



18èmes Journées de la Recherche Cunicole

Nantes 27-28 mai 2019

LE NORMAND B., CHATELLIER S., VASTEL P., REBOURS G., CAPUCCI L., 2019. *Dosage des anticorps anti-RHDV2 chez les lapines et leurs lapereaux en lien avec la vaccination.* 18èmes Journées de la Recherche Cunicole, 27-28 mai 2019, Nantes, France, **37-40.**

Texte complet

+

Fichier de présentation orale

Dosage des anticorps anti-RHDV2 chez les lapines et leurs lapereaux en lien avec la vaccination

Le Normand B.^{1*}, Chatellier S.¹, Vastel P.², Rebours G.², Capucci L.³

¹ MCVet Conseil, Site VELVET, 47, Bd Leclerc, 35460 St Brice en Cogles, France.

² TECHNIA, France, .BP 10, 44220 Couëron, France

³ Department of Virology, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, via Bianchi 7, 25124 Brescia, Italy

* correspondant : b.lenormand@reseau cristal.fr

Résumé – Un suivi sérologique de 30 lapines primipares et de 2 de leurs lapereaux suite à la vaccination contre la maladie hémorragique virale à virus variant (RHDV-2) a été réalisé par cELISA, et par dosage des IgM2 sur les lapereaux. Les lapines étaient vaccinées à 10 semaines d'âge avec ERAVAC[®] et les lapereaux ont été vaccinés au cours de l'étude à 45 jours d'âge avec le même vaccin. Trois lapines sur 30 n'avaient pas d'anticorps 4 mois après l'injection de primovaccination. L'augmentation de la moyenne géométrique des titres en anticorps des lapines 11 jours après vaccination a été totalement similaire à celle des lapereaux 14 jours après vaccination. Les lapereaux présentant les meilleurs niveaux d'IgM2 2 semaines après leur vaccination sont issus de lapines négatives ou présentant un faible niveau en anticorps 25 jours après la mise-bas ; inversement, les lapereaux dépourvus d'IgM2 sont issus de lapines présentant la plus forte moyenne géométrique de titres à J25.

Abstract – Dosage of RHDV-2 antibodies on does and their kits in relation to the vaccination. Serological monitoring of 30 primiparous does and of 2 of their kits after vaccination against rabbit haemorrhagic viral disease due to RHDV-2 is performed by c-ELISA method and by IgM2 titration on kits. The does were vaccinated with ERAVAC[®] when they were 10 weeks old, and young rabbits are vaccinated with the same vaccine during this study when they are 45 days old. 3 does out of 30 don't have antibodies 4 months after the first vaccination with ERAVAC[®]. The increase of geometric average antibodies titers of the does 11 days after vaccination is totally similar to that of their kits 14 days after vaccination. The young rabbits with the best IgM2 titers 2 weeks after vaccination are from does without or with very low antibodies titers 25 days after parturition ; on the contrary, kits without IgM2 are from does with the best geometric average antibodies 25 days after parturition.

Introduction

Depuis 2010, la maladie hémorragique virale du lapin (communément appelée VHD pour *Viral Haemorrhagic Disease*) est due à un virus variant appelé RHDV-2, différent par son profil génétique et clinique du virus classique connu jusqu'alors lors des épizooties en élevage. Depuis 2013, les éleveurs français disposent de vaccins adaptés et la pratique de la vaccination n'a été mise en place sur le terrain pratiquement que sur les reproducteurs car leur coût empêche une vaccination systématique des populations de jeunes lapins de chair. Depuis 2016, l'épizootie en élevage a révélé des cas avec de fortes mortalités dans les populations de jeunes lapins en croissance.. Depuis 2016, l'épizootie en élevage s'est intensifiée et a révélé des cas aigus, avec de fortes mortalités dans les populations de jeunes en croissance. Un programme de lutte a été mis en place par l'Itavi (Institut technique de l'aviculture) en collaboration avec l'Interprofession (Clipp) et la Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires (SNGTV). Des formations sur la

biosécurité des élevages ont été organisées dès 2018 afin d'apporter les éléments essentiels à la protection des élevages. Les vétérinaires ont sollicité les différents services sanitaires existants (DGAI, Anses, ONCFS) pour lancer une enquête épidémiologique.

Les bilans sanitaires dans les élevages montrent que la très grande majorité des éleveurs pratique une vaccination suivie des reproducteurs, et parfois une répétition des vaccinations dans un contexte épidémiologique tendu. Nous avons souhaité approfondir la connaissance de la situation immunitaire des lapines et de leurs lapereaux dans un élevage vacciné par le suivi d'une cohorte au sein d'un troupeau dans un contexte dépourvu d'expression clinique de VHD.

