

PREMIERE DETECTION DU RHDV2 DANS L'ILE DE LA REUNION EN ELEVAGE ET DANS LA FAUNE SAUVAGE

Le Gall-Reculé G.^{1*}, Boucher S.², Caceres S.³, Chan P.¹, Cozette J.⁴, Decors A.⁵, Dilé B.⁶, Léoville N.⁷, Schneider F.⁸, Marchandeau S.⁹

¹ ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité de Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles, BP 53, 22440 Ploufragan, France

² LABOVET Conseil, 22 rue Olivier de Serres, BP 539, 85505 Les Herbiers cedex, France

³ OFB, Direction des Outre-mer, Service Connaissance et Appui aux Acteurs, Unité Technique Connaissance Océan Indien, 49 rue Mazagran, 97400 Saint-Denis, France

⁴ Fédération Départementale des Chasseurs de La Réunion, 1 rue Sainte Anne, 97400 Saint-Denis, France,

⁵ OFB, Direction de la Recherche et de l'Appui Scientifique, Santé de la Faune et Fonctionnement des Ecosystèmes Agricoles, 9 avenue Buffon, 45071 Orléans cedex 2, France

⁶ LABOVET Conseil, ZI Evre et Loire, 49600 Beaupréau, France

⁷ Laboratoire Vétérinaire Départemental de la Réunion, 14 rue du stade de l'Est, 97490 Sainte-Clotilde, France

⁸ VETORUN, 1 allée de la Desserte, ZI n°2, 97410 Saint-Pierre, France

⁹ OFB, Direction de la Recherche et de l'Appui Scientifique, Santé de la Faune et Fonctionnement des Ecosystèmes Agricoles, CS 42355, 44323 Nantes cedex 3, France

Hormis le premier et le dernier auteur, les auteurs sont classés par ordre alphabétique

* correspondante : ghislaine.legall-recule@anses.fr

Résumé - La maladie hémorragique virale du lapin (VHD ou RHD pour Rabbit Hemorrhagic Disease) due à un lagovirus, le RHDV, a été décrite pour la première fois dans l'île de la Réunion en 1989 chez des lapins d'élevage. En novembre 2023, après plusieurs années sans RHD détectée, plusieurs cas de mortalité de lapins d'engraissement non vaccinés vis-à-vis de la RHD ont été rapportés dans des élevages de lapins professionnels ainsi que chez des lapins de particuliers élevés en clapiers. Trois échantillons de foie de lapin présentant des signes cliniques de RHD ont été récoltés début 2024 : deux en janvier provenant d'un élevage professionnel et d'une basse-cour familiale distants d'environ 18 km à vol d'oiseau, et un en février dans un élevage professionnel proche du premier. Le diagnostic initial par RT-PCR temps réel a détecté du RHDV2 dans les trois échantillons. Afin de confirmer le diagnostic et entreprendre des études de phylogénie, les ARN génomiques des trois virus ont été partiellement séquencés (1/3 du génome viral, 2.336 nucléotides). Les RHDV2 provenant des deux élevages professionnels présentaient une séquence nucléotidique identique et étaient très proche du virus ayant infecté le lapin de clapier (99,7 % d'identité nucléotidique). Par ailleurs, un cadavre à l'état de réduction squelettique de lièvre à collier noir (*Lepus negricollis*) -la seule espèce de léporidé sauvage de l'île- a été récolté en montagne en avril 2024. De l'ARN de RHDV2 a pu être caractérisé à partir de la moelle osseuse. La séquence nucléotidique du 1/3 du génome viral était très proche de celles des RHDV2 isolés des lapins domestiques (99,8 % d'identité nucléotidique). Le génotypage et les études phylogéniques ont montré que le lagovirus le plus proche des quatre souches était un RHDV2 espagnol recombinant avec une souche non-pathogène de génotype GI.4 récolté en 2020 (95,6 % d'identité nucléotidique). Cette étude constitue la première caractérisation du RHDV2 dans l'île de la Réunion et la découverte d'une nouvelle espèce de lièvre du genre *Lepus* sensible au RHDV2. Le renforcement de la prophylaxie sanitaire et vaccinale a été fortement recommandé et depuis le printemps 2024, aucun nouveau foyer de RHD dans les élevages vaccinés n'a été rapporté par le GDS 974.

