



Etude de la VHD dans les élevages cunicoles en région Auvergne-Rhône-Alpes

Résultats du projet LIVREC



Etude financée par la région Auvergne-Rhône-Alpes à l'aide du dispositif PEPIT.

L. OTTMANN¹, A. HUNEAU-SALAÜN², C. GUILLOU-CLOAREC², A. DINH¹, R. THOMAS², A. CHASTAGNER¹, G. LE GALL-RECUÉ², S. LE BOUQUIN².

Contact : ottmann@itavi.asso.fr

¹ ITAVI – Lyon & Ploufragan

² Anses – Ploufragan-Plouzané-Niort

Résumé

La VHD (Viral Haemorrhagic Disease) est une maladie virale qui touche les élevages cunicoles. Il n'existe pas de traitement adapté aux élevages de chair à cette maladie, les seuls moyens de lutte étant la biosécurité et la vaccination des animaux. Outre les impacts sur la santé animale, la VHD a de lourdes conséquences socio-économiques avec de nombreuses fermetures d'élevages, ce qui met en danger l'avenir de la filière. Les objectifs du projet LIVREC sont donc d'étudier l'efficacité des méthodes de nettoyage et de désinfection (N&D), la persistance du virus dans l'élevage en région Auvergne-Rhône-Alpes et d'identifier des facteurs-clés de sa survie dans les zones contaminées. Ainsi, un suivi a été mené sur cinq lots (4 élevages + 1 récidence) ayant déclarés la VHD : une enquête a été réalisée sur les méthodes de N&D de chaque élevage, complétée par un échantillonnage par prélèvement de surface avant et après-N&D, puis à 3 mois et 6 mois post-N&D. Les échantillons étaient analysés par l'Anses, permettant de savoir si le génome viral était présent ou non dans les prélèvements. Ainsi, cette étude a mis en évidence que la double désinfection permettait une meilleure élimination du virus et que même trois mois post-N&D, le virus était particulièrement persistant dans certaines zones, tel que le circuit d'équarrissage, qui sont donc à traiter avec un soin particulier lors du N&D.

1. Contexte

Apparu en Chine en 1984, le virus de la VHD (rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV) infecte les lapins européens (*Oryctolagus cuniculus*) domestiques et sauvages. Ce lagovirus est responsable de fortes mortalités en élevages cunicoles, induisant d'importantes pertes économiques pour la filière (Le Gall-Reculé et Boucher, 2017). Cet impact a été atténué grâce aux efforts des professionnels qui ont pris des mesures adaptées pour faire face à la maladie notamment en termes de biosécurité et de vaccination. Toutefois, l'émergence d'un nouveau génotype viral en 2010 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011), le RHDV2, a obligé les éleveurs à repenser et à renforcer leurs moyens de prévention et de protection (Boucher *et al.*, 2011). En effet, alors que le RHDV touche les lapins plus âgés, après 6 à 8 semaines d'âge, le RHDV2 peut toucher également les jeunes lapereaux sous la mère,

âgés de quelques jours (Le Gall-Reculé et Boucher, 2017 ; Gadoud et Seigner, 2022). La résistance du virus dans l'environnement est très grande (il reste infectieux au moins jusqu'à 90 jours dans des foies exposés aux conditions environnementales extérieures et plus de 7 mois dans un élevage atteint non désinfecté). Cette résistance favorise sa transmission par contacts directs (entre animaux malades) ou indirects (notamment eau, végétaux, poils, aérosols, insectes et matériel contaminé). Il peut ainsi se propager facilement et rapidement dans la faune sauvage (Le Gall-Reculé et Boucher, 2017).

