



**HAL**  
open science

# Origine de la pathogénicité des lagovirus : avancées sur la diversité génétique virale et le développement d'un système de génétique inverse

Clément Droillard

## ► To cite this version:

Clément Droillard. Origine de la pathogénicité des lagovirus : avancées sur la diversité génétique virale et le développement d'un système de génétique inverse. Microbiologie et Parasitologie. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B016 . tel-03157952

**HAL Id: tel-03157952**

**<https://theses.hal.science/tel-03157952>**

Submitted on 3 Mar 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par

**Clément DROILLARD**

## **Origine de la pathogénicité des lagovirus : avancées sur la diversité génétique virale et le développement d'un système de génétique inverse**

Thèse présentée et soutenue à Ploufragan, le 8 septembre 2020

Unité de recherche : Anses Ploufragan/Plouzané/Niort, Unité Virologie, Immunologie, Parasitologie, Aviaires et Cunicoles

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Soizick LE GUYADER Directrice de recherche, IFREMER, Nantes, France  
Pierre Emmanuel CECCALDI Professeur, Université Paris-Diderot, France

### **Composition du Jury :**

Président Jacques LE PENDU Directeur de recherche, CRCINA, Inserm, Nantes, France

Examineurs Soizick LE GUYADER Directrice de recherche, IFREMER, Nantes, France  
Pierre Emmanuel CECCALDI Professeur, Université Paris-Diderot, France  
Jacques LE SEYEC Chargé de recherche, IRSET, Rennes, France

Dir. de thèse Nicolas ETERRADOSSI Directeur de recherche, ANSES, Ploufragan, France  
Co-dir. de thèse Ghislaine LE GALL-RECULE Chargée de projet recherche, ANSES, Ploufragan, France



## Remerciements

Ce manuscrit est le résultat de mes trois ans de travaux de recherche effectués au sein de l'unité Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles (VIPAC) du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), sur le site de Ploufragan (Côtes d'Armor, 22). Ce travail a été possible grâce à l'aide financière de Saint-Brieuc Agglomération et du conseil départemental des Côtes d'Armor.

Je tiens à remercier sincèrement Dr. Soizick Le Guyader et Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également Dr. Jacques Le Pendu et Dr. Jacques Le Seyec d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie aussi chaleureusement les membres de mon comité de pilotage de thèse pour leur implication au bon déroulement de ce projet : Pr. Martine Bonnaure-Mallet, en qualité de tutrice, Pr. Nathalie Ruvoën-Clouet, Pr. Stephane Bertagnoli et Dr. Labib Bakkali-Kassimi.

Je tiens à remercier les Drs. Gilles Salvat et Nicolas Eterradosi, en qualité de directeurs successifs de l'Anses Ploufragan, de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de ce laboratoire de recherche. En qualité d'ancien chef de l'unité VIPAC et de directeur de thèse, je remercie une nouvelle fois le Dr. Nicolas Eterradosi pour son accueil dans l'unité, sa participation à l'organisation de ma thèse, ses nombreux conseils, son expertise et sa rigueur scientifique.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement le Dr. Ghislaine Le Gall-Reculé, en qualité de co-directrice de thèse, pour sa disponibilité, sa patience, sa rigueur et sa pédagogie tout au long de la thèse. Grâce à vous j'ai appris énormément et j'ai pu mener à bien ma thèse dans d'excellentes conditions.

Je remercie profondément Evelyne, qui m'a formé aux techniques de laboratoire et qui m'a aidé et soutenu tout au long de la thèse. Travailler avec toi a été une très belle expérience, tu m'as appris beaucoup pendant ces trois années, et notamment à sortir de ma zone de confort !

Je tiens à remercier encore une fois Evelyne mais aussi Paul, Céline (alias The Punisher), et Lili pour leur aide et les bons moments qu'on a passés. Merci à FX pour avoir partagé ses connaissances en bio-informatique et pour nos matchs de bad ! Merci à Chantal et à Audrey (alias La Méchante) pour nos discussions matinales. Merci à Béatrice, pour son aide et son soutien. Enfin, merci à toutes les personnes de l'unité VIPAC pour les bons moments que j'ai pu passer pendant ces trois ans de thèse.

Je remercie aussi Nathan, Florian et Alexandre pour leur soutien quotidien et les bons moments que l'on a passés dans l'unité et en dehors. Merci à tous les autres doctorants de l'Anses Ploufragan que j'ai pu rencontrer pendant la thèse pour les bons moments qu'on a pu passer.

Merci aux membres du SELEAC et du SPPAE pour leur disponibilité et leur participation aux phases d'expérimentation *in vivo* ainsi qu'au bon déroulement de celles-ci.

Merci à Michel Morin et à Eric Chorin pour leur accompagnement sur le management de la qualité de thèse. Je remercie également tous les membres de l'ANSES de Ploufragan que j'ai eu à rencontrer.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leurs encouragements et leurs soutiens.

Merci à toi Cindy pour ton amour, ta patience et ton soutien au cours de ces trois années de thèse.

## Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>4</b>
<b>PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
<b>A. INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>7</b>
<b>B. LES CALICIVIRUS DES LEPORIDES .....</b>	<b>9</b>
<b>I. Taxonomie des Lagovirus.....</b>	<b>9</b>
1. Génogroupe GI.....	11
2. Génogroupe GII.....	11
<b>II. Caractéristiques physico-chimiques et structurales des Lagovirus.....</b>	<b>12</b>
1. Morphologie .....	12
2. Organisation génomique.....	13
3. Protéines virales.....	14
3.1. Les protéines non-structurales.....	14
3.2. Les protéines structurales.....	17
4. Propriétés physico-chimiques .....	20
5. Résistance aux agents physico-chimiques.....	20
<b>III. Cycle viral.....</b>	<b>20</b>
1. Cellules cibles.....	20
1.1. <i>In vitro</i> .....	20
1.2. <i>In vivo</i> .....	21
2. Les étapes du cycle viral.....	22
<b>IV. Propriétés biologiques.....</b>	<b>25</b>
1. Hémagglutination.....	25
2. Caractéristiques antigéniques .....	26
3. Evolution génétique.....	27
3.1. Evolution par mutations ponctuelles ou recombinaison homologue .....	28
3.2. Franchissement de la barrière d'espèce .....	29
<b>V. Maladies causées par les lagovirus .....</b>	<b>31</b>
1. Espèces cibles.....	31
2. Evolution clinique.....	31
2.1. Suraguë.....	32
2.2. Aiguë .....	32
2.3. Subaiguë.....	32
2.4. Chronique.....	32
3. Lésions macroscopiques et microscopiques.....	33
3.1. Lésions provoquées par un lagovirus pathogène .....	33
3.2. Lésions provoquées par les lagovirus non-pathogènes.....	35
4. Pathogénie.....	35
5. Réponse immunitaire à l'infection.....	35
6. Epidémiologie descriptive et analytique.....	37
6.1. Historique et répartition géographique.....	37
6.1.1. Lagovirus pathogènes .....	37
6.1.2. Lagovirus non-pathogènes .....	39
6.2. Epidémiologie moléculaire des EBHSV et des RHDV.....	39
6.2.1. Epidémiologie moléculaire des EBHSV.....	39
6.2.2. Epidémiologie moléculaire des RHDV.....	40
6.3. Persistance dans le milieu extérieur.....	41
6.4. Modalités de transmission.....	42
6.4.1. Directe .....	42
6.4.2. Indirecte.....	42
6.5. Les facteurs de sensibilité.....	42
7. Diagnostic .....	45
7.1. Différentiel.....	45
7.2. Sérologique.....	46

7.2.1.	ELISA .....	46
7.2.2.	Inhibition de l'hémagglutination .....	46
7.3.	Virologique .....	47
7.3.1.	Hémagglutination .....	47
7.3.2.	Western blot .....	47
7.3.3.	Immunohistochimie.....	47
7.3.4.	Microscopie électronique .....	47
7.4.	Moléculaire.....	48
7.4.1.	Transcription inverse-PCR (RT-PCR) .....	48
7.4.2.	RT-qPCR .....	48
7.4.3.	Immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR).....	48
8.	Prophylaxie .....	49
8.1.	Sanitaire.....	49
8.1.1.	Mesures sanitaires défensives.....	49
8.1.2.	Mesures sanitaires offensives .....	49
8.2.	Médicale.....	50
C.	GENETIQUE INVERSE .....	51
I.	<i>Définition de la génétique inverse</i> .....	51
II.	<i>Principaux outils pour développer un système de génétique inverse pour les virus à ARN positif</i> .....	52
1.	Transcrire le génome .....	52
2.	Avoir des extrémités génomiques complètes.....	54
III.	<i>Systèmes de génétique inverse pour les Calicivirus</i> .....	55
1.	Feline Calicivirus (FCV).....	55
2.	Porcine Enteric Calicivirus (PEC) .....	58
3.	Murine Norovirus (MNV) .....	58
4.	Tulane Virus (TV) .....	63
5.	Norovirus Humain .....	63
6.	RHDV .....	65
7.	Bilan et Evolution des systèmes de génétique inverse des calicivirus.....	69
D.	PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE THESE .....	72
	<b>TRAVAUX PERSONNELS.....</b>	<b>74</b>
	<b>CHAPITRE 1 : ÉTUDE DES SEQUENCES GENOMIQUES ET DU GENE CODANT LA VP60 DES LAGOVIRUS NON-PATHOGENES DES LEPORIDES .....</b>	<b>75</b>
I.	<i>Etude de la diversité génétique des lagovirus HaCV.....</i>	<i>75</i>
1.	Introduction .....	75
Publication 1 .....	77	
Publication 2 .....	87	
2.	Conclusions.....	90
II.	<i>Etude des liens évolutifs entre les lagovirus non-pathogènes RCV-E1 (Gl.3) et les lagovirus pathogènes RHDV2 (Gl.2) .....</i>	<i>92</i>
1.	Introduction .....	92
Publication 3 .....	93	
2.	Conclusions.....	113
	<b>CHAPITRE 2 : AVANCEES DANS LE DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU SYSTEME DE GENETIQUE INVERSE POUR CARACTERISER LES MOTIFS DE PATHOGENICITE DES LAGOVIRUS .....</b>	<b>114</b>
I.	<i>Caractérisation génomique et phénotypique de la souche de référence.....</i>	<i>115</i>
1.	Introduction .....	115
Publication 4 .....	117	
2.	Conclusions.....	138
II.	<i>Travaux préliminaires pour l'élaboration d'un nouveau système de génétique inverse des lagovirus</i>	<i>139</i>
1.	Introduction .....	139
2.	Matériels et méthodes .....	140
2.1.	Stratégie adoptée pour le développement du système de génétique inverse .....	140

2.2.	Autorisation HCB.....	141
2.3.	Souche de référence.....	142
2.4.	Constructions plasmidiques.....	142
2.4.1.	Cartes plasmidiques.....	144
2.4.2.	Exérèse de l'insert AMPV.....	145
2.4.3.	Amplification du génome de la souche GI.1d/00-21.....	145
2.4.4.	Clonage par assemblage de Gibson.....	146
2.4.5.	Clonage par Restriction Free (RF) cloning.....	147
2.4.6.	Corrections des mutations et construction de pSMART B par RF cloning.....	149
2.5.	Essais de régénération du virus <i>in vitro</i> .....	150
2.5.1.	Types cellulaires transfectés.....	150
2.5.2.	Agents de transfection.....	150
2.5.3.	Transfection <i>in vitro</i> des plasmides A, B et GFP.....	153
2.5.4.	Détection de l'ARN viral produit dans les cellules transfectées.....	154
2.5.5.	Détection en PCR de la présence de génomes viraux complets dans les inoculums de cellules transfectées.....	154
2.5.6.	Séquençage en NGS des amplicons issus des PCRs chevauchantes.....	155
2.5.7.	Détection de protéines virales post-transfection.....	156
2.5.7.1.	Coloration en immunofluorescence de cellules fixées sur plaques.....	156
2.5.7.2.	Coloration en immunofluorescence de cellules fixées sur lamelles de verre.....	157
2.6.	Tentatives de régénération du virus <i>in vivo</i> .....	158
2.6.1.	Ethique.....	158
2.6.2.	Animaux.....	158
2.6.3.	Suivi clinique.....	158
2.6.4.	Inoculations de cellules transfectées.....	158
2.6.5.	Inoculations de plasmides <i>in vivo</i> .....	161
2.6.6.	Détection et quantification des ARNs viraux dans les inoculums.....	162
2.6.7.	Détection des ARNs viraux dans les prélèvements.....	163
2.6.8.	Etude du statut sérologique.....	163
3.	Résultats et discussion.....	164
3.1.	Vérifications de la séquence des plasmides.....	164
3.2.	Transfection <i>in vitro</i> .....	164
3.2.1.	Détection et quantification d'ARN viral à partir de cellules et surnageants.....	164
3.2.2.	Amplification et séquençage de génomes complets.....	167
3.2.3.	Détection des protéines virales.....	168
3.3.	Essais <i>in vivo</i> .....	170
3.3.1.	Essai 1 : inoculations de cellules transfectées.....	170
3.3.1.1.	Inoculums.....	170
3.3.1.2.	Symptômes et lésions macroscopiques.....	170
3.3.1.3.	Etude de l'excrétion virale.....	170
3.3.1.4.	Recherche de virus dans les animaux.....	170
3.3.1.5.	Etude de la séroconversion.....	171
3.3.2.	Essai 2 : inoculations de broyats de foie et de cellules transfectées.....	172
3.3.2.1.	Inoculums.....	172
3.3.2.2.	Symptômes et lésions macroscopiques.....	172
3.3.2.3.	Etude de l'excrétion virale.....	172
3.3.2.4.	Recherche de virus dans les animaux.....	172
3.3.2.5.	Etude de la séroconversion.....	173
3.3.3.	Essai 3 : inoculations des plasmides <i>in vivo</i> .....	173
3.3.3.1.	Validation de l'inoculation.....	173
3.3.3.2.	Symptômes et lésions macroscopiques.....	174
3.3.3.3.	Recherche de virus dans les animaux.....	174
4.	Conclusions.....	174
	<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>176</b>
I.	<i>Etude des lagovirus non-pathogènes du lièvre (HaCV).....</i>	<i>177</i>
1.	Diversité génétique des HaCV.....	177
2.	Recherche de potentiels liens évolutifs entre les HaCV et les EBHSV.....	179

3.	Phénotype des virus HaCV .....	180
II.	<i>Etude de l'origine de la pathogénicité des RHDV2</i> .....	180
1.	Diversité génétique et recombinaisons.....	180
2.	Recherche d'autres espèces hôtes des lagovirus.....	182
III.	<i>Développement d'un système de génétique inverse en vue de l'étude du pouvoir pathogène</i> .....	183
1.	Tentative de développement d'un nouveau système de génétique inverse .....	184
1.1.	Caractérisation de la souche de référence.....	184
1.2.	Constructions plasmidiques et résultats obtenus.....	185
2.	Potentielles limites de l'étude.....	186
3.	Perspectives .....	188
3.1.	Vérifier la production d'un virus identique à la souche de référence .....	188
3.2.	Production de virus chimères.....	189
3.3.	Autres applications du système de génétique inverse.....	190
	<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>191</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>194</b>
	<b>ANNEXE 1 : ATTESTATION DE MANAGEMENT QUALITE DE THESE</b> .....	<b>222</b>
	<b>ANNEXE 2 : ILLUSTRATION DES AMORCES DE SEQUENÇAGE SANGER SUR LA CARTE PLASMIDIQUE DE PSMART B</b> .....	<b>226</b>
	<b>ANNEXE 3 : TABLEAU BILAN DES SYSTEMES DE GENETIQUE INVERSE DES CALICIVIRUS</b> .....	<b>228</b>
	<b>ANNEXE 4 : AGREMENT D'UTILISATION CONFINEE D'ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES A DES FINS DE RECHERCHE, DE DEVELOPPEMENT ET D'ENSEIGNEMENT</b> .....	<b>234</b>
	<b>ANNEXE 5 : AMORCES UTILISES EN PCR POUR CONSTRUIRE, CORRIGER ET CRIBLER LES PLASMIDES PSMART A ET B.</b> .....	<b>237</b>

## Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AcM	Anticorps monoclonaux
ADNc	ADN complémentaire
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol II	ARN polymérase II
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
BGH	Bovine Growth Hormone
BHK-21	Fibroblaste rénal de bébé hamster
BSR-T7	Fibroblaste rénal de bébé hamster exprimant l'ARN polymérase T7
BV-2	Lignée de cellules microgliales murines
Caco-2	Cellules humaines d'adénocarcinome colorectal
cf	Confer
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CLP	Core-Like Particles
CLTA	Chaîne légère de la clathrine A
CMH	Complexes majeurs d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
Cos-7	Cellules rénales de singe vert africain
cp	Copie
CRFK	Crandell-Reese feline kidney
CsCl	Chlorure de césium
DJRK	Du and Ji Rabbit Kidney cells
domaine P	Protrusion
domaine S	Shell
dpi	Jours post-infection
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBHS	Syndrome du lièvre brun européen
EBHSV	European Brown Hare Syndrome Virus
ECP	Effets cyto-pathogènes
eIF	Eukaryotic initiation factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EOPS	Exempt d'organisme pathogène spécifié
FCV	Feline Calicivirus
fJAM-A	Féline Junctional adhesion molecule-A
FPV	Fowlpox virus
GFP	Green Fluorescent Protein
Gly	Glycine

HA	Hémagglutination
HaCV	Hare Calicivirus
HBGA	Histo Blood Group Antigens
HCB	Haut Conseil des Biotechnologies
HDVr	Ribozyme du virus de l'hépatite delta
HEK 293	Human embryonic kidney 293 cells
HeLa	Henrietta Lacks cells, cellules épithéliales humaines
HepG2	Human liver hepatocellular carcinoma
HHr	Ribozyme Hammerhead
HPD	Highest posterior density
hpi	Heure post-infection
Huh-7.5	Lignée de cellules d'hépatocarcinome humain
HuNoV	Human Norovirus
IBRS-2	Cellules rénales de porc
IC-RT-PCR	Immunocapture Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IF	Immunofluorescence
Ig	Immunoglobuline
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
IRES	Internal ribosome entry site
jpi	Jours post-infection
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LLC-PK	Cellules rénales de porc
LLK-MK2	Cellules rénales de singe
MA 104	Cellules épithéliales de rein de singe vert africain
MAb	Anticorps monoclonal
minCMV	Promoteur minimal CMV
MNV	Murine norovirus
MRCV	Michigan Rabbit Calicivirus
MVA	Virus de la vaccines
NCR	Natural cytotoxicity triggering receptor
Newbury1	Newbury 1 virus
NK	Natural killer
nm	Nanomètre
NTA	Bras N-terminal
NTP	Nucléotide triphosphate
nts	Nucléotides
NV	Norwalk virus
OGM	Organisme génétiquement modifié
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
ONCFS	Office Nationale de la Chasse et de la Faune Sauvage
ORF	Open reading frame
p.i.	Post-infection
PABP	Poly(A)-binding protein
PBS	Tampon phosphate salin

pCMV	Promoteur de l'ARN polymérase II du Cytomégalovirus
PEC	Porcine Enteric Calicivirus
pEF-1 $\alpha$	Promoteur de l'ARN polymérase II du gène du facteur d'élongation humain 1 alpha
PK-15	Cellules rénales de porc
Pro	Protéase
pSP6	Promoteur de la polymérase du bactériophage SP6
pT7	Promoteur de l'ARN polymérase T7 du bactériophage T7
RAW 264.7	Lignée de macrophage murin
RCV	Rabbit Calicivirus
RCV-A1	Australian Rabbit Calicivirus
RCV-E1	European Rabbit Calicivirus 1
RCV-E2	European Rabbit Calicivirus 2
RdRp	RNA-Dependent RNA Polymerase
RF cloning	Restriction Free cloning
RHD	Maladie hémorragique du lapin
RHDV	Rabbit haemorrhagic disease Virus
RHDV2	Rabbit haemorrhagic disease Virus 2
RK	Cellules rénales de lapin
RK13	Rabbit Kidney 13
rpm	Tours par minute
RT	Transcription inverse
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
SaV	Sapporo virus
SFV	Sérum de veau fœtal
TetO	Tet activateur
TetR	Répresseur Tet
tMRCA	Ancêtre commun le plus récent
TURBS	Termination upstream ribosomal binding site
TV	Tulane Virus
UTR	Untranslated Transcribed Region
UV	Ultraviolets
Vero	Cellules épithéliales de rein de singe vert africain
VLP	Virus-like particles
VPg	Viral Protein genome-linked
WB	Western Blot

## Liste des figures et tableaux

- Figure 1.** Organisation des taxons du genre *Lagovirus* dans la famille des *Caliciviridae*
- Figure 2.** Microscopie électronique et cryo-microscopie électronique du virion RHDV intact et d'une particule core-like (CLP)
- Figure 3.** Représentation schématique de l'ARN génomique et de l'ARN subgénomique du RHDV
- Figure 4.** Modèles du mécanisme d'initiation de la traduction basés sur des données publiées et non publiées pour le calicivirus félin (FCV) et le norovirus murin (MNV)
- Figure 5.** Représentation en ruban tridimensionnel de la protéine de capsid VP60 de FCV
- Figure 6.** Description des sept régions hypervariables de la protéine de capsid VP60
- Figure 7.** Reconstruction du portail VP2, protéine homologue à la VP10 des lagovirus
- Figure 8.** Schéma de la synthèse des ligands HBGA du lapin
- Figure 9.** Représentation schématique du cycle viral des lagovirus
- Figure 10.** Lésions de la maladie hémorragique du lapin (RHD)
- Figure 11.** Distribution des différents génotypes de lagovirus pathogènes dans le monde
- Figure 12.** Représentation schématique des premiers systèmes de génétique inverse disponibles pour les FCV.
- Figure 13.** Représentation schématique des derniers systèmes de génétique inverse disponibles pour les FCV.
- Figure 14.** Représentation schématique des premiers systèmes de génétique inverse disponibles pour les MNV.
- Figure 15.** Représentation schématique des derniers systèmes de génétique inverse disponibles pour les MNV.
- Figure 16.** Représentation schématique du premier système de génétique inverse disponibles pour les HuNoV.
- Figure 17.** Représentation schématique des systèmes de génétique inverse disponibles pour les HuNoV.
- Figure 18.** Représentation schématique du premier système de génétique inverse disponibles pour les RHDV.
- Figure 19.** Représentation schématique du second système de génétique inverse disponibles pour les RHDV.
- Figure 20.** Représentation schématique du dernier système de génétique inverse disponibles pour les RHDV.
- Figure 21.** Principaux systèmes de génétique inverse des *Caliciviridae*
- Figure 22.** Représentation schématique du plasmide pFr-AMPV-C
- Figure 23.** Représentation schématique du plasmide pSMART-GFP
- Figure 24.** Représentation schématique des plasmides pSMART A et pSMART B
- Figure 25.** Représentation schématique des amplifications réalisées à partir du plasmide pFr-AMPV-C
- Figure 26.** Stratégie d'amplification du génome viral pour générer les extensions nécessaires aux assemblages Gibson destinés à construire les plasmides pSMART A et B
- Figure 27.** Principe du Restriction Free cloning

**Figure 28.** Exemple d'analyse de résultats de cytométrie en flux de cellules transfectées avec le plasmide pSMART – GFP

**Figure 29.** Organisation du premier essai d'inoculation de cellules transfectées à des lapins EOPS.

**Figure 30.** Organisation du second essai d'inoculation de cellules transfectées et de broyat de foie à des lapins EOPS

**Figure 31.** Organisation de l'essai d'inoculation de plasmide *in vivo*

**Figure 32.** Observation au microscope à fluorescence de cellules BSR-T7 à grossissement X200 ou X600

**Figure 33.** Etude de la séroconversion des animaux de l'essai 1

**Figure 34.** Etude de la séroconversion des animaux de l'essai 2

**Tableau 1.** Bilan des fonctions des protéines non-structurales des Calicivirus

**Tableau 2.** Bilan des fonctions des protéines structurales des Calicivirus

**Tableau 3.** Intervalles du nombre de substitution/site/an 95% highest posterior density (HPD) décrit au niveau du gène codant la protéine de capsid VP60 de différents géotypes de lagovirus

**Tableau 4.** Ensemble des lésions macroscopiques et microscopiques provoquées par les virus RHDV et RHDV2 chez l'*Oryctolagus cuniculus*

**Tableau 5.** Diagnostic différentiel de la RHD

**Tableau 6.** Méthodes et objectifs des outils de diagnostic disponibles pour le RHDV

**Tableau 7.** Principales caractéristiques des vaccins disponibles en France pour lutter contre les lagovirus pathogènes

**Tableau 8.** Principaux avantages et inconvénients de l'utilisations des promoteurs eucaryotes et pT7 en génétique inverse

**Tableau 9.** Conditions de transfection testées avec le plasmide pSMART-GFP

**Tableau 10.** Condition optimale de transfection des cellules RK13 et BSR-T7

**Tableau 11.** Description des différentes conditions nécessaires à la démonstration de la production d'ARN viral post-transfection

**Tableau 12.** Amorces utilisées pour amplifier le génome viral avec des PCR chevauchantes

**Tableau 13.** Description des inoculums du premier essai de transfection de cellules transfectées *in vivo*

**Tableau 14.** Conditions d'inoculation de l'essai 2

**Tableau 15.** Synthèse des résultats de PCR post-transfections

**Tableau 16.** Résultats de RT-qPCR sur les ARNs traités à la DNase I provenant des inoculums des essais d'inoculation de cellules transfectées et de broyat de foie

## Présentation bibliographique

## A. Introduction générale

La première définition du mot virus fut donnée par un ingénieur chimiste hollandais, Martinus Wilhem Beijerinck en 1898 après avoir transmis la maladie de la mosaïque, maladie qui touche les feuilles des plantes, en inoculant à un plant de tabac sain de la sève filtrée d'un plant de tabac malade. Dans cet inoculum, aucune bactérie ne fut observée au microscope, Beijerinck désigna alors l'agent pathogène comme *Contagium vivum fluidum* à savoir un fluide vivant contagieux (Chastel, 1997). Ce n'est qu'en 1939 que l'agent infectieux de la maladie de la mosaïque, le virus de la maladie de la mosaïque du tabac (Tobacco Mosaic Virus, TMV), fut observé au microscope électronique (Kausche et al., 1939). La définition moderne du mot virus fut donnée par le biologiste André Lwoff en 1957 : « Les virus sont infectieux et potentiellement pathogènes ; ce sont des entités nucléo-protéiques possédant un seul type d'acide nucléique (ARN ou ADN) ; ils sont reproduits (par la cellule) à partir de leur matériel génétique ; ils sont incapables de croître et de se diviser ; ils sont dépourvus de système de Lipman » (Lwoff, 1957).

Depuis le TMV, de très nombreux virus ont été découverts. Ces virus sont classés par le comité international de la taxonomie des virus (ICTV) en fonction de leurs caractéristiques comme le type de génome (virus à ADN, virus à ARN, simple brin ou double brin ...) ou l'hôte (vertébrés, plantes ...). Aujourd'hui, l'ICTV a classé 6590 espèces virales à travers 4 domaines, 9 royaumes, 16 phylum, 2 sous-phylum, 36 classes, 55 ordres, 8 sous-ordres, 168 familles, 103 sous-familles, 1421 genres et 68 sous-genres (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

Les virus étudiés dans cette thèse font partie du domaine *Riboviria* (virus à ARN), royaume *Orthornavirae* (virus possédant le gène codant la RdRp), phylum *Pisuviricota* (virus à ARN simple brin et double brin infectant les eucaryotes), sous-phylum *Pisoniviricetes* (virus à ARN positif simple brin possédant le gène codant la protéase 3C ou 3C-like), ordre des *Picornavirales*, famille des *Caliciviridae* et genre *Lagovirus*. L'ordre des *Picornavirales* regroupe les virus non-enveloppés, de forme icosaédrique et de symétrie T=3, dont le génome viral possède une petite protéine (inférieure à 5 kDa) liée de manière covalente en 5' et code une polyprotéine clivée par une ou plusieurs protéases virales (Le Gall et al., 2008). La famille des *Caliciviridae* rassemble les virus qui possèdent une architecture de la capsidie particulière comprenant 32 dépressions en forme de calice à la surface de la capsidie (cf. II. Caractéristiques physico-chimiques et structurales des Lagovirus - 1. Morphologie) (Vinje et al., 2019).

