ne diffère pas de l'étude précédente, hormis les amorces utilisées pour la RT-PCR qui ont été redessinées. Les RT-PCR sont nichées et permettent l'obtention d'un fragment d'ADN de faible taille (371 pb). Des résultats positifs ont été trouvés en 2 des 9 sites d'études, à Plouedern et sur l'île de Beniguet (Département 29).

Cette étude a permis l'isolement de 6 souches de NP-LV, 2 provenant de l'île de Beniguet et 4 de Plouedern. Des séquençages partiels de ces différentes souches ont pu être obtenus ce qui a permis de les comparer aux souches déjà connues.

## **B. Sur l'archipel de Kerguelen**

La RHD n'a jamais été rapporté au sein de la population de lapins sauvages de l'archipel.

Une première étude menée en 2001-2002 sur la population de lapins sauvages vivant sur l'archipel des Kerguelen a montré une séroprévalence faible. Sur 81 échantillons sériques, seuls 2 se sont révélés positifs à l'IsoELISA pour les IgG, à des titres de 1/40 et 1/80 (Cooke *et al.*, 2004).

Une seconde étude a été menée sur 77 échantillons de sérum provenant de lapins issus de 4 sites distincts (Ratmanoff, Pointe Morne, Port-aux-Français et Pointe Molloy), ainsi que 46 en décembre 2004 en 2 sites distincts des précédents (Port-Jeanne d'Arc et Armor). Les sites de prélèvements sont représentés sur la carte 2. Des tests ELISA pour la détection d'anticorps anti-VP60 ont été réalisés sur l'ensemble des échantillons. Au total, 35% des lapins échantillonnés étaient séropositifs, répartis sur 5 des 6 sites de prélèvement. Le seul site de prélèvement pour lequel l'ensemble des lapins échantillonnés fut séronégatif est le Cap Ratmanoff (Marchandeaudeau *et al.*, 2011).

Cette deuxième étude a permis de mettre en évidence la présence de NP-LV en différents endroits de l'archipel des Kerguelen.



**Carte 1 : Origine des prélèvements sanguins (D'après Marchandeau et *al.*, 2011 ; Kaupp, Wikimedia).**

Nous allons donc maintenant nous intéresser à la recherche d'ARN de virus apparenté au RHDV dans les échantillons en provenance de l'archipel de Kerguelen.

## II. Présentation de l'archipel des Kerguelen (Siège des TAAF, 2012)

L'archipel des Kerguelen se situe entre 48°35' et 49°54' de latitude Sud et entre 68°43' et 70°35' de longitude Est, à 2000km des côtes de l'Antarctique.

### Topographie

Sa superficie totale est d'environ 7200km<sup>2</sup>, comprenant une grande île principale couvrant 92% de la superficie, la Grande Terre, et de nombreuses îles et îlots satellites majoritairement très proches de l'île principale. Les côtes de l'archipel sont très découpées et forment de nombreuses baies, golfes et fjords.



**Carte 2** : Carte topographique de l'archipel de Kerguelen (Kaupp, Wikimedia).

Le point culminant, le Mont Ross, se trouve sur la Grande Terre et culmine à 1850m d'altitude.

### **Climat**

Le climat de l'archipel est océanique, froid et venteux, se situant dans les « cinquantièmes hurlants ». Les températures aux extrêmes vont de -10°C à 20°C mais elles se situent le plus souvent entre 2°C et 10°C. Le vent souffle quasi-continuellement à une vitesse moyenne de 35km/h, atteignant régulièrement 150 à 200km/h.

### **Faune**

L'archipel se situe dans une zone où les eaux froides de l'antarctique et les eaux chaudes de l'océan indien se rencontrent et offrent ainsi des conditions favorisant la diversité de la faune. On trouve ainsi en particulier de nombreux mammifères ou oiseaux marins. Cette faune a cependant été amoindrie suite à la surexploitation des ressources mais aussi par l'introduction d'animaux exogènes tels que les lapins, les chats, les rats, etc.

En ce qui concerne plus particulièrement les lapins, ils ont été introduits en 1874 et ont persisté depuis. On les retrouve ainsi désormais principalement sur la Grande Terre, l'île principale, mais aussi sur six îles plus petites. Leurs effets sur la végétation locale ont été rapides et dévastateurs. Des plantes tels que le chou des Kerguelen (*Pringlea antiscorbutica*) ou l'azorelle (*Azorella selago*) ont quasiment disparu sur une large partie du territoire, ne persistant qu'en de rares endroits, inaccessibles aux lapins, sur les plateaux rocheux de plus à plus de 200m d'altitude (Cooke et *al.*, 2004). Plusieurs tentatives d'éradication ont été entreprises. Le virus de la myxomatose a ainsi été introduit en 1955 mais ne s'est pas répandu de façon homogène sur toute la surface de l'île. Se transmettant par contact entre les lapins, il est resté cantonné proche de son lieu d'introduction (Chapuis et *al.*, 1994).

En 1987, la puce du lapin (*Spilopsyllus cuniculi*) a été introduite pour faciliter la transmission du virus de la myxomatose. Celle-ci s'est répandue sur l'île et a permis d'augmenter le nombre de lapins infectés par la myxomatose. En effet, la proportion de lapins présentant des anticorps anti-virus myxomateux passa de 34% en 1987 à 85% en 1998 (Chekchak et *al.*, 2000).

### **Histoire**

L'archipel fut découvert en février 1772 par le navigateur Yves Joseph Kerguelen de Trémarec et 4 ans plus tard par James Cook. Ce n'est qu'en 1893 que l'avis français Eure

prend possession des îles Kerguelen au nom de la France. Le gouvernement autorise alors son exploitation par les frères Henry et René-Emile Bossière. Par la suite, de nombreux scientifiques explorent et étudient l'archipel.

### III. Matériels et méthodes

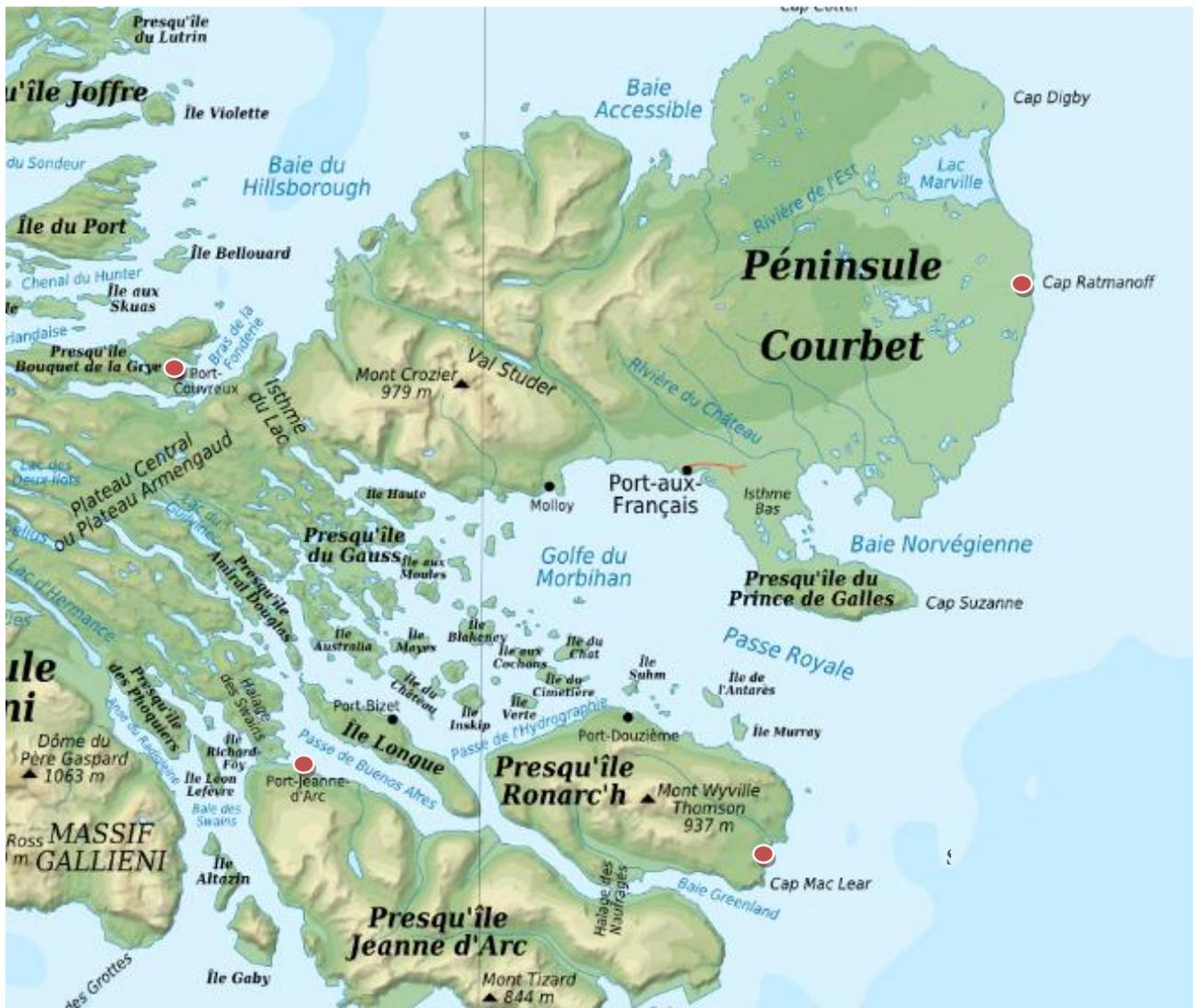
#### A. Origine des prélèvements

Des prélèvements d'intestin grêle ont été réalisés sur des lapins prélevés lors des périodes de chasses et hors chasse, entre 2004 et 2008 sur les Îles Kerguelen en 4 sites distincts.

Lieu	Année	Code	Nombre
Port Jeanne d'Arc	2004	PJDA04 1-3	3
Port Jeanne d'Arc	2007	PJDA07 1-15	9
Port Couvreur	2007	POC05,07 1-15	15
Port Couvreur	2007	POC10,07 1-9	9
Ratmanoff	2007	RAT04,07 1-15	15
Ratmanoff	2007	RAT07,07 1-15	15
Ratmanoff	2008	RAT08,08 1-15	15
Sourcils Noirs	2007	SN09,07 1-7	7
Sourcils Noirs	2008	SN08,08 1-15	15

**Tableau 1** : Origine des prélèvements des tissus.

La carte 3 présente les sites de provenance des lapins sur la carte des Îles Kerguelen.



**Carte 3:** Origine des prélèvements des tissus (Kaupp, Wikimedia).

Les prélèvements sont congelés dans des eppendorfs individuels sur lesquels figurent le numéro de l'animal, puis ils sont envoyés à l'ENVT et à l'ANSES de Ploufragan.

Au laboratoire, ces échantillons sont traités pour obtenir les ARN Totaux. S'en suit une RT-PCR qui s'effectue avec des amorces spécifiques des protéines VP60. Ces manipulations sont réalisées dans le laboratoire IHVV au sein de l'UMR 1225 INRA-ENVT.

## **B. Recherche du virus par RT-PCR**

La première étape consiste en l'extraction des ARN Totaux au TRIzol Reagent®. La deuxième étape consiste en une reverse transcriptase qui va permettre l'obtention d'ADNc. Ce dernier subira deux PCR utilisant des amorces spécifiques de la protéine VP60.

