

Durée de protection conférée par un vaccin vis-à-vis des calicivirus classique et variant de la maladie hémorragique virale du lapin.

H. MORIN¹, O. LE MINOR¹, F. BEILVERT¹, T. LE MOULLEC¹

¹ Laboratoire FILAVIE, la Corbière – 49450 Roussay, France

Résumé – La survenue en 2010 de cas de maladie hémorragique virale (VHD) sur des lapins issus de cheptels correctement vaccinés a conduit à la mise en évidence d'un nouveau calicivirus dénommé RHDV2 pour lequel les vaccins existants n'apportaient pas la protection attendue. Cette situation nous a amenés à mettre au point un premier vaccin en urgence (disposant d'une ATU) qui a permis de contrôler cette affection. La présence des virus variant et classique dans l'environnement et l'absence de protection croisée entre les deux virus RHDV1 et RHDV2 nous ont conduits à développer un vaccin bivalent permettant d'obtenir une protection vis-à-vis des deux calicivirus.

Abstract – Duration of protection afforded by a vaccine against RHVD1 and RHVD2 strains in rabbit.

The onset in 2010 of several outbreaks of RHVD on rabbits from vaccinated herds resulted in the discovery of a new calicivirus named RHDV2 for which existing vaccines did not protect properly. To address this situation our laboratory developed a first vaccine in emergency which resulted in the control of this new disease. Nevertheless the persistence of the two viruses and the lack of cross-protection between them led us to develop a new bivalent vaccine in order to obtain a protection against both caliciviruses.

Introduction

La maladie hémorragique virale du lapin (VHD) est une maladie fortement contagieuse et mortelle pour le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) apparue en France à la fin des années 80. L'agent étiologique, le RHDV, est un calicivirus appartenant au genre *Lagovirus*. Le développement de la vaccination a permis de contrôler la maladie de manière satisfaisante jusqu'à la survenue de cas en 2010 sur des cheptels apparemment correctement vaccinés. La maladie présentait toutefois quelques caractéristiques différentes de la forme initiale avec en particulier une atteinte d'animaux plus jeunes (parfois de moins de 10 jours) un tableau clinique avec un fort ictère et évoluant généralement sur un mode moins aigu (Boucher *et al.*, 2011). Les analyses entreprises à partir de ces épisodes cliniques par l'ANSES Ploufragan-Plouzané ont permis de caractériser un nouveau virus qui forme à lui seul un nouveau groupe relativement distant des autres calicivirus connus et dénommé « RHDV2 » (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a et 2013). Devant cette situation nous avons développé en urgence un nouveau vaccin inactivé contenant le virus variant de la VHD (FILAVAC VHD VARIANT) et démontré la protection vis-à-vis d'une épreuve effectuée avec un virus variant. A l'inverse un lot de vaccin inactivé VHD classique expérimental préparé selon la même formulation que le vaccin FILAVAC VHD VARIANT n'a pas permis d'obtenir de protection satisfaisante vis-à-vis de cette même épreuve (Le Minor *et al.*, 2013). Nous avons alors décidé de développer un vaccin bivalent permettant

une protection vis-à-vis de ces deux agents variant et classique de la VHD et cet article présente les résultats expérimentaux obtenus avec le vaccin commercial FILAVAC VHD C+V et tout particulièrement la durée de protection conférée par l'administration d'une dose recommandée.

1. Matériel et méthodes

1.1. Vaccin

FILAVAC VHD C+V (dossier de demande d'AMM en cours d'instruction) est un vaccin inactivé adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium, contenant un virus classique et un virus variant. Il est administré par voie sous-cutanée, à des lapins âgés de 4 et de 10 semaines.

1.2. Animaux

Deux-cent-six lapins EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés) ont été mis en place et confinés dans un bâtiment d'élevage protégé :

- 78 lapins de 10 semaines d'âge ont reçu une dose recommandée de vaccin VHD C+V par voie sous-cutanée, 78 lapins du même âge ont été conservés comme témoins ;
- 25 lapereaux de 4 semaines d'âge ont reçu une dose recommandée de vaccin VHD C+V par voie sous-cutanée, 25 lapereaux du même âge ont été conservés comme témoins (dont 20 ont reçu une injection d'eau PPI par

voie sous-cutanée pour l'étude de l'innocuité).