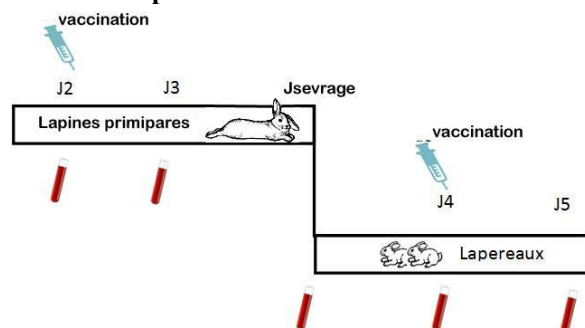
1. Matériel et méthodes

1.1. Protocole (figure 1)

Dans un élevage de 600 lapines primipares, 30 lapines ont été tirées au sort pour faire l'objet d'un suivi sérologique. Ces lapines ont été élevées de façon

identique (logement, alimentation) et ont toutes été vaccinées à 10 semaines par une injection sous-cutanée unique d'un vaccin contenant une souche de RHDV-2 (V-1037). Le vaccin est formulé avec un adjuvant huileux (ERAVAC[®]).

Figure 1 : Schéma expérimental du protocole de prélèvements et de vaccins



Ces lapines ont subi une prise de sang 25 jours après la mise-bas, soit 17 semaines après leur primovaccination. Le même jour, 24 des 30 lapines ont été à nouveau vaccinées avec ERAVAC[®] (J25), les 6 lapines témoins non vaccinées permettant de valider l'absence de passage viral durant le protocole. Les lapines ont été prélevées à nouveau 5 jours après vaccination (J30) et au sevrage 11 jours après vaccination (Jsevrage).

2 lapereaux ont été choisis au hasard puis repérés par marquage dans chacune des 30 portées. Ces 60 lapereaux ont été prélevés au sevrage (Jsevrage), le même jour que leurs mères ; ils ont subi à nouveau une prise de sang à J45, jour où ils ont été vaccinés avec ERAVAC[®], puis à J59 soit 14 jours après vaccination (59 lapereaux ont été prélevés à J59 en raison de la mort d'un des lapereaux de l'étude suite à des troubles digestifs). A J59, 6 lapereaux témoins supplémentaires ont été choisis au hasard dans les portées des 6 lapines témoins non vaccinées (1 par lapine) ; ces 6 lapereaux n'ont pas été vaccinés.

1.2. Analyses réalisées

Les sérums obtenus par centrifugation ont été conservés à -20°C jusqu'à envoi en transport réfrigéré au laboratoire de référence de l'Office International des Epizooties pour la VHD à Brescia en Italie.

Tous les sérums ont été analysés par la technique cELISA utilisant des Ac monoclonaux anti-RHDV2 et anti-RHDV. Cette analyse ELISA par compétition détecte toutes les sortes d'immunoglobulines dirigées contre le virus variant RHDV-2.

Tous les sérums des lapereaux à J59 ont été analysés pour titrer les IgM2 par une technique ELISA directe inversée. Les IgM sont les premiers anticorps à se former après contact avec un antigène.

Des titrages des IgG2 ont été effectués de façon aléatoire sur des lapines (N=8) et sur des lapereaux au moment de la vaccination à J45 (N=30). Les IgG se

forment après les IgM, avec des niveaux plus élevés et sur des durées plus longues.

2. Résultats et discussion

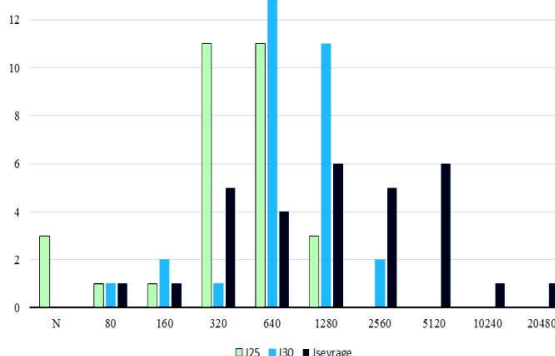
2.1. Résultats des animaux témoins

Les 6 lapines n'ayant pas eu de rappel vaccinal au cours du protocole (à J25) ont des titres en Ac cELISA RHDV-2 stables entre J25 et Jsevrage. De plus, les 6 lapereaux non vaccinés sont négatifs en cELISA RHDV-2 à J59. L'absence de signes cliniques durant le protocole ainsi que le résultat des sérologies sur les animaux témoins, adultes ou jeunes, confirment l'absence de circulation virale sauvage de RHDV-2 dans l'élevage.

2.2. Résultats des sérologies sur les lapines (N=30)

Les résultats sont illustrés par la figure 2. A J25, 17 semaines après leur primovaccination avec une injection unique d'ERAVAC[®], 3 lapines sur 30, soit 10%, sont sérologiquement négatives en c-ELISA : elles ne présentent pas un niveau en Ac détectable par cette technique. Après vaccination à J25, leurs niveaux en anticorps anti-RHDV2 augmentent : il ne s'agit donc pas de lapines réfractaires à la vaccination.

Figure 2 : Suivi sérologique cELISA RHDV-2 sur lapines après rappel : nombre de lapines en fonction de leurs titres sériques



L'AMM du vaccin prévoit une seule injection en primovaccination à partir de 30 jours d'âge, avec un rappel 9 mois après ; or dans notre étude 10% des lapines primipares vaccinées à 10 semaines n'ont pas d'anticorps 17 semaines après : il est donc nécessaire de revoir la qualité de la prise vaccinale en élevage pour les jeunes lapines, en prenant en considération les éventuels facteurs de dépression immunitaire (manipulations, changements de cage, première parturition).