Abstract – First occurrence of RHDV2 in Reunion Island in farm rabbits and in wildlife. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) caused by a lagovirus, RHDV, was first described in farm rabbits on Reunion Island in 1989. In November 2023, after several years without RHD being detected, several cases of mortality in fattening rabbits not vaccinated against RHDV were reported in professional rabbit farms and in barnyards. Three samples of rabbit liver showing clinical signs of RHD were collected in early 2024: two in January from an intensive husbandry and a barnyard approximately 18 km apart as the crow flies, and one in February from an intensive husbandry close to the first. Initial diagnosis by real-time RT-PCR detected RHDV2 in all three samples. In order to confirm the diagnosis and undertake phylogeny studies, the genomic RNAs of the three viruses were partially sequenced (1/3 of the viral genome, 2,336 nucleotides). The RHDV2 from the two intensive husbandries had an identical nucleotide sequence and were very close to the virus that had infected the hutch rabbit (99.7% nucleotide identity). In addition, a skeletally reduced corpse of a black-collared hare (*Lepus negricollis*) -the only wild leporid species on the island- was collected in the mountains in April 2024. RHDV2 RNA was characterised from the bone marrow. The nucleotide sequence of 1/3 of the viral genome was very close to that of RHDV2 isolated from domestic rabbits (99.8% nucleotide identity). Genotyping and phylogenetic studies showed that the lagovirus closest to the four strains was a Spanish RHDV2 recombinant with a non-pathogenic strain of genotype GI.4 collected in 2020 (95.6% nucleotide identity). This study represents the first characterisation of RHDV2 on Reunion Island and the discovery of a new species of *Lepus* susceptible to RHDV2. Reinforcement of sanitary prophylaxis and vaccination has been strongly recommended and since the spring of 2024, the GDS 974 has reported no new outbreaks of RHD in vaccinated farms.

Introduction

La filière cunicole de l'île de La Réunion (Océan indien, France) s'est structurée à 95 % autour de la Coopérative des Producteurs de Lapins de La Réunion (CPLR) créée en 1981. La CPLR est propriétaire de l'unique abattoir et depuis 2013, elle commercialise la production. La filière dispose de deux ateliers de multiplicateurs et comptait en 2020 17 éleveurs professionnels de lapins de chair qui ont produit 153 tonnes équivalent carcasse (TEC). La filière comprend désormais deux sites avec des parcs au sol. Elle a pour objectifs d'installer de nouveaux éleveurs et d'atteindre 234 TEC en 2030 pour mieux couvrir les besoins en viande de lapin du marché réunionnais et répondre à la demande de l'état de tendre vers une plus grande autonomie alimentaire des départements d'outre-mer (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire, 2021)

La maladie hémorragique virale du lapin (RHD pour "Rabbit Hemorrhagic Disease", initialement appelée VHD pour « Viral Hemorrhagic Disease ») est une maladie hautement infectieuse et souvent fatale. Elle est causée par deux génotypes de lagovirus pathogènes (famille des *Caliciviridae*), le RHDV et le RHDV2 (ou GI.1 et GI.2 selon la nouvelle nomenclature proposée par Le Pendu et al., 2017, et adoptée par l'ICTV en 2023). Le RHDV, initialement caractérisé en 1984 en Chine, a diffusé rapidement dans le monde. Il a été détecté en Europe dès 1986, et en France en juillet 1988. Il affecte exclusivement les lapins d'élevage (de chair et de fourrure), de compagnie et les lapins sauvages (lapins de garenne) de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. La maladie a été décrite pour la première fois dans l'île de la Réunion (Océan Indien) en 1989 chez des lapins d'élevage (Morisse et al., 1991). Le RHDV2 a été détecté pour la première fois en France en 2010 (Le Gall-Reculé et al., 2011) et a diffusé en quelques années au niveau mondial. Dans plusieurs pays dont la France, il a remplacé le RHDV. A la différence du RHDV, le RHDV2 infecte plusieurs autres genres de léporidés ainsi que les jeunes animaux de moins de quatre semaines d'âge (synthèse dans Asin et al., 2024). Quel que soit le génotype de lagovirus en cause, la RHD constitue une maladie d'importance économique majeure pour la production de viande de lapin dans le monde et une menace pour les populations de léporidés sauvages et les écosystèmes naturels.

En novembre 2023, après plusieurs années sans RHD détectée, plusieurs cas de mortalité de lapins en croissance non vaccinés vis-à-vis de la RHD ont été rapportés dans des élevages de lapins professionnels ainsi que chez des lapins de particuliers élevés en clapiers. Des échantillons ont été récoltés début 2024 dans les deux types d'élevage pour caractériser l'agent étiologique. La recherche de lagovirus a aussi été menée dans la faune sauvage de l'île.