## 1. Extraction de l'ARN

Les prélèvements dont il faut extraire l'ARN proviennent tous d'intestin grêle. Pour cette étape, des gants, des pipettes réservées à la manipulation d'ARN et des tubes eppendorfs stériles sont utilisés. La manipulation s'effectue sous une hôte réservée à cet usage pour éviter les contaminations par des ARNase.

Cette étape d'extraction est suivie par une étape de nettoyage de l'ARN obtenu à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Clean-up (Macherey-Nagel).

Le TRIzol Reagent (TRIzol Reagent, manuals) est un réactif prêt à l'emploi permettant l'extraction de l'ARN total de tissus provenant d'animaux, plantes, levures, bactéries en une heure. C'est une solution monophasique de phénol, isothiocyanate de guanidine et d'autres composés qui facilitent l'isolation des ARN de taille moléculaire variable. Le TRIzol permet de préserver l'intégrité de l'ARN durant la manipulation par inhibition de l'activité ARNase lors de rupture et la dissolution cellulaire pendant l'homogénéisation.

Après homogénéisation du tissu avec le TRIzol Reagent, du chloroforme est ajouté. Ceci permet l'obtention de trois phases : une phase aqueuse translucide contenant l'ARN extrait, une phase intermédiaire et une phase organique rouge contenant de l'ADN et les protéines.

Le protocole suivi est le suivant :

Découpe : Sous hôte, deux fragments du prélèvement sont découpés (5mmx5mm environ) et placés dans deux eppendorf de 1,5mL. Un seul fragment est traité, l'autre est replacé au congélateur.

Homogénéisation : 1ml de TRIzol Reagent est ajouté puis on broie l'échantillon à l'aide d'une sonde afin d'obtenir un homogénat. Entre chaque échantillon traité la sonde utilisée est nettoyée en suivant ce protocole : 1<sup>er</sup> rinçage avec de l'eau distillée, 2<sup>ème</sup> rinçage à l'eau bouillante, 3<sup>ème</sup> et dernier rinçage avec de l'eau DEPC (RNase et DNase free).

Séparation des phases : On ajoute 250µL de CHCl<sub>3</sub> (Chloroforme) puis on agite 15s le mélange. L'eppendorf est laissé 10 min à température ambiante. S'en suit une centrifugation de 15min à 11750g à 4°C. On obtient alors 3 phases : seule la phase supérieure incolore contient l'ARN. On prélève cette phase et on la transfère dans un nouvel eppendorf de 1,5mL contenant 500µL d'isopropanol.

Précipitation de l'ARN : On mélange la solution obtenue précédemment par inversion puis on laisse incuber 10min à température ambiante. L'isopropanol a fait précipité l'ARN qui n'est pas encore visible. S'en suit une centrifugation de 10min à 11750g. On obtient alors un surnageant translucide et un culot gélatineux blanchâtre d'ARN.

Lavage de l'ARN : On élimine le surnageant et on ajoute 1mL d'éthanol à 70°. S'en suit une centrifugation de 5min à 4°C à 7500g.

Séchage de l'ARN : On élimine un maximum de surnageant puis on sèche le culot d'ARN sous hôte stérile à température ambiante.

Dissolution de l'ARN : On ajoute 100µL d'eau DEPC pour dissoudre l'ARN puis on le conserve à -80°C.

## 2. Nettoyage de l'ARN

On utilise pour cela le NucleoSpin® RNA Clean-up (Macherey-Nagel) (RNA Clean-Up, User Manual). Cette étape est nécessaire pour garantir l'absence d'inhibiteur de la RT-PCR et stabiliser l'ARN précédemment obtenu.

Le protocole suivi est celui donné par le fabricant. Il est décrit dans le tableau ci-dessous:

<p><b>Préparation de l'échantillon</b>            Pré-mélange : 350µL RA1                              350µL Ethanol            + 100µL ARN            ⇒ Mélanger avec le vortex</p> 	<p><b>2 Fixation de l'ARN à la membrane</b>            Placer une colonne dans un eppendorf fourni            Charger les 700µL            Centrifuger 30s à 8000g</p> 
<p><b>Lavage et séchage de la membrane</b>            Changer l'eppendorf à chaque fois.            1<sup>er</sup> : 200µL RA2            ⇒ Centrifuger 30s à 8000g            2<sup>ème</sup> : 600µL RA3            ⇒ Centrifuger 30s à 8000g            3<sup>ème</sup> : 250µL RA3            ⇒ Centrifuger 2min à 11000g</p> 	<p><b>4 Elution de l'ARN purifié</b>            Ajouter 60µL d'eau RNase free            ⇒ Centrifuger 1min à 11000g</p> 

**Tableau 2** : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® RNA Clean-Up (RNA Clean-Up, User Manual).

### 3. Réalisation de la RT

On réalise maintenant la reverse-transcription qui va nous permettre d'obtenir l'ADNc. Pour cette manipulation, nous utilisons des amorces aléatoires (Random Primer 1/12<sup>ème</sup>) ainsi que de la Superscript® (Invitrogen). Il s'agit d'une reverse transcriptase thermostable issue de la reverse-transcriptase M-MLV. Elle permet de réduire l'activité RNase pour obtenir des ADNc plus complets, et à une température optimale de 50°C ce qui accroît la spécificité gène-amorce.

Le protocole est le suivant :

Préparation du mélange : Dans un eppendorf de 1,5mL, on ajoute au 10µL d'ARN extrait : 1µL de Random Primer au 1/12<sup>ème</sup>, 1µL d'eau RNase free.

Etapas d'incubation :

- On laisse incuber 5min à 65°C, puis on met l'eppendorf dans la glace. Centrifugation
- On ajoute 4µL de Tampon 5X, 1µL dNTP et 1µL de RNAsine + 0,5 µL de Superscript®.
- On laisse incuber 10min à 25°C.
- On laisse incuber 50min à 42°C.
- On laisse incuber 10min à 70°C. A cette température, la réaction est inactivée.

On finit par centrifuger et mettre dans la glace.

Un deuxième protocole a été utilisé, remplaçant la Superscript® (Invitrogen) par la Revert Aid™ H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas). Le protocole pour son utilisation est le suivant :

Préparation du mélange : Dans un eppendorf de 1,5mL, on ajoute au 10µL d'ARN extrait : 1µL de Random Primer au 1/12<sup>ème</sup>, 1µL d'eau RNase free.

Etapas d'incubation :

- On laisse incuber 5min à 65°C, puis on met l'eppendorf dans la glace. Centrifugation.

- On ajoute 4µL de Tampon 5X, 2µL dNTP et 0,5µL de Ribolock + 1µL de RevertAid™
- On laisse incuber 10min à 25°C.
- On laisse incuber 60min à 42°C.
- On laisse incuber 10min à 70°C. A cette température, la réaction est inactivée.

On fini par centrifuger et mettre dans la glace.

C'est ce deuxième protocole qui a été utilisé en majorité, sur tous les échantillons.

#### 4. PCR semi-nichées

Cette étape va nous permettre de rechercher spécifiquement si un virus apparenté au RHDV est présent au sein de l'ADNc obtenu d'après les différents ARN présents dans le prélèvement. Si tel est le cas, le gène codant pour la protéine VP60 sera amplifié et pourra être révélé par électrophorèse ensuite.

Les amorces utilisées ont été redessinées à partir de la séquence connue du gène codant pour la VP60 ainsi que des séquences obtenues lors des précédentes études sur les NP-LV.

Les caractéristiques de ces amorces sont indiquées dans le tableau 3 :

Amorce	Sens	Séquence (5'-3')	Positions
VP60-lago-S1	Sens	CCA-CCC-CAA-CAG-GTG-GAC-CAA-CAA-GA	172-198
VP60-lago-S2	Sens	CAT-GTA-CCA-TCC-AAC-TGG-TGA-CCC-TGG	528-555
VP60-lago-AS	Antisens	CTG-TTG-TCA-TTG-CCA-ACC-CCA-GTG-AG	743-767

**Tableau 3 : Séquences et positions des amorces utilisées pour la détection du virus.**

La technique utilisée pour amplifier la séquence codante pour la protéine VP60 est une PCR semi-nichée qui n'utilise que 3 amorces, avec l'amorce antisens commune au deux PCR. Cette technique augmente la sensibilité et la spécificité du test par rapport à une PCR simple. L'amplicon obtenu, produit de la 2<sup>ème</sup> PCR sera ensuite recherché par électrophorèse.

Amorces utilisées				Amplicon obtenu (taille en pb)	
1 <sup>ère</sup> PCR	T <sub>H</sub> (°C)	2 <sup>ème</sup> PCR	T <sub>H</sub> (°C)	1 <sup>ère</sup> PCR	2 <sup>ème</sup> PCR
VP-lago-S1	53	VP-lago-S2	53	595 pb	239 pb
VP-lago-AS		VP-lago-AS			

**Tableau 4 : Ordre d'utilisation des amorces et description de l'amplicon produit.**

### Réalisation de la PCR semi-nichée :

On réalise les deux PCR successivement. Pour chacune d'elles, un mélange réactionnel et préparé qui sera ensuite réparti dans les micro-tubes à PCR contenant de l'ADNc provenant des échantillons. Le volume final obtenu est de 50µL/tube.

Mélanges réactionnels (45µL/tube) :

- Taq Polymérase (KAPA2G™Robust, 5U/µL) utilisé à 0,5U/tube.
- Tp5X with MgCl<sub>2</sub> utilisé à 1X par rapport à la concentration finale.
- 5X KAPAEhancer utilisé à 1X par rapport à la concentration finale.
  - ⇒ Ces trois composants proviennent du même fabricant.
- Mélange de dNTP (10mM chacun), utilisé à 50X par rapport à la concentration finale.
- Amorces : utilisées à la concentration de 10µM.
- Eau nano-pure pour atteindre un volume final de 50µL/tube.

A ce mélange, on ajoute 5µL d'ADNc.

Préalablement à la deuxième PCR, on effectue une dilution au 100<sup>ème</sup> du produit de la PCR-1. Les 5µL sont alors prélevés de cette dilution.

Les témoins positifs consistent en un plasmide contenant le gène de la VP60, et un extrait de cDNA issu d'un foie provenant d'un lapin atteint de RHD ; le témoin négatif est de l'eau pure.

Deux autres Taq Polymérase ont été essayées. Les protocoles sont donnés ci-dessous.

Avec la Taq Polymérase Eurobiotag® :

- Taq Polymérase (Eurobiotag® , 5U/µL) utilisé à 1U/tube.
- Tp10X (MgCl<sub>2</sub>) utilisé à 10X par rapport à la concentration finale.
  - ⇒ Ces deux composants proviennent du même fabricant.
- Mélange de dNTP (10mM chacun), utilisé à 50X par rapport à la concentration finale.
- Amorces : utilisées à la concentration de 10µM.
- Eau nano-pure pour atteindre un volume final de 50µL/tube.

A ce mélange, on ajoute 5µL d'ADNc.