Le genre *Lagovirus* regroupe des virus non-pathogènes et des virus pathogènes pour les lagomorphes. Les premiers lagovirus pathogènes décrits sont le virus de la Maladie Hémorragique du Lapin (RHDV) affectant le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) et le virus du Syndrome du Lièvre Brun Européen (European Brown Hare Syndrome Virus, EBHSV) affectant plusieurs espèces de lièvres

(*Lepus europaeus*, *L. timidus* et *L. corsicanus*) (Abrantes et al., 2012). L'EBHSV a émergé au début des années 1980 en Suède après l'observation de fortes mortalités dans les populations de lièvres et à rapidement diffusé en Europe (Gavier-Widen and Morner, 1991). Le RHDV a quant à lui été détecté pour la première fois en 1984 en Chine (Liu et al., 1984). Le RHDV a également rapidement diffusé en Europe puis sur les continents Américain et Africain (Morisse et al., 1991). Le RHDV fut introduit volontairement en Australie pour réguler les populations de lapins dans la faune sauvage (Cooke and Fenner, 2002). Ces deux virus présentent des caractéristiques morphologiques et génétiques proches. Les virus RHDV et EBHSV induisent la maladie hémorragique du lapin (RHD) et le syndrome du lièvre brun européen (EBHS) chez leurs hôtes. Ces maladies se caractérisent par une hépatite virale souvent fatale chez leurs hôtes. Elles induisent d'importantes pertes économiques pour l'industrie du lapin et ont un impact écologique majeur au niveau de la faune sauvage (Capucci et al., 1991; McIntosh et al., 2007; Delibes-Mateos et al., 2014). L'impact de la RHD dans les élevages a été contrôlé par des mesures sanitaires et la vaccination jusqu'à l'émergence d'un nouveau génotype de virus en 2010, le RHDV2.

Ce nouveau virus, capable d'infecter à la fois les lapins (*O. cuniculus*) et plusieurs espèces de lièvres, provoque lui aussi des hépatites virales et a rapidement diffusé partout dans le monde (Le Gall-Reculé et al., 2011; Puggioni et al., 2013; Camarda et al., 2014; Le Gall-Reculé et al., 2017; Velarde et al., 2017; Rouco et al., 2019). L'arrivée du RHDV2 a relancé les études scientifiques sur les lagovirus et notamment sur l'origine de la pathogénicité des lagovirus pathogènes. Deux hypothèses sont aujourd'hui étudiées pour expliquer l'émergence des lagovirus pathogènes : l'émergence du pouvoir pathogène à partir de souches de lagovirus non-pathogènes, par mutations ponctuelles ou recombinaisons homologues, et le saut de la barrière d'espèce à partir d'une espèce sympatrique des léporidés (Esteves et al., 2015).

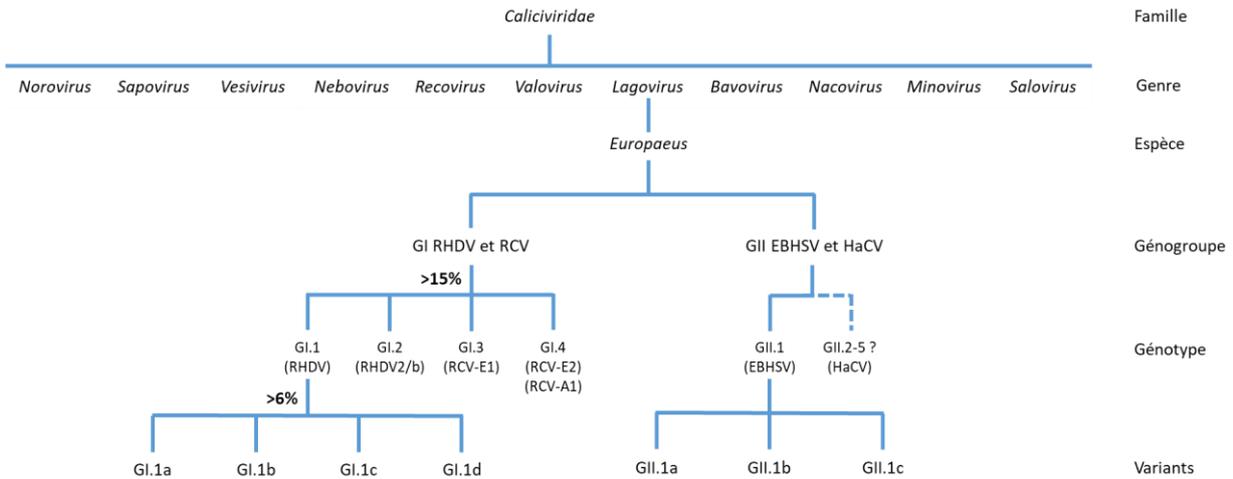
Ces deux hypothèses nous ont conduits à nous intéresser au cours de ce travail de thèse à caractériser le génome des lagovirus non-pathogènes présents en France, jusqu'à lors peu étudiés, et à tenter de développer un nouveau système de génétique inverse dans le but d'identifier les motifs de pathogénicité des lagovirus.

## B. Les Calicivirus des Léporidés

### I. Taxonomie des *Lagovirus*

Les *Caliciviridae* appartiennent au règne des *Ribovirus*. Jusqu'à peu, la famille *Caliciviridae* comptait cinq genres : les *Norovirus* (Norwalk virus, NV ou Human Norovirus, HuNoVs et Murine norovirus, MNV), les *Sapovirus* (Sapporo virus, SaV), les *Vesivirus* (Feline Calicivirus, FCV), les *Nebovirus* (Newbury 1 virus, Newbury1) et les *Lagovirus* (RHDV et EBHSV), tous infectant des mammifères. Un récent rapport du comité international de la taxonomie des virus (ICTV) a ajouté six nouveaux genres à la famille des *Caliciviridae* : les *Recovirus* et les *Valovirus* infectant des mammifères, les *Bavovirus* et les *Nacovirus* infectant des oiseaux, et enfin les *Minovirus* et les *Salovirus* infectant les poissons (Vinje et al., 2019).

La classification des *Lagovirus* (Le Pendu et al., 2017) est basée sur la séquence nucléotidique complète du gène codant la protéine de capsid (VP60). Cette classification définit le genre *Lagovirus* comme étant composé d'une seule espèce *europaeus*, elle-même composée de deux génogroupes. Le génogroupe GI regroupe les virus ayant au moins 70% d'identité nucléotidique avec le gène codant la VP60 des virus RHDV, tandis que le génogroupe GII regroupe les virus ayant au moins 70% d'identité nucléotidique avec le gène codant la VP60 des virus EBHSV. Ces génogroupes sont composés de plusieurs génotypes qui sont pour certains constitués de variants. La nouvelle proposition de nomenclature définit les génotypes comme des groupes phylogéniques significatifs (bootstrap >70%), constitués d'au moins trois séquences de gène codant la VP60 de virus issus de foyers épidémiologiquement indépendants, et ayant plus de 15% de distance génétique avec les autres groupes phylogéniques. Les variants sont quant à eux définis comme des groupes phylogéniques significatifs (bootstrap >70%) constitués d'au moins trois séquences de gène codant la VP60 et ayant entre 6 et 15% de distance génétique avec les groupes phylogéniques les plus proches. L'organisation taxonomique des *lagovirus* est illustrée à la Figure 1.



**Figure 1.** Organisation des taxons du genre *Lagovirus* dans la famille des *Caliciviridae*, telle que proposée par Le Pendu et al. (2017). Les groupes reconnus sont indiqués par un trait plein, tandis que les nouveaux groupes potentiels, à confirmer, sont indiqués en pointillés avec un point d'interrogation. *Lagovirus europaeus* constitue l'espèce unique des lagovirus. Il contient deux génogroupes qui peuvent être subdivisés en génotypes, puis subdivisés en variants. Les génogroupes sont désignés par des chiffres romains, les génotypes avec des chiffres arabes et les variants avec des lettres. Les distances génétiques minimales requises pour distinguer les génotypes et les variants sont indiquées sous forme de pourcentages. L'ancienne nomenclature est indiquée entre parenthèses pour les génotypes (d'après Le Pendu et al., 2017; Vinjé et al., 2019)

## 1. Génogroupe GI

Le génogroupe GI est constitué de quatre génotypes :

- GI.1 : anciennement appelé RHDV, ce génotype est le seul du génogroupe GI à avoir différents variants : GI.1a, GI.1b, GI.1c et GI.1d
- GI.2 : anciennement appelé RHDV2 (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2)
- GI.3 : anciennement appelé RCV-E1 (European Rabbit Calicivirus 1, non pathogène)
- GI.4 : composés des virus anciennement appelés RCV-A1 (Australian Rabbit Calicivirus) et RCV-E2 (European Rabbit Calicivirus 2), non pathogènes.

## 2. Génogroupe GII

Le génogroupe GII est constitué d'un seul génotype confirmé, le GII.1 anciennement appelé EBHSV. Ce génotype possède trois variants : GII.1a, GII.1b et GII.1c. Les virus potentiellement non-pathogènes HaCV (Hare Calicivirus) sont susceptibles de former plusieurs génotypes potentiels : GII.2 ? (Le Pendu et al., 2017) et tout dernièrement, GII.3 ? à GII.5 ? (Mahar et al., 2019) mais le nombre insuffisant des séquences reportées dans ces études empêchait de le confirmer compte tenu des critères définis par la proposition de nomenclature des *Lagovirus* de Le Pendu et al. (2017).

## 3. Les virus non-classés

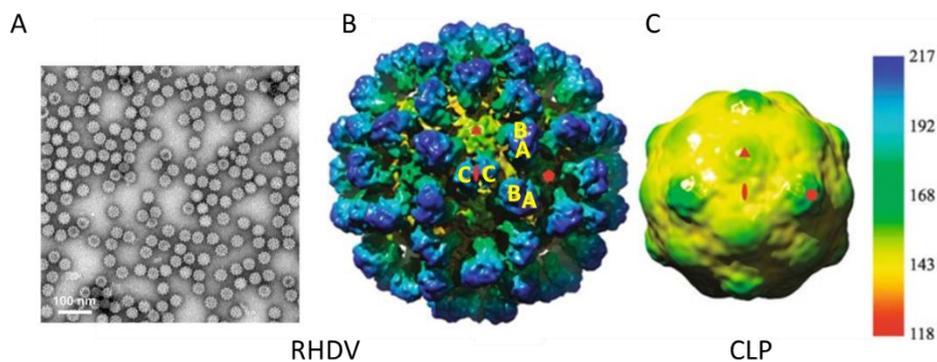
Dans le genre *Lagovirus*, il existe des souches qui ne peuvent pas être classées avec la nouvelle proposition de taxonomie. Les raisons pour lesquelles ces souches sont non-classées sont soit une diversité génétique trop importante soit un nombre de représentants insuffisant pour créer un génogroupe, un génotype, ou un variant (Le Pendu et al., 2017). Les souches non-classées sont le Michigan Rabbit Calicivirus (MRCV) (Bergin et al., 2009), le Rabbit Calicivirus (RCV) (Capucci et al., 1996) et les virus HaCV (Cavadini et al., 2015a; Mahar et al., 2019).

Dans l'ensemble du document, nous garderons l'ancienne nomenclature pour parler des virus de manière générale. Pour désigner les génotypes et les variants, la proposition de nomenclature de Le Pendu et al. (2017) sera utilisée.

## II. Caractéristiques physico-chimiques et structurales des *Lagovirus*

### 1. Morphologie

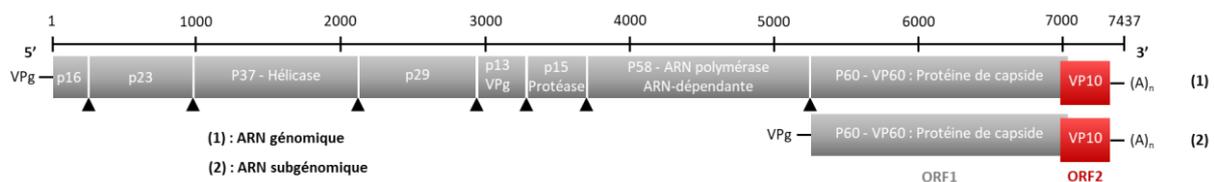
Les virus RHDV et RHDV2 sont les plus étudiés des lagovirus. Les premières observations en microscopie électronique ont montré que le RHDV est un virus non-enveloppé dont les particules virales ont environ 35 nm de diamètre (Figure 2A). La cryo-microscopie électronique révèle que la capsidie des virus RHDV a une forme icosaédrique, de symétrie T=3, formée de 180 molécules de la protéine de structure majeure (VP60) organisée en 90 dimères (Thouvenin et al., 1997). Ces capsomères une fois assemblés présentent à la surface des virions des dépressions en forme de calice, d'où le nom de la famille virale (Valíček et al., 1990). L'image reconstituée du RHDV obtenue en cryo-microscopie électronique est représentée en Figure 2B. Les RHDV existent aussi sous la forme de Core-Like Particles (CLP) qui sont retrouvées dans les fractions de virus purifiées à partir de la rate et/ou du foie des lapins infectés. Les CLP sont des structures de petites tailles, entre 23 et 32 nm, et sont dues à la dégradation des capsomères à la surface des virions. Cette dégradation donne un aspect lisse aux CLP observées en cryo-microscopie électronique (Figure 2C) (Hu et al., 2010). Des CLP ont aussi été observées pour l'EBHSV (Capucci et al., 1991).



**Figure 2.** Microscopie électronique et cryo-microscopie électronique du virion RHDV intact et d'une particule core-like (CLP). (A) Image de microscopie électronique en coloration négative de virus RHDV purifiés (barre d'échelle = 100 nm) (Wang et al., 2013). (B) et (C) Les cartes reconstituées du virion RHDV intact et d'une CLP de diamètre ~41 nm et ~32 nm, respectivement. Les axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2 sont indiqués par des symboles rouges. Les capsomères AB et CC sont étiquetés en jaune. La barre de couleur représente les différentes profondeurs, données par rapport au centre de la particule virale, avec quatre gradients de couleur allant du rouge (118 Å) au jaune (143 Å), au vert (168 Å), au cyan (192 Å) et au bleu (217 Å) (Hu et al., 2010).

## 2. Organisation génomique

Tous les lagovirus ont la même organisation génomique (Figure 3). Leur génome consiste en deux ARNs simples brins monocaténaire de polarité positive : l'ARN génomique d'environ 7.4kb et l'ARN subgénomique d'environ 2.2 kb, homologue avec le tiers 3' de l'ARN génomique. L'ARN génomique et l'ARN subgénomique sont polyadénylés à leur extrémité 3' et liés de manière covalente à une protéine virale, la Viral genome-linked Protein (VPg), à leur extrémité 5' (Parra and Prieto, 1990; Meyers et al., 1991a). L'ARN génomique et l'ARN subgénomique sont encapsidés dans des particules différentes (Meyers et al., 1991a). Chez les autres calicivirus, l'encapsidation de l'ARN génomique et subgénomique est peu décrite. La seule description concerne les FCV, où l'ARN subgénomique a été décrit dans des particules virales de faibles densités (Neill, 2002). L'organisation génomique des lagovirus se caractérise par la présence de deux cadres de lecture ouverts ou ORF (Open Reading Frame). L'ARN génomique possède un grand ORF 1 qui code pour une polyprotéine d'environ 2345 acides aminés (aa). L'ORF 2 recouvre partiellement la région 3' de l'ORF 1 sur environ 20 nucléotides (nts). Il est aussi présent sur l'ARN subgénomique. L'ORF 2 code la protéine mineure de capsid, VP10, d'environ 118 aa (Boga et al., 1992). Les ORFs de l'ARN génomique et de l'ARN subgénomique sont encadrés par deux régions non-codantes ou UTR (Untranslated Transcribed Region), une à l'extrémité 5' (5' UTR) du génome, d'environ 9 nts, et l'autre à l'extrémité 3' (3' UTR) du génome, en amont de la queue poly(A) et dont la taille peut varier entre 46 et 78 nts (Figure 3). Ces régions non-codantes forment des structures secondaires sur le génome viral. Il a été décrit que le 5' UTR était impliqué dans l'initiation de la traduction de l'ORF 1 tandis que le 3' UTR jouait un rôle dans la réplication virale des calicivirus chez les FCV et les MNV (Alhatlani et al., 2015).



**Figure 3.** Représentation schématique de l'ARN génomique et de l'ARN subgénomique du RHDV. La taille du génome en nucléotides est indiquée en haut du schéma. L'ORF1 est illustré en gris, l'ORF 2 est illustré en rouge. Les 5' et 3' UTR sont représentés par des traits noirs (d'après Parra and Prieto, 1990; Meyers et al., 1991).

### 3. Protéines virales

#### 3.1. Les protéines non-structurales

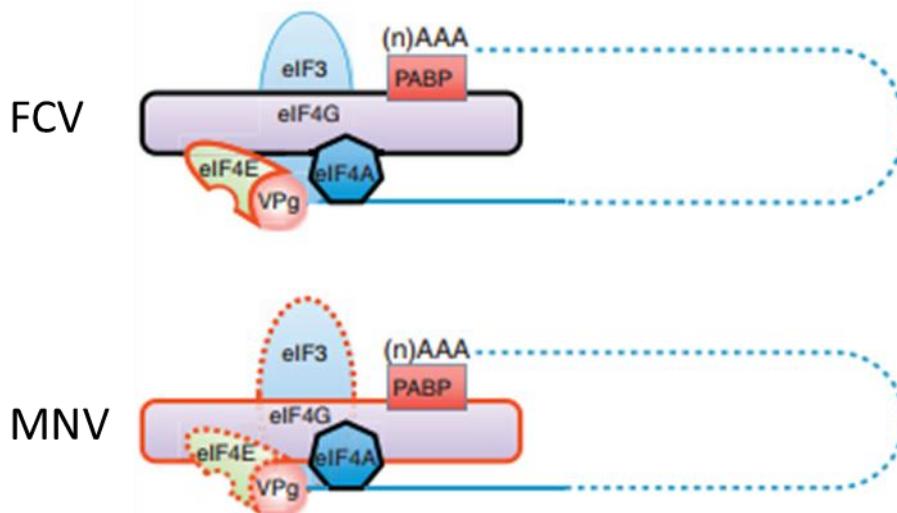
La traduction de l'ORF 1 de l'ARN génomique des lagovirus permet la production d'une polyprotéine, qui après plusieurs clivages protéolytiques par la protéase virale, libère sept protéines non-structurales et une protéine structurale. Les sept protéines non-structurales ont tout d'abord été nommées par leurs masses protéiques (exprimées en kDa). Ainsi on retrouve de l'extrémité 5' à 3' : la p16, la p23, la p37, la p29, la p15, la p13 et la p58 (Wirblich et al., 1995; Meyers et al., 2000). Parmi ces protéines non-structurales, la p16, la p23 et la p29 ont une fonction inconnue chez tous les lagovirus.

La protéine p37 a été identifiée comme une 2C-like hélicase du fait de sa forte homologie de séquence protéique avec la protéine 2C du Poliovirus, appartenant à la famille des hélicases, et grâce à trois motifs conservés (Marin et al., 2000) : le motif A (GxxGxGKS/T) impliqué dans la fixation des nucléotides triphosphates (NTP), le motif B (DD/E) qui joue le rôle de chélateur d'ion divalent (Cho et al., 1998) et le motif C (KxxxFxSxxxxxS/TTN) qui est impliqué dans l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) (Pfister and Wimmer, 1999). Le rôle de cette 2C-like hélicase dans la réplication virale des lagovirus n'a pas encore été démontré expérimentalement. Toutefois, chez les norovirus, la 2C-like hélicase serait liée au complexe viral de réplication et permettrait de déstabiliser les structures d'ARN double brin (Han et al., 2018; Li et al., 2018).

Le rôle de la protéine p15 a été rapidement supposé du fait de sa forte homologie de séquence protéique avec la protéase 3C des *Picornavirus* (Meyers et al., 1991b; Boniotti et al., 1994). La protéine p15 a été renommée 3C-like protéase après la confirmation expérimentale de son activité de protéase en *cis* et *trans*, et l'identification de sa triade catalytique (His27, Asp44, et Cys104). Le rôle de cette protéine est de cliver la polyprotéine lors de la traduction du génome viral (Wirblich et al., 1995; Martin Alonso et al., 1996). Les positions des sites de clivage mis en évidence chez les calicivirus sont conservées sur le génome des lagovirus. Cependant leurs séquences peuvent varier (Meyers et al., 2000). Plus récemment, il a été montré que la 3C-like protéase des lagovirus était impliquée dans l'apoptose des cellules RK13 (Rabbit Kidney 13, cellules rénales de lapin), HeLa et HepG2 (cellules cancéreuses humaines) *in vitro* en interagissant avec les caspases 3, 8 et 9 (acteurs majeurs de l'apoptose) après avoir exprimé la protéase dans ces cellules (Chen et al., 2019).

La petite protéine p13 est attachée de manière covalente aux extrémités 5' du génome viral et de l'ARN subgénomique. Cette particularité lui a valu le nom de Viral genome-linked Protein ou VPg (Meyers et al., 1991a). Cette protéine a de nombreuses fonctions. D'une part, la VPg du RHDV a été décrite comme essentielle à l'initiation de la traduction, grâce à son interaction avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Eukaryotic initiation factor 4 E) dans le cytoplasme des cellules (Zhu

et al., 2015). Cette fonction a aussi été décrite chez les FCV et MNV (Goodfellow et al., 2005). La suite du mécanisme induisant l'initiation de la traduction de l'ARN viral n'a pas encore été totalement démontrée, mais des modèles ont été proposés pour les virus FCV et MNV. L'interaction de la VPg avec eIF4E permettrait le recrutement du reste du complexe de l'initiation de la traduction eIF4F composé de eIF43, eIF4A et eIF4G. Une fois le complexe attaché à la VPg, le domaine de liaison à la queue polyA de eIF4G, PABP (Poly(A)-binding protein) pourrait se lier à la queue polyA du génome viral et pourrait permettre le recrutement des sous-unités ribosomales pour initier la traduction des protéines virales (Figure 4) (Goodfellow, 2011).



**Figure 4.** Modèles du mécanisme d'initiation de la traduction basés sur des données publiées et non publiées pour le calicivirus félin (FCV) et le norovirus murin (MNV). Les facteurs d'initiation de la traduction qui interagissent directement avec la Viral genome-linked Protein (VPg) et jouent un rôle fonctionnel dans la synthèse des protéines virales sont mis en évidence par une ligne rouge continue, tandis que ceux qui se lient directement la VPg mais dont la fonction dans la synthèse des protéines virales reste à être déterminée sont mis en évidence par une ligne rouge en pointillés. Les facteurs qui n'interagissent pas directement avec la VPg ou pour lesquels il n'existe pas de données, mais qui sont importants pour l'initiation de la traduction sont affichés avec une ligne noire continue. L'interaction de la protéine de liaison à la queue poly A (PABP) avec la queue poly A (30A) est déduite de la littérature publiée sur d'autres virus à ARN positif sachant qu'une queue poly A est présente à l'extrémité 3' du génome des calicivirus (Goodfellow, 2011).

D'autre part, lors de la réplication virale, la polymérase virale va interagir avec la VPg pour ajouter un résidu uracyl sur sa tyrosine 21 et va lier la VPg au génome viral (Machin et al., 2001; Goodfellow, 2011). Enfin, un motif conservé KGKxKxGRG a été identifié sur l'extrémité N-terminale de la VPg chez les norovirus, les sapovirus et les RHDV. Grâce à ce motif, la VPg du MNV est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire au stade G0/G1 dans les macrophages murins (McSweeney et al., 2019).

La dernière protéine non-structurale est la protéine p58. Cette protéine a rapidement été identifiée comme étant une ARN polymérase ARN dépendante (RNA-Dependent RNA Polymerase ou RdRp) sur la base de l'homologie de séquence existant avec la RdRp des picornavirus (Meyers et al., 1991b). La fonction de la RdRp est de synthétiser l'ARN viral lors de la réplication du virus. Son rôle d'ARN polymérase a été confirmé par des essais de transcription *in vitro* réalisés en utilisant la RdRp de virus RHDV après expression dans *Escherichia coli* (*E. coli*) (Vazquez et al., 1998). La RdRp existe sous deux formes chez les RHDV :

- Une forme précurseur : où la RdRp est liée à la 3C-like protéase
- Une forme mature : où la polymérase est seule

Ces deux formes sont retrouvées dans les cellules infectées par le virus et sont toutes deux actives (Konig et al., 1998). La forme précurseur est impliquée dans les stades précoces de la réplication. En effet, elle est 13 fois plus active que la forme mature pour initier l'uridylation de la VPg. La forme mature est quant à elle impliquée dans l'étape de la réplication virale en catalysant l'élongation des ARNs viraux néo synthétisés (Machin et al., 2009). L'expression de RdRP recombinantes de virus RHDV et RCV-A1 dans des cellules RK13 induit un réarrangement de la membrane de l'appareil de Golgi (Urakova et al., 2017). Cet effet de la RdRp n'est retrouvé que chez les virus RHDV et RCV-A1 et n'a pour le moment aucune fonction connue.

L'ensemble des fonctions des protéines non-structurales est résumé dans le Tableau 1 ci-contre.

**Tableau 1.** Bilan des fonctions des protéines non-structurales des Calicivirus

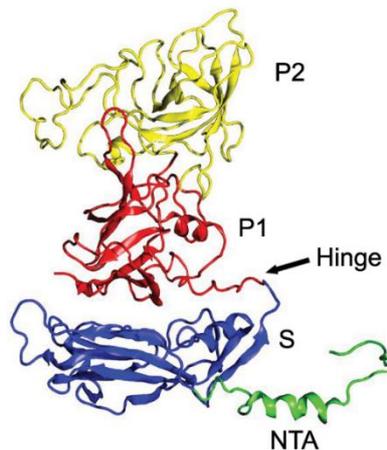
Nom de la protéine	Rôle de la protéine	Référence
<b>p37 - Hélicase</b>	Rôle inconnu pour les lagovirus	Abrantes et al., 2012
	Déstabilise les structures secondaires de l'ARN viral chez les Norovirus	Han et al., 2018; Li et al., 2018
<b>p15 - 3C-like protéase</b>	Cliver la polyprotéine lors de la réplication virale	Wirblich et al., 1995; Martin Alonso et al., 1996
	Joue un rôle dans l'apoptose cellulaire	Chen et al., 2019
<b>p13 - VPg</b>	Initie la traduction virale	Zhu et al., 2015; Goodfellow et al., 2005
	Chez les MNV : induit l'arrêt du cycle cellulaire au stage G0/G1	McSweeney et al., 2019
<b>p58 - RdRp</b>	Synthèse de l'ARN polymérase	Vazquez et al., 1998
	Initie la nucléotidylation de la VPg	Machin et al., 2009
	Réarrangement de l'appareil de Golgi	Urakova et al., 2017

### 3.2. Les protéines structurales

La p60, aussi appelée VP60, est une protéine de 60 kDa codée à la fois par l'ARN génomique et l'ARN subgénomique. La VP60 a deux fonctions, la première est de protéger physiquement le génome viral de l'environnement, et la seconde est d'interagir avec les cellules de l'hôte pour initier l'infection virale.