1. Analyse de trois foyers de RHD en élevage

1.1. Echantillons biologiques

Trois échantillons de foie de lapin présentant des signes cliniques de RHD ont été récoltés début 2024 : deux en janvier provenant d'un élevage professionnel et d'une basse-cour familiale distants d'environ 18 km à vol d'oiseau, et un en février dans un élevage professionnel proche du premier (Figure 1). Ils ont été envoyés au laboratoire d'analyse vétérinaire de Labovet Conseil (Les Herbiers) pour le diagnostic.

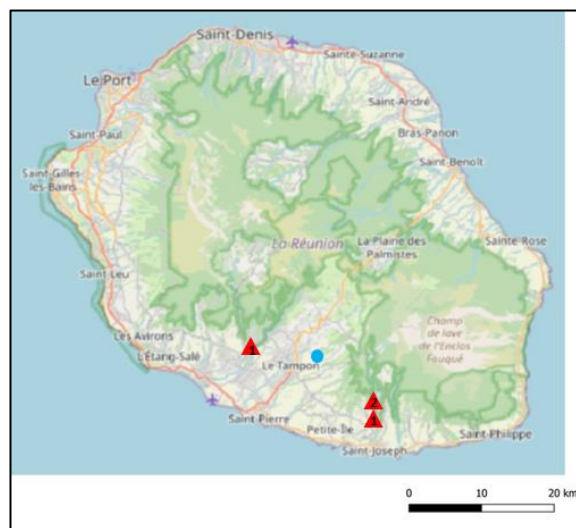


Figure 1 : Localisation dans l'île de la Réunion des RHDV2 récoltés et analysés en 2024. Les triangles rouges correspondent aux foyers en élevage de lapin (1 = janvier, 2 = février), le cercle bleu correspond au lièvre à collier noir.

1.2. Analyses moléculaires

Le diagnostic initial pour les trois élevages a été réalisé à l'aide de la RT-PCR temps réel développée par Duarte et al. (2015) pour diagnostiquer le RHDV2. Pour les analyses de caractérisation génétique des virus par séquençage, les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 µL d'exsudat de foie en utilisant le kit "RNeasy Mini kit" (QIAGEN). Une partie du génome viral (2.336 nucléotides) a été amplifiée par RT-PCR à l'aide de deux amorces spécifiques des lagovirus pathogènes et non pathogènes (amorce sens 4860F 5'-CATGACTCCGATGATGGTNAG, position 4839-4859 ; amorce anti-sens 7255R décrite dans Le Gall-Reculé et al., 2017) et du kit SuperScriptTM III One-Step Platinum Taq HiFi (Invitrogen). La RT-PCR utilisée permet d'amplifier les 445 derniers nucléotides du gène codant la polymérase (protéine non structurale), le gène codant la protéine de capsid VP60 en entier, et le début du gène codant la VP10 (protéine structurale mineure). Cette PCR recouvre ainsi le site de recombinaison majeur situé près de la jonction des gènes polymérase et VP60 (Lopes et al., 2015). Les produits PCR purifiés ont été séquencés selon la méthode de Sanger et l'assemblage des séquences a été

effectué avec le logiciel Geneious Prime. Le génotypage des virus a été réalisé en alignant les séquences nucléotidiques avec les séquences disponibles dans les banques internationales de séquences nucléotidiques à l'aide du programme BLAST (site web de NCBI).

1.3. Résultats

Du RHDV2 a été détecté par RT-PCR temps réel dans les trois échantillons d'élevage. L'analyse des séquences virales a confirmé ce diagnostic et a montré que les RHDV2 provenant des deux élevages professionnels présentaient une séquence nucléotidique identique, et une identité nucléotidique de 99,7 % avec la séquence du virus ayant infecté le lapin de clapier. Les séquences ont été déposées dans les banques de séquences nucléotidiques (numéros d'accèsion PQ472579-PQ472581). Le génotypage a montré que le virus le plus proche des trois souches (95,6 % d'identité nucléotidique en moyenne) était un RHDV2 espagnol recombinant avec un lagovirus non pathogène de génotype GI.4 et récolté en 2020 (numéro d'accèsion MZ203092, Velarde et al., 2021). Ce lagovirus recombinant est apparu en Péninsule Ibérique en 2013 où il co-circule -désormais de façon majoritaire- avec le RHDV2 d'origine (détecté pour la première fois en Espagne en 2012) et un RHDV2 recombinant avec le RHDV ibérique (variant GI.1b, détecté pour la première fois en 2014) (Lopes et al., 2015).