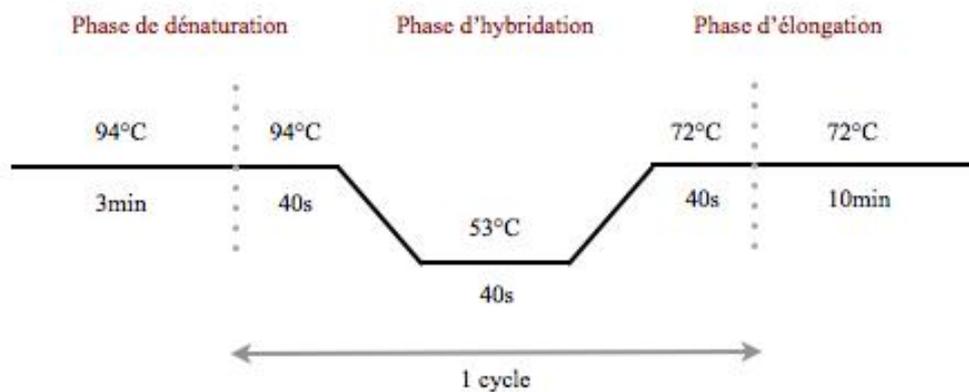
### Avec la Taq Polymérase Phusion® :

- Taq Polymérase (Phusion® DNA Polymerase, 0,02U/μL) utilisé à 1U/tube.
- 5X Phusion® HF Buffer utilisé à 1X par rapport à la concentration finale.  
⇒ Ces deux composants proviennent du même fabricant.
- Mélange de dNTP (10mM chacun), utilisé à 50X par rapport à la concentration finale.
- Amorces : utilisées à la concentration de 10μM.
- Eau nano-pure pour atteindre un volume final de 50μL/tube.

A ce mélange, on ajoute 5μL d'ADNc.

Seul le premier protocole a été utilisé sur l'intégralité des échantillons.

Chaque réaction de PCR comporte 35 cycles :



**Figure 10 :** Ordre d'utilisation des amorces et description de l'amplicon produit.

## 5. Electrophorèse

### Préparation et migration du gel:

Pour révéler les éventuels amplicons obtenus après la PCR semi-nichée, une électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose à 1%, pour les produits de PCR1 et de PCR2. Le gel est obtenu par mélange de tampon TBE (Tris Borate EDTA) avec de la poudre d'agarose. Pour 50mL de gel, on ajoute 3μL de SYBR®Safe qui permettra la révélation de l'ADN s'il est présent.

Le gel est immergé dans le tampon TBE. Dans le premier ou le dernier puits du gel, seul un marqueur de poids moléculaire est déposé (1kb, Invitrogen). Dans les autres puits on dépose un mélange constitué de 8 $\mu$ L d'échantillons + 2 $\mu$ L de tampon de charge (bleu de bromophénol et glycérol). Le gel est ensuite mis à migrer pendant environ 1h00 à 80Volts.

Révélation :

Une fois la migration achevée, on observe le gel sous rayonnement UV ( $\lambda=312\text{nm}$ ). Les amplicons recherchés ont des tailles théoriques attendues conformes à celles notées dans le tableau 4 (environ 600 pb en PCR1 et 230 pb en PCR2).



Lapins	Dates d'échantillonnage	Résultats PCR1	Résultats PCR2	Confirmation O/N	Résultats confirmés
PJDA04-1	2004	-	+	O	PCR2 : -
PJDA04-2	2004	-	-	N	
PJDA04-3	2004	-	-	N	
PJDA07-1	2007	-	-	N	
PJDA07-2	2007	-	+	O	PCR2 : +
PJDA07-3	2007	-	-	N	
PJDA07-4	2007	-	-	N	
PJDA07-5	2007	-	-	N	
PJDA07-6	2007	-	-	N	
PJDA07-7	2007	-	-	N	
PJDA07-8	2007	-	-	N	
PJDA07-9	2007	-	+	O	PCR2 : +
PJDA07-10	2007	-	-	N	
PJDA07-11	2007	-	+	N	
PJDA07-12	2007	-	-	N	
PJDA07-13	2007	-	-	N	
PJDA07-14	2007	-	-	N	
PJDA07-15	2007	-	+	N	
POC05,07-1	2007	-	-	N	
POC05,07-2	2007	-	-	N	
POC05,07-3	2007	-	-	N	
POC05,07-4	2007	-	-	N	
POC05,07-5	2007	-	-	N	
POC05,07-6	2007	-	-	N	
POC05,07-7	2007	-	-	N	
POC05,07-8	2007	-	-	N	
POC05,07-9	2007	-	-	N	
POC05,07-10	2007	-	-	N	

POC05,07-11	2007	-	-	N	
POC05,07-12	2007	-	-	N	
POC05,07-13	2007	-	-	N	
POC05,07-14	2007	-	-	N	
POC05,07-15	2007	-	-	N	
POC10,07-1	2007	-	-	N	
POC10,07-2	2007	-	-	N	
POC10,07-3	2007	-	-	N	
POC10,07-4	2007	-	-	N	
POC10,07-5	2007	-	-	N	
POC10,07-6	2007	-	+	O	PCR2 : +
POC10,07-7	2007	-	+	O	PCR2 : +
POC10,07-8	2007	-	-	N	
POC10,07-9	2007	-	-	N	
RAT04,07-1	2007	-	+	N	
RAT04,07-2	2007	+	+	O	PCR1 : + PCR2 : +
RAT04,07-3	2007	-	+	N	
RAT04,07-4	2007	-	+	N	
RAT04,07-5	2007	-	+	N	
RAT04,07-6	2007	-	+	N	
RAT04,07-7	2007	-	+	O	PCR2 : +
RAT04,07-8	2007	-	+	N	
RAT04,07-9	2007	-	-	N	
RAT04,07-10	2007	-	+	N	
RAT04,07-11	2007	-	-	N	
RAT04,07-12	2007	-	-	N	
RAT04,07-13	2007	-	-	N	
RAT04,07-14	2007	-	-	N	
RAT04,07-15	2007	-	+	N	

RAT07,07-1	2007	-	+	<b>O</b>	<b>PCR2 : +</b>
RAT07,07-2	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-3	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-4	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-5	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-6	2007	-	+	<b>N</b>	
RAT07,07-7	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-8	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-9	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-10	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-11	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT07,07-12	2007	-	+	<b>O</b>	<b>PCR2 : +</b>
RAT07,07-13	2007	-	+	<b>O</b>	<b>PCR2 : +</b>
RAT07,07-14	2007	-	-	<b>O</b>	<b>PCR2 : -</b>
RAT07,07-15	2007	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-1	2008	-	-	<b>O</b>	<b>PCR2 : +</b>
RAT08,08-2	2008	-	+	<b>O</b>	<b>PCR2 : -</b>
RAT08,08-3	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-4	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-5	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-6	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-7	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-8	2008	-	+	<b>O</b>	<b>PCR2 : +</b>
RAT08,08-9	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-10	2008	-	+	<b>O</b>	<b>PCR2 : +</b>
RAT08,08-11	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-12	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-13	2008	-	+	<b>N</b>	
RAT08,08-14	2008	-	-	<b>N</b>	
RAT08,08-15	2008	-	-	<b>O</b>	<b>PCR2 : -</b>

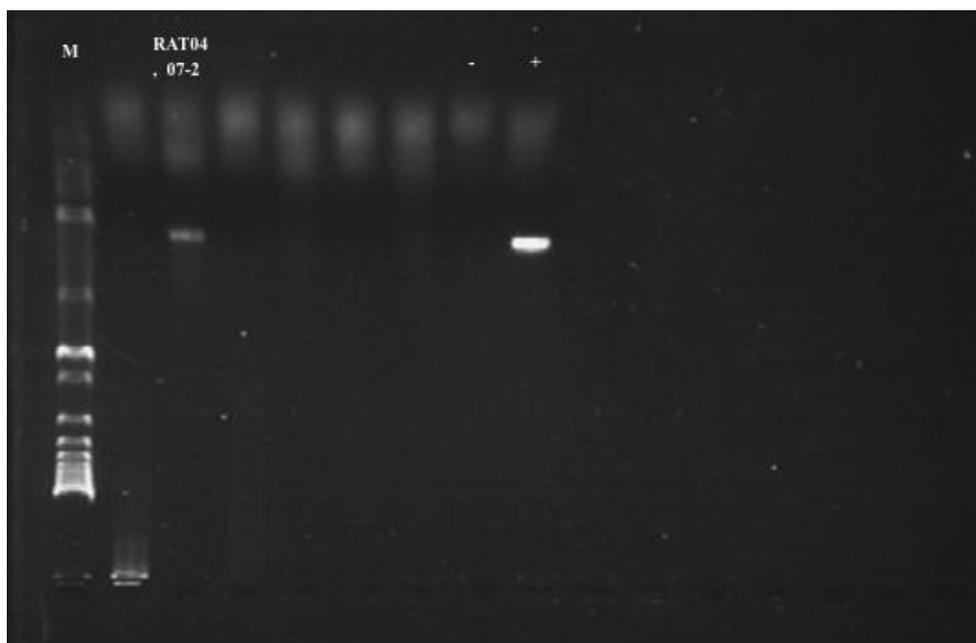
SN09,07-1	2007	-	-	N	
SN09,07-2	2007	-	-	N	
SN09,07-3	2007	-	+	O	PCR2 : +
SN09,07-4	2007	-	+	O	PCR2 : -
SN09,07-5	2007	-	+	O	PCR2 : -
SN09,07-6	2007	-	-	O	PCR2 : +
SN09,07-7	2007	-	-	N	
SN08,08-1	2008	-	-	N	
SN08,08-2	2008	-	-	O	PCR2 : -
SN08,08-3	2008	-	-	N	
SN08,08-4	2008	-	+	O	PCR2 : +
SN08,08-5	2008	-	-	N	
SN08,08-6	2008	-	+	O	PCR2 : +
SN08,08-7	2008	-	+	O	PCR2 : -
SN08,08-8	2008	-	-	N	
SN08,08-9	2008	-	-	O	PCR2 : -
SN08,08-10	2008	-	-	N	
SN08,08-11	2008	-	-	O	PCR2 : -
SN08,08-12	2008	-	-	O	PCR2 : -
SN08,08-13	2008	-	+	O	PCR2 : -
SN08,08-14	2008	-	-	N	
SN08,08-15	2008	-	-	N	

**Tableau 5 : Résultats des PCRs semi-nichées sur les échantillons d'intestins des lapins de Port-Couvreux, Ratmanoff, Port-Jeanne-d'Arc et Sourcils Noirs sur l'Archipel des Kerguelen, prélevés entre 2004 et 2008.**

Les ADNc de 8 échantillons trouvés positifs suite à la seconde PCR ont été adressés début 2012 à l'ANSES Ploufragan. D'autres PCR ont été réalisées afin d'obtenir des informations sur les séquences isolées.

Pour un échantillon, RAT04/07-02, le séquençage a pu être réalisé sur l'amplicon obtenu après la PCR1, permettant l'obtention d'une séquence plus longue (Illustration 5).

Cette PCR1 a été faite en utilisant la Taq Polymérase Phusion® après une RT utilisant la Revert Aid™.



**Illustration 5** : Gel d'électrophorèse correspondant à la PCR1 réalisée avec la Taq Polymérase Phusion® sur les ADNc obtenus à partir d'intestins de lapins collectés dans les régions Rattmanoff et Port-Couvreux sur l'Archipel des Kerguelen, en 2007.

M : Marqueur de poids moléculaire

+ : Témoin positif

RAT04,07-2 : Seul échantillon + en PCR1

- : Témoin négatif

Les échantillons négatifs ne sont pas identifiés.