La VP60 est capable de s'auto-assembler pour former la capsid des lagovirus (Laurent et al., 1994). Ainsi, 90 dimères de VP60 sont nécessaires pour former une capsid complète (Thouvenin et al., 1997). La capsid est la cible principale de la réponse immunitaire humorale. Il a été proposé que la présence de CLP dans les foies de lapins infectés par le RHDV serait la conséquence de la dégradation des particules infectieuses par le système immunitaire de l'hôte (Lavazza and Capucci, 2008).

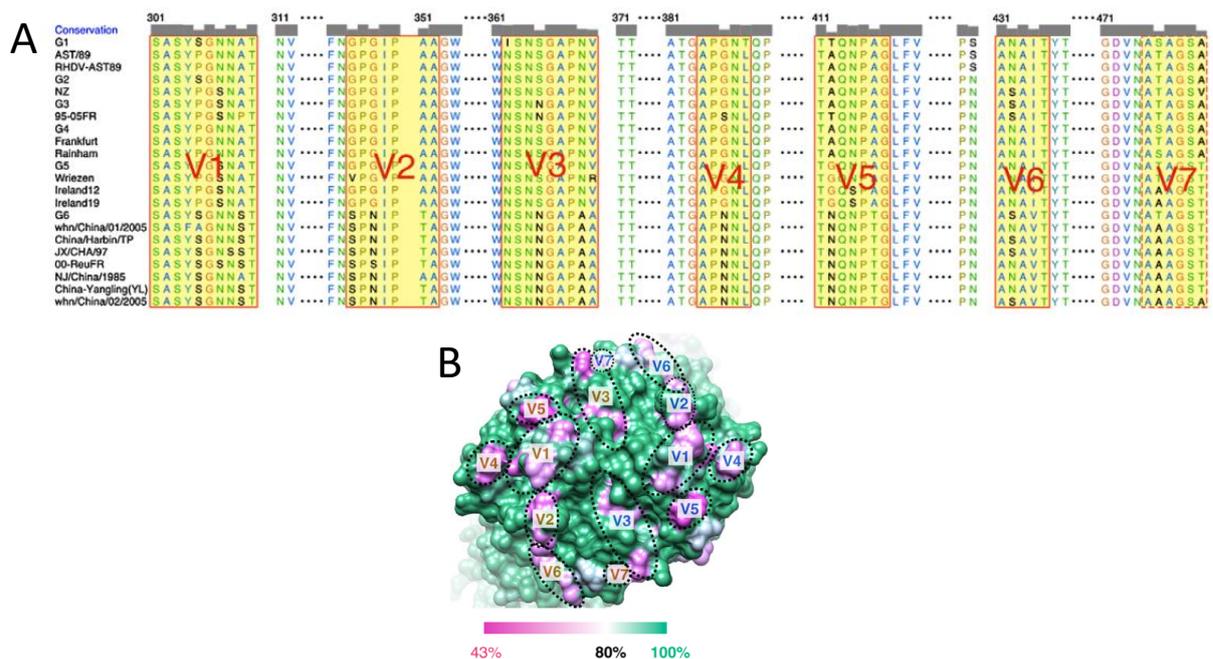
La protéine VP60 est composée du bras N-terminal (NTA, aa 1–65), du domaine S (Shell, aa 66–229), du domaine P (Protrusion, aa 238–579) et d'une courte charnière (Hinge, aa 230–237) qui permet de connecter les domaines S et P. Une fois les dimères assemblés, le domaine S constitue la paroi de la capsid et le domaine P produit les projections en forme de calice retrouvées à la surface des particules virales. Le domaine P est composé de deux sous-unités : la sous-unité P1, liée au domaine S par la charnière, présente la sous-unité P2 à la surface de la particule virale (Figure 5).



**Figure 5.** Représentation en ruban tridimensionnel de la protéine de capsid VP60 de FCV : la partie NTA est illustrée en vert, le domaine S en bleu, et les domaines P1 et P2 sont en rouge et jaune respectivement (Ossiboff et al., 2010).

La sous-unité P2 présente une grande variabilité génétique. Sept régions hypervariables, V1 à V7, ont été dernièrement identifiées sur ce domaine. Ces régions correspondent à des boucles flexibles exposées qui forment des sites de fixation aux antigènes tissulaires de groupe sanguin (Histo Blood Group Antigens, HBGA) (Figure 6) (Wang et al., 2013).

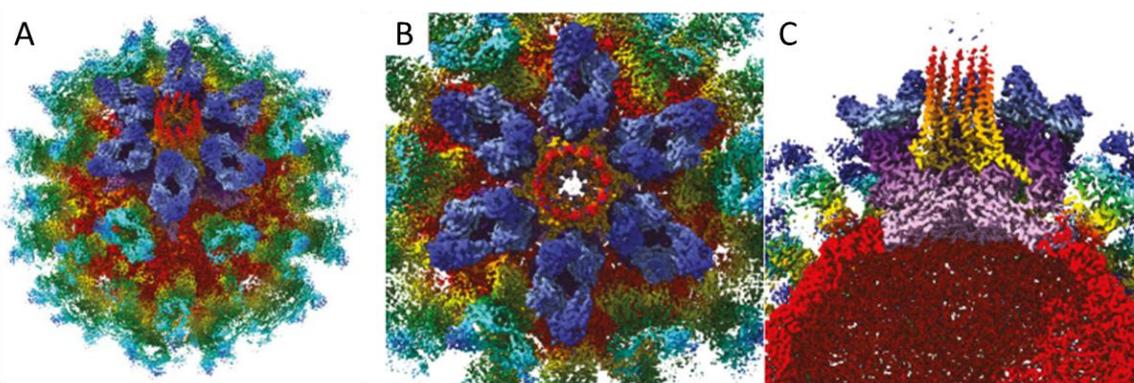
Les HBGAs sont exprimés, entre autres, à la surface des cellules épithéliales du duodénum et de la trachée des lapins. Ces deux tissus sont décrits comme étant les voies d'entrée pour le virus (Ruvoen-Clouet et al., 2000).



**Figure 6.** Description des sept régions hypervariables de la protéine de capsid VP60. (A) Alignement de séquences de gène VP60 de virus RHDV (variants G1.1a-d). Seule la région de la sous-unité P2 pour les résidus de 301 à 480 est illustrée. Les numéros d'accèsion GenBank des souches analysées sont : JF438967 (G1), Z24757 (AST/89), Z49271 (RHDV-AST89), FR823355 (G2), AF231353 (NZ), FR823354 (G3), AJ535092 (95-05FR), AJ535094 (G4), Y15424 (Francfort), AJ006019 (Rainham), AM085133 (G5), Y15427 (Wriezen), AY926883 (Irlande12), AY928269 (Irlande19), AJ969628 (G6), DQ069280 (whn/China/01/01/2005), AF453761 (Chine/Harbin/TP), DQ205345 (JX/CHA/97), AJ303106 (00-ReuFR), AY269825 (NJ/Chine/1985), DQ530363 (China-Yingling(YL)) et DQ069281 (whn/China/02/2005). Les sept régions hypervariables (V1-V7) sont surlignées en jaune. (B) Emplacement des régions hypervariables à la surface des sous-domaines P2 des dimères de VP60. Les régions les plus conservées sont illustrées en vert tandis que les plus variables sont illustrées en violet. Les sept régions hypervariables dans chaque sous-unité P2 sont indiquées par des ellipses noires en pointillés et sont marquées en or dans un monomère et en bleu dans l'autre (Wang et al., 2013).

La VP10 est la seule protéine codée par l'ORF2. De petite taille (environ 118 aa chez les lagovirus), elle est retrouvée chez tous les calicivirus. La VP10 n'a pas de fonction précise connue chez les lagovirus. Le virus RHDV reste infectieux en absence de VP10 (Liu et al., 2008a) contrairement au

FCV (Sosnovtsev et al., 2005). Il semblerait que la VP10 induise l'apoptose des cellules infectées par le RHDV, et qu'elle soit impliquée dans la régulation négative de l'expression de la protéine VP60 (Liu et al., 2008a; Chen et al., 2009). Ce dernier rôle est contradictoire avec celui de la VP10 des HuNoV qui semble au contraire augmenter l'expression de la protéine VP60, et stabiliser celle-ci (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Plus récemment, il a été montré que la VP2 des FCV, protéine homologue à la VP10 des lagovirus, était capable de créer un pore à la surface de la capsid lorsque la VP1, protéine homologue de la VP60 des lagovirus, se lie à son récepteur cellulaire fJAM-A. La fixation du virus FCV au récepteur fJAM-A participe à l'internalisation de la particule virale par endocytose, déclenchée par la perturbation d'homodimères fJAM-A. L'enveloppement du virion dans l'endosome entraîne une liaison supplémentaire des molécules de fJAM-A, ce qui déclenche des changements de conformation de la capsid entraînant la formation d'un pore constitué de six dimères de VP2. Les terminaisons N-hydrophobes de la VP10 s'insèrent dans la membrane endosomale et forment un canal à travers lequel le génome peut être libéré (Figure 7) (Conley et al., 2019).



**Figure 7.** Reconstruction du portail VP2, protéine homologue à la VP10 des lagovirus, créé par le FCV suite à sa fixation au récepteur fJAM-A après observation en cryo-microscopie électronique. (A) Structure en trois dimensions du portail VP2 à la surface de la capsid virale. (B) Portail en vue du dessus. (C) Plan de coupe perpendiculaire à l'axe du portail. Dans A-C, la capsid est colorée pour mettre en évidence les différents composants : VP2 est de couleur orange et rouge, les dimères VP1 disposés autour du sommet du portail sont de couleur violette et les molécules fJAM-A associées sont de couleur bleue (Conley et al., 2019).

L'ensemble des fonctions des protéines structurales est résumé dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Bilan des fonctions des protéines structurales des Calicivirus

Nom de la protéine	Rôle de la protéine	Référence
p60 - VP60	Protection de l'ARN viral	Lavazza and Capucci, 2008
	Fixation au HBGA	Lopes et al., 2018
VP10	Joue un rôle dans l'apoptose des cellules	Liu et al., 2008
	Régulation négative de l'expression de la protéine VP60	Chen et al., 2009
	Chez les FCV, relargage de l'ARN génomique dans la cellule hôte	Conley et al., 2019

#### 4. Propriétés physico-chimiques

Le virus extrait et purifié à partir de foies de lapins infectés par le RHDV, présente une densité en gradient de chlorure de césium (CsCl) entre 1,32 et 1,36 g/cm<sup>3</sup> (Liebermann et al., 1992). La densité 1,31 g/cm<sup>3</sup> représente un virion qui ne contient pas de matériel génomique tandis que la densité 1,36 g/cm<sup>3</sup> représente les particules infectieuses, qui contiennent le matériel génétique du virus. Ces densités varient légèrement dans la littérature. La centrifugation en gradient de sucrose permet la visualisation de trois bandes ayant un coefficient de sédimentation de 100S, 136S et 175S. Des bandes de densité et de coefficient de sédimentation similaires à ceux du RHDV ont été retrouvées pour l'EBHSV et les autres calicivirus. Cette hétérogénéité dans les coefficients de sédimentation correspond à une incorporation ou non du matériel génétique des particules virales, qui peut survenir lors de différentes conditions de stockage ou à différentes valeurs de pH (Ohlinger et al., 1990). Un stock viral fraîchement préparé est capable d'absorber les ultraviolets (UV) à une longueur d'onde de 260 nm. Le ratio A260/A280 a une valeur de 1,44 quand le virus infectieux est présent (Parra and Prieto 1990).

#### 5. Résistance aux agents physico-chimiques

Bien que le RHDV soit résistant à l'éther, au chloroforme, à la trypsine, à une exposition à un pH 3,0 pendant 30 min ou à un chauffage à 50°C pendant 1 heure (Xu and Chen, 1989; Lavazza and Capucci, 2016), il est toutefois sensible à quelques méthodes de désinfection. En effet, le RHDV est inactivé suite à une exposition avec de l'eau de Javel 10% ou tout agent permettant d'augmenter le pH jusqu'à 12. Plus généralement, les calicivirus en solution sont sensibles à la chaleur (> 30 min à au moins 60°C), aux UV-C (40 mJ/cm<sup>2</sup>) et aux UV-B (60 mJ/cm<sup>2</sup>), aux hautes pressions (≥200 MPa pendant au moins 5 min à 4 °C), au formaldéhyde et au chlore libre (Nims and Plavsic, 2013). Sur les surfaces inertes, les calicivirus sont sensibles au glutaraldéhyde, à l'acide hypochloreux, aux vapeurs de peroxyde d'hydrogène ou encore à l'ozone (Nims and Plavsic, 2013).

### III. Cycle viral

#### 1. Cellules cibles

##### 1.1. *In vitro*

Il est à ce jour impossible de cultiver les lagovirus sur culture cellulaire. Un cas de multiplication de virus RHDV a été publié sur des cellules Du and Ji Rabbit Kidney (DJRK) qui correspondent à des cellules épithéliales rénales primaires de lapin (Ji et al., 1991). Cependant cet essai de multiplication n'a jamais été reproduit par d'autres équipes. Plusieurs tentatives ont échoué sur différentes lignées cellulaires telle que les lignées RK (cellules rénales de lapin), PK-15 et IBRS-2 (cellules rénales de porc), MA 104 et Vero (cellules épithéliales de rein de singe vert africain), BHK-21 (fibroblaste rénal de bébé hamster), HeLa (cellules cancéreuses humaines).

La multiplication du RHDV sur œufs embryonnés de poule a aussi échoué (Mitro and Krauss, 1993). Un autre cas de multiplication virale a été montré sur lignée cellulaire RK13. Cette multiplication virale a été obtenue à partir d'un virus RHDV génétiquement modifié par génétique inverse. Un motif Arg-Gly-Asp a été introduit sur la région hypervariable V1 de la VP60 du virus mutant. Ce motif permet au virus mutant d'interagir avec le récepteur intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules RK13 et donc son internalisation (Zhu et al., 2017).

### 1.2. *In vivo*

Les lagovirus se multiplient donc uniquement chez leurs hôtes naturels. Très rapidement après leur caractérisation, des infections en condition expérimentale ont été réalisées avec succès pour les virus RHDV sur des lapins d'environ 2 kg (soit plus de 12 semaines d'âge) inoculés par voie intramusculaire ou intra-nasale (Smid et al., 1989), RHDV2 sur des lapins dès 30 jours d'âge inoculés par voie sous-cutanée ou intra-nasale (Dalton et al., 2012), RCV sur des lapins (âge non précisé) inoculés par voie oro-nasale ou infectés par contacts avec les lapins infectés (Capucci et al., 1996), RCV-E1 sur des lapins de 10 semaines dont l'un a été inoculé par voie oro-nasale et les autres infectés naturellement par contacts avec le lapin inoculé (Le Gall-Reculé et al., 2011), RCV-A1 sur des lapins de 13 semaines inoculés par voie orale (Strive et al., 2010) et RCV-E2 sur des lapins de 10 semaines inoculés par voie orale (Le Gall-Reculé G., comm. pers.). Il en a été de même pour l'EBHSV sur le lièvre européen (*Lepus europaeus*) (Nowotny et al., 1991). En ce qui concerne les virus HaCV, aucune donnée publiée n'a fait état d'une expérimentation en condition de laboratoire pour décrire la multiplication du virus chez son hôte.

Les cellules cibles des lagovirus sont peu décrites. Les hépatocytes sont les principales cibles des virus RHDV et RHDV2. Les virus sont retrouvés principalement dans le cytoplasme et plus rarement au niveau de la membrane cellulaire et dans le noyau des hépatocytes (Park and Itakura, 1992; Mikami et al., 1999; Ramiro-Ibanez et al., 1999; Neimanis et al., 2018a). Les autres cibles des virus RHDV et RHDV2 sont les macrophages du foie, appelés les cellules de Kupffer, et les macrophages de la rate, de la moelle osseuse et des poumons. Les virus RHDV ont aussi été retrouvés dans des monocytes intravasculaires et dans des macrophages tissulaires qui ont réintégré la circulation sanguine dans divers tissus (Neimanis et al., 2018a).

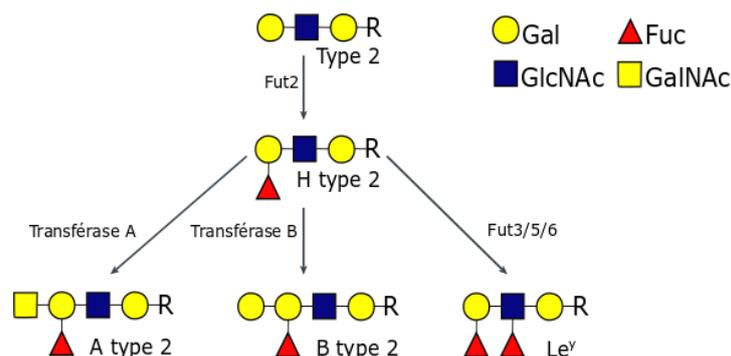
Les virus non-pathogènes RCV-E1 (GI.3) ciblent quant à eux l'intestin grêle au niveau du duodénum chez les lapins européens. Le virus infecte les cellules épithéliales et provoque des lésions sporadiques, légères à modérées, qui n'entraînent pas de signes cliniques dans un cadre expérimental (Aleksija Neimanis, comm. pers., 2019).

Aucune étude histologique n'a été publiée pour connaître précisément les cellules cibles des autres virus non-pathogènes du lapin mais comme pour le RCV, les ARNs du virus RCV-A1 (GI.4) ont été détectés dans la partie haute de l'intestin, majoritairement au niveau du duodénum, des premiers animaux sacrifiés suite à une infection expérimentale (3 ou 4 jours post-infection selon l'étude) (Capucci et al., 1996; Strive et al., 2010).

## 2. Les étapes du cycle viral

Le récepteur permettant l'internalisation des lagovirus dans les cellules cibles n'a pas encore été décrit. Les récepteurs chez les autres calicivirus sont les récepteurs fJAM-1 pour les FCV (Makino et al., 2006), les récepteurs murins CD300lf et CD300ld pour les MNV (Haga et al., 2016) et les acides sialiques pour les Tulane virus (Tan et al., 2015).

Toutefois, des ligands aux lagovirus ont été décrits. Les virus du génogroupe GI et les virus EBHSV (GII.1) sont capables de se fixer à certains Histo-Blood Group Antigen (HBGA) : l'antigène A type 2, B type 2 et H type 2, mais aussi à l'antigène de Lewis Le<sup>y</sup> (Ruvoen-Clouet et al., 2000; Nystrom et al., 2011; Lopes et al., 2018a). L'interaction avec les HBGA confère à ces lagovirus une activité hémagglutinante. Les HBGA et les antigènes de Lewis sont des oligosaccharides présents à la fin des chaînes de glycanes. La biosynthèse de ces antigènes se fait à partir d'un précurseur de type 2 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R, où R représente une O-glycoprotéine, une N-glycoprotéine, ou un glycolipide. Ce précurseur de type 2 est ensuite  $\alpha$ 4fucosylé à l'aide d'une  $\alpha$ 1,2fucosyltransférase (codée par le gène Fut2) pour donner l'antigène H type 2 (Figure 8) (Marionneau et al., 2001).



**Figure 8.** Schéma de la synthèse des ligands HBGA du lapin. (A) Schéma de la synthèse de H type 2, A type 2, B type 2 et Le<sup>y</sup>. L'enzyme A transférase est une  $\alpha$ 1,3N-acetylgalactosaminyltransférase qui ajoute un résidu GalNAc sur le dernier galactose de l'antigène H type 2, pour former l'antigène A type 2. L'enzyme B transférase est une  $\alpha$ 1,3galactosyltransférase qui ajoute un résidu galactose sur le dernier galactose de l'antigène H type 2, pour former l'antigène B type 2. Si le lapin exprime un des gènes Fut3, 5 ou 6, il pourra former l'antigène de Lewis Le<sup>y</sup>. Ces gènes codent une  $\alpha$ 1,4fucosyltransférase qui fixe un résidu fucose sur le dernier galactose de l'antigène H type 2. La présentation schématique des O-glycanes est basée sur la nomenclature utilisée dans le manuel Essentials of Glycobiology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908>) et adoptée par le Consortium for Functional Glycomics (<http://www.functionalglycomics.org>) (Nystrom et al., 2011).

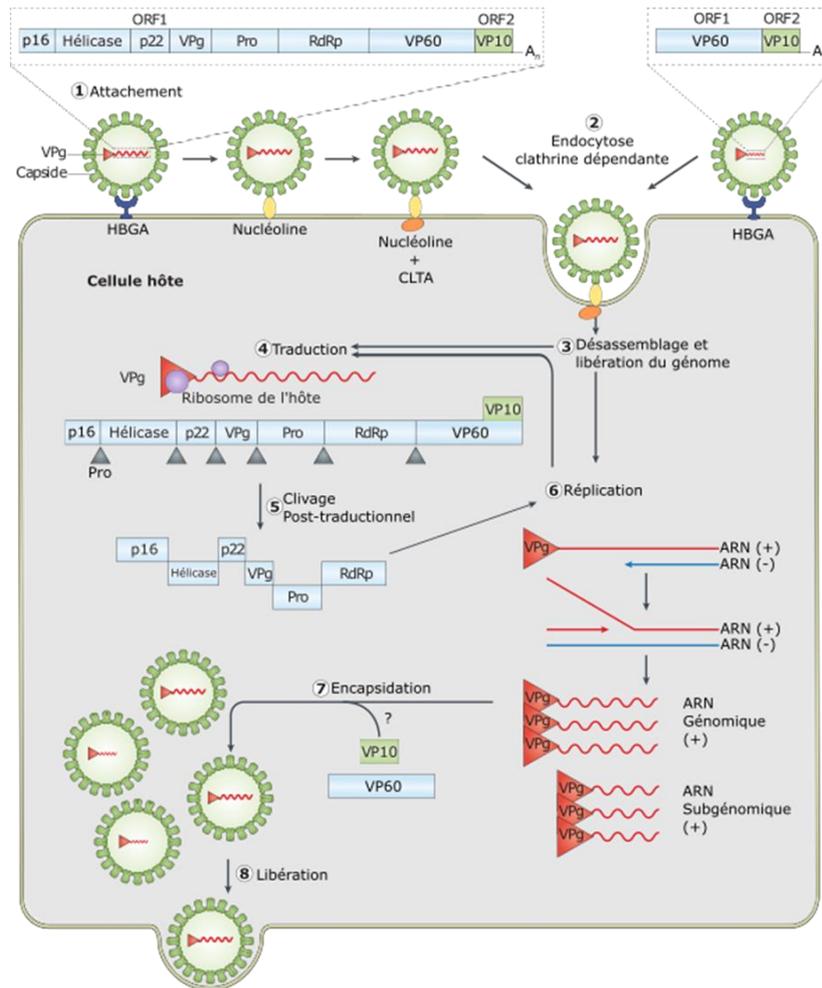
Le devenir de cet antigène H type 2 dépend ensuite du phénotype du lapin. Les lapins peuvent être classés en quatre phénotypes :

- A+B+ : lapin qui exprime les enzymes transférases A et B pour produire des antigènes A et B
- A+B- : lapin qui exprime l'enzyme transférase A uniquement pour produire des antigènes A
- A-B+ : lapin qui exprime l'enzyme transférase B uniquement pour produire des antigènes B
- A-B- : lapin qui n'exprime ni la transférase A, ni la B

Comme il a été dit précédemment (cf. 3.2 Les protéines structurales), les antigènes A, B et H sont retrouvés sur les cellules épithéliales des voies respiratoires, de la trachée et de l'épithélium intestinal des lapins, deux tissus décrits comme étant la voie d'entrée du virus (Marionneau et al., 2001). Les différents génotypes de lagovirus n'ont pas la même affinité pour les différents HBGA. Les HBGA sont décrits comme les ligands d'autres calicivirus tel que les Norwalk virus (Marionneau et al., 2002) et les Tulane virus (Farkas et al., 2010).

Le mécanisme d'entrée des lagovirus a été décrit grâce à un virus RHDV génétiquement modifié, possédant un motif RGD (cf. Cellules cible – *in vitro*). La liaison du domaine RGD au récepteur intégrine  $\alpha 3\beta 1$  va permettre de recruter la protéine nucléoline à la membrane cellulaire. La nucléoline va ensuite se lier au motif conservé DVN du domaine P1 de la protéine VP60 puis va recruter la chaîne légère A de la protéine clathrine. Cette interaction va permettre l'internalisation du virus modifié par endocytoses clathrine dépendante (Zhu et al., 2018) (Figure 9). Bien que la nucléoline a été décrite comme étant impliquée dans l'attachement et l'internalisation de nombreux virus comme par exemple l'enterovirus 71 (Su et al., 2015) ou certains virus Influenza aviaires tel que le H1N1, H3N2, H5N1 et H7N9 (Murayama et al., 2007; Melen et al., 2012; Chan et al., 2016; Kumar et al., 2016; Yan et al., 2017), aucune étude n'indique qu'en l'absence de ce motif RGD, l'internalisation du RHDV se déroule de cette manière.

Le mécanisme d'internalisation d'endocytose clathrine dépendant a aussi été décrit chez les FCV (Stuart and Brown, 2006). Une fois l'endosome dans le cytoplasme de la cellule hôte, le matériel génétique viral peut être libéré par la création d'un pore à la surface de la capsid (cf. 3.2 Les protéines structurales). La protéine VPg va alors interagir avec la machinerie traductionnelle de la cellule hôte eIF4F pour initier la traduction de l'ORF 1 et de la VP60 de l'ARN subgénomique (cf. 3.1 Les Protéines non-structurales) (Figure 9)



**Figure 9.** Représentation schématique du cycle viral des lagovirus. L'ARN génomique et l'ARN subgénomique sont composés de deux ORFs. Pour l'ARN génomique, l'ORF 1 est composé de six gènes codant les protéines non-structurales et le gène codant la protéine de capsid VP60. Pour l'ARN subgénomique, l'ORF 1 est composé du gène codant la VP60. L'ORF 2 est composé du gène codant la VP10, il est présent à la fois sur l'ARN génomique et l'ARN subgénomique. Le génome et subgénome viral sont des ARNs positifs (+) simples brins polyadénylés qui ont une protéine, la VPg, liée en 5'. L'ARN génomique et l'ARN subgénomiques sont encapsidés dans une capsid formée des protéines VP60 et VP10. La particule virale se fixe à la surface des cellules cibles telles que les hépatocytes par des interactions entre la VP60 et les antigènes tissulaires de groupe sanguin de la cellule hôte (HBGA) (étape 1). La capsid virale va ensuite se fixer à la protéine nucléoline. Cette interaction va permettre le recrutement de la chaîne légère de la clathrine A (CLTA) et l'internalisation par endocytose clathrine dépendante de la particule virale (étape 2 et 3). L'ARN (+) est ensuite traduit dans le cytoplasme de la cellule hôte. La traduction est médiée par les ribosomes de l'hôte qui sont recrutés par des facteurs cellulaires recrutés par la protéine virale non-structurale VPg (étape 4). La polyprotéine qui est codée par l'ORF 1 est clivée post-traductionnellement (étape 5) par la protéase codée par le virus (Pro) en protéines individuelles : la p16, l'hélicase, la p22, la VPg, la Protéase (Pro), l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), et la VP60. Au cours de la réplication du génome, l'ARN (+) est transcrit en ARN négatif (-), qui sert de modèle pour la synthèse de nouveaux ARNs génomiques (+) et des ARNs subgénomiques (+) (étape 6). Le mécanisme d'encapsidation des ARNs génomiques et subgénomiques dans des particules différentes n'est pas décrit dans la littérature mais la VP60 est capable de s'autoassembler pour former la capsid virale (étape 7). Les particules virales néosynthétisées sont ensuite relarguées par la cellule, là aussi par un mécanisme qui reste inconnu (étape 8) (D'après De Graaf et al. 2016 et Zhu et al. 2018).