Six mois après la vaccination, un premier groupe de lapins âgés de 10 semaines en début d'étude, a été tiré au sort et transféré en animalerie protégée pour la réalisation des épreuves virulentes (essai 1). Douze mois après la vaccination, un second groupe de lapins de même âge (essai 2) ainsi que le groupe de lapins âgés de 4 semaines en début d'étude (essai 3), ont été transférés dans l'animalerie pour la réalisation des épreuves virulentes

1.3. Épreuve virulente

Les virus d'épreuve, différents des souches vaccinales sont préparés et administrés par voie intramusculaire à des titres ayant fait l'objet d'une calibration préalable. Il s'agit du virus de référence V/RHD/4 (souche ANSES), pour la souche « classique » d'épreuve et d'un virus variant provenant d'un élevage français en 2012 pour la souche « variante » d'épreuve.

Essai n°1 :

- 10 sujets vaccinés et 6 lapins témoins ont été éprouvés avec RHDV Souche Classique (SC) ;
- 10 sujets vaccinés et 15 lapins témoins ont été éprouvés avec le RHDV Souche Variante (SV) ;

Le pourcentage de morts imputables à la VHD a été calculé sur les 18 jours suivant l'épreuve.

Essai n°2 :

- 11 sujets vaccinés et 6 lapins témoins ont été éprouvés avec RHDV SC ;
- 11 sujets vaccinés et 16 lapins témoins ont été éprouvés avec le RHDV SV ;

Le pourcentage de morts imputables à la VHD a été calculé sur les 14 jours suivant l'épreuve.

Essai n°3 :

- 13 sujets vaccinés et 7 lapins témoins ont été éprouvés avec RHDV SC ;
- 11 sujets vaccinés et 16 lapins témoins ont été éprouvés avec le RHDV SV ;

Le pourcentage de morts imputables à la VHD a été calculé sur les 14 jours suivant l'épreuve.

1.4. Mesures

Un suivi clinique journalier de l'ensemble, ainsi que pondéral et sérologique tous les deux mois sur 20 lapins de chaque groupe a été effectué pendant les 6 premiers mois de l'étude.

Un taux de mortalité non spécifique de 3% similaire dans le groupe vacciné et témoin, a été relevé sur les 6 premiers mois. Les animaux morts ont été contrôlés afin d'écarter toute contamination par un virus VHD,

ce qui a été également confirmé par une absence de séroconversion chez l'ensemble des témoins.

Une observation du lieu d'injection et un relevé de température ont été effectués sur un sous-groupe de lapins de 4 semaines d'âge pendant les 4 jours suivant la vaccination.

Après épreuve les animaux sont examinés quotidiennement, autopsiés en cas de mortalité et systématiquement pour l'ensemble à la fin de la période d'observation.

Un prélèvement de foie pour la recherche d'antigène du virus RHVD est réalisé sur tous les animaux morts.

2. Résultats et discussion

2.1. Croissance et observations cliniques

L'analyse des poids moyens n'a révélé aucune différence significative entre les témoins et les vaccinés, pour chaque groupe d'âge. Aucune réaction locale n'a été observée un mois après la vaccination, à l'exception d'un petit nodule détectable à la palpation (1 lapin vacciné /20) qui s'est résorbé spontanément après 4 mois. Deux et trois jours après la vaccination, tous les animaux vaccinés présentaient une température comprise dans l'intervalle physiologique normal. Les températures moyennes du groupe vacciné n'étaient pas significativement supérieures à celles du groupe témoin.

2.2. Résultats des épreuves virulentes

Épreuve n°1 : épreuve à l'aide des souches classique et variante sur animaux vaccinés à 10 semaines et éprouvés 6 mois plus tard.

Le pourcentage de morts imputables à la VHD a été calculé sur les 18 jours suivant l'épreuve.

Dans les groupes témoins, la sévérité des épreuves a été jugée satisfaisante en raison :

- de 6 lapins sur 6 (100%) morts après l'épreuve RHDV SC dans un délai de 2 à 4 jours ;
- de 6 lapins sur 15 (40%) morts après l'épreuve RHDV SV dans un délai de 3 à 6 jours.