## **B. Résultats du séquençage des amplicons et analyse des séquences**

Le séquençage de 7 amplicons de petites tailles (obtenue par la PCR semi-nichée) a permis de révéler 7 séquences allant de 178 à 308pb.

La plus grande séquence obtenue en PCR semi-nichée est celle de l'échantillon RAT04/07-8. Les séquences de cet échantillon ainsi que celles des échantillons RAT07/07-13, RAT04/07-7, RAT07/08-2 et SN12/08-6 sont similaires à la séquence de l'échantillon RAT04/07-2 obtenue en PCR1. Celles des échantillons RAT07/07-1, est similaire à la séquence de l'échantillon POC10/07.

**1<sup>er</sup> type de séquence :**

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon RAT04/07-2 en PCR1 (597pb)**

CCACCCCAACAGGTGGACCAACAAGAACTTGGAGGACAACTTTTACTA  
CAATGATGTTTTTACATGGTCAGTTGCAGACGCCCCGGGCAACATCCTGT  
ACACTGTCCAACACTCGCCACAAAACAATCCGTTACAGCTGTTCTAAGT  
CAAATGTACGCTGGCTGGGCCGGTGGCATGCAGTTCCGGTTTATAGTCGC  
TGGGTACAGGTGTCTTCGGTGGGCGTCTGGTTCGCAGCGGTTATAACCACCGG  
GCATTGAGATTGGGCCGGGTTTGGAAAGTCAGACAATTCCCTCATGTTGTC  
ATTGACGCTCGTTCACTCGAACCAGTCACCATCACCATGCCGGACTTGCG  
CCCCAACATGTACCACCCGACAGGCAACCCTGGCCTCGTTCCCACGTTGG  
TCCTGAGCGTTTATAACAACCTCATCAACCCATTTGGTGGATCCACGAGC  
GCAATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGACTTTGAGTTTGT  
GATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCAG  
ATCTCCTACAACCCAGTTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon RAT04/07-7 en PCR2 (241pb)**

CATGTACCATCCAACCTGGTGACCCTGGCCTCGTTCCCACGTTGGTCCTGA  
GCGTTTATAACAACCTCATCAACCCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATC  
CAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGACTTCGAGTTTGTGATGAT  
CCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCAGATCTCC  
TCACAACCCAGTTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon RAT04/07-8 en PCR2 (308pb).**

CCNTNCATCAACCCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACGGT  
GGAAACAAGGCCAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCT  
CCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCAGATCTCCTACAACCCCA  
GTTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGANGGAATGGTGAGATAGTGGG  
GCTGCAGCCAGTCCCCCAGTTCTCACTGGGGTTGGCAANNANAAAAGGNC  
TAAGGATCTGCATTTTCACTAAAATCTCCCACTCACTGGGGTTGGCAATG  
ACAACAGA

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon RAT07/07-13 en PCR2 (192pb).**

ANTGTTTANAACAACCTCATCAACCCGTTTGGTGGGTCCACCAGCGCAAT  
CCAGGTGACAGTGGAACAAGGCCAAGTGAAGATTTTGGATTTCGTGATGA  
TTCGAGCCCCCTCCAGCAAGACTGTTGACTCAATTTACCCGCAGGCCTC  
CTCACGACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGANAACAGN

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon RAT07/08-2 en PCR2 (190pb).**

CGTTNATAACANCCTCGTCAACCCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCC  
AGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATC  
CGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCAGATCTCCT  
CACAACCCAGTTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGA

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon SN12/08-6 en PCR2 (178pb).**

CNTCTGCCCTANTCANNNGTTCGGANTGGGGTTGGNAANGACGTCANGGTG  
GAAACAAGGCCAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTC  
CAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCAGATCTCCTACAACCCAG  
TTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAANAGN

2<sup>ème</sup> type de séquence :

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon POC10/07-7 en PCR1 (308pb).**

CATGTACCATCCAACCTGGTGACCCTGGCCTTGTCCACACTAGTCCTTA  
GTGTTTATAACAACCTCATCAACCCGTTTGGTGGGTCCACCAGCGCAATC  
CAGGTGACAGTGGAACAAGGCCAAGTGAAGATTTTGAGTTCGTGATGAT  
TCGAGCCCCCTCCAGCAAGACTGTTGACTCAATTTACCCGCGGGCCTCC  
TCACGACCCAGTCCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG

**Séquence obtenue à partir de l'échantillon RAT07/07-1 en PCR2 (189pb)**

GNNNCGTTNATAACAACCTCATCAACCCATTTGGTGGATCCACGAGCGCA  
ATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGAT  
GATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCAGATC  
TCCTCACAACCCAGTTCTCACTGGGGTTGGCAATGACA

L'alignement des séquences permet de mettre en évidence d'une part que ces séquences sont bien des séquences du gène codant pour la VP60 d'un virus apparenté au RHDV (Figure 11), et d'autres part qu'il existe bien 2 types de séquences se rapprochant respectivement des anciennes souches françaises pathogènes du groupe G1 (Figure 12) et des nouvelles souches pathogènes française dont la 10-01 (Figure 13 et 14). Cette dernière figure se base sur une plus grande séquence, la séquence de l'échantillon RAT04/07-2 obtenue en PCR1 et faisant 597pb.

RAT07/07-13	CC-----GTTTGG--TGGGTCCACCAGCGCAATCCAGGTGACAGTGGAACAAGGCC
G1	CC-----GTTTGG--TGGATCCACCAGCGCAATCCAGGTGACAGTGGAACAAGGCC
POC10/07-7	CC-----GTTTGG--TGGGTCCACCAGCGCAATCCAGGTGACAGTGGAACAAGGCC
SN12/08-6	CCTANTCNNGTTCGGANTGGGGTTGGNAANG-----ACGTCANGGTGGAACAAGGCC
RAT04/07-8	CC-----ATTTGG--TGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTGACAGGTGGAACAAGGCC
RAT04/07-7	CC-----ATTTGG--TGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTGACAGGTGGAACAAGGCC
RAT04/07-2	CC-----ATTTGG--TGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTGACAGGTGGAACAAGGCC
RAT07/08-2	CC-----ATTTGG--TGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTGACAGGTGGAACAAGGCC
RAT07/07-1	CC-----ATTTGG--TGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTGACAGGTGGAACAAGGCC
	**                    ** * *        * *                    * * * *        *****
RAT07/07-13	AAGTGAAGATTTTGAGTTCGTGATGATTCGAGCCCCCTCCAGCAAGACTGTTGACTCAAT
G1	AAGTGAAGATTTTGAGTTCGTGATGATTCGAGCCCCCTCCAGCAAGACTGTTGACTCAAT
POC10/07-7	AAGTGAAGATTTTGAGTTCGTGATGATTCGAGCCCCCTCCAGCAAGACTGTTGACTCAAT
SN12/08-6	CAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGAT
RAT04/07-8	CAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGAT
RAT04/07-7	CAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGAT
RAT04/07-2	CAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGAT
RAT07/08-2	CAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGAT
RAT07/07-1	CAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGAT
	***** * * * *        *****        * *        *****        *****        * *
RAT07/07-13	TTCACCCGCGAGGCTCCTCAGACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGANAACAGN--
G1	TTCACCCGCGAGGCTCCTCAGACCCCGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGGTG
POC10/07-7	TTCACCCGCGGGCTCCTCAGACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG---
SN12/08-6	CTCGCCCGCAGATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAANAGN--
RAT04/07-8	CTCGCCCGCAGATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGANG
RAT04/07-7	CTCGCCCGCAGATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG---
RAT04/07-2	CTCGCCCGCAGATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG---
RAT07/08-2	CTCGCCCGCAGATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGA--
RAT07/07-1	CTCGCCCGCAGATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACA-----
	** ***** *        *****        *****        *****        *****        *

**Figure 11** : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des 8 échantillons de notre étude et d'une souche de RHDV du groupe G1 (11976-Portugal). Les nucléotides communs à toutes les séquences sont marqués par une étoile en dessous. Le premier nucléotide des séquences correspond au nucléotide 601 du gène codant pour la VP60.

```

RAT07/07-1 -----GNNNCGTTNATAACAACCTCATCAAC
G1 ACTGGTGACCCTGGCCTTGTTCACACTAGTCCTTAGTGTTTATAACAACCTCATTAAC
POC10/07-7 ACTGGTGACCCTGGCCTTGTTCACACTAGTCCTTAGTGTTTATAACAACCTCATCAAC
*** ***** **

RAT07/07-1 CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGAC
G1 CCGTTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACAGTGGAAACAAGGCCAAGTGAAGAT
POC10/07-7 CCGTTTGGTGGTCCACGAGCGCAATCCAGGTCACAGTGGAAACAAGGCCAAGTGAAGAT
** ***** **

RAT07/07-1 TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
G1 TTTGAGTTCGTGATGATTCGAGCCCCCTCCAGCAAGACTGTTGACTCAATTTACCCGCA
POC10/07-7 TTTGAGTTCGTGATGATTCGAGCCCCCTCCAGCAAGACTGTTGACTCAATTTACCCGCG
***** **

RAT07/07-1 GATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACA-----
G1 GGCTCCTCAGACCCCGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGTGGAAATGGCCAA
POC10/07-7 GGCTCCTCAGACCCCGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG-----
* ***** **

```

**Figure 12** : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des échantillons POC10/07-7, RAT07/07-1 et d'une souche de RHDV du groupe G1 (11976-Portugal). Les nucléotides communs à toutes les séquences sont marqués par une étoile en dessous. Le premier nucléotide des séquences correspond au nucléotide 541 du gène codant pour la VP60.

```

RAT07/07-13 CCGTTTGGTGGTCCACGAGCGCAATCCAGGTCACAGTGGAAACAAGGCCAAGTGAAGAT
SN12/08-6 -----GTCANGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGAC
RAT04/07-7 CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGAC
RAT07/08-2 CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGAC
RAT04/07-8 CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGAC
10-01 CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGAC
RAT04/07-2 CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTCACGGTGGAAACAAGGCCAGTGAGGAC
** * ***** **

RAT07/07-13 TTTGAGTTCGTGATGATTCGAGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCAATTTACCCGCA
SN12/08-6 TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
RAT04/07-7 TTCGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
RAT07/08-2 TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
RAT04/07-8 TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
10-01 TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
RAT04/07-2 TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
** ***** **

RAT07/07-13 GGCTCCTCAGACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGANAACAGN-----
SN12/08-6 GATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAANAGN-----
RAT04/07-7 GATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG-----
RAT07/08-2 GATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGA-----
RAT04/07-8 GATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAGANGGAATGGTGAG
10-01 GATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGTACCAGACAACAGATGGAATGGTGAG
RAT04/07-2 GATCTCCTCACAACCCAGTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG-----
* ***** **