La traduction de l'ORF 2 est quant à elle initiée par un mécanisme de réinitiation de la traduction à la fin de la traduction de l'ORF 1. Ce mécanisme appelé TURBS, pour termination upstream ribosomal binding site, est géré par trois motifs situés aux alentours du codon stop de l'ORF 1 et du codon AUG de l'ORF 2. Le motif 1, GUGGGA, est conservé chez tous les calicivirus. Les motifs 2 et 2\* n'ont pas de séquences conservées chez les calicivirus mais ont la particularité d'être deux séquences complémentaires. Ces deux motifs sont situés de part et d'autre du motif 1 et permettent d'exposer celui-ci en formant une structure secondaire de l'ARN. Le motif 1 exposé interagirait avec l'ARN 18s de la petite sous-unité ribosomale et permettrait, en fin de traduction de l'ORF 1, de rediriger le ribosome sur l'ORF 2 pour initier sa traduction (Wennesz et al., 2019).

La polyprotéine générée par la traduction de l'ORF 1 va ensuite être autoclivée par la protéase virale pour produire les protéines non-structurales matures et la VP60. Une fois produites, l'hélicase et la RdRp vont former un complexe de réplication viral. Ce complexe va permettre la réplication du génome viral et la transcription de l'ARN subgénomique *via* la synthèse d'un ARN de polarité négative, complémentaire à l'ARN du génome viral.

Cet ARN de polarité négative va servir de matrice à la fois pour la synthèse de nouveaux génomes viraux complets et la transcription des ARNs subgénomiques. Les nouveaux génomes viraux vont soit être traduits pour générer davantage de protéines virales, soit être encapsidés pour former de nouvelles particules infectieuses.

L'assemblage des particules virales est là aussi peu décrit dans la littérature. Un modèle d'assemblage en deux étapes des particules virales des FCV a cependant été proposé. La première étape consiste à l'auto-assemblage de protéines VP60 en plusieurs petites sous-unités qui passent par plusieurs stades de maturation pour former des structures stables. La seconde étape vise à assembler ces structures stables pour former la capsid virale tout en capturant l'ARN néo-synthétisé (Komolafe and Jarrett, 1986).

La dissémination des virions néo-synthétisés n'a pas encore été décrite. Toutefois, la propriété de la VP10 d'induire la mort cellulaire programmée par apoptose pourrait participer à cette dissémination (Jung et al., 2000; Liu et al., 2008a; Abrantes et al., 2012).

#### IV. Propriétés biologiques

##### 1. Hémagglutination

Les virus RHDV (GI.1), RHDV2 (GI.2), EBHSV (GII.1) ainsi que les capsides complètes vides, (appelées Virus-like particules, VLP) sont capables d'hémagglutiner les érythrocytes humains porteurs des antigènes A, B et O (Capucci et al., 1991; Ruvoen-Clouet et al., 2000; Le Gall-Recule et al., 2013).

Toutefois, quelques souches de RHDV sont non-hémagglutinantes ou montrent des capacités variables d'hémagglutination dans les conditions standards (Tian et al., 2007). Les érythrocytes humains peuvent exprimer les HGBA A, B et H à leur surface, qui sont des sites de fixation des lagovirus (Lopes et al., 2018a). Les érythrocytes de poulet, d'oie et de mouton sont agglutinés par le virus RHDV mais à des titres d'hémagglutination beaucoup plus faibles alors que les érythrocytes de vache, cochon, chèvre, canard, caille, lapin, cochon d'inde, rat et souris ne sont pas agglutinés à cause de l'absence de HBGA à leur surface (Capucci et al., 1991; Ruvoen-Clouet et al., 1995). Cependant les CLP, dépourvus de domaine P2 et donc de sites de fixation aux HBGA, n'ont pas de propriétés hémagglutinantes (Hu et al., 2010). La capacité d'hémagglutination du virus est liée à la stabilité du sous-domaine P2 de la protéine de capsid et plus précisément à la stabilité du site de fixation aux HBGA (Wang et al., 2013). La gamme de pH donnant le titre d'hémagglutination le plus élevé est comprise entre 4 et 7. L'hémagglutination des lagovirus n'est pas affectée par des températures allant de 4 à 37°C. Un traitement du virus à des températures allant de 50 à 56°C pendant respectivement 60 et 15 min diminue légèrement les capacités hémagglutinantes des virus.

Cependant, les cycles de congélations/décongélations répétés, l'utilisation de trypsine à 0,5%, de borohydrure de sodium à 2%, de chloramine T à 2% semblent être délétères (Capucci et al., 1991). Les propriétés hémagglutinantes des virus RHDV, RHDV2 et EBHSV sont utilisées dans des tests de laboratoire afin de diagnostiquer les animaux infectés par ces virus (cf. 7. Diagnostic).

## 2. Caractéristiques antigéniques

Les virus RHDV, RHDV2, et EBHSV ont des propriétés antigéniques distinctes (Capucci et al., 1991; Bárcena et al., 2015). Chez le RHDV, le variant GI.1a a des propriétés antigéniques très différentes des autres variants RHDV (Capucci et al., 1998). Les propriétés antigéniques des lagovirus dépendent de la VP60. Ainsi il a été montré que les VLP de virus RHDV et de RHDV2 ont les mêmes propriétés antigéniques que les virus infectieux (Nagesha et al., 1995; Bárcena et al., 2015). Capucci et al. (1995) ont identifié plusieurs anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre les virus RHDV et EBHSV. Ces AcM ont été classés en deux groupes :

- Le groupe 1 : comprenant les AcM 6G2, 5D1 et 5G3 qui reconnaissent des épitopes internes de la capsid
- Le groupe 2 : contenant les AcM 1H8, 3H2, 6H6 et 6F9 qui reconnaissent les épitopes exposés à la surface de la capsid.

Parmi ces AcM, seuls 1H8, 3H2 et 6H6 sont exclusifs au virus RHDV. De plus, 1H8 et 6F9 sont capables de protéger des lapins face à une infection par le RHDV et reconnaissent donc des épitopes neutralisants. Plus récemment, trois nouveaux épitopes ainsi que leurs sites de fixation ont été décrits (Bárcena et al., 2015) :

- 2E7 : qui se fixe à un épitope sur le domaine P1 (aa 549 – 579) des virus RHDV, RHDV2 et EBHSV
- 1G5 : qui se fixe à un épitope sur le domaine P2 (aa 326 – 333) des virus RHDV et RHDV2
- 1C9 : qui se fixe sur un épitope sur le domaine P2 (aa 305 – 310) des virus RHDV

Les virus RCV, RCV-E1 et RCV-A1 ont des propriétés antigéniques plus proches des virus RHDV que des virus EBHSV. Ces propriétés antigéniques ont permis de détecter des lapins infectés par ces virus à l'aide d'ELISA sérologiques RHDV qui se sont révélés positifs alors que les lapins n'avaient pas développé de RHD (Capucci et al., 1996; Strive et al., 2010; Le Gall-Recule et al., 2011).

Les virus HaCV sont des virus supposés non-pathogènes, ce phénotype n'ayant pas été confirmé en expérimentation animale. Ces virus ont été initialement détectés sur des lièvres sains d'un élevage en Italie. Le sang de 30 animaux a été collecté et les sérums ont été analysés avec deux ELISA : un ELISA spécifique des EBHSV et un ELISA détectant tout lagovirus. Quelques échantillons se sont révélés positifs en ELISA spécifique EBHSV (faibles titres) alors que la quasi-totalité des échantillons se sont révélés positifs en ELISA spécifique lagovirus (titres moyens). La présence de virus HaCV a ensuite été confirmée par RT-PCR (Cavadini et al., 2015b). Cette étude a montré que les virus HaCV ont un profil antigénique distinct des virus EBHSV.

### 3. Evolution génétique

Les lagovirus ont pratiquement tous le même taux de substitution/site/an au niveau du gène codant la protéine VP60 (Tableau 3). Ces taux de substitution/site/an sont dans la moyenne décrite pour les virus à ARN positif qui est estimée entre  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  substitution/site/an (Sanjuán et al., 2010).

**Tableau 3.** Intervalles du nombre de substitution/site/an 95% highest posterior density (HPD) décrits au niveau du gène codant la protéine de capsid VP60 de différents génotypes de lagovirus.

Génotypes	Intervalles du nombre de substitution/site/an (95% HPD)	Références
GI.1	$2.47 \times 10^{-3} - 3.08 \times 10^{-3}$	Eden et al., 2015
GI.2	$3.32 \times 10^{-4} - 4.58 \times 10^{-4}$	Silvério et al., 2018
GI.4	$4.6 \times 10^{-3} - 7.0 \times 10^{-3}$	Mahar et al., 2016
GII.1	$2,6 \times 10^{-3} - 3.6 \times 10^{-3}$	Lopes et al., 2014

Deux hypothèses sont évoquées dans la littérature pour expliquer l'origine de la pathogénicité chez les lagovirus (Esteves et al., 2015) :

- L'émergence du pouvoir pathogène à partir de souches non-pathogènes, par mutations ponctuelles ou recombinaisons homologues
- Le saut de la barrière d'espèce à partir d'une espèce sympatrique des léporidés

### 3.1. Evolution par mutations ponctuelles ou recombinaison homologue

Plusieurs éléments rendent la première hypothèse plausible. En effet, des anticorps dirigés contre le RHDV ont tout d'abord été retrouvés sur des lapins d'élevage ne présentant pas de signes cliniques de RHD, 12 ans avant la première détection de la maladie en 1984 en Chine (Rodak et al., 1990). Par la suite, des anticorps dirigés contre le RHDV ont été retrouvés sur des lapins sauvages sans symptômes récoltés en Australie et en Nouvelle Zélande antérieurement à l'introduction du RHDV dans ces pays (O'Keefe et al., 1999; Cooke et al., 2000; Robinson et al., 2002). Cette hypothèse a été ensuite confortée par la détection de différents virus non-pathogènes, capables de protéger partiellement, entièrement ou pas du tout les animaux contre le RHDV (Capucci et al., 1996; Strive et al., 2010; Le Gall-Recule et al., 2011). Les analyses d'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) du gène codant la VP60 ont montré que le virus non-pathogène RCV détecté en Italie (Capucci et al., 1996) ainsi que le premier virus non-pathogène RCV-A1 isolé en Australie (Strive et al., 2009) ont un ancêtre commun avec les virus RHDV datant de 1500-1850, soit bien avant la première détection de virus RHDV en 1984 (Kerr et al., 2009). En d'autres termes, cela signifie que des lagovirus circulaient dans les populations de lapins bien avant la première détection de RHDV et que ces virus étaient apparentés aux virus appartenant au groupe GI. Il est cependant peu probable que les virus RHDV proviennent d'une évolution des virus RCV-A1. En effet les analyses de tMRCA du gène codant la VP60 ont montré que les virus RCV-A1 avaient un ancêtre commun datant de l'introduction des lapins en Australie vers 1850, date qui est bien antérieure à la première détection du RHDV. Dans cette études, l'ancêtre commun le plus récent du gène codant la VP60 des virus RHDV, RCV et RCV-A1 est estimé entre 1462 et 1783. Cet intervalle, bien qu'important, est similaire de celui estimé précédemment (Jahnke et al., 2010).

L'analyse des séquences de génomes complets de variants GI.1d collectés à partir des années 2000 et de GI.2 a révélé que de nombreuses souches pathogènes étaient recombinantes avec des souches non-pathogènes (Ghislaine Le Gall-Reculé comm. pers., Silvério et al. 2018). Le point de recombinaison de ces souches a été localisé entre la polymérase virale et la protéine de capsid. Pour les variants GI.1d, les souches recombinantes identifiées ont des gènes codant des protéines non-

structurales très proches de ceux des virus non-pathogènes GI.3 (environ 95% d'identité nucléotidique) et des gènes codant les protéines structurales de virus pathogènes GI.1d (Ghislaine Le Gall-Reculé comm. pers.). Dans le cas des GI.2, certaines souches ont des gènes codant des protéines non-structurales très proches de ceux des virus non-pathogènes GI.4 et des gènes codant les protéines structurales de virus pathogènes GI.2. Ces événements de recombinaison sont des liens évolutifs directs entre les lagovirus pathogènes et non-pathogènes (Silvério et al. 2018).

Chez le lièvre, des anticorps contre l'EBHSV ont été retrouvés dans des sérums collectés en Grande Bretagne sur des lièvres européens sauvages et sans symptôme entre les années 1962 et 1971, soit bien avant la première détection d'EBHSV en 1980 en Suède. (Duff et al., 1997). Il est impossible de savoir si ces anticorps sont la conséquence d'une infection par un EBHSV, ou d'une infection par un lagovirus non-pathogène. Par ailleurs, l'analyse de prélèvements de lièvres tués à la chasse entre 1998 et 2000 en Argentine, pays dans lequel aucun foyer d'EBHS n'a été décrit, a montré la présence d'anticorps anti-EBHSV et d'antigènes EBHSV en ELISA ainsi que des particules virales de calicivirus en microscopie électronique (Frolich et al., 2003).

La principale limite de l'hypothèse suggérant que l'émergence du pouvoir pathogène se fasse à partir de souches non-pathogènes, par mutations ponctuelles ou recombinaisons homologues, est la distance génétique entre les souches pathogènes et les souches non-pathogènes caractérisées à ce jour. En effet, il y a en moyenne 20% de distance génétique au niveau du gène codant la VP60 entre ces deux types de souches. Cette distance génétique semble trop importante pour rendre l'hypothèse probable (Esteves et al., 2015).

### 3.2. Franchissement de la barrière d'espèce

La seconde hypothèse implique un saut d'espèce à partir d'espèces plus vraisemblablement sympatriques, ce qui maximise les chances d'exposition virale avec les léporidés européens (lapins et lièvres), qu'elles soient natives ou introduites par l'Homme. Le RHDV2 est pour le moment le seul lagovirus pour lequel le saut de barrière d'espèce a été démontré dans la faune sauvage. Initialement détecté chez le lapin *Oryctolagus cuniculus* en 2010 (Le Gall-Reculé et al., 2011), le RHDV2 a été détecté à partir de 2011 chez plusieurs espèces de lièvres *Lepus sp.* (Puggioni et al., 2013; Camarda et al., 2014; Hall et al., 2017; Le Gall-Reculé et al., 2017; Velarde et al., 2017; Neimanis et al., 2018b).

Du côté de l'EBHSV, il a été décrit que le virus pouvait en conditions expérimentales infecter par voie naturelle le lapin à queue blanche *Sylvilagus floridanus* (Lavazza et al., 2015a). Le fait que le RHDV2 et l'EBHSV puissent infecter plusieurs espèces de léporidés rend plausible l'hypothèse du saut de barrière d'espèce pour expliquer l'émergence de la pathogénicité des lagovirus (Domingo, 2010).

L'espèce *Sylvilagus floridanus* est suspectée comme étant l'espèce réservoir des lagovirus (Esteves et al., 2015; Lavazza et al., 2015a). Cette espèce est originaire de l'Amérique du nord et a été introduite sur le continent européen à plusieurs reprises à des fins cynégétiques : en France en 1953, dans le nord de l'Italie en 1966, en Espagne en 1980 et en Suisse en 1982 (Rosin et al., 2008). Ces différentes dates d'introduction sont très proches des années d'émergence des premières souches pathogènes EBHSV et RHDV en 1980 et 1984 respectivement. De plus il semblerait que les *S. floridanus* soient réfractaires à l'infection par le RHDV car ils ne développent pas de signes cliniques et ne séroconvertissent pas après inoculation par voie naturelle en conditions expérimentales (Gregg et al., 1991; Lavazza et al., 2015a). L'étude de Lavazza et al. (2015a) a aussi montré que sur 252 sérums provenant de *S. floridanus* collectés entre 1999-2000 en Italie où l'espèce s'est implantée par endroits, 14% étaient positifs en ELISA anti-RHDV (faibles titres). Les auteurs suggèrent que les faibles titres de ces ELISA seraient dû à la circulation de lagovirus non-pathogènes chez les *S. floridanus* (Lavazza et al., 2015a). Ces résultats ont récemment été complétés par l'étude de 267 sérums et 50 échantillons duodénaux, de foies et de rates, collectés sur des *S. floridanus* en Italie en 2015. Les sérums ont été analysés par cELISA EBHSV, RHDV ou EBHSV/RHDV. Les résultats montrent que 17,2% ont été détectés positifs avec de faibles titres (1/10 – 1/20) en cELISA EBHSV, 26.6% ont été détectés positifs avec de faibles titres (1/10 – 1/80) en cELISA RHDV, et 6,4% ont été détectés positifs avec de faibles titres en cELISA EBHSV/RHDV. Les prélèvements d'organes ont quant à eux été analysés en PCR avec des amorces reconnaissant tous les lagovirus, et aucun échantillon n'a été détecté positif (D' Angelo et al., 2019). Plusieurs hypothèses ont été faites par les auteurs pour expliquer ces résultats. La première est que les résultats positifs à faible titre sont en fait des faux positifs. D'après les auteurs, il est aussi envisageable que les prélèvements aient été prélevés longtemps après l'infection des animaux et que le signal détecté soit une chute d'anticorps post-infection. La dernière hypothèse rejoint celle décrite par Lavazza et al. (2015a) qui explique ces faibles intensités positives en cELISA par la circulation d'un lagovirus non-pathogène inconnu qui aurait des propriétés antigéniques proches de celles des lagovirus connus.

L'espèce de chauve-souris nord-américaine *Perimyotis subflavus* pourrait aussi être une espèce réservoir potentielle pour les lagovirus. En effet, un nouveau calicivirus BtCalV/A10 a récemment été détecté chez cette chauve-souris aux Etats-Unis (Kocher et al., 2018). Les résultats de cette étude indiquent qu'il est capable de se lier aux HBGA et qu'il aurait ainsi la capacité de surmonter l'obstacle de la transmission inter-espèce. Par ailleurs parmi les *Caliciviridae*, le gène codant la VP60 du RHDV possède le plus d'homologie de séquence avec celui du BtCalV/A10. Bien que ce virus soit très éloigné du RHDV (22% d'homologie de séquence nucléotidique), les auteurs suggèrent d'effectuer

des études complémentaires, notamment en Chine, pour savoir si d'autres calicivirus génétiquement proches du RHDV circulent chez les chauves-souris *Perimyotis subflavus*.

Aujourd'hui encore, l'espèce réservoir qui pourrait être à l'origine de l'émergence des lagovirus pathogènes chez les *Oryctolagus cuniculus* et les *Lepus sp.* est inconnue. Tant que cette espèce n'a pas été identifiée, il sera impossible de valider l'hypothèse du saut d'espèce comme origine de la pathogénicité des lagovirus.

## V. Maladies causées par les lagovirus

### 1. Espèces cibles

Les virus du génogroupe GI sont capables d'infecter l'espèce *Oryctolagus cuniculus* (Strive et al., 2009; Le Gall-Recule et al., 2011; Lavazza and Capucci, 2016). Le RHDV2 peut aussi infecter les lièvres *Lepus capensis* (Puggioni et al., 2013), *Lepus corsicanus* (Camarda et al., 2014), *Lepus europaeus* (Hall et al., 2017; Le Gall-Recule et al., 2017; Velarde et al., 2017) et *Lepus timidus* (Neimanis et al., 2018b). Les virus du génogroupe GII sont capables d'infecter les lièvres : *Lepus europaeus* (Gavier-Widen and Morner, 1991; Cavadini et al., 2015a; Droillard et al., 2018; Mahar et al., 2019). L'EBHSV peut aussi infecter les *Lepus timidus* (Gavier-Widen and Morner, 1991) ainsi que les lapins *Sylvilagus floridanus* en conditions expérimentales (Lavazza et al., 2015a).

### 2. Evolution clinique

Les symptômes de la maladie hémorragique du lapin (RHD), provoqués par le RHDV et le RHDV2, dépendent de l'évolution de la maladie contractée par les animaux. La RHD peut être suraiguë, aiguë, subaiguë ou chronique. En règle générale, la période d'incubation dure entre un et trois jours puis les animaux succombent entre 12 et 36 heures après un pic de fièvre (hyperthermie > 40°C) (Xu and Chen, 1989; Marcato et al., 1991) avec un taux de mortalité compris entre 40% et 90% (Lavazza and Capucci, 2016). Pour les premières souches RHDV2 collectées entre 2010 et 2011, l'évolution de la RHD est plus longue avec une période d'incubation de trois à cinq jours et une mortalité variable allant de cinq à 70% (Le Gall-Recule et al., 2013). Les souches RHDV2 plus récentes, collectées entre 2016 et 2017, semblent être plus virulentes que les souches RHDV2 de 2010-2011, avec une période d'incubation de 3 jours en moyenne et un taux de mortalité de 80% (Capucci et al., 2017; Neimanis et al., 2018a).

L'évolution clinique du syndrome du lièvre brun européen (EBHS), provoquée par l'EBHSV, est peu décrite du fait qu'il est difficile de faire des expérimentations animales sur lièvres en condition de laboratoire. L'EBHS semble avoir la même évolution clinique que la RHD, avec une période d'incubation de trois jours et un taux de mortalité pouvant atteindre 50% (Frölich and Lavazza, 2008).

### 2.1. Suraiguë

La forme suraiguë affecte les lapins et les lièvres très sensibles qui n'ont pas été infectés auparavant. Les animaux meurent soudainement sans aucun symptôme préalable. Les virus RHDV et RHDV2 sont capables de provoquer une forme suraiguë de RHD (Xu and Chen, 1989; Lavazza and Capucci, 2016).

### 2.2. Aiguë

La forme aiguë est la forme que l'on retrouve le plus souvent lors d'une épizootie. Les animaux infectés ont du mal à se déplacer, et souffrent d'anorexie dans les derniers stades de la maladie. Les principaux symptômes sont : l'apathie, la congestion de la conjonctive et des signes neurologiques comme un opisthotonos, une excitation, une paralysie ou de l'ataxie. La plupart des animaux ont une respiration rapide, la température du corps est souvent élevée jusqu'à 41°C, 12 à 36 heures avant la mort, puis tombe sous la normale en phase terminale. Certains des animaux meurent pendant des convulsions. D'autres deviennent frénétiques dans leurs cages et crient avant la mort. Tous les lagovirus pathogènes sont capables de provoquer ces manifestations cliniques (Xu and Chen, 1989; Gavier-Widen, 1994; Neimanis et al., 2018a).

### 2.3. Subaiguë

La forme subaiguë est retrouvée dans les derniers stades d'une épizootie liée au RHDV. Les symptômes sont les mêmes que dans la forme aiguë mais la plupart des lapins survivent à l'infection. Cette forme subaiguë est retrouvée plus fréquemment lors des épizooties liées aux EBHSV et aux premières souches RHDV2 collectées entre 2010 et 2011 du fait de leurs faibles taux de mortalité (Gavier-Widen, 1994; Le Gall-Recule et al., 2013; Lavazza and Capucci, 2016).

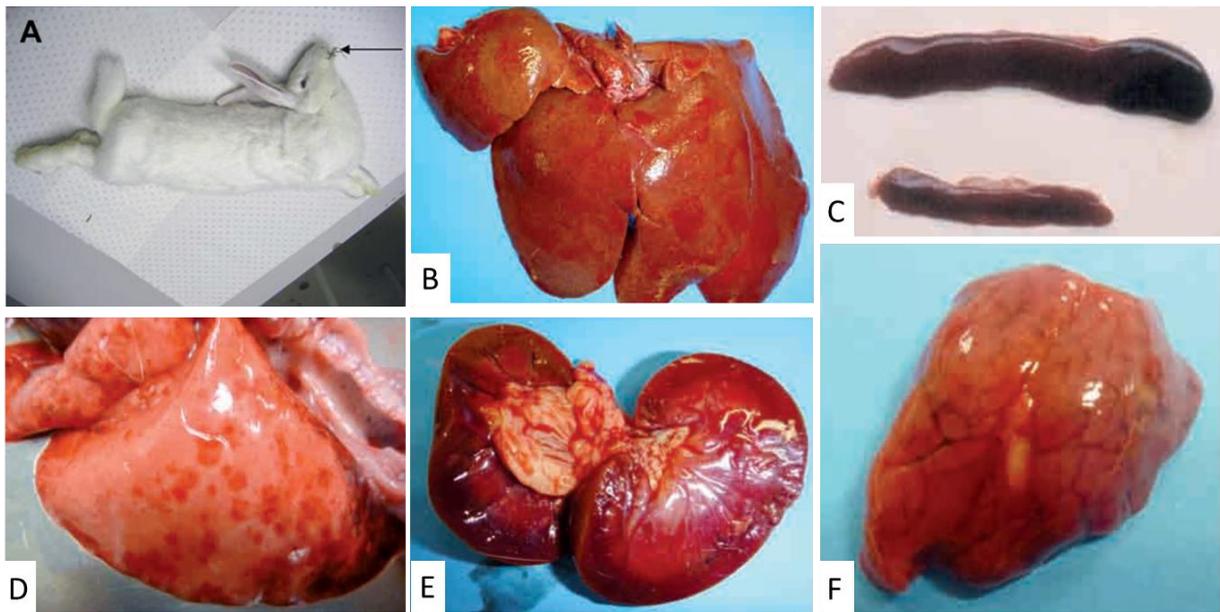
### 2.4. Chronique

La forme chronique de la maladie a été décrite durant des épizooties liées au RHDV et au RHDV2 sur un faible nombre de lapins. Les animaux présentent alors un ictère, sont léthargiques et anorexiques. Ils ne meurent pas et séroconvertissent (Capucci et al., 1991; Lavazza and Capucci, 2016). Cette forme plus chronique de la maladie a été associée à la présence de CLP (Capucci et al., 1991; Granzow et al., 1996).

### 3. Lésions macroscopiques et microscopiques

#### 3.1. Lésions provoquées par un lagovirus pathogène

Les animaux infectés par des lagovirus pathogènes montrent, après nécropsie, des lésions congestivo-hémorragiques au niveau du foie, des poumons, des reins, de la rate, du thymus et de la trachée, voire des intestins. Le foie se décolore, jaunit et augmente de volume. La rate, les ganglions et le thymus sont hypertrophiés et congestionnés. Les lésions macroscopiques caractéristiques de la RHD sont illustrées en Figure 10.



**Figure 10.** Lésions de la maladie hémorragique du lapin (RHD). (A) Lapin retrouvé mort de la RHD après des convulsions. La flèche indique de la nourriture dans la gueule du lapin (Kerr and Donnelly, 2013). (B-F) Lésions suite à une infection par le RHDV2 (Boucher et al., 2012b). (B) Foie jaunâtre et nécrosé. (C) Splénomégalie, la rate hypertrophiée est illustrée en haut, la rate normale est illustrée en bas. (D) Poumon qui présente des suffusions. (E) Reins hémorragiques et congestionnés. (F) Hypertrophie du thymus.