Sept jours après l'épreuve RHDV SC, un sujet vacciné a été euthanasié pour des raisons de bien-être animal suite à l'apparition de troubles musculo-squelettiques. L'examen nécropsique, ainsi que les recherches d'antigènes et d'ARN de RHDV dans le foie de l'animal, ont permis d'exclure la VHD.

Les autres lapins vaccinés sont restés en bonne santé pendant l'ensemble du suivi.

L'épreuve permet d'observer une protection totale 6 mois après l'administration d'une dose recommandée de vaccin VHD C+V, par voie sous-cutanée, sur des lapins de 10 semaines d'âge sensibles à la VHD, éprouvés avec des souches virulentes RHDV classique et variante.

Cf. tableaux n° 1 et 2 en annexe

Epreuve n°2 : épreuve à l'aide des souches classique et variante sur animaux vaccinés à 10 semaines et éprouvés 12 mois plus tard.

Dans les groupes témoins, la sévérité des épreuves a été jugée satisfaisante en raison :

- de 6 lapins sur 6 (100%) morts après l'épreuve RHDV SC dans un délai de 2 jours ;
- de 11 lapins sur 16 (69%) morts après l'épreuve RHDV SV dans un délai de 3 à 4 jours.

Huit jours après l'épreuve RHDV SC, un sujet vacciné a été retrouvé mort sans aucune lésion évocatrice de RHVD et présentant simplement une rupture de la paroi stomacale due à une lyse post-mortem. La recherche d'antigènes de RHDV dans le foie de l'animal s'est révélée négative permettant d'exclure la VHD.

Les autres lapins vaccinés sont restés en bonne santé pendant l'ensemble du suivi.

Les résultats en annexe (tableau 3 et 4) montrent une protection totale 12 mois après l'administration de la dose recommandée de vaccin VHD C+V, par voie sous-cutanée, sur des lapins de 10 semaines d'âge sensibles à la VHD, éprouvés avec des souches virulentes RHDV classique et variante.

Epreuve n°3 : épreuve du groupe de lapins âgés de 4 semaines en début d'étude éprouvés 12 mois après vaccination.

Dans les groupes témoins, la sévérité des épreuves a été jugée satisfaisante en raison :

- de 7 lapins sur 7 (100%) morts après l'épreuve RHDV SC dans un délai de 2 jours ;
- de 8 lapins sur 16 (50%) morts après l'épreuve RHDV SV dans un délai de 3 à 6 jours.

Entre 2 et 6 jours après l'épreuve RHDV SC, trois sujets vaccinés ont été retrouvés morts et présentaient à l'autopsie des signes classiques de VHD. La recherche d'antigènes de RHDV dans les foies de ces animaux s'est révélée positive, confirmant la mortalité imputable au RVHD.

Les autres lapins vaccinés sont restés en bonne santé pendant l'ensemble du suivi. Cf. tableaux 5 et 6 en annexe.

Les résultats de cette épreuve permettent de démontrer l'obtention d'une protection totale (100% de protection) 12 mois après l'administration d'une dose recommandée de vaccin VHD C+V, par voie sous-cutanée, sur des lapins de 4 semaines d'âge, éprouvés avec une souche virulente RHDV variante.

Elle révèle en revanche une protection partielle mais insuffisante (77% de protection) 12 mois après l'administration du vaccin VHD C+V vis-à-vis de la souche classique sur des lapins de 4 semaines d'âge sensibles à la VHD.

Conclusions

L'ensemble de ces travaux montre l'efficacité du vaccin bivalent commercial FILAVAC VHD C+V vis-à-vis des calicivirus souches classique et variante (RHVD1 et RHVD2) dans les conditions d'utilisation préconisées. La protection obtenue après une seule administration de vaccin sur des animaux de 10 semaines s'avère efficace jusqu'à 12 mois après vaccination. Sur des animaux plus jeunes (4 semaines) la protection vis-à-vis d'une épreuve classique apparaît insuffisante 12 mois après vaccination et conduit à la préconisation d'un rappel à l'âge de 10 semaines pour bénéficier d'une durée d'immunité d'un an.

Remerciements

A Margaret SOURICE et Rémi MELLET pour leur importante contribution à cette étude.