Actuellement, la lutte contre cette maladie repose principalement sur les mesures de vaccination et de biosécurité telles que la surveillance, l'assainissement et la désinfection (Abrantes *et al.*, 2012). Toutefois, la vaccination présente un coût certain pour les éleveurs et une étude rétrospective de l'Anses entre 2013 et 2018

(Huneau-Salaün *et al.*, 2019) a mis en évidence une variabilité importante des pratiques de biosécurité, ainsi que de nettoyage et de désinfection (N&D) dans les élevages, ce qui influence le risque de survenue de l'infection. D'autre part, l'étude a révélé qu'un élevage initialement touché présente un risque élevé de récides, d'où l'importance d'avoir un protocole de N&D performant en place.

L'étude de l'Anses a été réalisée dans des élevages cunicole du Grand-Ouest. Cependant, en région AURA, plusieurs élevages fonctionnent en systèmes différents (lapins en croissance en plein air par exemple) et le contexte pédoclimatique est plus sec et chaud que dans le Grand-Ouest, ce qui peut impacter la propagation du virus. En effet, le RHDV2 est connu pour se répandre plus facilement dans un climat froid et la différence de système d'élevage implique également une différence de pratiques qui peuvent avoir un effet sur les risques de contamination du virus. De plus, la densité d'élevages cunicoles et moins importante en AURA. Ainsi, la pression sanitaire exercée par la faune sauvage et par les autres exploitations est moins importante (Cooke, 2002) dans cette région. L'hypothèse a ainsi été formulée que dans la région, les voies de contaminations soient différentes et se fasse majoritairement de manière indirecte, notamment par des vecteurs ayant été en contact avec du matériel virulent. C'est pourquoi il a été décidé de compléter les connaissances sur le virus en étudiant le RHDV2 dans le Sud-Est.

2. Matériel et méthode

2.1. Les élevages

Depuis 2018, un réseau de surveillance permet de centraliser tous les cas de VHD déclarés en France dans le cadre du « plan filière lapin » établi par le CLIPP. Certains élevages de la région AURA qui déclaraient la maladie sur cette base pouvaient être alors contactés afin de réaliser un suivi chez eux.

Ainsi, 5 visites (4 cas + 1 récidence) ont pu être réalisées dans 4 élevages en région AURA entre mars 2020 et septembre 2021. Ils viennent compléter les 5 suivis réalisés dans le Grand-Ouest.

Dans le Grand-Ouest, les élevages étaient en système « tout-vide, tout-plein » en bâtiments standards avec cages fixes. Dans le Sud-Est, les élevages étaient tous en système maternité et engraissement fixes. Un élevage était en bâtiment de type tunnel avec une partie des lapins en

croissance en plein air, les trois autres étaient en bâtiments standards.

2.2. Mesures réalisées

2.2.1. Fréquences des visites

Le suivi des élevages s'est déroulé en quatre visites selon le schéma ci-dessous (Figure 1). Une première visite était réalisée au moment de la déclaration du foyer pour faire des prélèvements qui ont servi de « point 0 », puis une visite post-nettoyage était faite. Les prélèvements réalisés à ce moment ont pour objectif d'évaluer l'efficacité du nettoyage et de la désinfection.

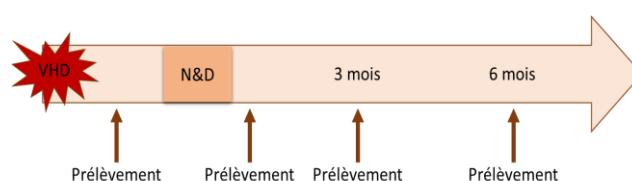


Figure 1 : Fréquence de visites et prélèvements effectués dans les élevages contaminés au cours du temps.

Le virus RHDV2 est très persistant dans le temps et l'environnement (Henning *et al.*, 2005). Pour vérifier cela dans un contexte post-N&D d'une exploitation, une visite était réalisée 3 mois, puis 6 mois après N&D. Ces visites étaient couplées à un questionnaire simplifié concernant l'état actuel de l'élevage vis-à-vis de la VHD (récidence, changement de pratique de biosécurité, de protocole de vaccination). L'ensemble de ces données ont permis d'obtenir des informations sur la persistance du virus dans l'environnement.