Après rappel à J25, toutes les lapines vaccinées, y compris les 3 négatives, ont des anticorps qui montent dès le 5^{ème} jour après vaccination. Les 6 lapines non vaccinées ont des titres stables (tableau 1).

Tableau 1. Moyennes géométriques (GMT) des Ac anti RHDV-2 pour les lapines vaccinées ou non à 25 jours

Vaccination	OUI	NON
GMT J25	475,5	403,2
GMT Jsevrage	1810,2	452,5
facteur multiplicateur	3,8	1,1

2.3. Résultats des sérologies sur les lapereaux

Au sevrage, les titres obtenus par cELISA en anticorps anti-RHDV-2 des 60 lapereaux figurent dans le tableau 2. 66% des lapereaux présentent des anticorps au moment du sevrage. Les lapereaux issus des lapines négatives ou positives avec un titre faible en cELISA sont tous dépourvus d'anticorps.

Tableau 2. Nombre de lapereaux par classes de titres en anticorps anti RHDV-2 (cELISA) en fonction des classes de titres en anticorps anti RHDV-2 de leurs mères (2 lapereaux par lapine) à Jsevrage

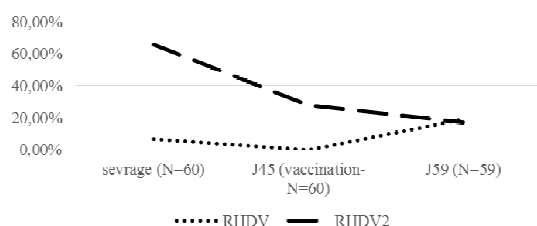
Titre mère	Titre lapereaux				
	0	10	20	40	Total
N	6				6
80	2				2
160		1	1		2
320	10	10	2		22
640	2	9	10	1	22
1280		3	3		6

Les lapereaux ont une transmission d'anticorps par leur mère (anticorps d'origine maternelle = AOM) qui est variable selon le niveau en anticorps de celle-ci ; ce tableau fait apparaître une tendance : les lapereaux qui présentent les titres les plus élevés sont issus de lapines à titres élevés. Cependant, à cet âge, une grande variabilité est observée, tenant tant au niveau du transfert qu'à la durée de vie et à la persistance des AOM.

A J45, jour de la vaccination des lapereaux, 28% ont encore des anticorps anti-RHDV2. Les anticorps RHDV suivent des évolutions similaires à celle des anticorps RHDV-2 (figure 3) ; ainsi la vaccination RHDV-2 a stimulé la production d'anticorps RHDV.

A J59, soit 2 semaines après leur vaccination, seulement 10 lapereaux sur 59 (17%) ont des anticorps par cELISA (figure 3), mais avec une moyenne géométrique des titres en augmentation par rapport à J45 ; le facteur multiplicateur est de 3,8, ce qui est identique à celui des lapines 11 jours après leur rappel de vaccination.

Figure 3. Evolution du % de lapereaux en Ac RHDV et RHDV-2 en cELISA



Les titres en IgM2 des lapereaux à J59 ont été mesurés sur les 59 lapereaux de l'étude. 32% présentent des IgM2 14 jours après vaccination (tableau 3). 12 lapereaux issus de 6 lapines ont des

IgM2 relativement élevées et homogènes ; parmi eux, 6 étaient également positifs en cELISA à J59 : ils sont issus des 3 lapines négatives en cELISA à J25, et le titrage des IgG2 sur les prélèvements effectués au moment de la vaccination montrent que ces lapereaux ne présentaient pas d'anticorps au moment de la vaccination.

Le tableau 3 montre que la moyenne géométrique des titres cELISA RHDV-2 à J25 pour les 16 lapines mères des lapereaux sans IgM2 est très supérieure à celle des 6 lapines dont les lapereaux ont tous des IgM2 avec des niveaux élevés ; les lapines dont 1 lapereau seulement est dépourvu d'IgM2 ont une moyenne géométrique de titres intermédiaire.

Tableau 3. Présence d'IgM2 sur les lapereaux 14 j après vaccination selon les lapines mères

	0	1	2
	lapereau/2	lapereau/2	lapereaux/2
Nb Mères	16	8	6
Nb laperer..	32	8	7 12
	Pas d'IgM2 : 68%		IgM2 : 32%
cELISA à 25j GMTmères	566	390	N ou 202

Seize lapereaux négatifs en IgM2 à J59 ont été testés pour les IgG2 à J45, au moment de leur vaccination : tous présentaient des IgG2 au moment du vaccin

Conclusions

Notre étude permet de dessiner une certaine dynamique immunitaire dans un troupeau : il apparaît ici que les lapereaux qui développent le plus rapidement des anticorps après vaccination sont aussi ceux qui ont le moins d'anticorps d'origine maternelle résiduels au moment de cette même vaccination. Inversement, quand les 2 lapereaux suivis dans la portée ne présentaient pas d'IgM2 14 jours après vaccination, ils étaient issus de lapines dont la moyenne géométrique des titres en anticorps anti-RHDV-2 à J25 était la plus élevée.

