

Etude du portage hépatique du virus RHVD chez des lapereaux de 35 et 57 jours issus de mères mortes de VHD (Maladie Hémorragique Virale) avant le sevrage

S. BOUCHER¹, C. BOUCRAUT BARALON², A.-C. BOUVIER³, J.L. PINGRET², C. JACQUINET⁴

¹LABOVET (Réseau Cristal) - BP 539 - 85505 Les Herbiers cedex

²SCANELIS, 23 Chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE cedex 03

³Clinique vétérinaire, rue des Saulaies, 49080 Bouchemaine

⁴CEVA Santé Animale, 10 av Ballastière, 33500 LIBOURNE

Résumé. Dans un élevage vendéen, une bande de lapines primipares non vaccinées a présenté un épisode de VHD confirmé par ELISA. Elles avaient au moment de leur mort des lapereaux de 32 jours. L'analyse du foie des lapereaux issus de ces femelles avec une technique RT-PCR en temps réel a révélé un porteur sain à 35 jours. Les lapereaux ont été vaccinés avec 0,5 ml de Lapinject VHD® à l'âge de 35 jours puis leur foie ont été analysés avec la même technique quand les lapereaux ont eu 57 jours. Aucun de ces lapins n'est mort de VHD à l'âge de 10 semaines et pourtant, 3 sujets étaient porteurs sains à 57 jours. Les auteurs conseillent donc une vaccination des lapins d'engraisements en milieu contaminé sur plusieurs bandes et non sur une seule.

Abstract. Study of hepatic virus RHVD-carrying rabbits, in 35- and 57-day-old animals originating from mothers dead from VHD (Viral Hemorrhagic Disease) before weaning. In a rabbitry of Vendée (France), does which were not vaccinated developed RHD, as confirmed by ELISA. The young rabbits were 32 days old when the mother died. The analysis of young rabbits livers with a real time RT-PCR technique showed a contaminated but healthy rabbit at 35 days. The young rabbits were vaccinated with 0,5 ml of Lapinject VHD® when they were 35 days old and their livers were analysed with the same technique when the rabbits were 57 days old. None of these rabbits had died from RHD at the age of 10 weeks, however three rabbits were contaminated but healthy when they were 57 days old. Thus the authors advise to vaccinate several consecutive batches in case of rabbits reared in infected rabbit farms.

Introduction

Contrairement à la plupart des lapines reproductrices, les lapins d'engraisement ne sont en général pas vaccinés contre la VHD dans les élevages français et ce pour des raisons de coût du vaccin. En cas de déclaration de maladie dans un élevage, nous conseillons de vacciner tous les sujets sevrés et d'effectuer un rappel sur les femelles si nécessaire.

L'objectif de cette étude est de savoir si des sujets issus de mères atteintes puis mortes de VHD sont porteurs au moment du sevrage. Qu'en est-il ensuite de ces lapereaux vaccinés au sevrage en milieu contaminé ? Restent-ils porteurs ? Peuvent-ils être malades ?

Les réponses à ces questions sont importantes car elles nous permettent de mettre en place des plans de prophylaxie vaccinale raisonnés. Une des questions qui nous est fréquemment posée dans ce cas de figure est « la vaccination d'une bande d'engraisement suffit-elle » ?

1. Matériel et méthodes

Nous avons travaillé dans un élevage situé en Vendée qui conduit son troupeau de 650 cages mères en bande unique « tout-vide, tout-plein » sur 42 jours. La vaccination avait été oubliée sur une bande du préceptel. Lors d'un passage viral, cette bande a largement exprimé la maladie. Les autopsies réalisées selon la technique décrite par Boucher et Nouaille

(2002) ont permis de mettre en évidence les différentes lésions observées sur 10 femelles mortes et de proposer un diagnostic.

La confirmation du diagnostic a été effectuée par la recherche du virus de la VHD sur les foies congelés des lapines. La technique dite ELISA sandwich, décrite par le CNEVA (1996) permet de rechercher les antigènes viraux de RHVD directement dans les exsudats de foie, organe considéré comme riche en particules virales. La densité optique (DO) calculée de l'échantillon est exprimée par la différence de DO entre la révélation par le sérum positif et la révélation par le sérum négatif. Le foie est considéré comme positif si $DO_c > 0,1$.

Les femelles positives à ce test élevaient alors des lapereaux de 32 jours d'âge prêts à être sevrés. Ce sont ces lapereaux qui ont servi de matériel d'étude. Vingt lapereaux non vaccinés à 35 jours d'âge ont été analysés. Leurs frères et sœurs ont tous été vaccinés (3000 sujets) à 35 jours. Ils ont reçu une dose de vaccin LAPINJECT VHD® de 0,5 ml par voie sous cutanée. Vingt lapereaux de ce lot issu de mères atteintes de VHD et vaccinés à 35 jours ont été prélevés vingt-deux jours plus tard, à l'âge de 57 jours, soit plus de 8 semaines, âge où ils sont sensibles à la maladie.