2. Analyse d'un lièvre à collier noir

2.1. Echantillon biologique

Suite à une information du réseau de surveillance des maladies de la faune sauvages SAGIR de l'OFB vers les chasseurs visant à augmenter la vigilance vis-à-vis du RHDV2 chez le lièvre à collier noir (*Lepus nigricollis*) -la seule espèce de léporidé sauvage à la Réunion- plusieurs cas de mortalités inhabituelles de lièvres en provenance de différents endroits de l'île ont été signalés rétrospectivement au réseau. Les mortalités auraient été constatées fin 2023-début 2024. Un cadavre de lièvre à l'état de réduction squelettique a été trouvé en avril en montagne entre 7 km et 10 km à vol d'oiseau des lapins analysés (Figure 1). L'état du cadavre ne permettant pas l'analyse sur les matrices classiques, des prélèvements alternatifs de moelle osseuse ont pu être réalisés pour la recherche de lagovirus. En effet, la RHD induit aussi des lésions histologiques au niveau de la moelle osseuse (Neimanis et al., 2018) et cette matrice est parfois utilisée pour tenter de détecter un lagovirus pathogène.

2.2. Analyses moléculaires

Approximativement, 30 mg de moelle osseuse ont été broyés dans de l'eau distillée sans RNase puis centrifugés pour séparer les plus grosses particules de tissus du surnageant. Les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 µL de surnageant en utilisant le kit "RNeasy Mini kit" (QIAGEN). La RT-PCR utilisée

précédemment pour les échantillons d'exsudat de foie de lapin n'ayant pas fonctionné, une autre RT-PCR a été réalisée avec le même kit mais avec des amorces permettant d'amplifier avec une grande sensibilité tous les génotypes de lagovirus pathogènes (U38-EBHS9 ; Le Gall-Reculé et al., 2017). La séquence du produit PCR de 307 pb correspondait à celle d'un RHDV2. Les 2336 nts ont en fin de compte pu être amplifiés grâce à deux RT-PCR chevauchantes (4860F-L337 et U38-7255R). Les produits PCR ont été séquencés et analysés comme précédemment. Par ailleurs, afin de confirmer les relations de parenté entre ces lagovirus et les autres lagovirus dont les séquences sont disponibles dans les banques de données nucléotidiques, des analyses phylogéniques ont été réalisées à l'aide de la méthode « Maximum likelihood » et l'arbre phylogénique a été construit en utilisant le programme IQ-TREE v2.3.5. Les analyses ont été réalisées séparément pour la partie génomique non-structurale (gène polymérase partiel) et structurale (gène VP60 entier et gène VP10 partiel).

2.3. Résultats

L'analyse de la séquence compilée avec les deux séquences des PCR chevauchantes a permis de caractériser un RHDV2 recombinant presque identique aux souches isolées des lapins domestiques (99,8 % d'identité nucléotidique en moyenne). La séquence a été déposée dans les banques de séquences nucléotidiques (PQ472582). L'estimation des relations phylogéniques entre les séquences de lagovirus a confirmé ces résultats en montrant que 1) les quatre séquences de la polymérase partielles étaient significativement regroupées entre elles et avec celles des RHDV2 recombinant GI.4 disponibles dont le RHDV2 recombinant espagnol MZ203092, 2) les quatre séquences VP60-VP10 partiel étaient regroupées significativement avec toutes les séquences RHDV2.

3. Discussion

Cette étude constitue la première caractérisation du RHDV2 dans l'île de La Réunion, et à ce jour dans un territoire de l'océan indien. Par ailleurs, les investigations analytiques menées sur le lièvre confirment que le diagnostic peut se faire à partir de moelle osseuse et que les ARN contenus dans ce tissu permettent le séquençage de lagovirus selon les méthodes classiques. La forte similarité entre les séquences des lapins et du lièvre suggère une origine virale commune récente avec un saut d'espèce qui aurait eu lieu localement, comme la transmission du RHDV2 entre les lapins européens et les populations sympatriques de lièvres telles que le lièvre européen (*Lepus europaeus*, Le Gall-Reculé et al., 2017), le lièvre variable (*Lepus timidus*, Neimanis et al., 2018) ou le lièvre ibérique *Lepus granatensis* (Velarde et al., 2021). Les résultats phylogéniques suggèrent l'introduction d'une seule souche virale dans l'île. Nos travaux décrivent pour la première fois la

