

# Suivi de la propagation dans les populations françaises de lapins de garenne du nouveau virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) caractérisé en 2010.

G. LE GALL-RECULE<sup>1</sup>, E. LEMAITRE<sup>1</sup>, F. ZWINGELSTEIN<sup>1</sup>, A. DECORS<sup>2</sup>,  
Y. PORTEJOIE<sup>3</sup>, E. FAURE<sup>4</sup>, S. MARCHANDEAU<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Anses, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané – Unité VIPAC – BP 53 - 22440 Ploufragan, France.

<sup>2</sup>ONCFS, Direction des études et de la recherche – 5 rue de Saint Thibaud – 78610 Auffargis, France.

<sup>3</sup>ANJOU LABORATOIRE, 18 Boulevard Lavoisier – BP20943 – 49009 Angers cedex 01, France.

<sup>4</sup>FNC, 13 rue du Général Leclerc – 92136 Issy-Les-Moulineaux cedex, France

<sup>5</sup>ONCFS, Direction des études et de la recherche – 39 bd Albert Einstein – CS 42355 – 44323 Nantes cedex 3, France.

**Résumé.** A partir de l'été 2010, de nombreux cas de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD ou RHD) ont été diagnostiqués chez des lapins de chair, vaccinés ou non, dans des élevages du nord et nord-ouest de la France, ainsi que dans les populations de lapins sauvages. Les analyses ont révélé que l'agent étiologique correspondait à un nouveau virus de la VHD, nommé RHDV2, génétiquement et antigéniquement différent des virus RHDV connus. Une étude de 3 ans a été entreprise par l'Anses, l'ONCFS et la FNC pour rechercher la présence du RHDV2 dans les populations de lapins sauvages avant sa première description en élevage, suivre sa propagation géographique ainsi que son évolution génétique. Les résultats de l'étude menée sur des échantillons récoltés entre 2009 et 2012 signalent sa présence en mai 2010. Le RHDV2 s'est propagé rapidement sur tout le territoire français ; il est devenu dès 2011, le génotype majoritaire.

**Abstract. Survey of the spread throughout French wild rabbit populations of the new virus of rabbit haemorrhagic disease virus (RHD) characterised in 2010.** Since summer 2010, numerous cases of Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) have been diagnosed in rabbits, RHD-vaccinated or not, in north and north-western France both in rabbitries and wild populations. Analyses revealed that the aetiological agent was a new RHD virus, designated RHDV2, phylogenetically and antigenically distinct from other RHDV previously known. A 3 years study has been undertaken by Anses, ONCFS and FNC to look for the presence of RHDV2 in wild rabbit populations before its first detection in rabbitries, to describe its geographic spreading as well as its genetic evolution. The results of the study carried on samples collected between 2009 and 2012 show its presence in May 2010. RHDV2 has quickly spread throughout France; it has become as early as 2011, the major genotype.

## Introduction

La maladie hémorragique virale du lapin (VHD) est une maladie hautement infectieuse et souvent fatale pour le lapin domestique ou sauvage de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Elle est endémique dans les populations de lapins sauvages d'Europe, d'Australie et de Nouvelle Zélande. L'apparition de la VHD a été responsable d'importantes pertes économiques dans les élevages industriels de lapins de chair ou de lapins producteurs de fourrure mais le développement de vaccins efficaces a permis de contrôler rapidement la maladie. Cependant, celle-ci reste une menace pour les populations de lapins de garenne. L'agent étiologique de la maladie, le RHDV, est un virus appartenant au genre *Lagovirus* de la famille des *Caliciviridae*.

Fin août 2010, un cas clinique de VHD a été rapporté dans un élevage du Pas de Calais entraînant plus de 25% de mortalité du cheptel reproducteur vacciné et une forte mortalité sur les lapins en phase de croissance non vaccinés. D'autres cas ont été répertoriés par la suite et à partir du mois d'octobre, leur fréquence a fortement augmenté, de nombreux élevages du nord et nord-ouest de la France, vaccinés

ou non vaccinés, ayant été infectés. A cette période, des foyers de VHD ont été enregistrés par le réseau de Surveillance épidémiologique de la faune sauvage SAGIR (réseau ONCFS/FNC/FDC, Lamarque *et al.*, 2000) dans plusieurs populations de lapins de garenne situées dans les mêmes régions, avec parfois des taux de mortalité importants. L'analyse d'échantillons récoltés en octobre 2010 a révélé la présence d'un virus de la VHD génétiquement distant des souches existantes. Les relations phylogéniques établies avec les lagovirus connus ont montré qu'il s'agissait d'un nouveau génotype du RHDV (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a).