2.2.2. Questionnaire

Afin de cerner au mieux les pratiques des éleveurs, un questionnaire était réalisé à chaque première visite. La première partie du questionnaire concernait les caractéristiques de l'élevage (type de production de l'atelier, conduite, rythme de reproduction, etc.). La deuxième partie avait pour objectif de cerner le contexte qui entourait la déclaration de la maladie (date et lieu de déclaration, symptômes, vaccination, historique). Elle permettait également de renseigner en détail le protocole de nettoyage et de désinfection des éleveurs tout en répertoriant le matériel présent (type de cage, disposition, matériaux) ainsi que ses spécificités de gestion propre à l'élevage (type de raclage, protocole de désinfection, devenir des effluents, etc.).

2.2.3. Échantillonnage

Lors de chaque visite, une vingtaine de prélèvements était réalisée sur différents circuits de l'élevage : circuit d'air (entrée et extracteurs), d'effluents (fosse et racleur), d'équarrissage (congélateur et bac), ainsi que dans le bâtiment d'élevage (cage, murs, sol et sas) et dans

l'environnement extérieur (abord de l'exploitation et voies de circulation).

Cet échantillonnage a été réalisé en frottant des chiffonnettes humides et stériles sur les surfaces ou des pédichiffonnettes sur le sol. Les échantillons étaient ensuite conditionnés à 4°C, puis envoyés pour analyse à l'Anses de Ploufragan-Plouzané-Niort.

2.3. Analyse des échantillons

Une fois réceptionnés à l'Anses, les échantillons étaient traités afin d'en extraire l'ARN. L'ARN des prélèvements réalisés dans les trois premiers élevages suivis ont été analysés en utilisant une RT-PCR spécifique des lagovirus du lapin (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011). Les produits des PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose puis les amplifiats positifs ont été séquencés pour un génotypage du RHDV2. Pour les échantillons des deux derniers suivis, les ARN viraux ont été recherchés à l'aide d'une RT-PCR en temps réel SYBR® Green spécifique des RHDV2 et développée entre temps.

Les résultats de ces tests indiquent la présence/absence du génome viral dans les échantillons. Ainsi, un échantillon positif permet de dire que de l'ARN du virus est présent mais ne permet pas de dire si le virus est entier, toujours actif et contagieux.

3. Résultats et discussion

3.1. Des contaminations dans plusieurs circuits, même après nettoyage et désinfection

Les résultats du graphique ci-dessous (Figure 2), permettent de voir que les circuits les plus contaminés avant le nettoyage et la désinfection sont les circuits de gestion des effluents (fosse principalement), le circuit d'air, et le bâtiment (particulièrement les cages (11/20 prélèvements positifs) et les murs (9/20)). Ces résultats sont cohérents puisque la VHD est due à un virus qui se propage via les sécrétions animales et les aérosols. Les particules virales se retrouvent alors dans la fosse avec les effluents, dans les cages des animaux contaminés et se répandent dans le bâtiment et l'air.

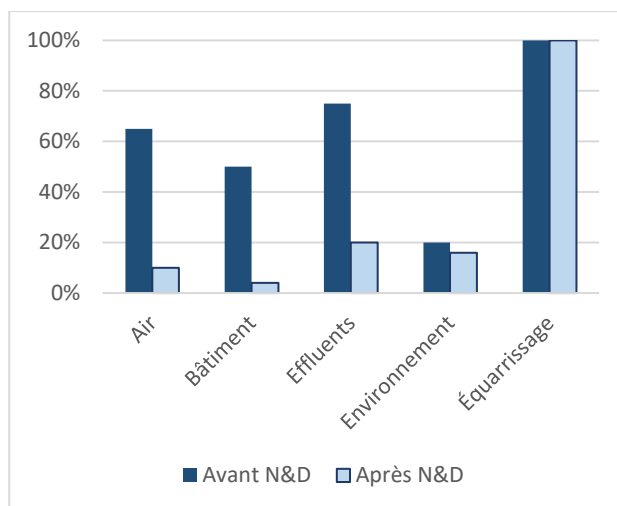


Figure 2 : Proportion de prélèvements positifs au RHDV2 avant et après nettoyage et désinfection