```

**Figure 13** : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des échantillons RAT04/07-2, RAT07/07-7, RAT04/07-8, RAT07/07-13, RAT07/08-2, SN12/08-6 et de la nouvelle souche de RHDV française (10-01). Les nucléotides communs à toutes les séquences sont marqués par une étoile en dessous. Le premier nucléotide des séquences correspond au nucléotide 601 du gène codant pour la VP60.

```

10-01      GTCACCACCGAGAACCGCTCCACGTCGATTGCAACGGCGGGGATTGGCGGTCCACCCCAA
RAT04/07-2 -----CCACCCCAA
                                           *****

10-01      CAAGTGGACCAACAAGAAACTTGGAGGACAAACTTTTACTACAATGATGTTTTTACATGG
RAT04/07-2 CAGGTGGACCAACAAGAAACTTGGAGGACAAACTTTTACTACAATGATGTTTTTACATGG
** *****

10-01      TCAGTTGCAGACGCCCGGGCAACATCCTGTACACTGTCCAACACTCGCCACAAAACAAT
RAT04/07-2 TCAGTTGCAGACGCCCGGGCAACATCCTGTACACTGTCCAACACTCGCCACAAAACAAT
*****

10-01      CCGTTCACAGCTGTCTAAGTCAAATGTACGCTGGCTGGGCCGGTGGCATGCAGTTCGGG
RAT04/07-2 CCGTTCACAGCTGTCTAAGTCAAATGTACGCTGGCTGGGCCGGTGGCATGCAGTTCGGG
*****

10-01      TTTATAGTCGCTGGGTGAGGTGCTTTCGGTGGGCGTCTGGTGCAGCGGTATATACCACCG
RAT04/07-2 TTTATAGTCGCTGGGTGAGGTGCTTTCGGTGGGCGTCTGGTGCAGCGGTATATACCACCG
*****

10-01      GGCATTGAGATTGGGCCAGGTTTGGAAAGTCAGACAATCCCTCATGTTGTCATTGACGCT
RAT04/07-2 GGCATTGAGATTGGGCCAGGTTTGGAAAGTCAGACAATCCCTCATGTTGTCATTGACGCT
*****

10-01      CGTTCACTCGAACCAGTCACCATCACCATGCCGACTTGGCGCCCAACATGTACCACCCG
RAT04/07-2 CGTTCACTCGAACCAGTCACCATCACCATGCCGACTTGGCGCCCAACATGTACCACCCG
*****

10-01      ACAGGCAACCCTGGCCTCGTTCACGTTGGTCCGAGCGTTTATAACAACCTCATCAAC
RAT04/07-2 ACAGGCAACCCTGGCCTCGTTCACGTTGGTCCGAGCGTTTATAACAACCTCATCAAC
*****

10-01      CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTACCGGTGGAACAAGGCCAGTGAGGAC
RAT04/07-2 CCATTTGGTGGATCCACGAGCGCAATCCAGGTACCGGTGGAACAAGGCCAGTGAGGAC
*****

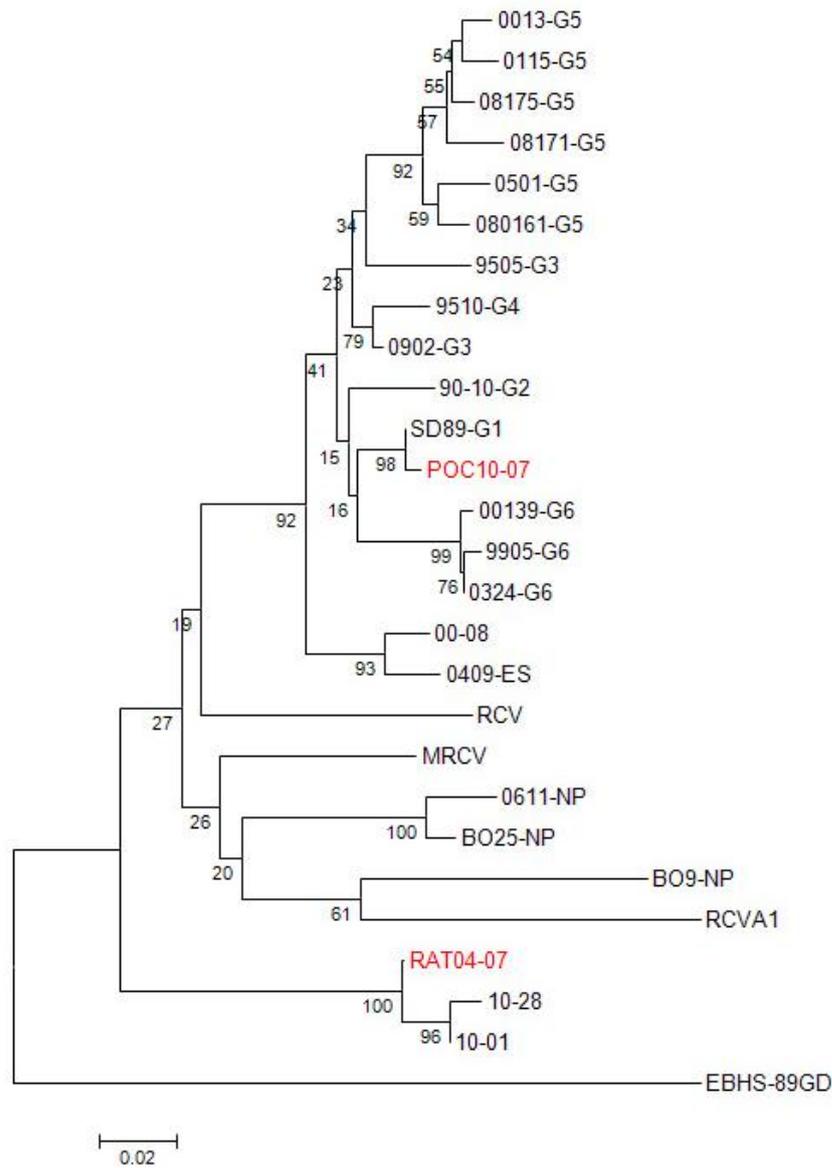
10-01      TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGCAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
RAT04/07-2 TTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCCCGCA
*****

10-01      GATCTCCTCACAACCCAGTTCTCACTGGGGTTGGTACCGACAACAGATGGAATGGTGAG
RAT04/07-2 GATCTCCTCACAACCCAGTTCTCACTGGGGTTGGCAATGACAACAG-----
*****

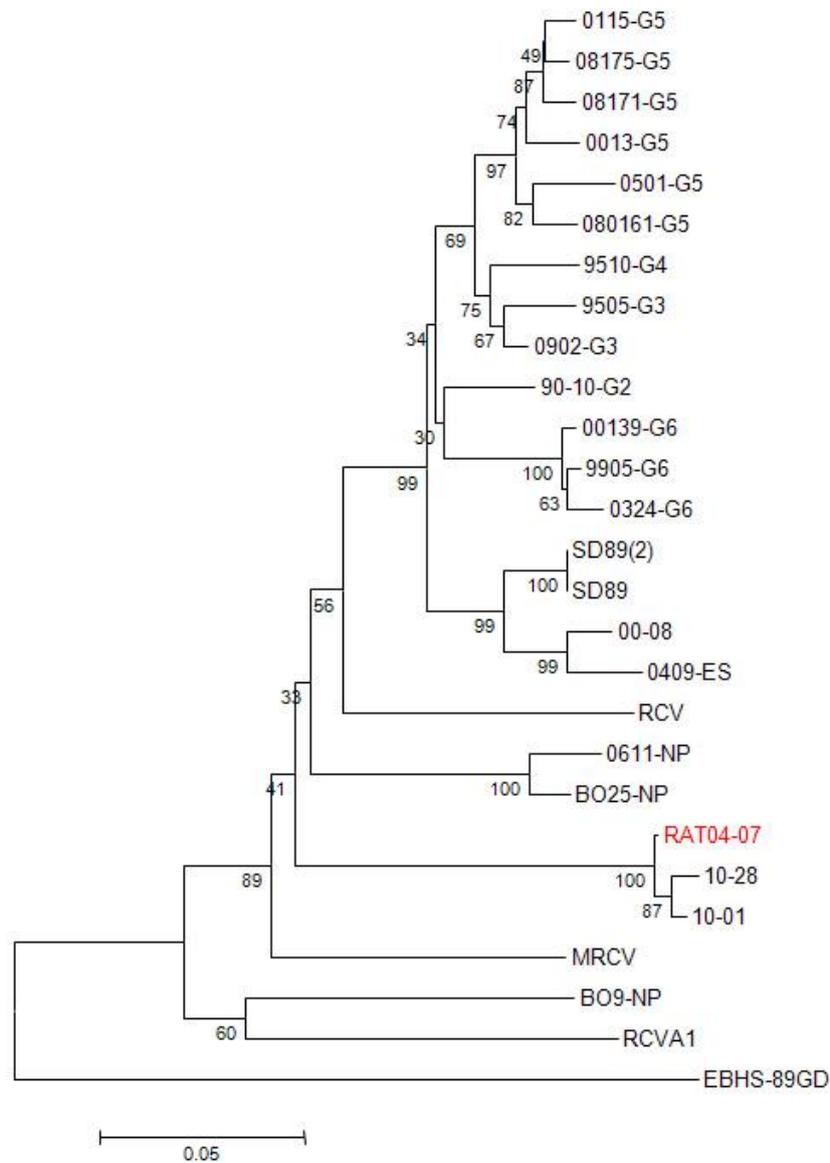
```

**Figure 14** : Figure 14 : Alignement et comparaison des séquences nucléotidiques du gène de la VP60 obtenues à partir des échantillons RAT04/07-2 et de la nouvelle souche de RHDV française (10-01). Les nucléotides communs à toutes les séquences sont marqués par une étoile en dessous. Le premier nucléotide des séquences correspond au nucléotide 121 du gène codant pour la VP60.

Un arbre phylogénétique a été réalisé pour identifier les parentés des souches isolées sur l'Archipel des Kerguelen avec les autres souches connues de RHDV et de NP-LV. Les illustrations 15 et 16 présentent un arbre utilisant les séquences de 240pb, ainsi qu'un autre utilisant la séquence de l'échantillon RAT04/07-2 de 597pb.



**Figure 15** : Arbre phylogénétique sommaire (Neighbour-joining, 1000 répliques) basé sur les nucléotides 527 à 767 du gène codant pour la VP60 ((240pb) et enraciné avec la souche EBHSV « GD 89 ». Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds. Les notions de Groupe (G2, G3, G4, G5, G6) font référence à l'ancienne nomenclature (Le Gall-Reculé, communication personnelle).



**Figure 16** : Arbre phylogénétique sommaire (Neighbour-joining, 1000 répliques) basé sur les nucléotides 171 à 768 du gène codant pour la VP60 (597pb) et enraciné avec la souche EBHSV « GD 89 ». Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds. Les notions de Groupe (G2, G3, G4, G5, G6) font référence à l'ancienne nomenclature (Le Gall-Reculé, communication personnelle).

## V. Discussion

L'objectif de l'étude menée sur l'Archipel des Kerguelen est d'isoler et de séquencer des souches de lagovirus non pathogènes afin de les comparer aux souches connues de RHDV pathogènes et aux souches connues de NP-LV. Cette étude doit aussi permettre de mieux comprendre l'évolution du RHDV et des lagovirus non pathogènes, ainsi que leurs interactions.

De nombreuses études ont porté sur les lagovirus non-pathogènes. Leurs isollements et caractérisations furent souvent infructueux. Mais les études qui aboutirent à la caractérisation au moins partielle de souches de lagovirus non-pathogènes révélèrent leur proximité avec les souches standards de RHDV.

Concernant les lagovirus non-pathogènes présents sur l'Archipel des Kerguelen, une étude préalable à la notre avait permis de mettre en évidence 35% de lapins séropositifs sur 77 échantillonnés.