Les études entreprises ultérieurement ont permis de mieux caractériser cette nouvelle forme de VHD (Boucher *et al.*, 2011 ; Boucher *et al.*, 2012a ; Boucher *et al.*, 2012b ; Le Gall-Reculé *et al.*, 2011b ; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013). Il a été ainsi montré que les lésions macroscopiques et microscopiques sont similaires à celles induites par la VHD classique avec cependant des différences en termes de durée de la maladie (les mortalités apparaissent plus tardivement), de taux de mortalité en moyenne plus faibles (30%), et de la fréquence plus élevée d'animaux développant une forme

subaiguë/chronique de la maladie (présence d'ictères, parfois prononcés). Le mode de transmission de la maladie semble identique mais les mortalités touchent plus fréquemment les lapereaux de 4 semaines. Les vaccins commerciaux développés contre le RHDV protègent généralement contre ce nouveau virus mais leur durée de protection est plus courte (3-4 mois). Cette protection croisée partielle est en accord avec les caractéristiques antigéniques du virus qui diffèrent des RHDV classiques. Cependant, les tests utilisés pour le diagnostic de la VHD (HAT, ELISA) permettent la détection du nouveau virus.

Nous avons nommé ce virus, dont l'origine reste inconnue à ce jour, RHDV2 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013).

Une étude d'épidémiologie moléculaire a été entreprise courant 2011 par l'Anses, l'Office National de la Chasse et de la Faune sauvage (ONCFS) et la Fédération Nationale des Chasseurs (FNC) pour rechercher la présence du RHDV2 dans les populations de lapins de garenne avant sa première description en élevage durant l'été 2010 et suivre sa propagation géographique jusqu'en 2014. Ces données permettent de mieux connaître le type de virus susceptible de circuler à la fois au sein des populations sauvage et domestique. De même, elles sont importantes pour suivre l'évolution génétique des différentes souches qui circulent en France afin notamment d'adapter nos outils de détection. Nous présentons ici les résultats de l'étude qui a été menée sur les échantillons récoltés dans plusieurs départements français entre 2009 et 2012.

## 1. Matériel et méthodes

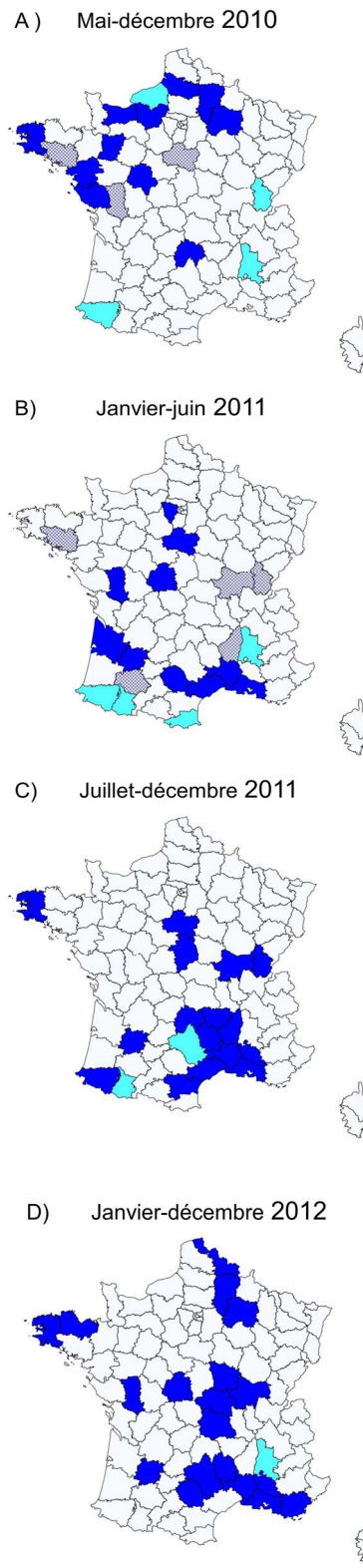
### 1.1 Echantillons biologiques

Deux cent soixante-sept échantillons de foies de lapins de garenne morts ont été analysés. Les animaux ont été prélevés par les interlocuteurs techniques départementaux du réseau SAGIR entre janvier 2009 et décembre 2012 et transmis pour analyse à Anjou Laboratoire (Angers). Ils présentaient des lésions caractéristiques de la VHD. La présence d'un virus de la VHD dans ces échantillons a été confirmée en ELISA VHD par Anjou Laboratoire. Nous avons considéré que les échantillons récoltés sur la même commune à moins de 2 mois d'intervalle correspondaient à une seule épidémiologie.