Tous les élevages suivis ont présenté des prélèvements positifs après N&D : 3/5 ont montré des prélèvements positifs dans le bâtiment d'élevage (mur, sol, congélateur). Les deux autres suivis ont montré des prélèvements positifs dans l'environnement extérieur de l'élevage, mais non dans bâtiment. Les prélèvements de la fosse ont été positifs post-N&D dans 2/3 élevages ayant vidangés la fosse pendant le vide sanitaire.

Si l'amélioration et le respect des règles de biosécurité permet une forte réduction de la propagation de la maladie (Abrantes *et al.*, 2012), l'étude a permis de voir que des traces du génome viral ont tout de même été trouvées dans le sas d'entrée de certaines exploitations ainsi qu'au niveau des voies de circulation qui ont donc pu être les voies d'entrée du virus dans le bâtiment. Il faut donc rester très vigilant sur la bonne l'application des pratiques de biosécurité.

Au niveau du circuit d'équarrissage (congélateur et bac), 100% des prélèvements étaient positifs. Etant donné que les lapins présents dans ce circuit sont les animaux qui ont eu la VHD, il est normal que l'ARN du virus soit présent sur ces outils. Cependant, après N&D, tous les prélèvements réalisés au niveau des bacs d'équarrissage et des congélateurs sont positifs au RHDV2. Il y a donc un risque à ce que le virus, s'il est encore actif, soit transporté et contamine à nouveau l'élevage. Cette étude a donc mis en lumière l'importance d'apporter une attention particulière sur le traitement de ce circuit lors du nettoyage et la désinfection pour limiter le risque de récides.

Après le N&D, la fréquence de détection d'ARN viral a fortement diminué au niveau du bâtiment, du circuit d'effluents, ainsi qu'au niveau du circuit d'air. Ces

évolutions permettent de dire que le N&D a éliminé toute trace de virus en ces endroits dans une majorité des cas. En ce qui concerne le circuit d'effluents, les prélèvements positifs provenaient de la fosse, or il est compliqué de la désinfecter complètement. Toutefois cela reste un point de vigilance car lors du brassage de la fosse, les particules virales présentes peuvent contaminer les animaux. De même, des précautions devront être prise lors des épandages, tel que l'enfouissement des lisiers et fumiers, afin de limiter les risques de diffusion ultérieure. Pour le circuit d'air, ce sont les entrées d'air qui étaient positives à la présence du génome viral et pour le bâtiment il s'agissait de prélèvements sur les murs et le sol.

Ces premiers résultats permettent de mettre en avant l'importance d'un N&D complet. S'il permet d'éliminer le virus sur plusieurs postes, il est possible d'émettre des points de vigilance où le nettoyage devrait être particulièrement approfondi, comme le circuit d'équarrissage par exemple.

3.2. Un virus persistant dans le temps

Le tableau ci-dessous (Tableau 1) présente les résultats de détection du génome de RHDV2 dans les prélèvements effectués directement après N&D, ainsi que ceux réalisés 3 mois, puis 6 mois après l'application du protocole de N&D.

Tableau 1 : Nombre et proportion de prélèvements positifs au RHDV2 par PCR selon le circuit étudié.

Circuit	Après N&D	N&D + 3 mois	N&D + 6 mois
Air	2/20 10%	0/20 0%	0/17 0%
Bâtiment	3/67 4%	4/66 6%	0/56 0%
Effluents	2/10 20%	0/9 0%	0/7 0%
Environnement	2/12 16%	0/12 0%	0/9 0%
Équarrissage	5/5 100%	2/5 40%	1/4 25%

En ce qui concerne le bâtiment d'élevage, le N&D a permis d'éliminer la majorité des virus présents. Toutefois à 3 mois post-N&D, du génome viral a été détecté dans 6 % des prélèvements correspondant au circuit en contact avec les animaux et la fosse. Le virus pouvant persister sur des surfaces au moins pendant 3 mois (Henning *et al.*, 2005) et 225 jours dans les tissus à 4°C (Smid *et al.* 1989), un

N&D insuffisant au moment du foyer peut expliquer ce résultat. Les résultats de l'échantillonnage des circuits d'air et les abords de l'exploitation sont négatifs à 3 mois post-N&D.