Cependant, les titres en anticorps, s'ils traduisent une capacité immunitaire, ne peuvent être corrélés à un niveau de protection face à un challenge viral. Néanmoins, des lapines sans anticorps ne sont pas protégées ; ici, 3 lapines sur 30 étaient négatives 4 mois après l'injection de primovaccination.

Ceci met en évidence l'intérêt d'un suivi sérologique pour améliorer les protocoles vaccinaux et les bonnes pratiques de vaccination. En effet, il n'est pas rare de constater des mortalités de primipares (parfois importantes) dans un troupeau vacciné : des facteurs de rupture immunitaires, en venant se superposer à la première mise-bas, pourraient expliquer ces observations. L'intérêt de l'hyper-immunisation des lapines et son impact sur le développement de l'immunité chez le jeune mériterait une étude plus approfondie. En effet, la transmission d'anticorps

d'origine maternelle en plus grande quantité au lapereau et la protection inhérente potentiellement conférée, pourraient être raisonnées en terme de coût/bénéfice pour l'éleveur.


On ne peut conclure une publication scientifique sur la VHD sans souligner l'importance du premier filtre de protection d'un élevage qu'est la biosécurité.

Remerciements

Les auteurs remercient les contributeurs à cette étude : les associés du GAEC ROLLAND, l'équipe technique d'UNEAL ainsi que les vétérinaires de la SELAS SVE.

Références

- Boucher S., Le Gall-Reculé 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 J. Rech. Cunicole*, Le Mans, 143-146.
- Boucher S., Le Gall-Reculé G., Le Minor O., 2016. Questions d'actualités sur la VHD à virus variant RHDV2. *Compte-rendu de la Journée Nationale ITAVI sur l'élevage du lapin de chair, 16 novembre 2016, Pacé, France*, 51-56.
- Boucher S., Le Gall-Reculé G., Le Normand B., Bertagnoli S., Guérin J-L., Decors A., Marchandeanu S., Plassiart G., 2012. Aspects cliniques de la maladie hémorragique virale due au virus variant 2010. *Le Point Vétérinaire* 327 : 35-38.
- Boucher S., Nouaille L., 2013. Maladies des lapins. *France Agricole Paris*, 3^e éd, p. 128-135.
- Le Gall-Reculé G, Boucher S. 2017. Connaissances et actualités sur la maladie hémorragique virale du lapin.. *17èmes Journées de la Recherche cunicole, Le Mans*, 97-110
- Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Marchandeanu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guérin 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 (13 pp)




RESEAU CRISTAL
SANTÉ ANIMALE

Dosage des anticorps anti-RHDV2 chez les lapines et leurs lapereaux en lien avec la vaccination

B. LE NORMAND*, S. CHATELLIER*, P. VASTEL**, G. REBOURS**, L. CAPUCCI***

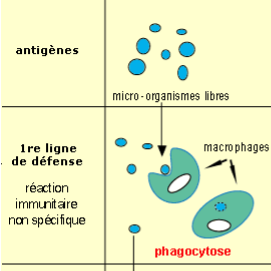
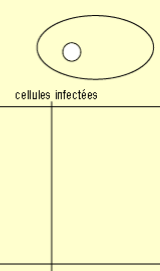
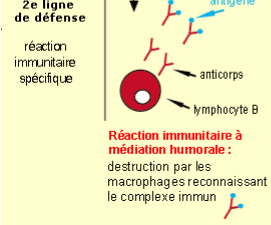
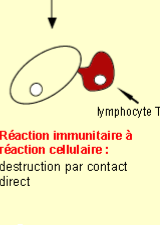
* MCVet-VeLVet - ** Techna - *** IZSLER Brescia Italie

JRC 2019, 27 & 28 Mai, Nantes



RAPPELS IMMUNITÉ

- ▶ Cascade métabolique
- ▶ Immunité
 - ▶ Innée : non spécifique
 - ▶ Cellulaire
 - ▶ Humorale : anticorps
- ▶ Immunité
 - ▶ Innée
 - ▶ Acquise
 - ▶ Passive : AOM
 - ▶ Active : contact avec Ag sauvage ou vaccinal

	antigènes micro-organismes libres	cellules infectées
1re ligne de défense réaction immunitaire non spécifique	 <p>macrophages</p> <p>phagocytose</p>	
2e ligne de défense réaction immunitaire spécifique	 <p>antigène</p> <p>anticorps</p> <p>lymphocyte B</p> <p>Réaction immunitaire à médiation humorale : destruction par les macrophages reconnaissant le complexe immun</p>	 <p>lymphocyte T</p> <p>Réaction immunitaire à réaction cellulaire : destruction par contact direct</p>

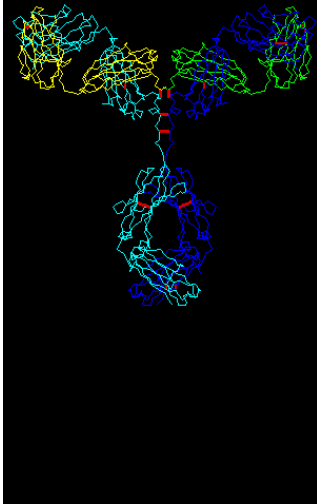
JRC 2019, 27 & 28 Mai, Nantes

2

RESEAU CRISTAL
SANTÉ ANIMALE

Immunoglobulines

- ▶ Parmi les protéines les mieux connues
- ▶ Domaines structuraux
 - ▶ Constants
 - ▶ Variables et hypervariables
- ▶ Reconnaissance Ag
 - ▶ Epitope (Ag) – Paratope (Ac)
 - ▶ Spécificité des Ac pour un Ag
 - ▶ Polyclonaux
 - ▶ Monoclonaux : RHDV-2
- ▶ Dirigés contre Ag de surface (neutralisants) ou contre Ag internes (témoins d'infection)
- ▶ Action de protection : ne pénètrent pas dans les cellules et n'empêchent pas la réplication si virus entré !