Au niveau histologique, le foie est marqué par des foyers de nécroses disséminés de petite taille. De nombreux hépatocytes et monocytes sont infectés par le virus. Au niveau des poumons, les macrophages alvéolaires sont majoritairement touchés. Pour la rate et les ganglions lymphatiques, là aussi les macrophages et les monocytes sont infectés (Ramiro-Ibanez et al., 1999). Les examens histologiques révèlent aussi un œdème, une nécrose du thymus et une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) sur le foie, le rein, et les poumons. L'ensemble de ses lésions peuvent être retrouvées chez des animaux infectés par le RHDV, le RHDV2, ou bien l'EBHSV (Gavier-Widen and Morner, 1991; Frölich and Lavazza, 2008; Dalton et al., 2018; Neimanis et al., 2018a).

Le Tableau 4 (Le Gall-Reculé and Boucher, 2017) correspond à la synthèse de l'ensemble des lésions macroscopiques et microscopiques produites par les virus RHDV et RHDV2.

Organe	Lésions
Foie	<b>Macroscopique</b> : hypertrophié, décoloré, jaunâtre <b>Microscopique</b> : altérations dégénératives des hépatocytes compatibles avec l'apoptose (vacuolisation extensive, altérations sévères de la structure mitochondriale, pycnose et lyse) activation des cellules de Kupffer, leucopénie. Le foie est remanié par des foyers de nécrose disséminés de petite taille. On remarque aussi des microthrombi intracapillaires en nombre variable
Trachée	<b>Macroscopique</b> : congestion et présence de sang en nature avec ou sans mucus dans la lumière de l'organe <b>Microscopique</b> : hyperhémie des muqueuses, hémorragies pétéchiales ou diffuses
Poumons	<b>Macroscopique</b> : congestion généralisée de l'organe avec zones hémorragiques <b>Microscopique</b> : hyperémie, œdème pulmonaire, hémorragies intra-alvéolaires et périvasculaires, parfois faible bronchiolite catarrhale, prolifération de lymphocytes
Reins	<b>Macroscopique</b> : hypertrophie, coloration rouge foncé, hémorragies dans les boucles glomérulaires et médullaire rénale <b>Microscopique</b> : hyperhémie, thrombi hyalin, tubulite dilatée, infiltration lymphocytaire, dégénérescence de l'épithélium tubulaire
Rate	<b>Macroscopique</b> : splénomégalie, coloration rouge foncé à violette. La rate est dite « en cigare » <b>Microscopique</b> : hyperémie, parfois caryorhémie au sein des follicules, hémosidérose, leucopénie
Thymus	<b>Macroscopique</b> : le thymus est hypertrophié et parsemé de pétéchies <b>Microscopique</b> : œdème, nécrose
Tube digestif	<b>Macroscopique</b> : il arrive qu'on puisse voir des suffusions et pétéchies sur certaines zones de l'intestin ou du colon.
Mamelle et cavité abdominale	<b>Macroscopique</b> : de petites quantités d'exsudats séreux, occasionnellement sanglants, parfois des hémorragies
Muscles	<b>Macroscopique</b> : peu ou pas de lésion, pétéchies sur le cœur parfois visibles <b>Microscopique</b> : anémie, pétéchies dans le muscle cardiaque, nécrose focale dans le myocarde, altération dégénérative, hémosidérose
Système nerveux central	<b>Macroscopique</b> : congestion des vaisseaux corticaux, vaisseaux dilatés dans la région de la pie-mère du cortex et du cervelet <b>Microscopique</b> : hyperhémie, petites hémorragies dans le cortex, parfois encéphalomyélite non purulente avec infiltration lymphocytaire
Graisse, peau	<b>Macroscopique</b> : la graisse et la peau accumulent les pigments biliaires et deviennent souvent jaunâtres <b>Microscopique</b> : pas de remaniements notables
Sang	<b>Macroscopique</b> : il coagule mal. On le dit « en gelée de groseille »

**Tableau 4.** Ensemble des lésions macroscopiques et microscopiques provoquées par les virus RHDV et RHDV2 chez l'*Oryctolagus cuniculus* (Le Gall-Reculé and Boucher, 2017)

### 3.2. Lésions provoquées par les lagovirus non-pathogènes

Les lagovirus non-pathogènes de lapin ne provoquent aucune lésion macroscopique chez leurs hôtes (Capucci et al., 1996; Strive et al., 2009; Le Gall-Recule et al., 2011; Cavadini et al., 2015b). Les lésions microscopiques n'ont pas été décrites dans la littérature mais la présence de génome viral a été détectée dans de nombreux organes après une infection par le RCV-A1 (Strive et al., 2010). Toutefois, des lésions microscopiques légères à modérées (nécrose et atténuation épithéliale, émoussement et fusion des villosités, prolifération accrue de l'épithélium dans les cryptes) ont été observées dans des cellules épithéliales de l'intestin grêle de lapins infectés expérimentalement par le RCV-E1 et sacrifiés à deux ou trois jours après l'infection (jpi), tandis qu'aucune lésion n'était détectée chez les lapins sacrifiés à neuf jpi (Aleksija Neimanis, comm. pers., 2019).

### 4. Pathogénie

Lors de l'infection virale, le RHDV et le RHDV2 induisent l'apoptose des cellules hépatiques et une splénomégalie (Park et al., 1995; Alonso et al., 1998). Des lésions du foie très proches de celles induites par le RHDV chez le lapin européen ont été décrites chez le lièvre européen infecté par l'EBHSV (Gavier-Widen and Morner, 1991). La nécrose hépatique va avoir pour conséquences la libération de facteurs qui activent la coagulation (Plassiart et al., 1992). Il s'installe alors une CIVD qui se traduit par l'apparition de pétéchies et suffusions, notamment sur les poumons, le cœur, les reins, parfois le colon. Le sang coagule lentement et se retrouve souvent dans la trachée des animaux infectés. C'est cette CIVD qui est en général à l'origine de la mort de l'animal (Ueda et al., 1992). Une leucopénie a été observée dans le foie et la rate des animaux infectés. Il semblerait que les lymphocytes B et T entrent en apoptose pendant l'infection virale (Marques et al., 2010). Toutefois, la présence de virus dans ces cellules n'a pas été démontrée et le mécanisme entraînant l'apoptose de ces cellules est à ce jour inconnu. La raréfaction des lymphocytes B et T dans le foie et la rate accompagne la maladie et se caractérise par une déficience de la réponse immunitaire (Marques et al., 2010) et une progression fatale de la maladie dans les deux à trois jours (Xu and Chen, 1989).

### 5. Réponse immunitaire à l'infection

Aucune donnée n'a été publiée sur la réponse immunitaire des lièvres à une infection par l'EBHSV. La réponse immunitaire à l'infection avec le RHDV est différente entre les lapins sensibles et résistants au virus. Chez les lapins sensibles, les neutrophiles sont les leucocytes majoritaires dans le foie des animaux infectés par voie intramusculaire en conditions expérimentales, 36 à 48 heures post-infection (hpi) Les neutrophiles ont été principalement observés en microscopie électronique proches des hépatocytes morts ou endommagés. Chez les lapins résistants, les lymphocytes sont les leucocytes majoritaires dans le foie des animaux infectés. Les lymphocytes ont été observés en microscopie

électronique à la surface des hépatocytes sains (Ferreira et al., 2005). Dans le foie des lapins, il a été décrit que la quantité de macrophages et de lymphocytes B et T augmentait à 48 hpi puis diminuait à sept jpi. Dans la rate, il a été décrit que seule la quantité de macrophages et de lymphocytes B augmentait à 48 hpi puis diminuait à sept jpi (Marques et al., 2012).

Les virus RHDV induisent une production d'anticorps spécifiques chez les lapins qui ont survécu à l'infection. Le développement de titres élevés en Immunoglobuline (Ig) de type IgM dès trois jours p.i. puis en IgA et en IgG est à l'origine d'une réponse immunitaire humorale efficace (Lavazza and Capucci, 2008). Les titres en IgM atteignent un maximum au bout de deux semaines puis diminuent rapidement. Les IgA sont présents un peu plus longtemps, puis disparaissent également. En revanche, les titres en IgG augmentent plus lentement et persistent plusieurs mois (Cooke et al., 2000). En cas de réexposition au virus, on observe une augmentation significativement supérieure des taux d'IgG et IgA. Par ailleurs, l'immunité contre le RHDV peut être transmise de la mère aux lapereaux par voie colostrale (Mitro and Krauss, 1993). En effet les lapereaux issus de mères dont le titre d'anticorps est faible apparaissent séronégatifs, tandis que les lapereaux issus de mères possédant un taux d'anticorps élevé sont séropositifs (Capucci et al., 1997).

En ce qui concerne les lagovirus non-pathogènes, les virus RCV et RCV-E1 ont été initialement détectés sur des lapins d'élevage sains séropositifs contre le RHDV à l'aide de tests ELISA. Les anticorps produits lors de l'inoculation de lapins séronégatifs avec le RCV ont été mis en évidence dès la seconde prise de sang du cinquième jour post inoculation (négatifs à trois jpi) (Capucci et al., 1996). De même pour le RCV-E1, l'expérimentation animale a permis de voir une séroconversion du lapin EOPS mis en contact avec trois lapins d'élevage séropositifs (titres faibles ou modérés) dès la première prise de sang au cinquième jour p.i. en utilisant un test ELISA VP60-RHDV (Le Gall-Recule et al., 2011).

Les virus RCV-A1 ont tout d'abord été détectés en Australie par PCR sur des lapins sauvages sains (Strive et al., 2009). Après avoir reproduit l'infection en expérimentation animale, il a été montré que les anticorps générés par l'infection pouvaient être là aussi détectés avec un ELISA de compétition dirigé contre le RHDV. Cet essai expérimental a aussi permis de voir une séroconversion des animaux au bout de la seconde prise de sang au septième jour post inoculation (négatifs à la première et à quatre jpi) avec la production d'IgM et d'IgA. Les IgM n'ont plus été détecté à partir de deux à trois semaines p.i. Les IgG ont quant à eux été détectés à partir du 11<sup>ème</sup> jpi (Strive et al., 2010). Alors qu'il n'existe aucune protection croisée entre le RHDV et l'EBHSV (Lavazza et al., 1996), ces différents lagovirus pathogènes induisent un degré variable d'immunité croisée vis-à-vis du RHDV. En effet, tandis que les anticorps produits lors d'une infection par le RCV permettent de protéger les animaux contre une infection expérimentale par le RHDV (1000 DL50 par voie intramusculaire), les anticorps

produits lors d'une infection par le RCV-E1 n'ont pas permis de protéger les animaux contre une infection expérimentale par le RHDV (Le Gall-Recule et al., 2011).

## 6. Epidémiologie descriptive et analytique

### 6.1. Historique et répartition géographique

#### 6.1.1. Lagovirus pathogènes

Le syndrome du lièvre brun européen a été détecté pour la première fois au début des années 1980 en Suède après l'observation de fortes mortalités dans les populations de lièvre (*Lepus europaeus* et *Lepus timidus*) (Gavier-Widen and Morner, 1991). La maladie n'a été associée au virus EBHSV qu'en 1988 après l'observation en microscopie électronique de particules virales dans le foie des lièvres infectés. Le virus s'est ensuite propagé rapidement au Danemark où le premier cas d'EBHS a été détecté en 1982 (Henriksen et al., 1989). Il a ensuite diffusé en 1986 en Italie (Poli et al., 1991), en Autriche, en Allemagne et en France (Morisse et al., 1991). Enfin le virus a été détecté en 1989 en Belgique (Nauwynck et al., 1993), en Grande Bretagne (Chasey and Duff, 1990) et à Malte (Morisse et al., 1991), en 1990 en Finlande (Salmela et al., 1993) et en 1997 en Suisse (Frolich et al., 2001).

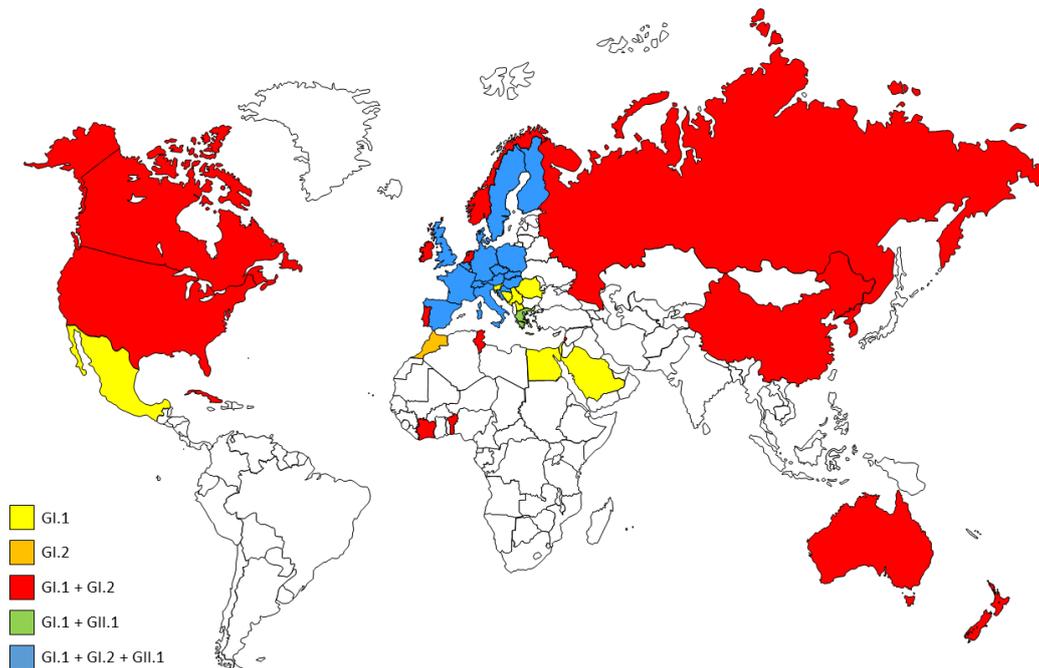
Le RHDV, a quant à lui été détecté pour la première fois en République Populaire de Chine dans la province du Jiangsu en 1984, apparemment chez des lapins Angora importés d'Allemagne. En moins de neuf mois, le virus tua 140 millions de lapins domestiques en Chine et se répandit sur plus de 50.000 km<sup>2</sup> (Liu et al., 1984). Le virus a ensuite diffusé en Corée (An et al., 1988), suite à l'importation de lapins chinois. L'Europe fut touchée par la maladie en 1986 dans le nord de l'Italie. Comme pour l'EBHSV, le RHDV a rapidement diffusé dans toute l'Europe. La Hongrie et la Tchécoslovaquie furent touchées en 1987, suivies par la France, l'Espagne, la Suisse, le Portugal en 1988.

Entre 1988 et 1989, le virus fut détecté au-delà du continent européen avec des cas décrit en URSS, au Mexique, au Liban et au nord de l'Afrique (Morisse et al., 1991). L'arrivée du RHDV en Australie et en Nouvelle Zélande est particulière. Le lapin a été déclaré comme espèce nuisible en 1995 par le gouvernement Australien et le RHDV a été étudié comme potentiel agent de biocontrôle de cette espèce. En mars 1995, le gouvernement Australien autorisa un essai expérimental en quarantaine, sur Wardang Island. Cette île est située à environ quatre kilomètres du continent Australien. Le 29 septembre 1995, des lapins morts d'une infection RHDV ont été retrouvés en dehors de la zone de quarantaine. Le premier cas sur le continent a été détecté le 12 octobre 1995, à 5 km à vol d'oiseau de la zone de quarantaine. Le virus a ensuite diffusé sur l'ensemble du continent. En octobre 1996, le gouvernement Australien autorisa la diffusion de lapins infectés dans la faune sauvage pour réguler les populations de lapin. En Nouvelle-Zélande, le premier cas de RHDV a été détecté dans une ferme en 1997. Peu de temps après cette première détection, le gouvernement a autorisé la

diffusion du virus sur l'ensemble du territoire pour, là aussi, réguler les populations de lapins dans ce pays (Cooke and Fenner, 2002).

Le virus RHDV2 a émergé chez les *Oryctolagus cuniculus* en France en 2010. Ce virus a été détecté après l'observation de cas cliniques de RHD rapportés en élevage chez des lapins vaccinés vis-à-vis du RHDV, ainsi que chez des lapins de garenne (Le Gall-Reculé et al., 2011). Par ailleurs lors d'une étude rétrospective, Westcott et Choudhury (2015) ont détecté le RHDV2 dans des échantillons de lapins récoltés en Grande Bretagne dès 2010. Comme les autres lagovirus pathogènes, le RHDV2 s'est propagé rapidement. En 2011, le virus est détecté en Espagne (Dalton et al., 2012), en Italie (Le Gall-Reculé et al., 2013) et en Sardaigne (Puggioni et al., 2013). Dans les années suivantes, des émergences sont observées au Portugal en 2012 (Abrantes et al., 2013), en Suède en 2013 (Neimanis et al., 2018c), dans les îles Canarie et dans l'archipel des Açores en 2014 (Duarte et al., 2015a), en Afrique et en Australie en 2015 (Lopes et al., 2018b; Rouco et al., 2019). Les dernières émergences datent de 2016 où le RHDV2 a été détecté à Madère (Carvalho et al., 2017), au Canada (Rouco et al., 2019) et aux Pays-Bas (Miao et al., 2019). Le RHDV2 a aujourd'hui remplacé les virus RHDV dans plusieurs pays (Le Gall-Reculé et al., 2013; Lopes et al., 2015a; Mahar et al., 2018).

La répartition des lagovirus pathogènes dans le monde est illustré en Figure 11.



**Figure 11.** Distribution des différents génotypes de lagovirus pathogènes dans le monde (d'après la carte de répartition du RHDV et du RHDV2 de l'OIE ([https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease\\_type\\_hidden=&disease\\_id\\_hidden=&selected\\_disease\\_name\\_hidden=&disease\\_type=0&disease\\_id\\_terrestrial=92&species\\_t=2&disease\\_id\\_aquatic=-999&species\\_a=0&serotype\\_id=452&sta\\_method=semesterly&selected\\_start\\_year=2019&selected\\_report\\_period=1&selected\\_start\\_month=1&date\\_submit=OK](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=92&species_t=2&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&serotype_id=452&sta_method=semesterly&selected_start_year=2019&selected_report_period=1&selected_start_month=1&date_submit=OK)).

### 6.1.2. Lagovirus non-pathogènes

L'épidémiologie moléculaire des lagovirus non-pathogènes est quant à elle beaucoup moins décrite que celle des lagovirus pathogènes. La circulation de lagovirus non-pathogènes a été suspectée avant l'émergence des lagovirus pathogènes et notamment en Australie et Nouvelle-Zélande avant l'introduction volontaire du RHDV (Rodak et al., 1990; O'Keefe et al., 1999; Cooke et al., 2000; Robinson et al., 2002). Toutefois, le premier lagovirus non-pathogène a été caractérisé sérologiquement et génétiquement en 1996 en Italie (Capucci et al., 1996). Ce lagovirus n'a été détecté qu'en Italie. Par la suite un autre virus non-pathogène, le GI.3/RCV-E1, a été caractérisé en France en 2006 (Le Gall-Recule et al., 2011). Une souche proche (nommée « Ashington ») avait été antérieurement caractérisée en Angleterre sur un lapin mort mais son phénotype non-pathogène n'avait pas été établi (Moss et al., 2002). Entre 2007 et 2009, les virus RCV-A1 et RCV-E2, faisant tous deux partie du génotype GI.4, ont été détectés en Australie et en France respectivement (Strive et al., 2009; Le Gall-Reculé et al., 2015; Le Pendu et al., 2017). Des virus RCV-E2 ont par ailleurs été récemment caractérisés en Suède (Aleksija Neimanis, comm. pers.). Les virus RCV-E2 et RCV-A1 sont suspectés de circuler au-delà des pays dans lesquels ils ont été détectés après la découverte de virus RHDV2 recombinant GI.4/GI.2 en Péninsule Ibérique (Lopes et al., 2015b; Silvério et al., 2018). Pour ce qui est des virus non-pathogènes chez le lièvre, leur existence avant la caractérisation des premiers cas d'EBHSV en 1980 en Suède a été suspectée par plusieurs auteurs après la détection d'anticorps contre l'EBHSV ou d'antigène EBHSV dans des populations de lièvres sains (cf. paragraphe 3.1. Evolution par mutations ponctuelles). La première détection de virus (potentiellement) non-pathogènes chez le lièvre a été faite en 2012 dans un élevage de lièvres sains en Italie (Cavadini et al., 2015b) sans que la non-pathogénicité ait été prouvée. D'autres virus HaCV ont été détectés depuis en France et en Australie (Droillard et al., 2018; Mahar et al., 2019).

## 6.2. Epidémiologie moléculaire des EBHSV et des RHDV

### 6.2.1. Epidémiologie moléculaire des EBHSV

Peu d'études existent sur l'épidémiologie moléculaire des EBHSV. La première étude entreprise à partir de virus collectés entre 1981 et 1994 dans huit pays européens a suggéré l'existence d'un seul groupe génétique (Nowotny et al., 1997) tandis que Chrobocinsk et al. (2001) ont montré que les cinq souches polonaises de 1992-1993 étaient génétiquement plus proches des EBHSV collectés en 1989 en France, Italie et Allemagne, que les trois souches collectées entre 1998 et 2001. Billinis et al. (2005) ont montré que les huit souches grecques collectées en 2002 formaient une seule lignée génétique avec la souche française de 1989. Une étude plus complète a été menée sur 169 EBHSV français prélevés entre 1989 et 2003 et un EBHSV grecque récolté en 2002. Elle a mis en

évidence l'existence de deux groupes génétiques distincts. Le groupe « G1 » rassemblait une partie des souches collectées sur tout le territoire français depuis 1989 (sous-groupes « G1.1 » et « G1.2 ») ainsi que toutes les souches originaires du nord de la France (sous-groupe « G1.3 »). Le groupe G2 était composé, en plus de la souche grecque, des souches originaires de la moitié sud de la France et récoltées plus récemment (1999-2003 ; réparties dans trois sous-groupes « G2.1 » à « G2.3 »). Cette étude a ainsi montré la persistance des souches EBHSV les plus anciennes et l'importance de la distribution géographique qui interagit avec la distribution temporelle des EBHSV en France (Le Gall-Recule et al., 2006). Une analyse phylogénique réalisée à partir des séquences entières du gène VP60 des souches de référence française, italienne et allemande de 1989, d'une souche italienne de 1992, de 54 EBHSV récoltés en Suède entre 1982 et 2008 et de 16 EBHSV récoltés en France entre 2001 et 2008, a montré que l'évolution des EBHSV s'est caractérisée par le remplacement total des souches suédoises les plus anciennes (1982-1989) regroupées au sein du groupe génétique « A », par le groupe génétique « B » rassemblant les souches suédoises les plus récentes avec les souches des autres pays européens depuis leur arrivée dans ces pays (1988-2008). Cet avantage sélectif, que les auteurs expliquent par un changement dans l'antigénicité des souches, aurait permis la dispersion et la persistance du groupe B (Lopes et al., 2014). Dans la proposition de nomenclature des EBHSV (génotype GII.1 ; Le Pendu et al. 2017), le variant GII.1a correspond aux EBHSV suédois du groupe génétique « A », tandis que les EBHSV du groupe génétique « B » se répartissent entre les variants GII.1b et GII.1c (comprenant respectivement des souches « G1.3 » et « G2 » ; Le Gall-Reculé et al., 2006) ainsi que des souches non classées (comprenant des souches « G1 » ; Le Gall-Reculé et al., 2006).

#### 6.2.2. Epidémiologie moléculaire des RHDV

Contrairement aux EBHSV, l'épidémiologie moléculaire des virus RHDV est bien documentée dans la littérature. Les premières souches détectées entre 1984 et 1989 en Asie puis ailleurs dans le monde appartiennent selon la nouvelle nomenclature proposée par Le Pendu et al. (2017) aux variants GI.1b et GI.1c. Les GI.1c/RHDV correspondent à la souche chinoise de 1984 et à des souches initialement récoltées dans plusieurs pays européens et au Mexique entre 1987 et 1989. Ce sont des souches GI.1c/RHDV d'origine tchèque qui ont été introduites en Australie et en Nouvelle Zélande en 1995 et en 1997 respectivement (Duarte et al., 2014) et qui ont par la suite évolué génétiquement dans ces pays (Kovaliski et al., 2014). Les GI.1b/RHDV ont été initialement caractérisés en Allemagne, Espagne et France en 1989. Alors qu'en France, les variants GI.1b/RHDV et GI.1c/RHDV ont co-circulé entre 1988 et 1989 avant d'être remplacés par le variant GI.1d/RHDV à partir de 1990 (rassemblant les groupes génétiques G3, G4 et G5 selon la dénomination utilisée dans Le Gall et al., 1998 et Le Gall-Reculé et al., 2003). Ces deux études françaises ont par ailleurs révélé une différence d'évolution génétique entre les virus RHDV et EBHSV dans ce pays, les virus RHDV se regroupant

phylogénétiquement plus en fonction de l'année de collecte qu'en fonction de leur localisation géographique. Ce schéma évolutif pour le RHDV a aussi été rapporté par Nowotny et al. (1997) en analysant les séquences de souches récoltées dans différents pays entre 1987 et 1995. Contrairement à ce qui s'est passé ailleurs en Europe, le variant RHDV GI.1b a circulé en Espagne et au Portugal jusqu'à l'arrivée du RHDV2 (Lopes et al., 2015a). Les souches GI.1b ont évolué génétiquement en Péninsule ibérique mais indépendamment des autres virus GI.1/RHDV. L'hypothèse proposée pour expliquer cette évolution indépendante serait que les Pyrénées aient servi de barrière physique entre les lapins de la péninsule Ibérique et les lapins français, limitant ainsi la circulation des lapins et des différents variants entre ces deux régions (Muller et al., 2009). Le seul endroit où le variant GI.1d a circulé majoritairement au Portugal est dans l'archipel des Açores (Duarte et al., 2014). Toutefois, des cas sporadiques de GI.1d/RHDV ont été détectés rétrospectivement au Portugal entre 1998 et 1999 (Lopes et al., 2017). Le variant GI.1a/RHDV a été initialement détecté en Chine en 1985 (Abrantes et al., 2012) puis entre 1995 et 1997 en Allemagne et en Italie où il a été dénommée « RHDVa » car correspondant au premier variant antigénique de RHDV décrit (Capucci et al., 1998; Schirmer et al., 1999; Grazioli et al., 2000).

Des épidémies indépendantes causées par des souches GI.1a ont été par la suite décrites en Europe et partout dans le monde, aux États-Unis, à Cuba, en Corée, au Japon, et à la Réunion (Le Gall-Reculé et al., 2003; Farnos et al., 2007; McIntosh et al., 2007; Tian et al., 2007; Yang et al., 2008). Alors qu'il est rarement détecté en France et en Péninsule ibérique dans la faune sauvage ou en élevage (Abrantes et al., 2014 ; Le Gall-Reculé et al., 2003 ; Ghislaine Le Gall-Reculé, comm. pers), il est fréquemment caractérisé dans les élevages de lapins de chair des autres pays et a même remplacé les souches RHDV initialement présentes en Asie, en Italie, en Pologne et aux USA (Lavazza et Capucci, 2008; McIntosh et al., 2007; Wang et al., 2012; Fitzner and Niedbalski, 2017).

### 6.3. Persistance dans le milieu extérieur

Les propriétés du RHDV lui permettent d'être résistant dans l'environnement. Il a été montré que le virus restait infectieux au moins 30 jours après avoir tué son hôte quand la carcasse était conservée à 22°C (McColl et al. 2002). De plus, le RHDV reste infectieux pendant 105 jours à 20°C sur du tissu, 225 jours à 4°C et deux jours à 60°C dans une suspension d'organe (Smid et al., 1991). Par ailleurs, il est resté infectieux 91 jours dans un foie de bovin dans lequel a été injecté du virus afin de mimer l'intérieur d'une carcasse de lapin, et maintenu à l'abri des UV à température ambiante (Henning et al., 2005). Cette résistance dans l'environnement favorise la transmission directe et indirecte du RHDV.