Les effluents sont un milieu extrêmement favorable à la conservation du virus et bien que les prélèvements se soient révélés négatifs à 3 et 6 mois post-N&D, le brassage du lisier pour l'épandage est une opération à risque de diffusion du virus par les aérosols ou les matières pouvant contaminer l'environnement proche des élevages et la faune sauvage.

Après N&D, des traces de génome viral étaient encore présentes dans tous les échantillons prélevés au niveau du circuit d'équarrissage. Cela indique que le N&D n'a pas été suffisamment efficace. Toutefois, il est possible de voir que la part de prélèvements positifs décline au fil du temps (100% post N&D, 40% 3 mois post N&D, 25% 6 mois post N&D). En plus des N&D réalisés, la quantité de virus tend à diminuer dans le temps (Henning *et al.*, 2005). L'échantillon trouvé positif lors des prélèvements à 6 mois post-N&D était présent dans le congélateur, or il a été démontré que le virus se conservait très bien au froid (persistance 225 jours à 4°C, Smid *et al.*, 1991). Cet échantillon indique donc que le N&D a été insuffisant.

3.3. Comparaison des protocoles de N&D existants

Le projet LIVREC a également permis d'identifier des différents protocoles de N&D entre le Sud-Est et le Grand-Ouest (Tableau 2). Il a été trouvé que les élevages du Grand-Ouest appliquaient plus souvent un protocole de N&D plus complet décomposé en quatre étapes, avec un nettoyage à sec, un lavage/décapage, et une désinfection en deux temps aussi appelée « double-désinfection ». Dans le Sud-Est, le protocole est simplifié avec principalement une étape de lavage/décapage suivi d'une seule désinfection.

La mise en commun des résultats de ces deux études a permis de s'apercevoir que la mise en pratique d'un protocole de désinfection plus complet, comme dans le Grand-Ouest, permettait une meilleure élimination du virus. Suite à cette étude, il peut donc être recommandé de réaliser une détersion lors du lavage ainsi qu'une double désinfection pour éliminer au mieux la présence du virus dans les circuits et ainsi limiter le risque de récidives.

Tableau 2 : Différences entre les protocoles de nettoyage et de désinfection principalement utilisés dans les deux régions

Étape de nettoyage	Sud-Est	Grand-Ouest
Nettoyage à sec	Non	Oui
Lavage /décapage	Oui <i>Haute-pression</i>	Oui Détergent <i>Haute pression</i>
Première désinfection	Oui Pulvérisation <i>Ammonium IV et glutéraldéhyde</i>	Oui Moussage <i>Ammonium IV et glutéraldéhyde</i>
Deuxième désinfection	Non	Oui

4. Conclusion

Le suivi de la présence du RHDV2 post-N&D dans des élevages touchés par le virus dans le Sud-Est de la France a permis de mettre en évidence des pistes d'amélioration avec :

- Un protocole de N&D plus complet. En effet, la double désinfection ainsi que la détersion lors du lavage semblent plus efficaces pour éliminer les traces de génome viral.
- Une attention particulière au N&D de certains circuits à risques tels que le circuit d'équarrissage (congélateur et bac), zone de concentration du génome viral couplé à un environnement froid (congélateur) propice à la conservation du virus.