Afin d'optimiser nos chances d'isoler un ARN viral apparenté au RHDV, de nouvelles amorces ont été redessinées à partir de plusieurs séquences connues du gène codant pour la VP60.

Chaque prélèvement a ainsi été traité de la manière suivante : une Reverse Transcription à partir des ARN totaux extraits des échantillons d'intestins prélevés sur cadavres de lapins tués entre 2004 et 2008. Cette Reverse Transcription a été suivie d'une PCR semi-nichée. La première PCR n'a donné de résultat satisfaisant qu'avec un seul échantillon, l'échantillon RAT 04/07, permettant le séquençage sur 597pb pour la protéine VP60. Cela a permis une meilleure caractérisation ainsi qu'une étude phylogénétique plus fiable le concernant.

De plus petites séquences ont aussi été obtenues à partir de 7 autres échantillons. On peut ainsi distinguer deux groupes parmi les séquences isolées sur l'Archipel des Kerguelen. Le premier groupe regroupant les échantillons RAT04/07-2, RAT07/07-7, RAT04/07-8, RAT07/07-13, RAT07/08-2, SN12/08-6 et le deuxième groupe regroupant POC10/07-7 et RAT07/07-1.

Le premier groupe, fondée sur l'échantillon RAT04/07-2 pour lequel on a obtenu la plus grande portion de séquence du gène codant pour la VP60, est proche de deux variants isolés récemment en France, mais pathogènes.

Une première hypothèse envisageable est que ces deux variants, le 10-01 et le 10-28 soient dérivés de lagovirus non-pathogènes présents depuis longtemps en France et importés il y a 150 ans sur l'Archipel des Kerguelen au moment de l'introduction des lapins de garennes. Les événements nécessaires et suffisants pour les rendre pathogènes n'ont pour le moment pas été identifiés. Sur la base uniquement des fragments de séquences que nous avons obtenus, il ne nous est pas possible d'avancer des hypothèses sur le déterminisme de la pathogénie. Il faudrait pour cela au minimum obtenir la séquence complète de la VP60 et idéalement du génome complet.

Une seconde hypothèse envisageable serait que ces variants ait été importés accidentellement lors de l'introduction de puces de lapins dans les années 80 destinées à faciliter la transmission de la myxomatose pour réguler les populations de lapins.

Pour le deuxième groupe, la présence de lagovirus non pathogènes proches d'une ancienne souche française, la SD89 du groupe G1 (ancienne nomenclature) est cohérente puisque les lapins présents sur l'Archipel des Kerguelen sont issus des populations de lapins françaises. Là aussi, il est probable qu'à l'origine, la souche SD89 soit dérivée d'un lagovirus apathogène, resté tel quel sur l'Archipel.

L'hypothèse initiale de l'existence de ces souches contemporaines à l'introduction des lapins au XIX siècle n'est cependant pas exclusive. En effet, les allées et venues sur l'île des équipes de recherches principalement, ne peuvent pas exclure l'introduction involontaire et accidentelle d'une ou plusieurs souches de virus ces dernières années.

De plus, le statut indemne de RHD de l'Archipel est lui aussi incertain. En effet, au cours des années 2000, des équipes de recherches ont observé des épisodes de surmortalité, sans qu'il n'y ait aucune autopsie ni aucun prélèvement d'effectué. On ne peut donc pas exclure que des souches potentiellement pathogènes circulent au sein des populations de lapins sur l'Archipel des Kerguelen. Tout comme nous ne pouvons exclure formellement que les souches identifiées dans cette étude soient non pathogènes, même si les prélèvements testés semblaient provenir d'animaux apparemment sains chassés.

Ces résultats suggèrent la préexistence à l'état non pathogène de nombreux lagovirus pouvant demeurer apathogène ou pouvant évoluer vers un état pathogène.

La question d'une contamination de nos échantillons a été envisagée. Cependant, nous l'avons exclu pour deux raisons. La première est que nous n'avons jamais manipulé au sein de notre laboratoire de souche G1. La deuxième est que les manipulations concernant l'étude des

souches 10-01 et 10-28 ont débuté bien après les nôtres, ne permettant en aucun cas une contamination de nos échantillons.

Durant nos manipulations, nous avons été confrontés à des difficultés de répétition des résultats, lorsque nous changions de réactifs. Ainsi, l'intégralité des échantillons a été traitée avec un protocole utilisant la Revert Aid™ H Minus Reverse Transcriptase pour la RT, la KAPA2G™Robust, pour les PCR. Mais quelques échantillons ont aussi été traités avec soit la Superscript® pour la RT, soit avec l'Eurobotaq® ou la Phusion® pour les PCRs. Dans notre étude, la Superscript® associé à la KAPA2G™Robust ne permettait pas d'obtenir de résultats positifs là où l'utilisation de la Revert Aid™ nous donnait des échantillons positifs. De la même façon, l'utilisation de l'Eurobotaq® nous a moins satisfait que la KAPA2G™Robust.

Concernant l'utilisation de la Phusion®, après une RT avec la Revert Aid™, nous avons obtenu de nombreux parasites, notamment suite à la PCR semi-nichée. Cependant, c'est avec cette Taq Polymerase que nous avons obtenu l'unique résultat positif en PCR1 sur l'échantillon 26 (Illustration 5).

Notre étude a ainsi mis en évidence la difficulté de la recherche de ces lagovirus non-pathogènes et une grande variabilité dans l'obtention ou non de résultats positifs. Selon nos réactifs, nous n'obtenions pas les mêmes résultats et ce fut aussi le cas entre notre équipe et l'équipe de l'ANSES Ploufragan. En effet, tous nos échantillons ont été traités en parallèle à l'ANSES Ploufragan qui a utilisé le même protocole d'extraction, mais une Taq Polymérase et un couple d'amorces différents. Ils n'ont obtenu aucun échantillon positif.

Il aurait été intéressant de disposer d'une RT qPCR qui nous aurait permis d'avoir un seuil de sensibilité analytique plus faible nous permettant d'obtenir, peut-être, davantage d'échantillons positifs. Mais nous n'en disposions pas au laboratoire. Cependant, maintenant que des séquences ont pu être obtenus, il serait envisageable de s'appuyer sur ces séquences pour mettre au point de nouvelles amorces adaptées à la RT qPCR et de mettre au point une RT qPCR pour passer de nouveau l'ensemble de nos échantillons.

De même, notre travail devra se poursuivre en dessinant de nouvelles amorces en amont et en aval des séquences obtenues afin d'obtenir à termes les séquences complètes du gène codant pour la VP60 des souches isolées.

## CONCLUSION

Notre étude a atteint son objectif, puisque de nouveaux NP-LV apparentés au RHDV ont été isolés et séquencés sur l'Archipel des Kerguelen, dans une population de lapins de sauvages vivant théoriquement isolée depuis plus de 150 ans. Deux groupes de variants ont pu être identifiés, clairement distincts l'un de l'autre et proches chacun de deux souches déjà connues de variants pathogènes du RHDV en France.

Ces virus ont été isolés à partir d'échantillons d'intestins de lapins sauvages cliniquement sains, indiquant qu'ils sont à priori non pathogènes. De nouvelles amorces ont été dessinées pour leurs recherches et plusieurs protocoles de Reverse Transcription et de PCR ont été essayés, donnant des résultats différents, plus ou moins satisfaisants. Mais ces essais de réactifs de PCR différents ont permis l'isolement en PCR1 d'un virus sur un échantillon, permettant l'obtention d'une séquence de taille assez grande de la VP60. Ce virus a ainsi pu être comparé aux souches de RHDV connues de façon plus précise.

Deux grands types de souches de NP-LV ont été identifiés sur l'Archipel des Kerguelen, sans que cela ait un lien avec leur localisation. En effet, le premier groupe réunit des virus isolés sur des échantillons prélevés au niveau de Cap Ratmanoff et Sourcils Noirs. Le deuxième groupe quant à lui, réunit des virus isolés sur des échantillons prélevés au niveau de Port Couvreur et Cap Ratmanoff. Ces deux types de séquences sont proches de souches pathogènes déjà isolées en France. Ils n'ont cependant pas de ressemblance particulière au niveau de la séquence de la VP60 séquencée, avec les souches de NP-LV isolées dans les précédentes études réalisées en France ou en Australie.

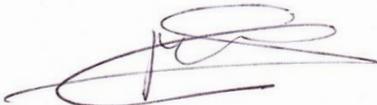
Il est nécessaire de poursuivre ces travaux afin de déterminer entre autre si ces souches isolées sur l'Archipel des Kerguelen ont un effet protecteur ou non envers une infection par le RHDV.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

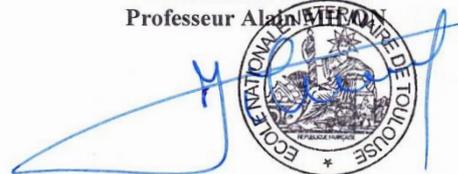
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Julia CLOET** intitulée « *Identification de nouveaux lagovirus non pathogènes apparentés au virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV), isolés dans les populations de lapins sauvages de l'archipel des Kerguelen* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 18/10/2012  
Professeur Stéphane BERTAGNOLI  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



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


Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand MONTHUBERT


Mlle Julia CLOET  
a été admis(e) sur concours en : 2007  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 30/06/2011  
a validé son année d'approfondissement le : 12/07/2012  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

## 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

**cm<sup>3</sup>** : 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  
**NH<sub>2</sub>** : groupement amine  
**nm** : nanomètre  
**NP-LV** : Non-Pathogen Lagovirus  
**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  
**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<sub>H</sub>** : 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<sub>S</sub>** : Virus Like Particules  
**VPg** : Viral Protein linked to the genome  
**VP10** : Viral Protein of 10 kDa  
**VP60** : Viral Protein of 60 kDa



## BIBLIOGRAPHIE

- Abrantes J., Van der Loo W., Le Pendu J., Esteves P.J. (2012), *Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review* – *Veterinary research*, 43:12.
- Ahmad ST, El-Samadony HA, Mahgoub KM (2011), *Immunological and virological studies on rabbit hemorrhagic disease virus*, *Global Veterinaria* 7(6), 545-556.
- Alda F, Gaitero T, Suarez M, Merchan T, Rocha G, Doadrio I (2010), *Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and western Europe*, *BMC Evolutionary Biology*, 10:347.
- Alexandrov M, Peshev R, Yanchev I, Bozhkov S, Doumanova L, Dimitrov T, Zacharieva S (1992), *Immunohistochemical localization of the rabbit haemorrhagic disease viral antigen*, *Arch. Virol.*, 127, 355-363.
- Barcena J, Morales M, Vazquez B, Boga JA, Parra F, Lucientes J, Pagès-Manté A, Sanchez-Vizcaino JM, Blasco R, Torres JM (2000), *Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus*, *Journal of virology*, 74(3), 1114-1123.
- Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, Boilletot E, Vautherot JF, Rasschaert D, Laurent S, Petit F, Boucraut-Baralon C, Milon A (1996), *Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein*, *Journal of virology*, 70(8) 5061-5066.
- Boniotti B, Wirblich C, Sibilina M, Meyers G, Thiel HJ, Rossi C (1994), *Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus*, *Journal of Virology*, 68(10), 6487-6495.
- Bruce JS, Twigg LE (2004), *Rabbit haemorrhagic disease virus: serological evidence of a non-virulent RHDV-like virus in South-Western Australia*, *Wildlife research*, 31, 605-612.