Pour chaque lapereau, un morceau de foie a été congelé afin de pouvoir réaliser la recherche d'antigène par une technique ELISA en cas de besoin

et une autre partie du foie a été analysée par une technique de RT-PCR en temps réel. Des précautions importantes ont été prises afin d'éviter la possibilité de contamination des échantillons lors des prélèvements et au cours de la RT-PCR

Les foies ont été conservés à -20°C jusqu'au moment du traitement des prélèvements. Les acides nucléiques ont été extraits à l'aide du kit Nucleospin RNA Virus, Macherey Nagel. Les acides nucléiques ont été élués dans 200 µl d'eau RNase free. Pour la RT-PCR en temps réel, deux amorces spécifiques ainsi qu'une sonde TaqMan® permettant d'amplifier un fragment de 93 pb sur le gène de la protéine de capsid VP60 du virus de la VHD ont été utilisées. Les amorces et la sonde ont été dessinées à partir d'un alignement de 63 séquences du gène de la VP60 du virus de la VHD. Des témoins positifs (gène de la VP60 cloné et cDNA de souches de référence) ainsi que des témoins négatifs (produit d'extraction d'eau sur chaque série) ont été introduits sur chaque série de PCR. L'absence d'inhibiteur de PCR a été vérifiée pour chaque extrait. La spécificité de l'amplification a été vérifiée par l'obtention d'une courbe caractéristique après PCR en temps réel sur un appareil de détection de séquences ABI 7900 HT. Les analyses ont été réalisées dans un environnement sécurisé dédié au diagnostic moléculaire.

2. Résultats

Les autopsies ont permis de mettre en évidence les lésions mentionnées dans le tableau 1.

Tableau 1 : lésions observées après autopsie des lapines

Type de lésions	Nombre de cas observés sur les 10 femelles	%
Hypertrophie du thymus avec pétéchies	10	100 %
Splénomégalie	10	100 %
Hépatite	7	70 %
Pétéchies sur le poumon	9	90 %
Trachée : congestion, sang non coagulé	5	50 %
Ictère	5	50 %
Sang dans les sinus	0	0 %

Toutes les lapines étudiées présentent au moins une des lésions caractéristiques d'une hépatite virale due au RHVD (Morisse, 1988 ; Ruvoen-Clouet, 1995 ; Boucher et Nouaille, 2002). On note une hépatite, une congestion pulmonaire, une hypertrophie du thymus, une splénomégalie, une trachéite hémorragique mais pas d'épistaxis. Cependant, une pasteurellose suraiguë peut très bien mimer ce tableau

lésionnel (hépatite, troubles de la coagulation, splénomégalie) selon Boucher (1989). Il était donc important de rechercher les antigènes viraux pour établir un diagnostic de certitude.

Les résultats des tests ELISA sur les foies congelés des lapines autopsiées sont reportés dans le tableau 2. Tous les prélèvements ont été traités simultanément.

Tableau 2 : Présence d'antigènes viraux de RHVD sur exsudats de foies (tests ELISA VHD)

Puits	DO	Interprétation
Sérum référence négatif	0,03	Négatif
Sérum référence positif	1,00	Positif
Echantillon 1	0,97	Positif
Echantillon 2	0,94	Positif
Echantillon 3	1,03	Positif
Echantillon 4	0,92	Positif
Echantillon 5	0,79	Positif
Echantillon 6	0,94	Positif
Echantillon 7	0,74	Positif
Echantillon 8	0,73	Positif
Echantillon 9	1,19	Positif
Echantillon 10	1,26	Positif

Les valeurs de DO obtenues à partir des exsudats de foies étant supérieures au seuil de détection du sérum de référence, il en a été conclu que, les foies des 10 femelles prélevés après autopsie portent tous des particules virales de RHVD.

Les analyses de RT-PCR sur le gène de la protéine VP60 du virus de la VHD se sont révélées positives sur quatre des 40 échantillons testés (1/20 foies de lapereaux de 35 jours non vaccinés et 3/20 foies de lapereaux vaccinés âgés de 57 jours) (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des RT-PCR sur foies de lapereaux issus de mères atteintes de VHD

Référence	Résultat	Remarque
Lapereaux non vaccinés âgés de 35 jours		
LH 80996/1 à 13	Négatif	
LH 80996/14	Positif	Charge virale faible*
LH 80996/15 à 20	Négatif	
Lapereaux vaccinés à 35 j et âgés de 57 jours		
LH 81348/1 à 6	Négatif	
LH 81348/7	Positif	Charge virale faible*
LH 81348/8	Négatif	
LH 81348/9	Positif	Charge virale faible*
LH 81348/10 à 16	Négatif	
LH 81348/17	Positif	Charge virale faible*
LH 81348/18 à 20	Négatif	

* inférieure au seuil de quantification

3. Discussion

Dans notre étude, toutes les femelles ayant produit les lapereaux se sont révélées atteintes de VHD. Dans cet élevage, seule une bande de précheptel n'était pas vaccinée et la mortalité totale a été de 8% du cheptel reproducteur sur la période d'épizootie alors qu'elle avoisine 0% en temps normal, une vaccination d'urgence ayant été mise en place sur ces animaux ainsi qu'un rappel sur l'ensemble des autres reproductrices. Ce diagnostic a été confirmé par la technique ELISA VHD, technique de référence classiquement employée depuis 15 ans pour établir un diagnostic de certitude.