JRC 2019, 27 & 28 Mai, Nantes 3

RESEAU CRISTAL
SANTÉ ANIMALE

AOM – Réaction immunitaire

- ▶ Dosage par ELISA
 - ▶ Ac totaux (RHDV-2 et RHDV)
 - ▶ IgM2
 - ▶ IgG2
- ▶ Intérêt
 - ▶ Ig totales après vaccin ?
 - ▶ AOM ?
 - ▶ Impact de ces AOM ?
 - ▶ IgM après vaccin ?

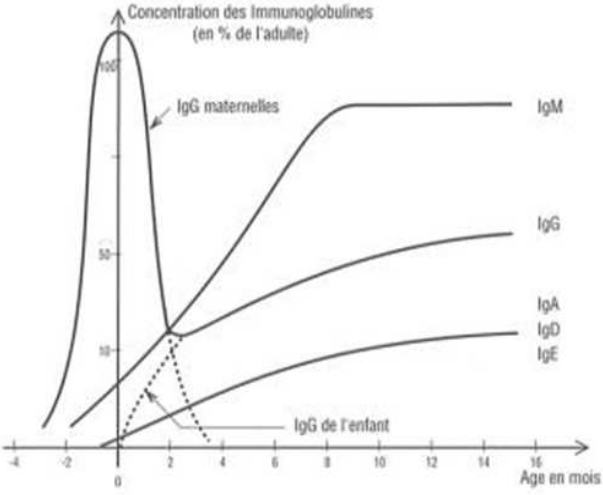


Fig. 13 CINÉTIQUE DES DIFFÉRENTES IMMUNOGLOBULINES EN PÉRIODE PÉRINATALE ET CHEZ LE NOUVEAU-NÉ

JRC 2019, 27 & 28 Mai, Nantes 4

RESEAU CRISTAL
SANTÉ ANIMALE

VHD (RHDV-2) en élevage : les écueils

- ▶ Mortalité par VHD de jeunes reproductrices (primipares) malgré la vaccination
- ▶ Doute sur l'efficacité de la vaccination en engraissement

JRC 2019, 27 & 28 Mai, Nantes

5

RESEAU CRISTAL
SANTÉ ANIMALE

Protocole et objectifs de l'étude

The diagram illustrates the study protocol. It shows a timeline starting with 'vaccination' at J25. A box labeled 'Lapines primipares' spans from J25 to J30. At J30, 'Jsevrage' (weaning) occurs. A second box labeled 'Lapereaux' (offspring) spans from J45 to J59. A second 'vaccination' is indicated at J45. Red vertical bars represent the duration of the study for each group.