sensibilité au RHDV2 d'une nouvelle espèce de lièvre du genre *Lepus*, le *Lepus negricollis*, confirmant que ce virus peut infecter un large éventail d'hôtes incluant 16 espèces de léporidés de cinq genres différents (*Oryctolagus*, *Sylvilagus*, *Pronolagus*, *Brachylagus* et *Lepus*), à la différence du RHDV (Asin et al., 2024). Il est donc très probable que sa détection chez les lièvres à collier noir soit corrélée avec les mortalités observées chez cette espèce. Dans son aire de distribution, le lièvre à collier noir ne présente pas de problème de conservation à ce jour, mais des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si le RHDV2 peut devenir une menace pour cette espèce. En effet, dans l'île de la Réunion, le lièvre à collier noir, introduit au 18^{ème} siècle, est une espèce chassée et l'émergence du RHDV2 constitue un nouveau paramètre à prendre en compte pour la gestion des populations de lièvre et de la biodiversité.

Conclusions

Depuis le printemps 2024, aucun nouveau foyer de RHD dans les élevages vaccinés n'a été rapporté par le GDS 974 suggérant l'efficacité des vaccins utilisés vis-à-vis du RHDV2 recombinant caractérisé. La persistance potentielle de ce virus très résistant dans l'environnement, qu'elle soit due aux épandages de fumiers d'élevages contaminés mal désinfectés ou à la circulation du virus dans les populations de lièvres, pourrait maintenir le risque de nouvelles contaminations des élevages cynicoles. Le renforcement de la prophylaxie sanitaire et vaccinale a donc été fortement recommandé, de même que l'information des vétérinaires cliniciens et des particuliers pour vacciner les lapins de compagnie et de basse-cour. A l'avenir, l'analyse moléculaire d'un plus grand nombre de virus circulant dans les élevages et dans les populations de lièvre de différentes localités, ainsi que dans les autres pays où ce recombinant est présent, dont la France depuis au moins 2022 selon les travaux menés à l'Anses de Ploufragan avec l'OFB, permettrait de donner des informations complémentaires sur les caractéristiques de cette nouvelle infection, voire de son origine.

Remerciements

Les auteurs remercient Frédéric Robert (FDC 974), Jean-François Cornuaille (OFB) et Patrick Dubard pour leur contribution à la collecte des échantillons de lièvre à collier noir. Ils remercient aussi Mathilde Lanthony (DAAF La Réunion) qui les a alertés sur les premiers cas de RHDV2 diagnostiqués dans les élevages professionnels et de basses-cours familiales. Les auteurs remercient également le laboratoire Inovalys-Angers pour l'envoi régulier d'échantillons de foie de lapins de garenne et de lièvres français infectés par des lagovirus pathogènes qui servent aux analyses phylogéniques.

Ce travail rendra dans le cadre de la convention de

partenariat OFB/Anses « EvoEpiLago » (2022-2025) qui étudie l'évolution des lagovirus chez les léporidés et le rôle épidémiologique des autres espèces sauvages sensibles (convention de recherche OFB-22-0969).

Références

- Asin J, Calvete C, Uzal FA, Crossley BM, Duarte MD, Henderson EE, et al. 2024. Rabbit hemorrhagic disease virus 2, 2010–2023: a review of global detections and affected species. *J Vet Diagn Investig.*, 10406387241260281.
- Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, et al. 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *Journal of Virological Methods*, 219:90-5.
- Le Gall-Reculé G., Boucher S., Le Normand B., Plassiart G., Portejoie Y., Decors A., Bertagnoli S., Guerin J-L., Marchandeau S., 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* 168: 137-138
- Le Gall-Reculé G, Lemaitre E, Bertagnoli S, Hubert C, Top S, Decors A, et al., 2017. Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Res.*, 48(1):70.
- Lopes AM, Dalton KP, Magalhães MJ, Parra F, Esteves PJ, Holmes EC, et al., 2015. Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. *J Gen Virol.*, 96(6):1309-19.
- Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire, Agreste, Service statistique ministériel de l'agriculture, 2021. Essentiel, La Réunion, Août 2021, pp 4.
- Morisse J-P, Le Gall G, Boilletot E., 1991. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, 10:283-95.
- Neimanis A, Larsson Pettersson U, Huang N, Gavner-Widén D, Strive T., 2018. Elucidation of the pathology and tissue distribution of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 (rabbit haemorrhagic disease virus 2) in young and adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Res.*, 49(1):46.
- Velarde R, Abrantes J, Lopes AM, Estruch J, Côte-Real JV, Esteves PJ, et al., 2021 Spillover event of recombinant Lagovirus europaeus/GI.2 into the Iberian hare (*Lepus granatensis*) in Spain. *Transbound Emerg Dis.*; 68(6):3187-93.