### 1.2 Analyses moléculaires

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 µl d'exsudat de foie à l'aide du kit "RNeasy Mini kit" (QIAGEN) et les ADN complémentaires aux ARN viraux ont été synthétisés. Pour le génotypage des virus étudiés et la phylogénie, une région du génome de 794 pb située dans une partie variable du gène codant la protéine de capsid VP60 a été amplifiée par PCR. Les amplifiats ont été purifiés puis séquencés dans les deux directions en utilisant les amorces de PCR. Les quelques échantillons négatifs avec cette première PCR ont été analysés à l'aide d'une seconde

**Figure 1 : Distribution spatiale des différents génotypes de souches de VHD caractérisées dans les populations de lapins de garenne sauvages en France entre 2010 et 2012.**



Les données sont regroupées par département. La couleur indique le génotype des souches responsables des épidémies : bleu clair = RHDV classique, bleu foncé = RHDV2, quadrillé = les deux types de souches. Gris clair = pas de donnée analysée.

PCR permettant d'amplifier une région plus conservée du gène VP60 (274 pb). Les amplifiats alors obtenus pour certains d'entre eux ont été séquencés comme décrit précédemment, mais ces séquences n'ont servi qu'au génotypage.

Le génotypage a été réalisé par alignements multiples (méthode CLUSTAL W) des séquences obtenues avec celles de RHDV représentatifs des différents groupes génétiques déterminés jusqu'à présent (Le Gall-Reculé *et al.*, 2003 ; Kinnear et Linde, 2010) et le RHDV2 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013). Par ailleurs, afin de confirmer les relations de parentés entre les virus et d'apprécier leur évolution génétique dans le temps, des analyses phylogéniques ont été réalisées selon la méthode phénétique du "Neighbor-joining" à l'aide du logiciel MEGA version 5.

## 2. Résultats

L'étude rétrospective menée sur les échantillons récoltés à partir de janvier 2009 a permis de détecter pour la première fois le RHDV2 dans un prélèvement récolté en mai 2010 dans le centre de la France (Cantal), quelques mois avant sa caractérisation en élevage.

Les analyses de génotypage réalisées à partir de cette date ont montré qu'en plus des souches classiques de RHDV, le RHDV2 était identifié de plus en plus fréquemment. Ainsi, entre les mois de mai et de décembre 2010, le RHDV2 a été responsable de 74% des foyers de VHD répertoriés (25/34 cas), principalement localisés dans le nord-ouest de la France (Figure 1A). Entre janvier et juin 2011, le RHDV2 a été responsable de 73% des cas de VHD (29/40) et a été identifié dans le sud de la France dès le mois de février (Figure 1B). Ces données montrent sa diffusion rapide et à large échelle dans les populations de lapins de garenne. Entre juillet et décembre 2011, le RHDV2 a été trouvé dans 95% des cas (40/42), puis en 2012 dans 97% des cas (31/32), répartis dans toute la France (Figures 1C et 1D).

Les résultats des études phylogéniques ont montré que sur la période considérée, les souches RHDV et RHDV2 analysées ont évolué génétiquement mais de façon attendue pour cette famille de virus. Aucun nouveau génotype de RHDV n'a été mis en évidence.

## 3. Discussion

L'émergence d'un nouveau virus de la VHD (RHDV2) génétiquement très distant des souches RHDV décrites jusqu'en 2010 dans le monde, est en grande partie à l'origine des mortalités rapportées au cours de l'été 2010 dans les populations de lapins de garenne du nord et nord-ouest de la France et dans de nombreux élevages de lapins de chair.

Notre étude épidémiologique a montré que le premier cas de VHD documenté causé par le RHDV2 a été caractérisé en mai 2010 dans le Cantal. Parallèlement en élevage, la première détection rétrospective du RHDV2 date d'avril 2010 sur des lapins en croissance non vaccinés, en Ille-et-Vilaine (Le Gall-Reculé *et al.*,

2011b ; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013). Ce virus est resté ainsi non détecté jusqu'à l'apparition en août 2010 des premiers cas de VHD dans des élevages de lapins de chairs vaccinés contre la maladie, situés dans le nord et le nord-ouest de la France. Il a ensuite diffusé en quelques mois vers le sud de la France. Cette diffusion rapide est assez spectaculaire et peut s'expliquer par la protection imparfaite des lapins conférée par les souches classiques de RHDV contre le RHDV2. On remarque que le RHDV2 ne semble pas avoir diffusé à partir du Cantal, ce qui peut s'expliquer par la distribution fragmentée des populations de lapins de garenne dans cette région (Marchandeau S., communication personnelle).