- Buddle, B.M., de Lisle, G.W., McColl, K., Collins, B.J., Morrissy, C., Westbury, H.A. (1997), *Response of the North Island brown kiwi, Apteryx australis mantelli and the lesser short-tailed bat, Mystacina tuberculata to a measured dose of rabbit haemorrhagic disease virus*. N.Z. Vet. J. 45, 109–113.
  
- Calvete C, Estrada R, Villafuerte R, Osacar JJ, Lucientes J (2002), *Epidemiology of viral haemorrhagic disease and myxomatosis in a free-living population of wild rabbit*, Veterinary record, 150, 776-782.
  
- Cancellotti FM, Renzi M. (1991), *Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy* - Rev Sci Tech. Jun;10(2):409-22.
  
- Capucci L, Scicluna MT, Lavazza A (1991), *Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbit and European brown hare syndrome*, Rev. Sci. Tech. OIE, 10(2), 347-370.
  
- Capucci L, Frigoli G, Ronshold L, Lavazza A, Brocchi E, Rossi C (1995), *Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies*, Virus Research, 37, 221-238.
  
- Capucci L, Chasey D, Lavazza A, Westcott D (1996a), *Preliminary characterization of a non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus from the United Kingdom*, Journal of Veterinary Medicine, B43, 245-250.
  
- Capucci L, Fusi P, Lavazza A, Pacciarini ML, Rossi C (1996b), *Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic*, Journal of Virology, 70(12), 8614-8623.
  
- Cappuci L, Nardin A, Lavazza A (1997), *Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus*, The Veterinary Record, 140, 647-650.
  
- Capucci L, Fallacara F, Drazioli S, Lavazza A, Lodovica Pacciarini M, Brocchi E (1998), *A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant*, Virus Research, 58, 115-126.

- Castanon S, Marin MS, Martin-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordas RJ, Parra F (1999), *Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus*, Journal of virology, 73(5), 4452-4455.
- Chasey D, Lucas MH, Westcott DG, Sharp G, Kitching A, Hughes SK (1995), *Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease*, The Veterinary Record, 137, 158-160.
- Chapuis JL, Chantal J, Bijlenga G (1994), *Myxomatosis in the sub-antarctic islands of Kerguelen, without vectors, thirty years after its introduction*, CR Acad. Sci. III.
- Chekchak T, Chapuis JL, Pisanu B, Boussès P (2000), *Introduction of rabbit flea, Spilopsyllus cuniculi (Dale), to a subantarctic island (Kerguelen Archipelago) and its assessment as a vector of myxomatosis*, Wildlife research 27(1), 91-101.
- Chen Liu, Liu Guangqing, Ni Zheng, Yu Bin, Yun Tao, Song Yi, Hua Jionggang, Li Shuangmao, Chen Jianping (2009), *Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60*, Journal of General Virology, 90, 2952-2955.
- Clark IN, Lambden PR (1997), *The molecular biology of caliciviruses*, Journal of General Virology, 78, 291-301
- Cooke BD, Robinson AJ, Merchant JC, Nardin A, Capucci L (2000), *Use of Elisas in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia*, Epidemiol. Infect. 124, 563-576.
- Cooke BD (2002), *Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations*, Rev. sci. tech. OIE, 21(2), 347-358.
- Cooke BD, Chapuis JL, Magnet V, Lucas A, Kovaliski (2004), *Potential use of myxoma virus and rabbit haemorrhagic disease virus to control feral rabbits in the Kerguelen Archipelago*, Wildlife Research, 31, 415-420.

- Fischer L, Le Gros FX, Mason PW, Paoletti E (1997), *A recombinant canarypox virus protect rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge*, *Vaccine*, 15(1), 90-96.
- Forrester NL, Boag B, Moss SR, Turner SL, Trout RC, White PJ, Hudson PJ, Gould EA (2003), *Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis*, *Journal of General Virology*, 84, 3079-3086.
- Forrester NL, Trout RC, Gould EA (2007), *Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire*, *Virology*, 358, 12-22.
- Forrester NL, Boag B, Buckley A, Moureau G, Gould EA (2009), *Co-circulation of widely disparate starins of rabbit haemorrhagic disease virus could explain localized epidemicity in the United Kingdom*, *Virology*, 393, 42-48.
- Fuller HE, Chasey D, Lucas MH, Gibbens JC (1993), *Rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom*, *The veterinary record*, December 18/25, 611-613.
- Garcia-Lastra R, San-Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Alvarez M, Gonzales-Gallego J, Tunon MJ (2010), *Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure*, *Vet. Res.*, 41:02.
- Gelmetti D, Grieco V, Rossi C, Capucci L, Lavazza A (1998), *Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridization with digoxigenin labeled RNA probe*, *Journal of Virological method*, 72, 219-226.
- Gould, A.R., Kattenbelt, J.A., Lenghaus, C., Morrissy, C., Chamberlain, T., Collins, B.J., Westbury, H.A. (1997), *The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation*. *Virus Res.* 47, 7–17.

- Gregg DA, House C, Meyer R, Berninger M (1991), *Viral haemorrhagic disease of rabbit in Mexico : epidemiology and viral characterization*, Rev. Sci Tech, 10(2), 435-51.
- Guitré C, Baginski I, Le Gall G, Prave M, Trépo C, Cova L (1995), *Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction*, Research in Veterinary Science, 58, 128-132.
- Hansman GS, Jason Jiang XJ, Green KY (2010), *Calicivirus, molecular and cellular virology*.
- Henning J, Meers J, Davies PR, Morris RS (2005), *Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment*, Epidemiol. Infect., 133, 719-730.
- Hu Z, Tian X, Zhai Y, Xu W, Zheng D, Sun F (2010), *Cryo-electron microscopy reconstruction of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus*, Protein & Cell, 1(1):48-58.
- Jahnke M, Holmes EC, Kerr PJ, Wright JD, Strive T (2010), *Evolution and phylogeography of nonpathogenic calicivirus RCV-A1 in wild rabbits in Australia*, Journal of virology, 84 (23), 12397-12404.
- Joubert P (2000), *Etude des mécanismes de maturation de la polyprotéines du virus de la maladie hémorragique du lapin*, Thèse.
- Jung JY, Lee BJ, Tai JH, Park JH, Lee YS (2000), *Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease*, 123, 135-140.
- Kaupp, Wikimedia [en ligne]. Disponible sur : [http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Kerguelen\\_topographic\\_map-fr.svg&page=1](http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Kerguelen_topographic_map-fr.svg&page=1) (consulté le 22/12/2011).
- Kerr PJ, Kitchen A, Holmes EC (2009), *Origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus*, Journal of Virology, 83(23), 12129-12138.

- Kinneart M, Linde CC (2010), *Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus*, Journal of Virology, 91, 174-181.
- Konig M, Thiel HJ, Meyers G (1998), *Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus*, Journal of Virology, 72(5), 4492-4497.
- Kovaliski J (1998), *Monitoring the spread of rabbit hemorrhagic disease virus as a new biological agent for control of wild European rabbits in Australia*, Journal of Wildlife disease, 34(3), 421-428.
- Laurent S, Vautherot JF, Madelaine MF, Le Gall G, Rasschaert D (1994), *Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into virulike particles and induces protection*, Journal of Virology, 68 (10), 6794-6798.
- Lavazza A et Capucci L (2009), *Rabbit haemorrhagic disease*, Terrestrial Manual, 2.6.2, 1-15.
- Lavazza A . et Capucci L. (2008), *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, 6<sup>th</sup> edition. OIE, 2 volumes, p.1045-1053.
- Lavazza A et Capucci L (2010), *Rabbit haemorrhagic disease*, Terrestrial Manual, 2.6.2, 1-15.
- Lebas F (2010), *Situation cunicole en France en 2009 : performances moyennes des élevages selon les résultats de RENACEB pour l'année 2009, situation du marché cunicole français et premières évaluations pour l'année 2010*, Cuniculture magazine, Vol 37 p.74-82.
- Le Gall-Reculé G, Zwingeistein F, Portejoie Y, Le Gall G (2001), *Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses*, Journal of Virology Methods, 97(1-2), 49-57.
- Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, De Boisséson C, Portejoie Y, Rasschaert D (2003), *Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants*, Arch. Virol., 148, 65-81.

- Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Fages MP, Bertagnoli S, Gelfi J, Aubineau J, Roobrouck A, Botti G, Lavazza A, Marchandeanu S (2011), *Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV*, *Virology* 410, 395-402.
- Leighton, F., Artois, M., Capucci, L., Gavier-Widen, D., Morisse, J. (1995), *Antibody response to rabbit viral hemorrhagic disease virus in red foxes (*Vulpes vulpes*) consuming livers of infected rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)*. *J. Wildlife Dis.* 31, 541–544.
- Liu Guangqing, Ni Zheng, Yun Tao, Yu Bin, Chen Liu, Zhao Wei, Hua Jionggang, Chen Jianping (2008), *A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity*, *Journal of General Virology*, 89, 3080-3085.
- Manté AP (1989), *Consideraciones técnicas de la sueroterapia y la profilaxis vacunal en la enfermedad vírica del conejo (RHDV)*, *Med Vet* 6, 285-291.
- Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della Salda L, Sarli G, Lucidi P (1991), *Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbit and European brown hare syndrome*, *Rev. Sci. Tech. OIE*, 10(2), 371-392.
- Marchandeanu S, Chantal J, Portejoie Y, Barraud S, Chaval Y (1998), *Impact of viral hemorrhagic disease on a wild population of European rabbits in France*, *Journal of wildlife disease*, 34(3), p.429-435.
- Marchandeanu S, Bertagnoli S, Peralta B, Boucraut-Baralon C, Letty J, Reitz F (2004), *Possible interaction between myxomatosis and calicivirosis related to rabbit haemorrhagic disease affecting the European rabbit*, *Veterinary record*, 155, 589-592.
- Marchandeanu S, Le Gall-Reculé G, Bertagnoli S, Aubineau J, Botti G, Lavazza A (2005), *Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus*, *Vet. Res.*, 36, 53-62.
- Marchandeanu S, Bertagnoli S, Léonard Y, Santin-Janin H, Peralta B, Le Gall-Reculé G, Pontier D (2010), *Serological evidence for the presence of non-pathogenic RHDV-like strains in rabbits of Kerguelen archipelago*, *Polar Biology*, 33(7), 985-989.

- Martin V (2010), *Identification de nouveaux variants apathogènes apparentés au virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV), isolés dans les populations de lapins de garennes, en France, Thèse.*
- Martin Alonso JM, Casais R, Boga JA, Parra F (1996), *Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein*, Journal of Virology, 70(2), 1261-1265.
- McColl KA, Merchant JC, Hardy J, Cooke BD, Robinson A, Westbury HA (2002), *Evidence for insect transmission of rabbit haemorrhagic disease virus*, Epidemiol. Infect., 129, 655-663.
- Merchan T, Rocha G, Alda F, Silva E, Thompson G, Hidalgo de Trucios S, Pagés A (2011), *Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (Oryctolagus cuniculus)*, Infection, genetics and evolution, 11 p.1469-1474.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ (1991), *Rabbit hemorrhagic disease virus : molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome*, Virology 184, 664-676.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ (1991), *Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles*, Virology 184, 677-686.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO (2000), *Rabbit hemorrhagic disease virus : genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs*, Virology, 276, 349-363.
- Mitro S. and Krauss H. (1993), *Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology* – European Journal of Epidemiology, Vol 9, N°1.
- Moss SR, Turner SL, Trout RC, White PJ, Hudson PJ, Desai A, Armesto M, Forrester NL, Gould EA (2002), *Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus*, Journal of General Virology, 83, 2461-2467.