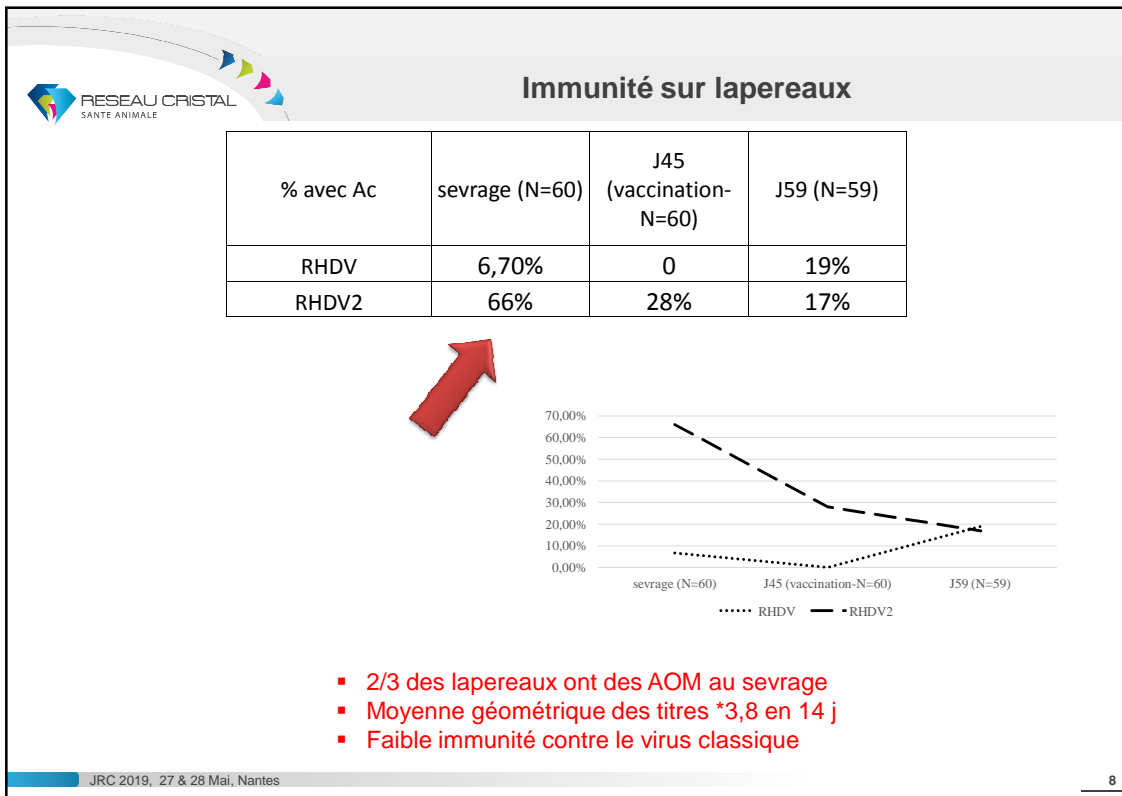
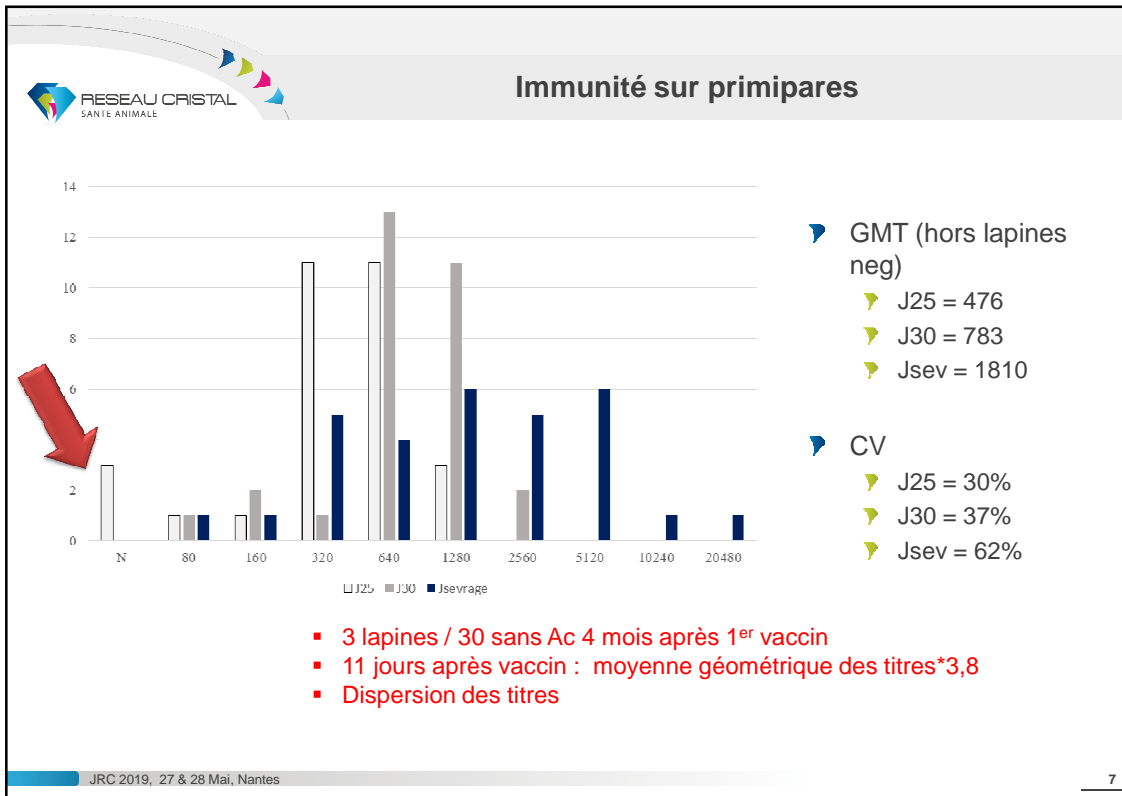
- ▶ Valider la vaccination du précheptel (élevage vacciné à 10 semaines, ERAVAC®)
- ▶ Suivre la prise vaccinale après rappel à 4 mois sur les primipares
- ▶ Mesurer les AOM sur les lapereaux issus de primipares
- ▶ Suivre la prise vaccinale après vaccination sur les lapereaux