Aujourd'hui, la plupart des cas de RHDV2 sont des récidives (dans cette étude, 2/5 cas en étaient). Si le projet LIVREC a permis de mettre en avant des points d'amélioration pour les élevages ayant été touchés, il reste un travail de recherche à faire pour limiter les récidives. Ainsi, deux projets sont actuellement en cours :

- Le projet SurvRéci porté par l'Anses en partenariat avec l'ITAVI et le CLIPP, débuté en septembre 2021, ayant objectif d'étudier spécifiquement les cas de récidives à la VHD afin de déterminer les facteurs clés qui permettraient de maîtriser les récidives de VHD dans les élevages cynicoles français.
- Le projet EVALAP, porté par le CLIPP et animé par l'ITAVI, ayant pour objectif de mettre en place et de diffuser une charte des bonnes pratiques en élevage cynicole afin de renforcer l'aspect préventif dans la lutte contre la VHD tout en améliorant les conditions d'élevage des lapins en terme de bien-être.

Ces projets pourront aider la filière à améliorer ses connaissances de la maladie pour mieux la maîtriser.

Remerciements

Nous remercions toutes les personnes ayant participé à cette étude. Le CLIPP et l'ILGS pour leur aide dans le recrutement des élevages, ainsi que le COFIL Cynicole et les éleveurs ayant participé à cette étude. Nos remerciements vont également à la région AURA financeur de ce projet via le dispositif PEPIT

Références bibliographiques

- Abrantes J., Van der Loo W., Le Pendu J., Esteves P.. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research* 43:12.
- 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 en France en 2010-2011, Quatorzième Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 22-23 novembre 2011 : 143-146.
- Cooke B.D., 2002. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 21 (2), 347-358.
- Gadoud B., Seinger P.. 2022. Mission d'appui à la filière lapin de chair. Rapport n°21124 du CGAAER, Novembre 2022, 60p.
- Henning J., Meers J., Davies P.R., Morris R. S.. 2005. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiology and infection*. 133. 719-730
- Huneau-Salaün A., Boucher S. Fontaine J., Le Normand B, Lopez S, Maurice T., Nouvel L., Bruchec A., Coton J., Martin G., Le Gall-Reculé G., Le Bouquin S.. 2019. Études épidémiologiques rétrospectives sur la maladie hémorragique virale RHDV2 dans les élevages cunicoles en France, entre 2013 et 2018. Dix-huitième Journées de la Recherche Cunicole, Nantes, 27-28 mai 2019 : 25-28.
- Le Gall-Reculé G., Boucher S., Le Normand B., Plassiart G., Portejoie Y., Decors A., Bertagnoli S., Guérin J-L., Marchandeau S.. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record* 168 : 137-138
- Le Gall-Reculé G., Boucher S., 2017. Connaissance et actualités sur la maladie hémorragique virale du lapin. Dix-septième Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 21-22 novembre 2017 : 97-109.
- Smid B, Valicek J, Stephanek J, Jurak E, Rodak L., 1989. Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. *J Vet Med*; 36: 237– 240
- Smid B., Valicek J., Rodak L., Stephanek J., Jurak E., 1991. Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology*; 26: 77-85.

Abstract: Study of RHD in rabbits farms in Auvergne-Rhône-Alpes region – Results of the Livrec project

Rabbit viral haemorrhagic disease (RHD) is threatening rabbit husbandry. Currently, the only means to face RHD are biosecurity and vaccination. In addition of the clear effects on animal welfare, RHD also has tremendous socio-economic consequences that leads many farms to shut down. This project aims to study the efficiency of different cleaning and disinfecting (C&D) protocols, the virus persistence in the Auvergne-Rhône-Alpes region and identify the key factors of its survival in the contaminated areas. Thus, 5 cases of RHD were studied. First farmers were questioned about their C&D protocols and the farms were sampled before and after C&D, then 3 months and 6 months post-C&D. Then, those samples were analysed by Anses to see if RHDV2 genome was present. This study showed that a double disinfection was more efficient to eliminate the virus and that even after 3 months post-C&D, RHDV2 was still present in several areas, especially in the rendering circuit. Therefore, a more thorough C&D should be applied in those areas.