Références

- Boucher S., Le Gall-Recule G., Plassiart G., Sraka B., 2011. Description clinique, nécropsique et histologique de cas de la Maladie Virale Hémorragique (VHD) à virus variant, survenus dans 60 élevages de lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) vaccinés ou non vaccinés en France en 2010/2011. 13^{ème} Jour. Rech. Cunicole, 22-23 nov., Le Mans, France.
- Dalton KP., Nicieza I., Balseiro A., Muguerza MA., Rosell JM., Casais R., Alvarez AL., Parra F., 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *EID*, 12 : 2009-12.
- Le Gall-Recule G. 1999. Détection du virus responsable de la maladie hémorragique virale du lapin par ELISA. Révision du 3 février 1999, pp4
- Le Gall-Recule G., Boucher S., Le Normand b., Plassiart G., Portejoie Y., Decors A., Bertagnoli S., Guerin JL., Marchandeau S., 2011a. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.*, 168: 137-138.
- Le Gall-Recule G., Zwingelstein F., Boucher S., Le Normand b., Bertagnoli S., Guerin JL., Portejoie Y., Decors A., Marchandeau S., 2011b. Caractérisation d'un nouveau variant du virus de la maladie virale hémorragique du lapin (VHD) en France. 13^{ème} Jour. Rech. Cunicole, 22-23 nov., Le Mans, France.
- Le Gall-Recule G., Lavazza A., Marchandeau S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guerin JL., 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.
- Le Minor O. ; Beilvert F., Le Moullec T., Mellet R., Djadour D., Martineau J. Evaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin contre le virus variant de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) 15^{ème} Jour. Rech. Cunicole, 19-20 nov., Le Mans, France.

Annexes :

Tableau 1 : résultats de l'épreuve classique sur lapins vaccinés à 10 semaines, 6 mois après vaccination

Groupe	Epreuve	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J18
T10 SC	0/6	0/6	5/6	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
V10 SC	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1*/10

Test de probabilité exacte de Fisher (unilatérale) : $p=0,0002$ (* en excluant le lapin euthanasié non significatif du groupe V10 SC)

Tableau 2 : résultats de l'épreuve variante sur lapins vaccinés à 10 semaines, 6 mois après vaccination

Groupe	Epreuve	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J18
T10 SV	0/15	0/15	0/15	3/15	5/15	5/15	6/15	6/15	6/15	6/15	6/15	6/15	6/15	6/15	6/15
V10 SV	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Test de probabilité exacte de Fisher (unilatérale) : $p=0,0283$

Tableau 3 : résultats de l'épreuve classique sur lapins vaccinés à 10 semaines, 12 mois après vaccination

Groupe	Epreuve	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
T10 SC	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
V10 SC	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	1/11	1/11	1/11	1/11	1/11	1/11	1*/11

Test de probabilité exacte de Fisher (unilatérale) : $p=0,0001$ (* en excluant le lapin mort non significatif du groupe V10 SC)

Tableau 4 : résultats de l'épreuve variante sur lapins vaccinés à 10 semaines, 12 mois après vaccination

Groupe	Epreuve	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
T10 SV	0/16	0/16	0/16	9/16	11/16	11/16	11/16	11/16	11/16	11/16	11/16	11/16	11/16	11/16	11/16
V10 SV	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11

Test de probabilité exacte de Fisher (unilatérale) : $p=0,0003$

Tableau 5 : résultats de l'épreuve classique sur lapins vaccinés à 4 semaines, 12 mois après vaccination

Groupe	Epreuve	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
T4 SC	0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
V4 SC	0/13	0/13	2/13	2/13	2/13	2/13	3/13	3/13	3/13	3/13	3/13	3/13	3/13	3/13	3/13

Test de probabilité exacte de Fisher (unilatérale) : $p=0,0015$

Tableau 6 : résultats de l'épreuve variante sur lapins vaccinés à 4 semaines, 12 mois après vaccination

Groupe	Epreuve	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
T4 SV	0/16	0/16	0/16	6/16	7/16	7/16	8/16	8/16	8/16	8/16	8/16	8/16	8/16	8/16	8/16
V4 SV	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11

Test de probabilité exacte de Fisher (unilatérale) : $p=0,0058$