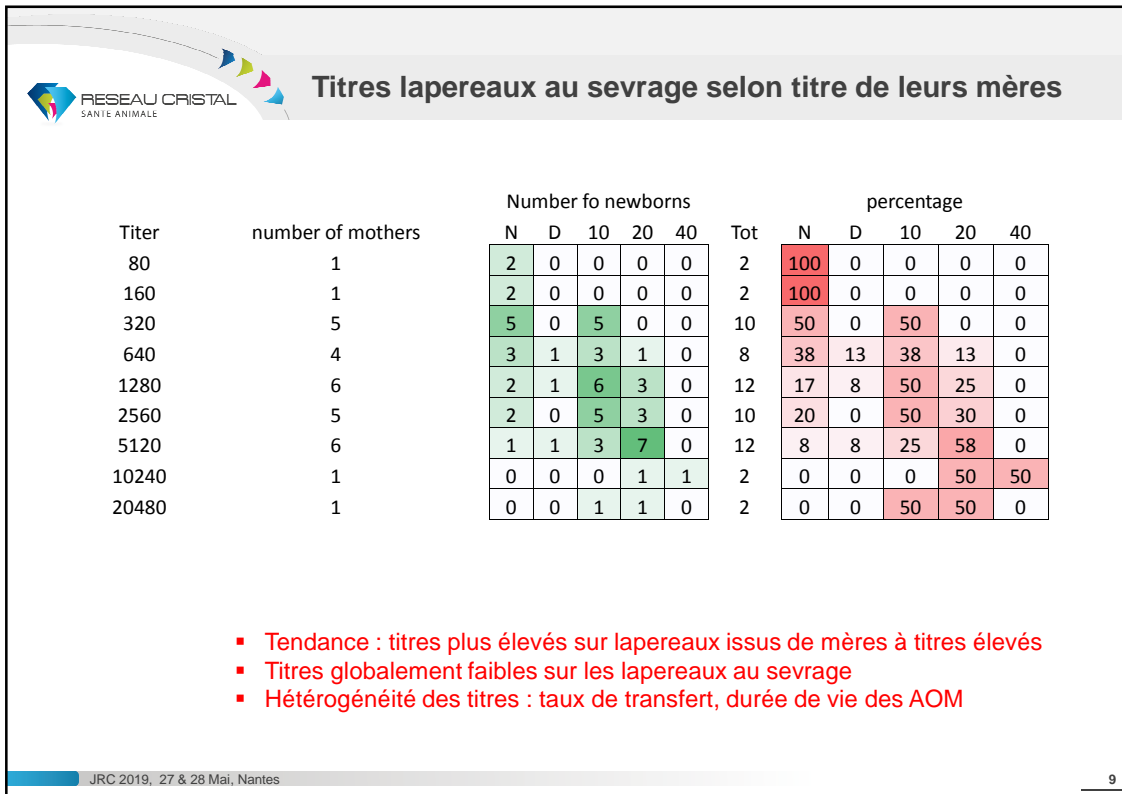
▶ Absence de circulation virale :

- ▶ Lapines : suivi de lapines non re-vaccinées
- ▶ Lapereaux : suivi de lapereaux non vaccinés