#### 6.4. Modalités de transmission

##### 6.4.1. Directe

Les voies d'entrée des Lagovirus sont l'appareil respiratoire supérieur, le tractus digestif et les lésions cutanées (Mitro and Krauss, 1993). Une fois l'hôte infecté, l'excrétion des particules virales passe par les sécrétions et par les excréments. La transmission des lagovirus peut se faire par contact direct et prolongé entre un animal infecté en période d'excrétion virale et un animal sensible (Ohlinger et al., 1993). Dans le cas de l'infection au RHDV, les lapereaux, étant résistants jusqu'à 8 semaines d'âge, peuvent servir de réservoir viral et peuvent donc jouer un rôle dans la propagation du virus (Matthaei et al., 2014).

##### 6.4.2. Indirecte

La résistance des lagovirus dans l'environnement leur permet d'être diffusé efficacement par transmission indirecte. La contamination indirecte peut avoir lieu par l'intermédiaire de l'eau ou de végétaux contaminés, de matériel d'élevage souillé ou encore par le biais de vecteurs ayant été en contact avec du matériel virulent.

Il a été décrit que les espèces carnivores, par l'intermédiaire de leurs déjections, ainsi que les oiseaux nécrophages, suite à l'ingestion de cadavres de lapins infectés, pouvaient disséminer du virus (Chasey, 1994; Frolich et al., 1998; Chiari et al., 2016; Di Profio et al., 2018). Les insectes tels que les puces, les mouches et les moustiques ont été décrits comme vecteurs mécaniques de la maladie en Australie (Asgari et al., 1998; Hall et al., 2019).

#### 6.5. Les facteurs de sensibilité

De nombreux paramètres liés à l'individu ou aux conditions environnementales semblent avoir une action sur la réceptivité et la sensibilité de l'hôte à l'infection virale. Cette partie va concerner les RHDV, RHDV2 et EBHSV en grande majorité, faute d'une description des facteurs de sensibilité des lagovirus non-pathogènes dans la littérature. Parmi ces facteurs de sensibilité on retrouve :

**Le sexe :** ce facteur de sensibilité a été étudié pour le RHDV uniquement et aucune différence de sensibilité n'a été mise en évidence entre les mâles et les femelles (Marchandeaun et al., 1998).

**L'âge :** les lapereaux âgés de zéro à quatre semaines sont résistants au RHDV. Cette résistance à la maladie diminue progressivement entre quatre et huit à neuf semaines, âge auquel les lapins deviennent tous sensibles (Morisse et al., 1991). Dans le cas du RHDV2, Dalton et al. (2014) ont rapporté la mort des lapereaux d'élevage de 11 jours d'âge et des infections expérimentales de lapereaux de 30 à 35 jours d'âge ont provoqué la mort d'une partie ou de la totalité d'entre eux selon

les souches virales inoculées (Dalton et al., 2012; Neimanis et al., 2018a). Il a été montré que pendant les périodes où les lapereaux sont résistants au RHDV, ils peuvent être infectés, séroconvertir, et propager le virus sans déclencher de signes cliniques (Matthaei et al., 2014). Pour ce qui est du RHDV2, les lapins deviennent sensibles à la maladie dès la troisième semaine d'âge (Lavazza and Capucci, 2016). Pendant longtemps les anticorps maternels ont été suspectés d'être à l'origine de la résistance des lapereaux contre le RHDV. En effet, des lapereaux ont présenté des anticorps IgG d'origine maternelle dont le titre diminuait au fur et à mesure du temps jusqu'à devenir nul à huit semaines d'âge, âge où les lapins deviennent sensibles (Cooke et al., 2000). Cependant des lapereaux ne présentant pas d'anticorps maternels se sont aussi révélés résistants au RHDV en expérimentation animale, montrant que les anticorps maternels n'étaient pas seuls à l'origine de cette résistance (Rodak et al., 1991). Les facteurs d'attachement HBGA ont ensuite été suspectés comme étant à l'origine de la résistance des lapereaux. En effet, au niveau des cellules épithéliales buccales, l'antigène O de type 2 apparaît à partir de la troisième semaine de vie et atteint son niveau maximal d'expression à la 10<sup>ème</sup> semaine. L'antigène A apparaît plus tard, à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine et atteint son expression maximale à la 12<sup>ème</sup> semaine (Ruvoen-Clouet et al., 2000).

Cependant, il a été montré que les HBGA pouvaient seulement induire une protection partielle contre le virus RHDV et que les hépatocytes n'exprimaient pas les HBGA (Nystrom et al., 2011). De plus il a été décrit que des lapereaux immunodéprimés infectés par le RHDV développaient des signes cliniques. Ce résultat montre que les HBGA ne sont pas à l'origine de la résistance des lapereaux (Marques et al., 2014). Plus récemment, une étude transcriptomique a été faite sur des lapereaux infectés par le RHDV ou par le RHDV2. A 24h post-infection, seulement 62 gènes ont été dérégulés chez les lapereaux infectés avec du virus RHDV tandis que 4.200 gènes ont été dérégulés chez les lapereaux infectés par le RHDV2. Cette étude a montré que les lapereaux infectés avec le RHDV surexprimaient les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMH II) en comparaison avec les lapereaux infectés avec le RHDV2. Les CMH sont responsables de la présentation des antigènes à la surface des cellules. De plus, les gènes impliqués dans l'activité des cellules natural killer (NK), des macrophages et des cholangiocytes (cellules épithéliales des canaux biliaires qui conduisent la bile produite par les hépatocytes, elles composent 5% du foie) sont surexprimés chez les lapereaux infectés par le RHDV. Parmi ces gènes il y a :

- NCR3 (natural cytotoxicity triggering receptor 3) : qui code un récepteur à la surface des cellules NK et qui joue un rôle dans la reconnaissance et dans la destruction des cellules infectées par le virus (Burn et al., 2011)
- MX1 : code les protéines MX responsable de la reconnaissance virale et de l'inhibition de la réplication virale (Haller and Kochs, 2002)

Il semblerait donc au vu de ces résultats que la résistance des lapereaux contre le virus RHDV soit due à l'immunité innée des animaux. Le RHDV2 est cependant capable de supprimer cette réponse immunitaire, *via* un mécanisme encore inconnu, ce qui expliquerait qu'il soit capable de provoquer des signes cliniques chez les lapereaux de deux semaines d'âge (Neave et al., 2018).

Immunité croisée : comme il a été dit précédemment, un lapin déjà infecté avec un virus RCV-A1 ou RCV, sera partiellement ou totalement protégé contre l'infection au RHDV (Capucci et al., 1996; Strive et al., 2010). De plus, il a été supposé qu'une infection par la myxomatose, *via* son pouvoir immunosuppresseur, pouvait rendre les lapins plus sensibles à l'infection contre le RHDV (Marchandea et al., 2004).

Expression des HBGA : comme il a été dit dans la partie III. Cycle Viral, les lapins peuvent être classés en fonction de leur phénotype d'expression des HBGA. Pour rappel, les lapins peuvent être A+B+, A-B+, A+B- et A-B-. Il a été décrit que les différents variants de RHDV ont une affinité différente avec les HBGA, notamment le variant GI.1d, qui a une forte affinité avec les antigènes A et B tandis que son affinité est plus faible avec l'antigène H de type 2, *in vitro* (Nystrom et al., 2011).

Cette capacité de fixation au HBGA du virus RHDV semble corrélée au pouvoir pathogène quand une faible dose est inoculée en condition expérimentale. En effet, dans l'étude de Nystrom et al. (2011), 10 lapins ont été inoculés par voie orale avec  $10^5$  copies de GI.1d. Parmi ces 10 lapins, trois avaient un phénotype A+B+ et sept avaient un phénotype A-B-. A 11 jpi, seuls les lapins A-B- ont survécu à l'infection. Par contre avec des doses inoculées plus fortes ( $10^7$  et  $10^9$  copies), il ne semble pas y avoir de différence de sensibilité entre les lapins A+B+ et A-B-.

## 7. Diagnostic

## 7.1. Différentiel

Le diagnostic différentiel de la RHD dépend de la forme clinique rencontrée (cf. 2. Symptômes et évolution clinique). Il est présenté ci-dessous sous forme de tableau (Tableau 5). Concernant l'EBHS, la maladie peut être confondue avec la toxoplasmose (Moinet, 2011).

**Tableau 5.** Diagnostic différentiel de la RHD (d'après Mitro and Krauss, 1993; Harkness et al., 2010) .

Formes et signes cliniques	Diagnostic différentiel
<b>Forme suraiguë Mort subite chez des lapins adultes sans signe précurseur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Stress aigu</li> <li>● Pneumopathie aiguë ou chronique (Pasteurellose en particulier)</li> <li>● Coup de chaleur</li> <li>● Entérotoxémie (<i>E. Coli</i>, <i>Clostridium perfringens</i> type E)</li> <li>● Infections coliformes</li> <li>● Cardiopathie</li> <li>● Déshydratation</li> <li>● Electrocutation</li> <li>● Intoxication</li> <li>● Toxémie de gestation, cétose</li> <li>● Rétention placentaire, toxémie à <i>Clostridium spp.</i></li> <li>● Myxomatose atypique</li> <li>● Autres causes de septicémie avec CIVD secondaire</li> </ul>
<b>Forme aiguë / subaiguë Abattement, anorexie, hyperthermie, signes d'atteinte respiratoire et neurologique, mort en 48h.</b>	Mêmes causes que pour les formes suraiguës, mais causant une atteinte plus modérée.
<b>Forme chronique Ictère</b>	Hémolyse intravasculaire Atteinte hépatique

## 7.2. Sérologique

### 7.2.1. ELISA

Les animaux infectés par un lagovirus pathogène séroconvertissent en quatre à six jours post-infection. Les anticorps produits lors de cette séroconversion peuvent être détectés *via* la méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Plusieurs méthodes ELISA sont utilisées dans les laboratoires de diagnostic :

- L'ELISA de compétition (cELISA) : ce test utilise un broyat de foie de lapin infecté et clarifié comme antigène. Les anticorps sont ensuite détectés à l'aide d'anticorps monoclonaux. Il est très spécifique et détecte principalement les anticorps dirigés contre les déterminants antigéniques sur la surface externe du virus (Lavazza and Capucci, 2008).
- L'ELISA sandwich avec des anticorps monoclonaux anti-isotypes (isoELISA ou IgELISA) : ce test permet de détecter la présence d'IgM, d'IgA et d'IgG anti-RHDV (Cooke et al., 2000). Cette technique est plus sensible que le cELISA
- L'ELISA en phase solide : dans cet ELISA, les antigènes doivent être purifiés. Une fois purifiés, ils sont adsorbés sur un support solide. L'adsorption va déformer le virus et permettre l'exposition d'épitopes internes. Cet ELISA permet de détecter un spectre plus large d'anticorps dirigés contre le virus pathogène, et augmente donc la sensibilité de la technique. Il peut ainsi être utilisé pour détecter des anticorps anti-EBHSV (Lavazza and Capucci, 2016).

### 7.2.2. Inhibition de l'hémagglutination

L'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est un test à la fois sérologique et virologique, mais est plus souvent utilisé dans la recherche d'anticorps dirigés contre le virus à étudier. Ce test consiste à mettre en contact des érythrocytes humains (groupe O en particulier), des anticorps antiviraux et des antigènes viraux qui ont une propriété hémagglutinante. Dans le cadre d'un test sérologique, un sérum de lapin est mis en contact avec de la protéine de capsid.

Si le sérum est positif en anticorps antiviraux, il va inhiber la capacité hémagglutinante de la protéine de capsid et aucune hémagglutination des érythrocytes humains ne sera observée. Ce test est plus souvent utilisé pour diagnostiquer le RHDV et le RHDV2 qui ont de fortes propriétés hémagglutinantes (Lavazza and Capucci, 2016). La recherche d'anticorps anti-EBHSV peut également être réalisée en IHA (Gavier-Widen and Morner, 1991) mais en raison du plus faible pouvoir hémagglutinant de l'EBHSV, cette technique reste difficile à mettre en œuvre (Le Gall, 1997).

### 7.3. Virologique

#### 7.3.1. Hémagglutination

Le test d'hémagglutination ou HA test a été la première technique de diagnostic de laboratoire utilisée en routine pour le RHDV (Ohlinger et al., 1990). Ce test est moins sensible que les outils de biologie moléculaire récents, mais a l'avantage d'être une technique simple et rapide à mettre en place. Il peut être confirmé par un test IHA décrit précédemment (Lavazza and Capucci, 2016).

#### 7.3.2. Western blot

Le western blot (WB), ou immunotransfert, basé sur la détection spécifique de protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose, est une technique plus rarement utilisée en diagnostic. En effet, cette méthode est plus lourde à mettre en place, et sert généralement de technique de confirmation lorsque le HA test et/ou l'ELISA donnent des résultats sérologiques douteux ou quand l'échantillon traité est trop riche en CLP (Lavazza and Capucci, 2016).

#### 7.3.3. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique basée sur la détection des antigènes viraux au sein de tissus ou de cellules. C'est une méthode lourde à mettre en place nécessitant des coupes de tissus (foie, rate, rein, etc) qui doivent être préalablement fixées, lavées puis perméabilisées. Elles sont disposées sur des lames et sont ensuite incubées avec du sérum anti-RHDV ou des anticorps monoclonaux spécifiques biotinylés. La révélation se fait grâce à l'incubation avec un complexe avidine-biotine couplé à la peroxydase (Lavazza and Capucci, 2016).

#### 7.3.4. Microscopie électronique

La microscopie électronique en coloration négative permet l'observation de particules virales. Cette technique a tout d'abord été employée avec des suspensions de foie de lapins infectés par le RHDV (Smid et al., 1989). L'observation de particules virales dans des matrices complexes n'est pas simple, c'est pourquoi les suspensions d'organes ont été purifiées sur gradient de densité de saccharose ou de chlorure de césium pour permettre d'identifier rapidement les particules virales d'intérêt ainsi concentrées (Ohlinger et al., 1990). Le diagnostic a été amélioré avec l'utilisation de l'immuno-microscopie électronique qui permet d'observer plus facilement les particules virales ainsi que les CLP grâce à leur agrégation résultant de la réaction immunologique induite par leur incubation avec un sérum hyperimmun ou un AcM spécifique (Valicek et al., 1990; Capucci et al., 1991; Lavazza et al., 2015b). Cette méthode de diagnostic est longue à mettre en place et nécessite un matériel coûteux et est plutôt réservée à des travaux de recherche sur les agents pathogènes ou à de la confirmation de résultat (Capucci et al., 1991).

## 7.4. Moléculaire

### 7.4.1. Transcription inverse-PCR (RT-PCR)

Les outils de biologie moléculaire ont grandement facilité et amélioré le diagnostic d'agents pathogènes. La première RT-PCR pour détecter du RHDV a été développée en 1995. Elle permettait d'amplifier 500 paires de bases (pb) du gène codant la VP60 et a été décrite comme  $10^4$  fois plus sensible que les méthodes ELISA (Guittré et al., 1995). Cette technique permet de détecter l'ARN viral dans de nombreux tissus (Shien et al., 2000) et de pouvoir séquencer les produits amplifiés (Gould et al., 1997). Plus récemment, une multiplex RT-PCR a été mise en place pour détecter les souches recombinantes RDHV/RHDV2 (Hall et al., 2018).

### 7.4.2. RT-qPCR

La RT-PCR quantitative (RT-qPCR) est un test qui permet à la fois de détecter et de quantifier l'ARN issu d'un échantillon. Cette technique est plus spécifique que les RT-PCR. La sensibilité dépend de la sonde et du jeu d'amorces sélectionné. Les marqueurs fluorescents les plus utilisées pour détecter les lagovirus sont :

- Sonde Taqman : utilisée pour détecter le RHDV, la RT-qPCR permet de détecter jusqu'à 10 copies d'ARN par réaction (Gall et al., 2007). Cette méthode a aussi été développée pour détecter et quantifier le virus RHDV2 (Duarte et al., 2015b).
- SYBR Green I (SYBR) : utilisée pour détecter le RHDV, la RT-qPCR permet de détecter jusqu'à 6,09 copies de plasmide par réaction (Liu et al., 2015).

### 7.4.3. Immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR)

L'IC-RT-PCR est la seule technique qui permet de détecter spécifiquement l'ARN encapsidé. Les particules virales sont tout d'abord capturées sur des anticorps spécifiques fixés dans une plaque ELISA puis légèrement dénaturées. La RT est ensuite effectuée dans la plaque ELISA et les ADNc complémentaires (ADNc) générés sont ensuite analysés en PCR. Cette technique est moins sensible qu'une RT-PCR classique mais 10 à 100 fois plus sensible qu'un ELISA sandwich (Le Gall-Recule et al., 2001). Les méthodes disponibles pour le diagnostic de la RHD classées selon l'objectif recherché sont rapportées dans le Tableau 6. Ce tableau est tiré de celui proposé dans le chapitre sur le RHD rédigé par le laboratoire de référence de l'Office International des Epizooties (OIE) pour les caliciviroses des lagomorphes (IZSLER, Brescia, Italie) du manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE (Lavazza and Capucci, 2016). Il peut aussi s'appliquer à l'EBHS.

Méthodes	Objectifs					
	Population d'animaux non infectés	Animal non infecté avant déplacement	Contribuer à une politique d'éradication	Confirmation de cas cliniques	Epidémiosurveillance	Tester le statut immunitaire d'un animal ou suivi post-vaccination
Identification de l'agent pathogène						
Détection de l'antigène	+	-	++	+++	+	-
RT-PCR temps-réel	+	-	++	+++	+	-
Détection de la réponse immunitaire						
ELISA	+++	+++	+++	-	+++	+++
HA	++	++	++	-	++	++

+++	Méthode recommandée
++	Méthode adaptée
+	Méthode peut être utilisée dans certaines situations, mais le coût, la fiabilité ou d'autres facteurs limitent considérablement son application
-	Méthode non adaptée

**Tableau 6.** Méthodes et objectifs des outils de diagnostic disponibles pour le RHDV (d'après Lavazza and Capucci, 2016)

## 8. Prophylaxie

### 8.1. Sanitaire

#### 8.1.1. Mesures sanitaires défensives

Les mesures sanitaires défensives visent à limiter l'introduction du virus dans les élevages. Pour cela, les éleveurs doivent installer un pédiluve à l'entrée de l'élevage, désinfecter régulièrement les locaux et le matériel d'élevage, utiliser des vêtements et des équipements spécifiques à l'élevage, stocker les aliments et les litières dans un endroit clos non accessible à des vecteurs du virus (insectes, rats, souris,...) et utiliser préférentiellement de l'aliment industriel qui est dépourvu de virus, contrairement au fourrage ou à l'aliment frais qui peut être contaminé (Ohlinger et al., 1993; Boucher and Nouaille, 1996).

#### 8.1.2. Mesures sanitaires offensives

Les mesures sanitaires offensives interviennent quant à elles quand la maladie est déclarée dans l'élevage. Lors d'une épizootie, les animaux malades et suspects doivent être mis à mort, et leurs cadavres doivent être stockés dans un bac clos en attendant la destruction réglementée par incinération. Il y a ensuite une étape de désinfection des locaux et du matériel avec un produit homologué employé aux doses virucides recommandées. L'étape de désinfection est suivie d'un vide sanitaire allant de deux à six semaines. Pendant ce vide sanitaire, des lapins sentinelles séronégatifs vis-à-vis du virus pourront être introduits pour vérifier si la désinfection a fonctionné (Ohlinger et al., 1993; Boucher et al., 2012a)

## 8.2. Médicale

Il n'existe pas de traitement permettant de soigner les animaux malades, infectés par des lagovirus pathogènes. En effet, la rapidité de l'évolution de la maladie ne laisse pas le temps de soigner ces animaux (Le Gall-Reculé and Boucher, 2017)

La vaccination est le principal moyen de prévenir l'infection par le RHDV et le RHDV2. Plusieurs vaccins possédant une autorisation de mise sur le marché (AMM) dirigés contre l'un ou ces deux virus sont disponibles en France. La durée de l'immunité induite par ces vaccins est de 9 à 12 mois. Les lagovirus ne se multipliant pas sur support cellulaire, la plupart des vaccins sont préparés à partir de suspensions de foie de lapins EOPS infectés expérimentalement. Ils sont inactivés et adjuvés. Les premières descriptions du virus RHDV2 ont montré que les vaccins dirigés contre le RHDV ne protégeaient pas les animaux contre les infections RHDV2 (Le Gall-Reculé et al., 2011; Dalton et al., 2012). De nouveaux vaccins ont été développés pour protéger les lapins contre le RHDV2. Le premier vaccin commercialisé sous AMM a été le Filavac<sup>®</sup> VHD K C+V (Filavie) en 2013. Il s'agit d'un vaccin bivalent inactivé, adjuvé (hydroxyde d'aluminium) qui protège les lapins à la fois contre le RHDV et contre le RHDV2 (Le Minor et al., 2019). Un autre vaccin initialement commercialisé en Espagne par Hipra est disponible depuis quelques années en France. Il s'agit du vaccin inactivé adjuvé (huile minérale) monovalent ERAVAC<sup>®</sup>. Le seul vaccin recombinant commercialisé en France est le vaccin bivalent Nobivac<sup>®</sup> Myxo-RHDV (MSD AH). Ce vaccin obtenu en intégrant le gène codant la VP60 d'un RHDV dans le génome d'un virus myxomateux est un vaccin atténué non adjuvé qui protège les lapins contre le RHDV et contre la myxomatose, une autre pathologie létale touchant les lapins (Spibey et al., 2012). Les caractéristiques des principaux vaccins disponibles en France pour lutter contre les lagovirus pathogènes sont listées dans le Tableau 7.

**Tableau 7.** Principales caractéristiques des vaccins disponibles en France pour lutter contre les lagovirus pathogènes.

Nom déposé	Souches vaccinales	Adjuvant	Voie et volume injecté
Nobivac <sup>®</sup> Myxo-RHD	Virus myxomatose vivant qui exprime la protéine de capsid de la souche 009 du virus RHDV	Aucun	Voie sous-cutanée : 0.2 mL/lapin
Filavac <sup>®</sup> VHD KC+V	LP.SV.2012 (RHDV2) et IM507.SC2011 (RHDV)	Hydroxyde d'aluminium	Voie sous-cutanée : 0.2 mL/lapin pour les présentations 50 et 200 doses ou 0.5 mL/lapin pour la présentation 1 dose
Eravac <sup>®</sup>	V 1037 (RHDV2)	Huile minérale	Voie sous-cutanée sur la paroi thoracique latérale : 0.5 mL/lapin

Un plan de vaccination vis-à-vis du RHDV2 en élevage a été décrit pour vacciner les reproducteurs : une primovaccination des futures lapines à cinq semaines d'âge, suivie d'un rappel à 11 semaines d'âge puis tous les six mois (Le Gall-Reculé and Boucher, 2017). L'OIE préconise aussi de vacciner les lapins quel que soit leur âge tous les six mois pour prévenir efficacement tous risques d'infection RHDV ou RHDV2 (Lavazza and Capucci, 2016).

Il n'existe pas de vaccin commercial pour protéger les lièvres contre l'EBHSV. Un autovaccin a été testé dans un élevage de lièvres touché par une crise d'EBHS en Allemagne et a permis de protéger les lièvres de l'infection (Drews et al., 2011). Les autovaccins sont préparés à partir des foies des animaux infectés morts et récoltés dans l'élevage pendant un épisode clinique. Les suspensions virales sont inactivées puis administrées aux animaux encore vivants de l'élevage touché. L'utilisation des autovaccins viraux n'est pas autorisée à ce jour en France.

### C. Génétique Inverse

#### I. Définition de la génétique inverse

La génétique classique vise à caractériser le génotype qui est responsable de l'observation d'un phénotype connu. La génétique inverse, quant à elle, vise à caractériser le phénotype qui découlera de l'expression d'un ou plusieurs gènes dont la séquence nucléique aura été préalablement modifiée. En virologie, un système de génétique inverse est un outil permettant de régénérer des virus infectieux à partir d'une copie ADN du génome viral. Cet outil permet de générer des virus génétiquement modifiés, dont le phénotype pourra ensuite être caractérisé. Les mutations génomiques étudiées peuvent avoir pour objet de produire des virus à pouvoir pathogène atténué, ou antigéniquement modifiés, qui peuvent être utilisés comme vaccin, ou des virus mutants pour l'analyse de fonction de gènes viraux ou de séquences non-codantes. Pour cela, les génomes modifiés doivent tout d'abord être clonés dans des plasmides puis être transfectés dans des cellules, *in vitro* ou *in vivo*. Lorsque le système de génétique inverse fonctionne et que les mutations testées ne sont pas létales, les cellules génèrent des particules infectieuses porteuses du génome modifié.

Le premier système de génétique inverse a été développé pour régénérer un virus à ADN bicaténaire linéaire, le bactériophage T2, dans des bactéries *E. coli* (Fraser et al., 1957). Le bactériophage Q $\beta$  a été le premier virus à ARN de polarité positive monocaténaire polyadénylé à être régénéré, là aussi dans des bactéries *E. coli* (Taniguchi et al., 1978). Le poliovirus (famille des *Picornaviridae*) est le premier virus de mammifère à avoir été régénéré en génétique inverse (Racaniello and Baltimore, 1981). C'est un virus dont le génome – constitué d'une molécule d'ARN simple brin, mono-segmenté, de polarité positive et polyadénylé ayant une protéine VPg liée en 5' (Zell et al., 2017) - est directement infectieux dès qu'il est introduit dans une cellule eucaryote (Holland et

al., 1959). Les *Caliciviridae* ont longtemps été confondus avec la famille des *Picornaviridae* (Liu et al., 1984; Morisse et al., 1991) du fait qu'ils partagent avec ceux-ci l'organisation génomique précitée. Cependant, contrairement aux *Picornaviridae*, peu de systèmes de génétique inverse sont disponibles pour les virus de la famille des *Caliciviridae*. Cela vient du fait que peu de calicivirus sont capables de se multiplier *in vitro*, et que les expérimentations *in vivo* en condition de laboratoire sont souvent difficiles à mettre en place (Desselberger, 2019).

## II. Principaux outils pour développer un système de génétique inverse pour les virus à ARN positif

Un certain nombre d'outils ont été développés afin de mettre en place les systèmes de génétique inverse des virus à ARN positif. La première étape indispensable au développement d'un système de génétique inverse est l'obtention d'une copie complète de la séquence génomique sous forme d'ADNc, afin de pouvoir la cloner dans un plasmide. Le second outil indispensable est un type cellulaire, *in vivo* ou *in vitro*, qui puisse prendre en charge le plasmide afin de générer des particules virales infectieuses.