- Moussa A, Chasey D, Lavazza A, Capucci L, Smid B, Meyers G, Rossi C, Thiel HJ, Vlasak R, Ronsholt L, Nowotny N, McCullough K and Gavier-Widen D (1992), *Haemorrhagic disease of lagomorphs: evidence for a calicivirus*, *Veterinary Microbiology*, 33, 375-381.
  
- Mutze G, Cooke B, Alexander P (1998), *The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia*, *Journal of Wildlife Disease*, 34(2), p. 221-227.
  
- Nadesha HS, Wang LF, Hyatt AD, Morrissy CJ, Lenghaus C, Westbury HA (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.
  
- Neill JD (1992), *Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion virus : identification of conserved and non-conserved amino-acid sequences among calicivirus capsid proteins*, *Virus Research*, 24, 211-222.
  
- Nyström K, Le Gall-Reculé G, Grassi P, Abrantes J, Ruvoën-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Lopes AM, Esteves PJ, Strive T, Marchandeu S, Dell A, Haslam SM, Le Pendu J (2011), *Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner*, *PloS Pathog* 7(8): e1002188.
  
- Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel H-J (1990), *Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease*, *Journal of virology*, p.3331-3336.
  
- Ohlinger VF, Thiel HJ (1991), *Identification of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits as a calicivirus*, *Rev. sci. tech. OIE* 10(2), 311-323.
  
- Ohlinger VF, Haas B, Thiel H-J (1993), *Rabbit Haemorrhagic disease (RHD) : characterization of the causative calicivirus*, *Veterinary research* n°24, p.103-116.
  
- OIE (2007), Iowa State University, *Rabbit hemorrhagic disease*, September 2.

- OIE (2011), *Maladie hémorragique du lapin*, Code sanitaire pour les animaux terrestres, Chapitre 13.2.
- O'Keefe JS, Tempero JE, Motha MXJ, Hansen MF, Atkinson PH (1999), *Serology of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits before and after release of the virus in New Zealand*, *Veterinary Microbiology*, 66(1), 29-40.
- Pages MP (2007), *Identification d'un nouveau variant a pathogène du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV)*, Thèse.
- Parra F, Prieto M (1990), *Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits*, *Journal of virology*, p. 4013-4015
- Parra F, Boga A, Soledad Marin M, Casais R (1993), *The amino terminal sequence of VP60 from rabbit hemorrhagic disease virus supports its putative subgenomic origin*, *Virus research*, 27(3), 219-228.
- Pasquier C, Bertagnoli S, Messud-Petit F, Izopet J, *Virologie humaine et animale*, p156-157, Dunod.
- Plassiart G, Guelfi JF, Ganiere JP, Wang B, André-Fontaine G, Wyers M (1992), *Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic disease*, *J. Vet. Med.* B39, 443-453.
- Pontier D, Guiserix M, Fouchet D, Sauvage F, Bahi-Jaber N, Louzir H, Marchandeu S, Guitton J-S, Le Gall-Reculé G, Bertagnoli S, Barbazan P, Gonzales JP (2009), *La pathocénose : une approche globale des systèmes hôtes/parasites pour une meilleure compréhension des émergences de maladies infectieuses. Le cas du passage d'une infection non visible à l'apparition d'une maladie grave*, ARN.
- Ramiro-Ibanez F, Martin-Alonso JM, Garcia Palencia P, Parra F, Alonso C (1999), *Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology*, *Virus Research*, 60, 21-28.

- Rassachaert D, Huguet S, Madelaine MF, Vautherot JF (1994), *Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit*, Virus Genes 9(2), 121-132.
- RNA Clean-up, User Manual [en ligne]. Disponible sur [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM\\_RNA\\_CleanUp.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_RNA_CleanUp.pdf) (consulté le 20/072011).
- Rodak L, Smid B, Valicek L, Valicek L, Vesely T, Stephanek J, Hampl J, Jurak E (1990), *Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins*, Journal of General Virology, 71, 1075-1080.
- Rodak L, Smid B, Valicek L (1991), *Application of control measures against viral haemorrhagic disease of rabbit in Czeck and Slovak Federal Republic*, Rev. Sci. Tech. OIE, 10(2), 513-524.
- Rohde J, Schirmeier H, Granzow H, Rziha HJ (2011), *A new recombinant Orf virus (ORFV, Parapoxvirus) protects rabbit against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)*, Vaccine 29, 9256-9264.
- Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G, Blanchard D, Le Pendu J (2000), *Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family*, Journal of virology, P. 11950-11954.
- Siège des Terres Australes et Antartiques Française, TAAF Terres Extrêmes [en ligne]. Disponible sur <http://www.taaf.fr/> (consulté le 22/122011).
- Smid B, Valicek L, Rodak L, Stephanek J, Jurak E (1991), *Rabbit haemorrhagic disease : an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactive vaccine*, Veterinary Microbiology, 26, 77-85.
- Smith AW, Skilling DE, Cherry N, Mead JH, Matson DO (1998), *Calicivirus emergence from the ocean reservoirs : zoonotic and interspecies movements*, Emerging infectious disease, Vol. 4, N°1, January-March.

- Spibey N, McCabe VJ, Greenwood NM, Jack SC, Sutton D, Van Der Waart L (2012), *Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease*, *veterinary Record*.
- Strive T, Wright JD, Robinson AJ (2009), *Identification and partial characterization of a new Lagovirus in Australian wild rabbit*, *Virology* 384, 97-105.
- Strive T, Wright J, Kovaliski J, Botti G, Capucci L (2010), *The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus*, *Virology*, 398, 125-134.
- Teifke JP, Reimann I, Schirrmeier H (2002), *Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus*, *J. Comp. Path.*, 126, 231-234.
- Tian XT, Li BY, Zhang L, Jiao WQ, Liu JX (2011), *Bioinformatics analysis of rabbit haemorrhagic disease virus genome*, *Virology Journal*, 8, 494.
- TRIzol Reagent, manuals [en ligne]. Disponible sur [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf) (consulté le 20/07/2011)
- Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Garcia-Ferreras J, Alvarez M, Jorquera F, Gonzales-Gallego J (2003), *Rabbit hemorrhagic viral disease : characterization of a new animal model of fulminant liver failure*, *J. Lab. Clin. Med.*, 272-278.
- Ueda K, Park JH, Ochai K, Itakura C (1992), *Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease*, *Jpn. J. Vet. Res.*, 40, 133-141.
- Wang X, Qiu L, Hao H, Zhang W, Fu X, Zhang H, He S, Zhang S, Du E, Yang Z (2012), *Adenovirus-based oral vaccine for rabbit hemorrhagic disease*, *Veterinary immunology and immunopathology*, 145, 277-282.
- Wirblich C, Meyers G, Ohlinger VF, Capucci L, Eskens U, Haas B, Thiel HJ (1994), *European brown hare syndrome virus : relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses*, *Journal of Virology*, 68(8), 5164-5173.

- Wirblich C, Sabilia M, Boniotti MB, Rossi C, Thiel HJ, Meyers G (1995), *3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus : identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity*, Journal of Virology, 70(11), 7974-7983.
- Wirblich C, Thiel HJ, Meyers G (1996), *Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies*, Journal of Virology, 70(11), 7974-7983.
- White PJ, Norman RA, Trout RC, Gould EA, Hudson PJ (2001), *The emergence of rabbit haemorrhagic disease virus: will a non-pathogenic strain protect the UK?* Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 356, 1087-1095.
- Xu WY (1991), *Viral haemorrhagic disease of rabbits in the people's republic of china : epidemiology and virus characterization*, Rev. Sci. Tech. OIE, 10(2), 393-408.

---

TITRE : IDENTIFICATION DE NOUVEAUX LAGOVIRUS NON PATHOGENES APPARENTES AU VIRUS DE LA MALADIE HEMORRAGIQUE VIRALE DU LAPIN (RHDV), ISOLES DANS LES POPULATIONS DE LAPINS DE GARENNES, SUR L'ARCHIPEL DES KERGUELEN.

---

RESUME : La maladie hémorragique du lapin est une maladie infectieuse extrêmement contagieuse, aiguë à suraiguë et souvent mortelle, atteignant uniquement l'espèce de lagomorphe *Oryctolagus cuniculus*. L'agent pathogène responsable est un virus de la famille des *Caliciviridae*, le RHDV. Bien qu'il soit considéré comme hautement pathogène, des études ont montré l'existence de virus apparentés d'un point de vue génétique mais dépourvu de son pouvoir pathogène. Des études antérieures ont permis d'isoler de tels virus en France, dans les populations de lapins de Garenne. L'objectif de cette étude est de rechercher des lagovirus non-pathogènes apparentés au RHDV dans une population de lapins sauvages particulière vivant isolée de toute introduction nouvelle de lapins depuis plus de 150 ans sur l'Archipel des Kerguelen. Pour cela, nous avons recherché par RT-PCR semi-nichée la présence d'ARN de virus apparentés au RHDV dans des échantillons intestinaux de lapins sains collectés en 4 sites de l'Archipel des Kerguelen entre 2004 et 2008. Nous avons ainsi identifié 8 lagovirus non-pathogènes apparentés au RHDV. Ces variants sont tous proches de souches connus de RHDV pathogènes français. L'étude de ces variants est intéressante pour l'approfondissement des connaissances phylogénétiques concernant les lagovirus apparentés au RHDV.

MOTS-CLES :

CALICIVIRIDAE, LAGOVIRUS, RHDV, ORYCTOLAGUS CUNICULI, POUVOIR PATHOGENE, POUVOIR IMMUNOGENE, VP 60, ARCHIPEL DES KERGUELEN

---

TITRE : IDENTIFICATION OF NEW NON PATHOGENIC LAGOVIRUS RELATED TO RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS (RHDV), ISOLATED IN POPULATIONS OF WILD RABBITS, IN KERGUELEN ARCHIPELAGO.

---

ABSTRACT: The rabbit haemorrhagic disease is a highly contagious, acute and often fatal infectious disease, infecting the lagomorph species *Oryctolagus cuniculus*. The causative agent is a virus belonging to the *Caliciviridae* family. Although it is considered highly pathogenic, previous studies showed the existence of viruses related genetically but without its pathogenicity. Previous studies isolated such viruses in France, in populations of wild rabbits. The objective of this study was to isolate non-pathogenic lagovirus related to RHDV in a population of wild rabbits, living isolated from any new introduction of wild rabbits for more than 150 years, on the Kerguelen Archipelago. To that aim, we looked for RNA of RHDV-like viruses by RT-PCR semi-nested, in healthy rabbits intestinal samples collected in 4 sites of the Kerguelen Archipelago between 2004 and 2008. We have identified 8 lagovirus related RHDV. These variants are all close to RHDV strains known in France. The study of these variants is interesting to deepen knowledge about the phylogenetic lagovirus related to RHDV.

KEYWORDS :

CALICIVIRIDAE, LAGOVIRUS, RHDV, ORYCTOLAGUS CUNICULI, PATHOLOGY, IMMUNOLOGY, VP 60, KERGUELEN ARCHIPELAGO