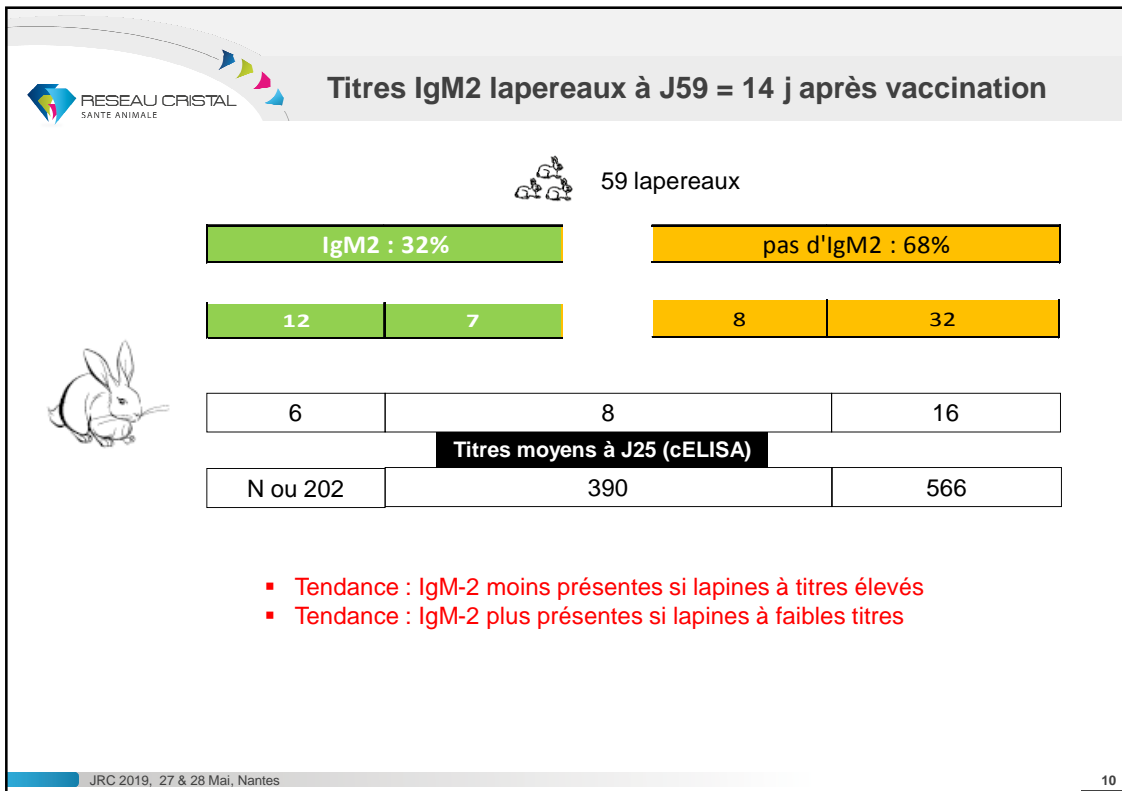
JRC 2019, 27 & 28 Mai, Nantes

6

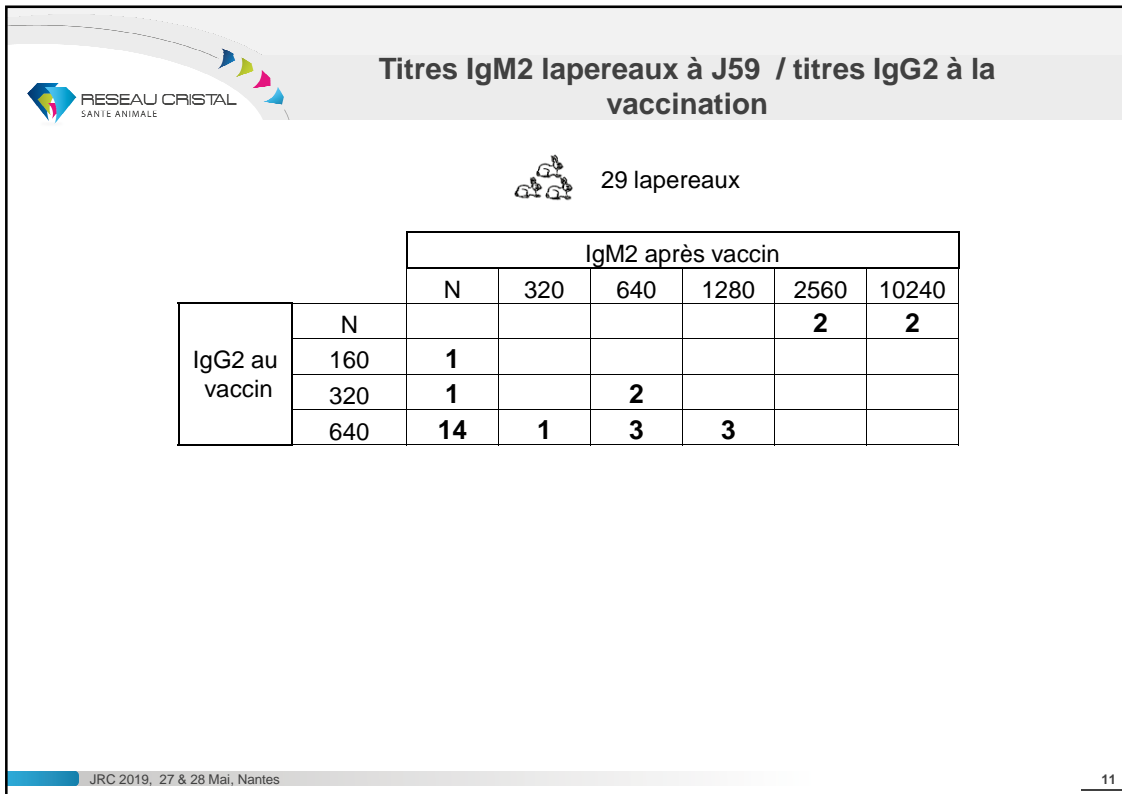





9



10



 **Conclusions**

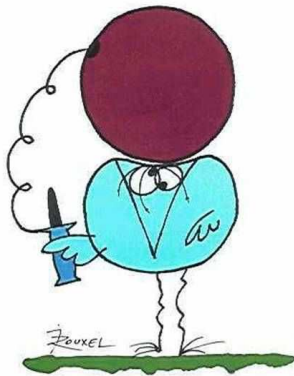
- ▶ **Dynamique immunitaire dans un troupeau :**
 - ▶ 10% des lapines primipares n'ont pas d'Ac détectables à J25
 - ▶ 66% des lapereaux ont des AOM au sevrage sous des lapines vaccinées plus de 4 mois avant
 - ▶ Les lapereaux développant le plus rapidement des Ig après vaccination sont plutôt issus de lapines avec moins d'Ac
 - ▶ Les lapereaux n'ayant pas développé des IgM 14 j après vaccination sont plutôt ceux qui avaient des titres plus élevés en IgG2 (AOM) au moment de la vaccination

- ▶ **Tendance (1 seul élevage !)**

- ▶ **Outil indispensable pour valider les protocoles vaccinaux en élevage = technique ELISA pour dosage des Ac spécifiques RHDV2 : utilisable à ce jour en France (laboratoire Les Herbiers)**
 - ▶ Plusieurs études sont nécessaires pour affiner les données de l'AMM qui sont par nécessité expérimentalement réduites
 - ▶ Possibilité de vérifier le niveau immunitaire des élevages

JRC 2019, 27 & 28 Mai, Nantes 12

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Nous remercions...

GAEC Rolland

Mme Mathilde Blond-Lemaître

M. Benoît Lamand

Dr Jean-François Mousny

pour leur persévérance et leur
entêtement dans l'exécution des
PS ... Merci et bravo !!!