### 1. Transcrire le génome

Pour générer ensuite de l'ARN viral à partir d'un ADNc, il faut que la séquence à exprimer soit précédée d'un promoteur. Le promoteur va permettre de recruter la polymérase de la cellule afin d'initier la transcription de la séquence d'intérêt. Deux promoteurs sont majoritairement utilisés en génétique inverse :

- Les promoteurs d'ARN polymérase eucaryote tels que les promoteurs de l'ARN polymérase II (ARN pol II), qui peuvent être soit dérivé du Cytomégalovirus humain (pCMV) (Thomsen et al., 1984) soit dérivé du gène du facteur d'élongation humain 1 alpha (pEF-1 $\alpha$ ) (Uetsuki et al., 1989)
- Le promoteur de l'ARN polymérase T7 du bactériophage T7 (pT7) (Dunn and Studier, 1983)

Les promoteurs eucaryotes sont décrits comme pouvant être utilisés dans un large spectre de cellules de mammifères. Ils ont une forte activité pour initier la transcription *via* l'ARN pol II dans le noyau des cellules (Boshart et al., 1985; Guo et al., 1996). Le promoteur CMV a été identifié sur le génome du Cytomégalovirus humain (Thomsen et al., 1984). Le pCMV est composé d'une séquence amplificatrice (enhancer) et du promoteur minimal CMV. Le promoteur du gène du facteur d'élongation humain 1 alpha a quant à lui été identifié sur le gène du facteur d'élongation humain 1 alpha (Uetsuki et al., 1989). Le pEF-1 $\alpha$  est composé d'une séquence régulatrice de la transcription (TATA box) ainsi que des deux premiers exons et du premier intron du gène du facteur d'élongation

humain 1 alpha (Kim et al., 1990). La transfection d'un plasmide possédant un promoteur eucaryote dans des cellules eucaryotes ne nécessite donc pas l'apport d'une polymérase exogène pour transcrire le plasmide. L'ARN pol II va ensuite recruter un complexe protéique qui va coiffer en 5' les ARNs synthétisés pour qu'ils soient traduits dans le cytoplasme (Cho et al., 1997). Malgré sa propriété d'être un promoteur fort, le promoteur eucaryote a un inconvénient.

En effet, il va permettre le recrutement de l'ARN pol II qui va être utilisée pour la transcription du plasmide mais aussi pour la transcription de l'ADN cellulaire. Il va donc y avoir une compétition entre la transcription de l'ARN généré par le système de génétique inverse et les ARNs produits par la cellule hôte. Cette compétition va avoir pour conséquence de diminuer le rendement des particules virales produites.

Le pT7 permet quant à lui de recruter la T7 RNA polymérase afin d'induire la transcription du génome du phage dans le cytoplasme de la bactérie infectée. Cette polymérase n'est exprimée que par le bactériophage T7. Le pT7 peut être utilisé *in vitro* ou en culture cellulaire.

Utilisé *in vitro*, dans un mélange réactionnel incluant des cations ( $Mg^{2+}$ ), un tampon (Tris-HCl), des NTPs et la polymérase du bactériophage T7, le pT7 va servir à initier la transcription d'un plasmide contenant la copie ADN de l'ARN viral. L'ARN transcrit *in vitro* peut ensuite être coiffé en 5' avec un analogue de la coiffe, puis être transfecté dans des cellules (Contreras et al., 1982; Ahlquist et al., 1984), ce qui peut suffire à régénérer les particules virales pour les virus à ARN positif ou à ARN double brin. Les difficultés liées à cette approche sont le manque de reproductibilité de la transfection des ARNs transcrits *in vitro*, raison pour laquelle les systèmes de génétique inverse utilisant le pT7 ont ensuite plutôt été basés sur la transfection des plasmides porteurs du pT7, de façon à ce que la transcription ait lieu directement dans les cellules transfectées.

Pour être utilisé en culture cellulaire, l'ARN polymérase T7 doit être apportée dans les cellules à transfecter. Les principales techniques qui permettent l'apport de cette polymérase exogène dans les cellules sont :

- L'infection des cellules par un virus auxiliaire génétiquement modifié pour qu'il exprime l'ARN polymérase T7 dans le cytoplasme,
- La transfection stable d'un plasmide qui va exprimer l'ARN polymérase T7 dans le cytoplasme des cellules

Les virus auxiliaires les plus utilisés pour exprimer l'ARN polymérase T7 sont le virus de la vaccine (MVA/T7) ou le virus de la variole aviaire dit fowlpox (FPV/T7) (Fuerst et al., 1986; Sutter et al.,

1995; Britton et al., 1996). L'expression d'un virus auxiliaire peut cependant être toxique pour les cellules.

Pour pallier le problème de toxicité, des lignées cellulaires ont été créées pour exprimer constitutivement l'ARN polymérase T7. Les HEK-293 furent les premières cellules modifiées pour à exprimer constitutivement l'ARN polymérase T7 (Radecke et al., 1995).

Ensuite les cellules BSR-T7, dérivées des cellules BHK (Buchholz et al., 1999), ont été développées et ont permis la régénération de nombreux virus en génétique inverse. L'apport de l'ARN polymérase T7 va permettre de fournir une polymérase spécifiquement dédiée à la transcription du plasmide de génétique inverse dans le cytoplasme des cellules transfectées.

Les principaux avantages et inconvénients de l'utilisations des promoteurs eucaryotes et pT7 sont résumés dans le Tableau 8.

**Tableau 8.** Principaux avantages et inconvénients de l'utilisation des promoteurs eucaryotes et pT7 en génétique inverse.

Promoteur	Avantages	Inconvénients
<b>Promoteur ARN polymérase II</b>	Promoteur fort Ne nécessite pas de plasmide ou de virus auxiliaire pour initier la transcription du plasmide	Permet le recrutement d'une polymérase non-exclusive à la transcription du plasmide à exprimer
<b>Promoteur ARN polymérase T7</b>	Promoteur fort Permet le recrutement d'une polymérase exclusive à la transcription du plasmide à exprimer Peut être utilisé <i>in vitro</i>	Nécessite un plasmide ou un virus auxiliaire pour exprimer la polymérase exogène nécessaire à la transcription

## 2. Avoir des extrémités génomiques complètes

D'autres outils ont été développés pour cette fois garantir que les ARNs régénérés dans les cellules transfectées avec les plasmides de génétique inverse auront des extrémités correspondant exactement à celles des extrémités non codantes du génome viral que l'on cherche à reproduire. Pour cela des ribozymes peuvent être placés de part et d'autre de la séquence à exprimer. Un ribozyme est

une séquence ribonucléotidique dont la structure secondaire va permettre d'autocliver la molécule d'ARN qui la contient, en 5' ou en 3' de la séquence ribozyme. La séquence du ribozyme du virus de l'hépatite delta (HDVr) doit être placée à l'extrémité 3' de la séquence à exprimer pour cliver cette extrémité. Cette séquence a été décrite pour la première fois en 1991 (Perrotta and Been, 1991). Pour cliver l'extrémité 5', il faut ajouter la séquence du ribozyme Hammerhead (HHR) à l'extrémité 5' de la séquence à exprimer. Ce ribozyme a quant à lui été décrit en 1986 (Prody et al., 1986). Après l'étape de transcription, la structure secondaire des ribozymes va permettre de cliver en 5' ou en 3' l'ARN néosynthétisé pour qu'il ait la taille et les extrémités exactes attendues.

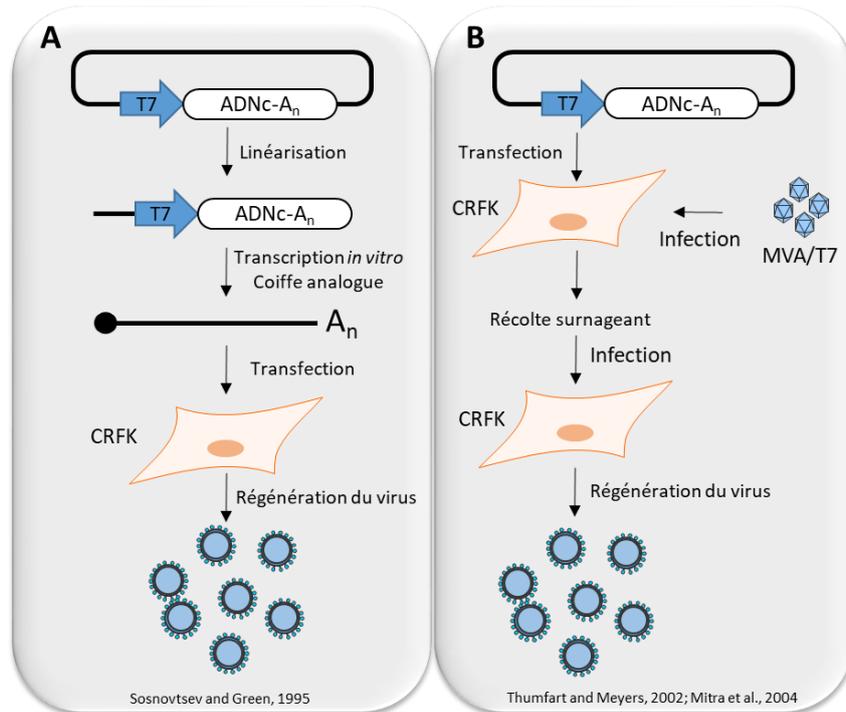
Une autre solution serait de linéariser le plasmide en aval du génome à exprimer puis d'effectuer un run-off transcription *in vitro*. Cette technique va aussi permettre la production d'ARN qui aura la taille et les extrémités exactes attendues.

### III. Systèmes de génétique inverse pour les Calicivirus

#### 1. Feline Calicivirus (FCV)

Le Calicivirus Félin (FCV) fait partie du genre *Vesivirus*. Ce virus a été isolé à partir de voies respiratoires de chat ayant une pneumonie (Burki, 1965). Le FCV est cultivable *in vitro* sur cellules rénales de chat (Crandell-Reese feline kidney, CRFK) (Love, 1973). Le système de génétique inverse des FCV est le premier système à avoir été mis au point parmi les calicivirus. Ce premier système consistait à cloner la copie ADN du génome de la souche Urbana dans un plasmide contenant un pT7 puis à linéariser ce plasmide avant d'en effectuer la transcription *in vitro* en utilisant l'ARN polymérase T7. Deux conditions de transcription ont été testées : avec ou sans analogue de la coiffe m7G(5')ppp(5')G. Cette coiffe est ajoutée en 5' des ARNs synthétisés pendant la réaction de transcription *in vitro* (Sosnovtsev and Green, 1995). Elle a pour rôle de simuler la protéine VPg du virus sauvage. Les ARNs produits ont été purifiés puis 1 µg d'ARN purifié a été transfecté dans des cellules CRFK. Seuls les ARNs portant une coiffe ont permis de régénérer le virus (Figure 12A) (Sosnovtsev and Green, 1995). Cette étude a montré qu'une coiffe était indispensable à la régénération des virus FCV. Une autre étude a confirmé ce résultat en régénérant *in vitro* la souche FCV 2024 avec le même système de génétique inverse (Thumfart and Meyers, 2002). Ce système a ensuite été optimisé en transfectant directement le plasmide contenant la copie ADN du génome de la souche 2024 sous la dépendance du pT7 dans des cellules préalablement infectées par un virus auxiliaire exprimant l'ARN polymérase T7. Dans cette étude, les cellules étaient préalablement infectées par le virus MVA/T7. Le virus MVA/T7 exprime l'ARN polymérase T7 dans le cytoplasme des cellules qu'il infecte et à la particularité de rajouter une coiffe à l'extrémité 5' des ARNs (Fuerst et al., 1986). Il a été décrit que 5 à 10% des ARNs transcrits dans les cellules par l'ARN polymérase T7, exprimée par le MVA/T7, possédaient une coiffe en 5' (Fuerst and

Moss, 1989). A 16 hpi, le surnageant des cellules a été filtré pour se débarrasser du MVA/T7, car sa réplication tue les cellules infectées. Le MVA/T7 étant un virus enveloppé de grande taille, d'environ  $360 \times 270 \times 250$  nm (Cyrklaff et al., 2005), il peut facilement être éliminé après une lyse des cellules et une filtration à  $0,1 \mu\text{m}$  sans éliminer le virus d'intérêt d'une taille inférieure à  $0,1 \mu\text{m}$ . Le filtrat a ensuite été inoculé à de nouvelles cellules CRFK pour multiplier le calicivirus régénéré (Figure 12B). La souche FCV Urbana a été par la suite régénérée avec le même système de génétique inverse (Thumfart and Meyers, 2002; Mitra et al., 2004).

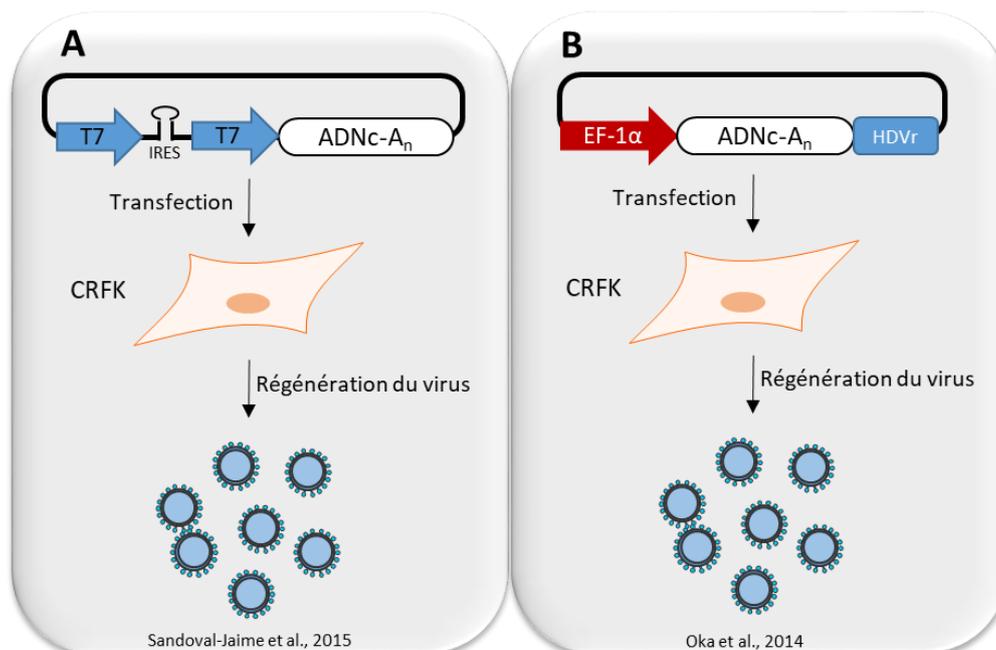


**Figure 12.** Représentation schématique des premiers systèmes de génétique inverse disponibles pour les FCV.

Un autre système a été développé plus récemment. Ce système repose sur la transfection d'un seul plasmide, sans l'aide de virus auxiliaire, dans des cellules BSR-T7 exprimant l'ARN polymérase T7 pour régénérer le FCV. Le système de génétique inverse est basé sur l'utilisation d'un site interne d'entrée du ribosome (Internal ribosome entry site, IRES) du virus de l'encéphalomyocardite, entre deux pT7 en 5' de la copie ADN du génome viral sans ribozyme (Figure 13A). Théoriquement, le système va permettre la production de deux ARNs viraux : un premier ARN viral couplé à l'IRES généré par le premier pT7, et un second ARN viral nu produit par le second pT7. D'après les auteurs, l'ARN nu va servir de matrice pour la réplication de l'ARN viral, tandis que l'ARN couplé à l'IRES va servir à la production des protéines virales. Ce système a permis de régénérer des FCV et des MNV (Sandoval-Jaime et al., 2015).

Dans l'ensemble de ces études, le génome viral issu de génétique inverse n'a pas été séquencé. Il n'est donc pas possible de conclure que ces systèmes soient capables de régénérer un virus identique au virus sauvage car il n'y a pas de preuve que le génome viral issu de la génétique inverse soit identique à la copie ADN du génome viral clonée dans le plasmide de départ. De plus, aucune expérimentation animale n'a été effectuée pour montrer que le phénotype du virus régénéré est identique au phénotype de la souche sauvage.

Enfin, un autre système simplifié a été développé en parallèle de celui décrit précédemment. En effet ce nouveau système nécessite un unique plasmide composé la séquence d'un pEF-1 $\alpha$ , de la copie ADN du génome de la souche FCV F4 polyadénylé (30A) suivie du HDVr. La transfection de ce plasmide dans des cellules CRFK, non infectées préalablement par un virus auxiliaire, suffit à régénérer la souche FCV F4 (Figure 13B). En effet, comme précédemment décrit, le pEF-1 $\alpha$  permet une transcription du plasmide par l'ARN pol II dans le noyau des cellules. Une fois transcrits les ARNs sont coiffés en 5' par un complexe protéique recruté par l'ARN pol II puis traduits dans le cytoplasme des cellules (Oka et al., 2014). Dans cette étude, il a bien été vérifié que le génome viral issu du système de génétique inverse est bien identique à la copie ADN clonée dans le plasmide de départ. Le système a donc permis la régénération d'un virus infectieux *in vitro* qui a les mêmes propriétés de répllication *in vitro*, ainsi que la même séquence de génome viral que la séquence consensus du génome du virus sauvage. Cependant, comme pour les autres études citées précédemment, aucune expérimentation animale n'a été décrite pour tester le phénotype du virus issu de génétique inverse et le comparer à celui du virus sauvage.



**Figure 13.** Représentation schématique des derniers systèmes de génétique inverse disponibles pour les FCV.

## 2. Porcine Enteric Calicivirus (PEC)

Le calicivirus entérique porcin (PEC) fait partie du genre des *Sapovirus*. Ce virus a été détecté pour la première fois sur des porcelets atteints de diarrhée (Saif et al., 1980). Ce virus est capable de se multiplier *in vitro* sur des cellules rénales de porc LLC-PK en présence de contenu intestinal de porc (Flynn and Saif, 1988). Un système de génétique inverse basé sur le système de transcription *in vitro* mis en place pour les virus FCV (Sosnovtsev and Green, 1995; Thumfart and Meyers, 2002) a été développé pour régénérer la souche Cowden PEC adaptée à la culture cellulaire après plusieurs passages sur cellules LLC-PK. Le plasmide développé pour ce système de génétique inverse contient la séquence d'un pT7, la copie ADN du génome de la souche Cowden PEC adaptée et une queue polyA de 35A. Un premier test de régénération de la souche a été effectué par transfection du plasmide dans les cellules LLC-PK préalablement infectées avec le virus MVA/T7 en présence de contenu intestinal de porc. Malheureusement cette tentative fut un échec car le MVA/T7 s'est montré toxique pour les cellules LLC-PK. La totalité des cellules étaient mortes 48h post-transfection, et aucun PEC n'a été détecté. La seconde tentative de régénération de virus PEC a été faite à partir d'ARNs portant une coiffe analogue m7G(5')ppp(5')G générés par la transcription *in vitro* du plasmide linéarisé. La transfection des ARNs produits dans les cellules LLC-PK a permis la régénération de la souche Cowden PEC adaptée. Le génome viral régénéré en génétique inverse n'a pas été séquencé mais le virus a été inoculé à des porcs en expérimentation animale. Le virus issu de génétique inverse a provoqué une maladie atténuée en comparaison du virus sauvage non-adapté, phénotype identique au phénotype Cowden PEC, adapté à la culture cellulaire (Guo et al., 2001).

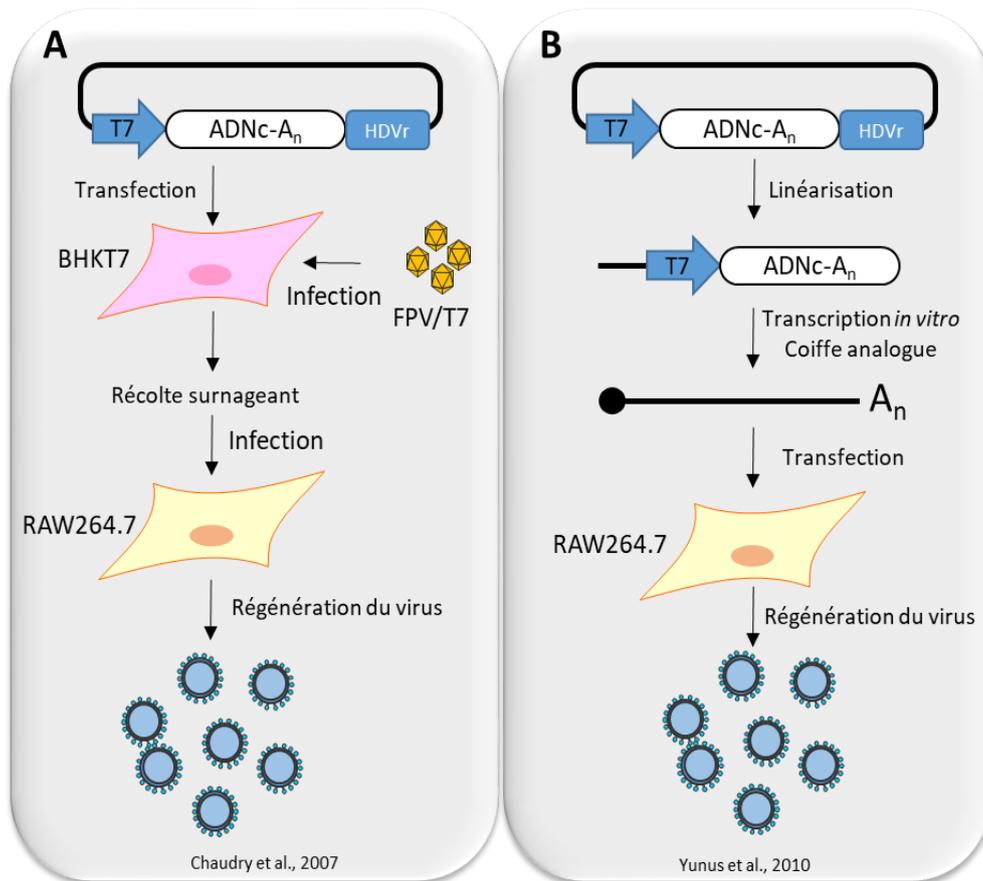
## 3. Murine Norovirus (MNV)

Les norovirus murins (MNV) ont été identifiés en 2003 sur des souris immunodéficientes (Karst et al., 2003). Le genre Norovirus est divisé en six génogroupes (G), dont trois infectent les humains (GI,II et IV), l'un infecte les souris (GV), et les autres infectent d'autres mammifères tels que les chiens (GIV et GVI) et les bovins (GIII) (Green, 2007). Le MNV fait donc partie du génogroupe GV et a été sélectionné comme modèle pour étudier le norovirus humain car il est le seul à pouvoir infecter des cultures cellulaires. En effet le MNV se multiplie facilement *in vivo* sur souris, mais aussi *in vitro* dans les cellules dendritiques et les lignées cellulaires RAW 264.7 (lignée de macrophage murin) et BV-2 (lignée de cellules microgliales murines). Ces cellules ne supportent pas la transfection d'acides nucléiques (Wobus et al., 2004).

Un premier système de génétique a été mis au point en essayant d'adapter le premier système de génétique inverse des FCV pour les MNV. Il s'est avéré que la production d'ARNs viraux à partir d'un plasmide linéarisé contenant la copie ADN du génome de la souche CW1 *in vitro*, qu'ils aient ou non

une coiffe à l'extrémité 5' du génome ou non, ne permettait pas de régénérer du virus sur cellules BHK. Un second système de génétique inverse basé sur le système optimisé des FCV a été mis au point. Deux plasmides ont été produits dans un vecteur contenant le pT7 : un premier contenant la copie ADN du génome de la souche CW1 et un second contenant la copie ADN de la partie subgénomique codant la protéine majeure et la protéine mineure de capsid. Les plasmides ont ensuite été co-transfectés dans des cellules BHK préalablement infectées avec le virus auxiliaire MVA/T7. Là aussi la régénération du virus MNV fut un échec car la réplication du virus auxiliaire inhibait la réplication du virus MNV issu de la génétique inverse en détruisant trop rapidement les cellules. Le virus auxiliaire a donc été remplacé par un Fowlpox virus exprimant l'ARN polymérase T7, le FPV/T7. Cette fois-ci une petite quantité de virus a été régénérée en co-transfectant les deux plasmides dans des cellules BHK. Le FPV/T7 n'inhibe donc pas la réplication du MNV issu de génétique inverse. Les cellules BHK ont ensuite été lysées pour multiplier le peu de virus régénéré sur les cellules RAW264.7. Ce système a été optimisé en ajoutant le ribozyme HDVr à l'extrémité 3' de l'ADNc du génome viral. Seul le plasmide contenant l'ADNc du génome viral suivi du HDVr a été transfecté dans des cellules BHK préalablement infectées avec le FPV/T7. Cette fois si, le système de génétique inverse a permis de générer une plus grande quantité de virus (Figure 14A). Ce résultat a été obtenu dans d'autres types cellulaires infectés par le FPV/T7 tels que des cellules 293T (cellules reinales embryonnaires humaines), Huh 7.5 (lignée de cellules d'hépatocarcinome humain) et des BSR-T7 (Chaudhry et al., 2007). Il est intéressant de noter que la régénération de virus MNV sur BSR-T7 non infectées par le virus auxiliaire FPV/T7 ne fonctionne pas. Même si cela n'a jamais été démontré, il a été suggéré que le FPV-T7 possède la capacité d'ajouter une coiffe en 5' des ARNs générés tout comme le virus MVA/T7 (Chaudhry et al., 2007). Cette méthode de génétique inverse a permis de régénérer la souche MNV 3 (Arias et al., 2012).

Ce système nécessite donc deux lignées cellulaires, un virus auxiliaire exprimant la polymérase T7 et une multiplication pour régénérer du virus en grande quantité. Un système a été développé en optimisant les conditions de transfection afin de pouvoir transfecter directement les cellules RAW264.7 permettant la réplication du virus. Ce système de génétique inverse est basé sur la transcription *in vitro* d'un plasmide linéarisé contenant la séquence d'un promoteur T7, de la copie ADN du génome MNV, une queue polyA de 26A suivie du HDVr. Les ARNs produits sont ensuite coiffés en 5' non pas avec un analogue de la coiffe m7G(5')ppp(5')G mais à l'aide de l'enzyme de coiffe du virus *Vaccinia* (kit ScriptCap) (Figure 14B).



**Figure 14.** Représentation schématique des premiers systèmes de génétique inverse disponibles pour les MNV.

Ce kit permet de multiplier la traduction des ARNs coiffés par cinq en comparaison avec des ARNs coiffés avec un analogue de la coiffe (Meis and Meis, 2007). Ces ARN ont ensuite été transfectés par électroporation dans les cellules RAW264.7. Ce système de génétique inverse permet de générer  $>10^6$  TCID<sub>50</sub> 12h post-transfection (Yunus et al., 2010).