Nos données montrent que dès 2011, le RHDV2 a remplacé presque en totalité les souches classiques de RHDV dans les populations sauvages. Il en est de même en élevage (Le Gall-Reculé G., communication personnelle). Cette constatation est importante à prendre en compte pour la filière cunicole puisque les vaccins commerciaux, développés à partir de souches classiques de VHD, ont une protection limitée contre le RHDV2.

---

## Conclusion

Cette étude va se poursuivre jusqu'en 2014. Elle permettra de suivre dans le temps et dans l'espace la présence du RHDV2 dans les populations sauvages, son évolution génétique et de confirmer ou non la quasi-disparition des souches classiques de RHDV au profit du RHDV2. Ces informations sont d'importance majeure pour l'élaboration des stratégies vaccinales des élevages de lapins de chair.

---

## Remerciements

Nous remercions Amandine Thépault, Alexis Le Hardy, Maxime Diraison, Aodrena Le Gall et Audrey Quemener pour leurs travaux de caractérisation moléculaire d'une grande partie des souches analysées dans cette étude (stages de fin d'études). Nous adressons aussi tous nos remerciements aux ITD SAGIR, agents de l'ONCFS et techniciens de FDC, qui ont fait remonter les cas d'épizooties dans les populations de lapins de garenne et à Marie Moinet (Anses, Laboratoire de Nancy) pour son soutien logistique dans la gestion de la base de données SAGIR.

Cette étude a été soutenue par des subventions de l'ONCFS et de la FNC.

---

## Références

- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., PLASSIART G., SRAKA B., 2011. Description clinique, nécropsique et histologique de cas de Maladie Hémorragique Virale (VHD) à virus variant, survenus dans 60 élevages de lapins de chairs (*Oryctolagus cuniculus*) vaccinés ou non vaccinés en France en 201-2011. *14èmes Journées de la Recherche Cunicole, 22-23 novembre, Le Mans, France*, 143-146.
- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., LE NORMAND B., BERTAGNOLI S., GUERIN J-L., DECORS A., MARCHANDEAU S., PLASSIART G., 2012a. Nouvelle forme de maladie hémorragique virale due au virus "variant 2010". *Le Point*

- Vétérinaire*, juillet-août 2012, 327, 30-34.
- BOUCHER S., LE GALL-RECLÉ G., LE NORMAND B., BERTAGNOLI S., GUERIN J-L., DECORS A., MARCHANDEAU S. PLASSIART G., 2012b. Aspect clinique de la maladie hémorragique virale due au virus "variant 2010". *Le Point Vétérinaire*, juillet-août 2012, 327, 35-38.
- KINNEAR M. ET LINDE C.C., 2010. Capsid divergence in rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.*, 91, 174-181.
- LAMARQUE F., HATIER C., ARTOIS M., BERNY P., DIEDLER C., 2000. Le réseau SAGIR, réseau national de suivi sanitaire de la faune sauvage française. *Epidémiologie et Santé Animale* 37, 21-30.
- LE GALL-RECLÉ G., ZWINGELSTEIN F., LAURENT S., DE BOISSESON 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-RECLÉ G., ZWINGELSTEIN F., BOUCHER S., LE NORMAND B., PLASSIART G., PORTEJOIE Y., DECORS A., BERTAGNOLI S., GUERIN J-L., MARCHANDEAU S., 2011a. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Record*, Feb. 5, 137-138.
- LE GALL-RECLÉ G., ZWINGELSTEIN F., BOUCHER S., LE NORMAND B., BERTAGNOLI S., GUERIN J-L., PORTEJOIE Y., DECORS A., MARCHANDEAU S., 2011b. Caractérisation d'un nouveau variant de virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) en France. *14èmes Journées de la Recherche Cunicole, 22-23 novembre, Le Mans, France*, 147-150.
- LE GALL-RECLÉ G., LAVAZZA A., MARCHANDEAU S., BERTAGNOLI S., ZWINGELSTEIN F., CAVADINI P., MARTINELLI N., LOMBARDI G., GUERIN J-L., LEMAITRE E., DECORS A., BOUCHER S., LE NORMAND B., CAPUCCI L., 2013. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.*, 44, 81..