La technique de RT-PCR en temps réel a confirmé la présence d'ARN génomiques spécifiques du virus de la VHD dans quatre foies (1 foie de lapin de 35 jours non vacciné et 3 foies de lapereaux vaccinés âgés de 57 jours).

La proportion assez faible d'animaux positifs pourrait sans doute être corrigée en analysant l'intestin plutôt que le foie des lapereaux de 35 jours, la contamination par voie orale ayant été démontrée par ailleurs. Cette hypothèse resterait à objectiver. Aucun lapereau n'est mort de VHD à 35 jours ce qui semble en accord avec les constatations de différents auteurs qui montrent que les lapins dans leur jeune âge ne sont pas sensibles à la maladie (Ruvoen Clouet, 1995 ; Boucher et Nouaille, 2002) à quelques exceptions près. Stahl (1993) explique qu'avant que les lapins soient mûres, les virus circulent et ne peuvent pas se fixer aux hépatocytes.

Aucun lapereau issu de ces femelles atteintes n'est mort de VHD à l'issue de l'expérience. L'abattage a eu lieu à 10 semaines soit un peu moins de deux semaines après l'arrêt des analyses et nous n'avons pas constaté de mortalité due à la VHD à cette date. La protection vaccinale est efficace dans le cas cité.

Cette étude montre que les lapins issus de mères atteintes de VHD peuvent être porteurs sains du virus à 35 jours d'âge. Le fait de les vacciner n'a pas empêché le portage sur quelques sujets mais la vaccination les a protégés de la maladie.

Cette étude prouve qu'il est important de vacciner les lapereaux issus d'un élevage contaminé par la VHD mais elle montre aussi que la vaccination d'une seule bande d'engraisement est probablement insuffisante

pour protéger l'élevage. En effet, les lapereaux vaccinés restent parfois porteurs et peuvent probablement ré-excréter le virus dans l'environnement. On peut donc penser qu'un troupeau vacciné reste potentiellement dangereux pour des lapins non vaccinés. En cas d'épizootie, on doit donc conseiller de vacciner les lapins d'engraisement au minimum pendant 2 bandes et peut-être plus. Parallèlement, une désinfection poussée est indispensable, l'excrétion du virus par un lapin vacciné étant possible.

L'idéal serait sans doute de conseiller la vaccination sans discontinuité des toutes les bandes sevrées. Or, pour des raisons économiques, il n'est pas possible de le faire. Habituellement, les reproducteurs sont correctement vaccinés mais pas les lapins d'engraisement. Il serait intéressant de poursuivre l'étude menée pour savoir à partir de quand il n'est plus retrouvé de particule virale sur les lapins et/ou dans l'environnement avec un tel plan de prophylaxie.

Conclusion

Les lapereaux issus de mères atteintes de VHD sont parfois porteurs du virus. Ils n'expriment pas la maladie dans leur jeune âge.

S'ils sont vaccinés, ils sont protégés mais ils restent porteurs sains du virus RHVD. Il est donc important lors d'épisode de VHD de conseiller la vaccination de plusieurs bandes d'engraisement.

Références

- BOUCHER S. 1989. La maladie hémorragique virale du lapin . *Cuniculture* N° 89, 16 (5) 242.
- BOUCHER S., NOUAILLE L., 2002. « Manuel Pratique des Maladies des Lapins », France Agricole 2^e éd., 272 p (14 – 19 et 104 – 109)
- CNEVA PLOUFRAGAN. 1996. Mise en évidence du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHDv) dans les foies de lapin par la technique ELISA. Manuel technique révision 2 pages 1 à 5.
- MORISSE JP., 1988. Le syndrome septicémie hémorragique chez le lapin : premières observations en France. *Le Point Vétérinaire* vol 20, N°117.
- RUVOEN CLOUET N. 1995. Le virus de la maladie hémorragique du lapin : étude du récepteur erythrocytaire et des caractéristiques antigéniques appliquées au diagnostic séroépidémiologique. *Thèse de doctorat* de l'Université de Nantes, spécialité virologie.
- STAHL A-F. 1993. Caractérisation de la protéine majeure du virus de la maladie hémorragique virale du lapin. *Thèse de doctorat vétérinaire*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