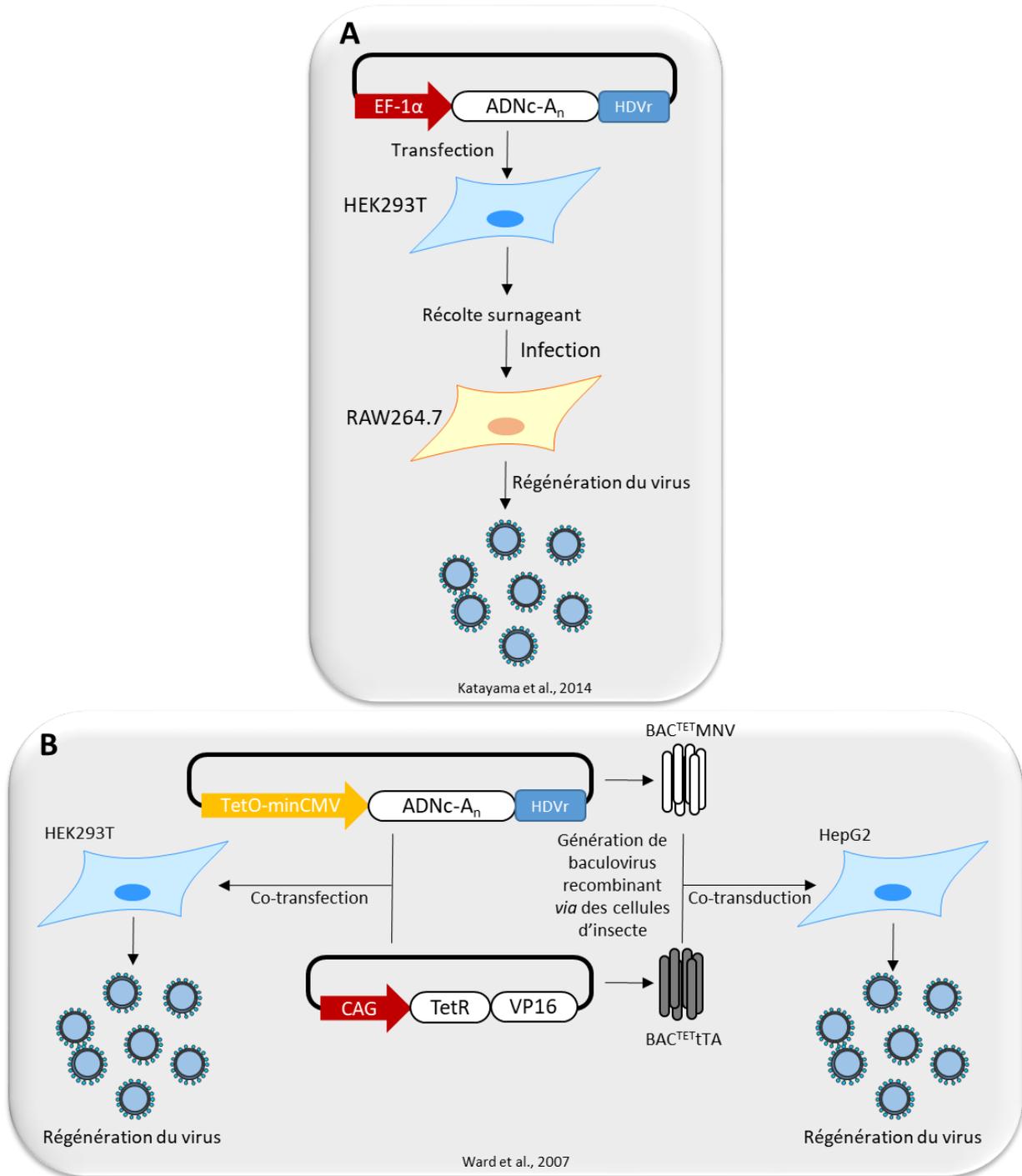
Un autre système a ensuite été développé en reprenant le système de Oka et al. (Oka et al., 2014) développé pour les FCV, basé sur un promoteur recrutant l'ARN pol II. Le plasmide est composé du pEF-1 $\alpha$ , de la copie ADN du génome de la souche MNV S7 polyadénylé (30A) suivie du HDVr. Le plasmide a été ensuite transfecté dans des cellules HEK293T. Deux jours post-transfection, les cellules sont lysées puis le lysat est déposé sur des RAW234.7 pour multiplier le virus (Katayama et al., 2014) (Figure 15A).

Un système, plus complexe, a été développé cette fois avec un promoteur minimal CMV inductible à la tétracycline. Ce système est quant à lui basé sur deux baculovirus :

- BAC<sup>TET</sup>tTA qui possède un promoteur mammifère CAG et qui exprime protéine répresseur Tet (TetR) fusionnée au transactivateur VP16
- BAC<sup>TET</sup>MNV qui possède un domaine Tet activateur (TetO) et un promoteur minimal CMV (minCMV) suivi de la copie du génome de la souche MNV-1 CW1P3 polyadénylé et du ribozyme HDVr

Pour que le système fonctionne, il faut que des cellules HepG2 soient infectées par les deux baculovirus. Dans un premier temps, le virus BAC<sup>TET</sup>tTA va exprimer le TetR fusionné au transactivateur VP16. Le domaine TetR de cette protéine de fusion va ensuite se fixer sur le domaine TetO du génome du second baculovirus BAC<sup>TET</sup>MNV. Cette fixation va permettre l'interaction entre VP16 et le promoteur minCMV qui va à son tour initier la transcription de la copie ADN du génome de la souche MNV-1 CW1P3. Après 24h post-transduction les cellules HepG2 ont été lysées. Le lysat a ensuite été appliqué sur des cellules RA264.7 pour multiplier le virus régénéré sur HepG2 (Figure 15B). Les rendements de production de virus régénéré semblent toutefois 10 fois inférieurs au système développé par Chaudhry et al. (Ward et al., 2007).

Comme pour les FCV, il est important de noter le manque de séquençage du génome viral issu de génétique inverse et/ou le manque d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de la souche régénérée dans les études décrites ci-dessus.



**Figure 15.** Représentation schématique des derniers systèmes de génétique inverse disponibles pour les MNV.

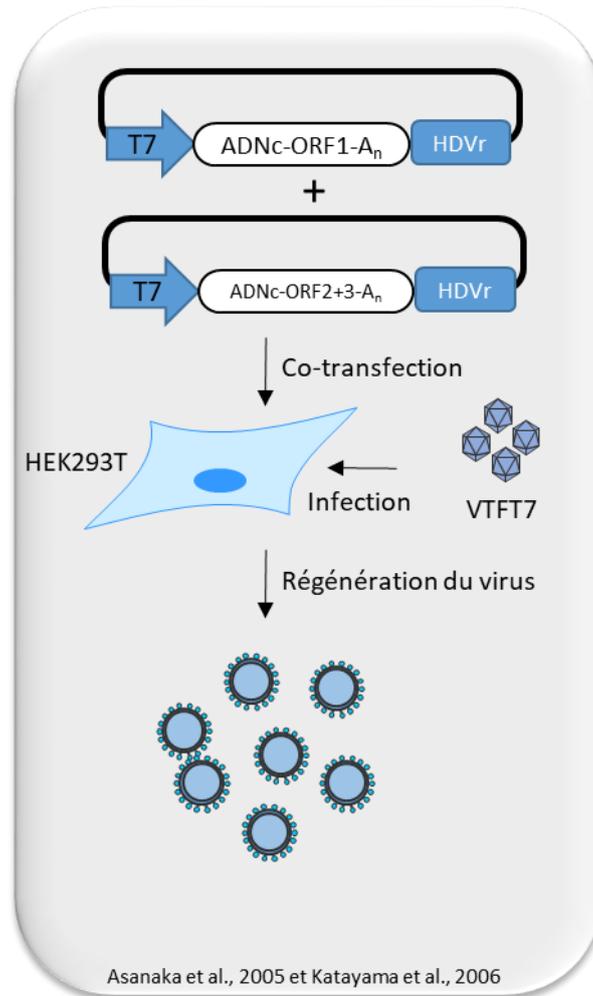
#### 4. Tulane Virus (TV)

Les Tulanes Virus (TV) ont été détectés pour la première fois en 2008 dans des fèces de macaques rhésus juvéniles. Par ailleurs, le virus est capable de se répliquer sur des cellules rénales de singe LLK-MK2 (Farkas et al., 2008). Un système de génétique inverse a été développé pour le TV. Ce système est basé sur un plasmide contenant la séquence d'un pT7 suivi de la copie ADN du génome du TV. Comme dans d'autres systèmes décrits précédemment, le plasmide a été linéarisé puis transcrit *in vitro*. Les ARNs ont ensuite été coiffés *in vitro* par une coiffe analogue m7G(5')ppp(5')G puis transfectés, après purification, dans les cellules LLK-MK2. Un virus a pu être régénéré grâce à ce système (Wei et al., 2008). Là encore, il n'a pas été formellement démontré que ce système de génétique inverse soit capable de régénérer un Tulane Virus identique au virus sauvage étant donné qu'aucun séquençage du génome viral issu du système de génétique inverse n'ait été entrepris.

#### 5. Norovirus Humain

Les norovirus humains (HuNoV) sont l'une des principales causes de gastro-entérite aiguë dans le monde chez l'Homme (Lopman et al., 2016). Tout comme le RHDV, le HuNoV ne dispose d'aucune lignée cellulaire permissive permettant de multiplier le virus *in vitro*. Trois systèmes de génétique inverse ont cependant été mis en place pour régénérer différents génogroupes.

Le premier système de génétique inverse a été basé sur l'utilisation de deux plasmides transfectés dans des cellules HEK293T. Le premier plasmide contient la séquence d'un pT7, la copie ADN du génome viral suivie d'une queue polyA et du HDVr. Ce plasmide permet donc l'expression de l'ARN génomique. Le second plasmide quant à lui contient la séquence d'un pT7, la copie ADN du subgénomme viral, une queue polyA et du HDVr. Ce plasmide exprime donc l'ARN subgénomme. Quand ces deux plasmides sont co-transfectés dans des cellules 293T précédemment infectées avec le virus vaccinia VTF7 (exprimant la polymérase T7), un virus apparenté au HuNoV est régénéré (Figure 16) (Asanaka et al., 2005; Katayama et al., 2006). Bien que le taux de cellules transfectées avec les deux plasmides soit faible, d'après les illustrations d'immunofluorescence, le virus a été observé en microscopie électronique, mais semble avoir une densité moins importante ( $1.318 \text{ g/cm}^3$ ) que le virus sauvage ( $1.39\text{--}1.40 \text{ g/cm}^3$ ). Les auteurs ont suggéré que cette différence de densité pouvait être due à la présence de VLP immatures (Katayama et al., 2006). Il est dommage que les auteurs n'aient pas vérifié la séquence génomique dans les particules virales régénérées pour expliquer cette différence de densité entre le virus sauvage et le virus régénéré.

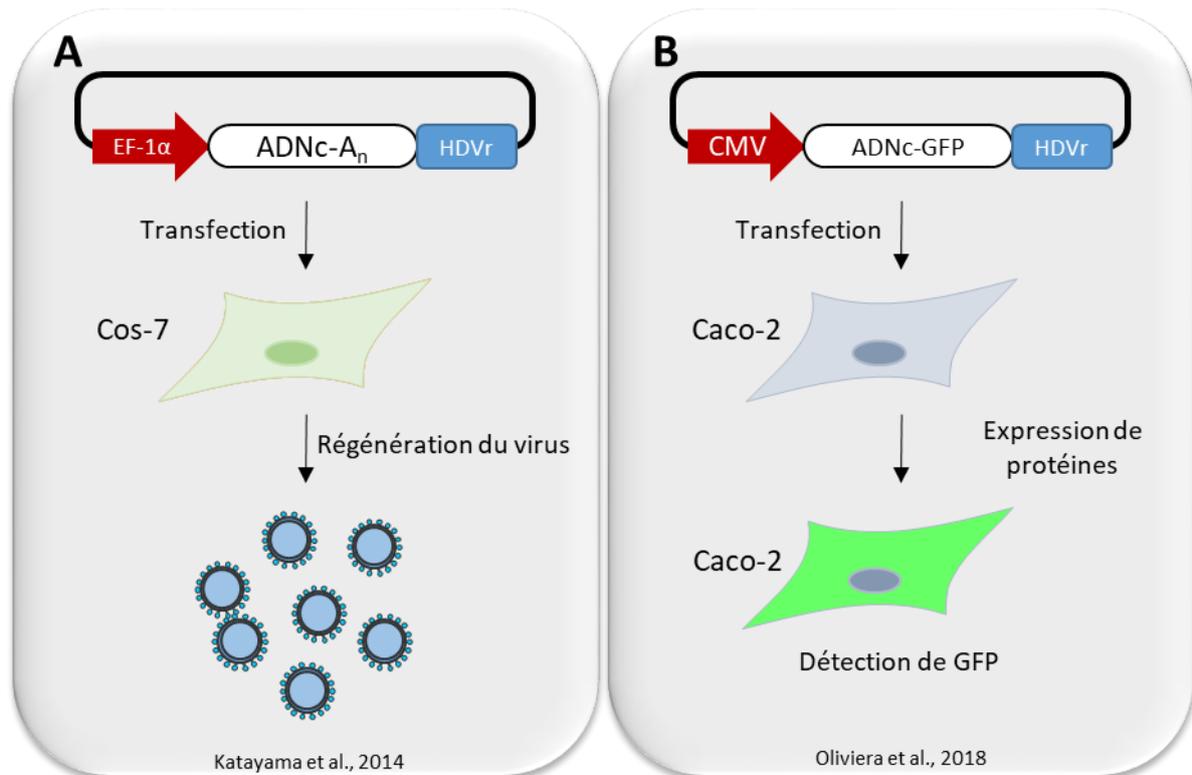


**Figure 16.** Représentation schématique du premier système de génétique inverse disponible pour les HuNoV.

Par la suite, ce système de génétique inverse a été simplifié en ne transfectant qu'un plasmide, contenant la séquence d'un pEF-1 $\alpha$ , la copie ADN du génome viral, une queue polyA et le HDVr. Ce plasmide a été transfecté dans des cellules Cos-7 (cellules rénales de singe vert africain) (Figure 17A) et le virus a été observé en microscopie électronique. Le virus régénéré à partir de ce système de génétique inverse, a cette fois montré la même densité que le virus sauvage mais là encore la séquence génomique dans les particules virales régénérées n'a pas été vérifiée (Katayama et al., 2014; Taube and Wobus, 2014).

Le dernier système de génétique inverse a été mis en place récemment, là aussi en ne transfectant qu'un seul plasmide dans des cellules Caco-2 (cellules humaine d'adénocarcinome colorectal). Le plasmide contient la séquence d'un promoteur CMV, la copie ADN du génome viral, une queue polyA et le HDVr. Le gène rapporteur de la Green Fluorescent Protein (GFP) a été inséré entre deux gènes du génome viral, tout en préservant les sites de clivage du virus. Ce plasmide a permis la

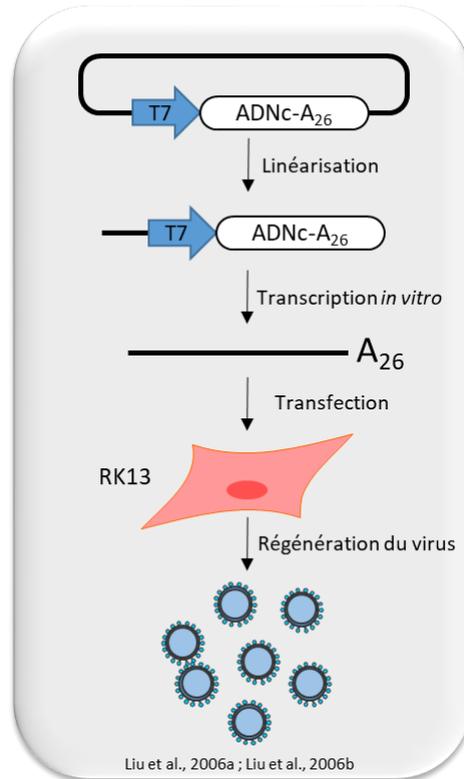
production de protéines virales et de GFP (Figure 17B). Cela a été montré après l'observation de GFP et de protéines de capside en immunofluorescence (IF) (Oliveira et al., 2018).



**Figure 17.** Représentation schématique des systèmes de génétique inverse disponibles pour les HuNoV.

## 6. RHDV

Le virus RHDV a aussi fait l'objet du développement de systèmes de génétique inverse malgré le fait qu'aucune lignée permissive ne soit aujourd'hui disponible pour multiplier le virus *in vitro*. Le premier système de génétique inverse développé est basé sur la transcription *in vitro* d'un plasmide contenant un promoteur SP6 (pSP6) et la copie ADN de la souche JX/CHA/97 (GI.1a) avec une queue polyA de 26A. Le pSP6 est un promoteur de la polymérase du bactériophage SP6 (Butler and Chamberlin, 1982). Ce système a la particularité de ne pas ajouter de coiffe à l'extrémité 5' des ARNs produits. Les ARNs ont été transfectés dans des cellules RK13 et des protéines ont été détectées en IF (Figure 18).



**Figure 18.** Représentation schématique du premier système de génétique inverse disponible pour les RHDV.

La régénération du virus a été effectuée *in vivo* sur 12 lapins exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) de huit semaines d'âge. Ces 12 lapins ont été divisés en trois groupes distincts :

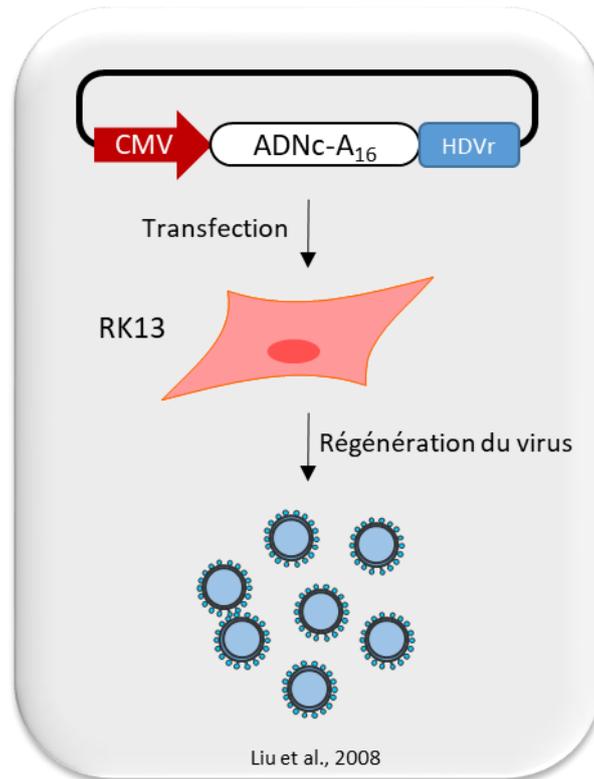
- Groupe 1 : quatre lapins ont été inoculés avec 100  $\mu$ L d'ARN et 20  $\mu$ g de lipofectine par la voie péritonéale
- Groupe 2 : quatre lapins ont été inoculés avec 100  $\mu$ L d'ARN par la voie intrahépatique
- Groupe 3 : quatre lapins ont été inoculés avec du tampon phosphate salin (PBS)

Les groupes 1 et 2 ont rapidement montré des signes cliniques typiques de la RHD (fièvre, perte d'appétit, opisthotonos) et les lapins furent mis à mort trois jpi. Aucun signe clinique n'a été observé sur le groupe 3. Les auteurs de ce travail montrent la production de particules virales dans le foie des lapins infectés et dans les cellules RK13 infectées en microscopie électronique (Liu et al., 2006a; Liu et al., 2006b). Ce dernier résultat a été illustré pour montrer des virus provenant d'un foie de lapin infecté (Liu et al., 2006b) mais aussi pour montrer des virus provenant de cellules RK13 transfectées (Liu et al., 2006a). D'après les auteurs, les résultats laissent penser que le virus régénéré *in vivo* est bien celui de génétique inverse. En effet, le site de digestion *EcoRV* a été détecté sur le génome viral extrait des foie lapin infecté par le virus issu de génétique inverse. Cependant, ce site *EcoRV* est aussi présent sur le

génomique du virus sauvage à la même position que sur le génome du virus issu de génétique inverse d'après la séquence publiée dans la base de données GenBank. Ce site de restriction ne peut donc pas discriminer le virus sauvage du virus issu du système de génétique inverse. Le génome viral issu du système de génétique inverse a aussi été séquencé. Les résultats indiquent l'apparition de six mutations dans le génome viral ne changeant pas la séquence en acide aminé de la phase codante. Ces résultats, s'ils étaient confirmés et fiables, feraient du RHDV un cas particulier puisque ce serait le seul calicivirus à pouvoir être régénéré par transfection d'ARNs non coiffés en 5' (Goodfellow and Taube, 2016). Dans une étude ultérieure, ce système de génétique inverse a permis de montrer que la queue polyA dans le plasmide n'était pas indispensable pour régénérer des virus infectieux (Liu et al., 2008b).

Ce système de génétique inverse a ensuite été optimisé. Le nouveau système utilise un plasmide contenant la séquence du pCMV, la copie ADN du génome de la souche JX/CHA/97, une queue de 16A et un HDVr. Ce plasmide a été transfecté dans des cellules RK13, et des effets cytopathogènes (ECP) ont été observés 12h post-transfection (Figure 19). Les auteurs ont décrit les ECP comme conséquence de la génération de particules infectieuses *in vitro*. Cependant aucun contrôle sur des cellules mises en contact avec l'agent de transfection seul n'a été décrit. Il est donc difficile de conclure que les ECP soient générées par la production de virus issu du système de génétique inverse. L'observation de protéine VP60 en IF, ajoutée à la quantification d'ARN viral en RT-qPCR (ciblant le gène codant la p16), a permis aux auteurs de conclure que ce système de génétique inverse permettait la régénération de la souche JX/CHA/97 (Liu et al., 2008b). Là aussi, le manque de témoins dans les expérimentations d'IF, le défaut de méthodologie dans la quantification d'ARN viral en RT-PCR et le manque de séquençage du génome viral issu du système de génétique inverse amène à s'interroger quant à la fiabilité des résultats rapportés. Pour l'IF, trois conditions sont décrites : des cellules RK13 qui n'ont subi aucune transfection, des cellules RK13 transfectées avec le plasmide contenant le génome de la souche JX/CHA/97 et des cellules RK13 transfectées avec le plasmide contenant le génome de la souche JX/CHA/97 délété du gène codant la protéine VP10.

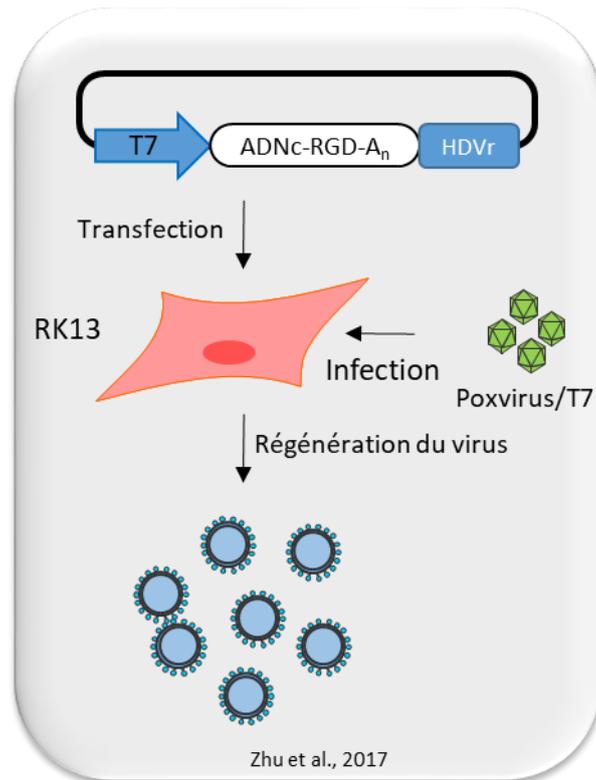
Les auteurs décrivent de la fluorescence dans les deux dernières conditions et concluent que cette fluorescence est causée par la production de protéines VP60 dans les cellules RK13. Cependant, avec les éléments disponibles dans l'article, il est impossible de dire que cette fluorescence est spécifique. Pour la quantification d'ARN viral issu du système de génétique inverse, aucune digestion à la DNase I n'a été décrite, il est donc probable que les quantités de génome viral décrites dans l'article soit biaisées par la présence de plasmide. Enfin, en plus du manque de séquençage du génome viral issu du système, aucune expérimentation n'a été mise en place pour démontrer que le système est capable de régénérer un virus infectieux identique au virus sauvage.



**Figure 19.** Représentation schématique du second système de génétique inverse disponible pour les RHDV.

Malgré la description de deux systèmes de génétique inverse qui semblent régénérer la souche JX/CHA/97, un dernier système de génétique inverse a été développé plus récemment, toujours par la même équipe, pour générer un virus mutant, qui a la capacité d'infecter les cellules cultivées *in vitro*. Ce virus mutant a été généré à partir d'un plasmide contenant la séquence d'un pT7 suivi de la copie ADN du génome de la souche JX/CHA/97 mutante, d'une queue polyA de 16A et d'un HDVr. Le génome de la souche JX/CHA/97 a été muté en deux positions de la protéine VP60 : S305R et N307D. Ces deux mutations permettent de créer un motif RGD sur le sous-domaine P2 de la VP60. Ce motif RGD est décrit comme étant un ligand de nombreux récepteurs d'adhésion cellulaire, les intégrines, présentes chez toutes les cellules adhérentes (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Le plasmide a donc été transfecté dans des cellules RK13 préalablement infectées avec un poxvirus exprimant la polymérase T7, pour permettre la régénération du virus mutant (Figure 20). Le virus mutant a ensuite été inoculé à trois lapins par la voie intramusculaire et a montré le même phénotype léthal, les mêmes lésions macroscopiques et microscopiques que la souche sauvage JX/CHA/97. La région mutée issue des foies collectés lors de l'essai a été amplifiée puis séquencée et le motif RGD a été retrouvé. Ce résultat montre que c'est bien le virus mutant qui a causé la mort des lapins (Zhu et al., 2017). Le développement d'un tel système laisse réfléchir sur la validité des deux premiers systèmes mis en

place. En effet, on peut se poser la question de l'intérêt d'un tel système si les deux précédents fonctionnent.



**Figure 20.** Représentation schématique du dernier système de génétique inverse disponibles pour les RHDV.

## 7. Bilan et Evolution des systèmes de génétique inverse des calicivirus

L'ensemble des systèmes de génétique inverse des calicivirus est résumé et classé par genre de calicivirus dans un tableau en annexe 3. Ce tableau présente les principaux résultats et les conclusions des auteurs concernant le développement du système de génétique inverse de chaque article décrit précédemment. Une colonne « limites de l'étude » est aussi présente dans ce tableau pour rendre compte des points complémentaires qui auraient pu être ajoutés pour contribuer au développement rigoureux d'un système de génétique inverse. Au laboratoire, différents critères sont pris en compte pour conclure que l'on dispose ou non d'un système de génétique inverse robuste et stable. Pour développer un système de génétique inverse, il faut commencer par régénérer une souche de référence. Dans l'idéal, il faudrait que le phénotype et le génotype de la souche issue de génétique inverse soit identique à la souche de référence *in vitro* et *in vivo*. On peut en effet imaginer qu'une fois *in vivo*, une quasi-espèce mieux adaptée soit générée et sélectionnée. L'animal sera donc infecté avec un virus mutant ayant un génome viral légèrement différent du plasmide. Pour développer

un système de génétique inverse, il est préférable de s'assurer dans un premier temps qu'il fonctionne *in vitro* en montrant :

- Production d'ARN viraux : la production d'ARN viral est la première étape de la réplication virale. On peut donc montrer que le système permet de produire des ARNs identiques à la séquence clonée dans le plasmide permettant la régénération du virus de référence. Des conditions témoins sont indispensables pour savoir si les acides nucléiques détectés, quantifiés ou séquencés proviennent d'ARNs produits par le système de génétique inverse et non par une contamination extérieure.
- Production de protéines virales : la production de protéines virales suit la production d'ARN viraux dans le cycle réplcatif. L'observation de protéines virales se fait majoritairement en IF et en WB. Là aussi les témoins d'expérimentation sont très importants pour vérifier la spécificité du signal obtenu.
- Productions de particules virales infectieuses *in vitro* : la production de particules infectieuses est la dernière étape de la réplication virale. L'observation d'ECP après plusieurs passages et l'augmentation du titre viral en fonction du temps permettent de conclure qu'un virus est infectieux *in vitro*. Ici aussi, les témoins sont importants pour s'assurer que les ECP observés soient bien causés par la production de particules virales infectieuses et non par la simple production de protéine toxique, ou de l'agent de transfection. Pour les virus qui ne se répliquent pas en culture cellulaire, il n'est possible de démontrer la production de particules virales infectieuses *in vitro* qu'en inoculant les cellules et ou surnageants de transfection à l'animal cible.

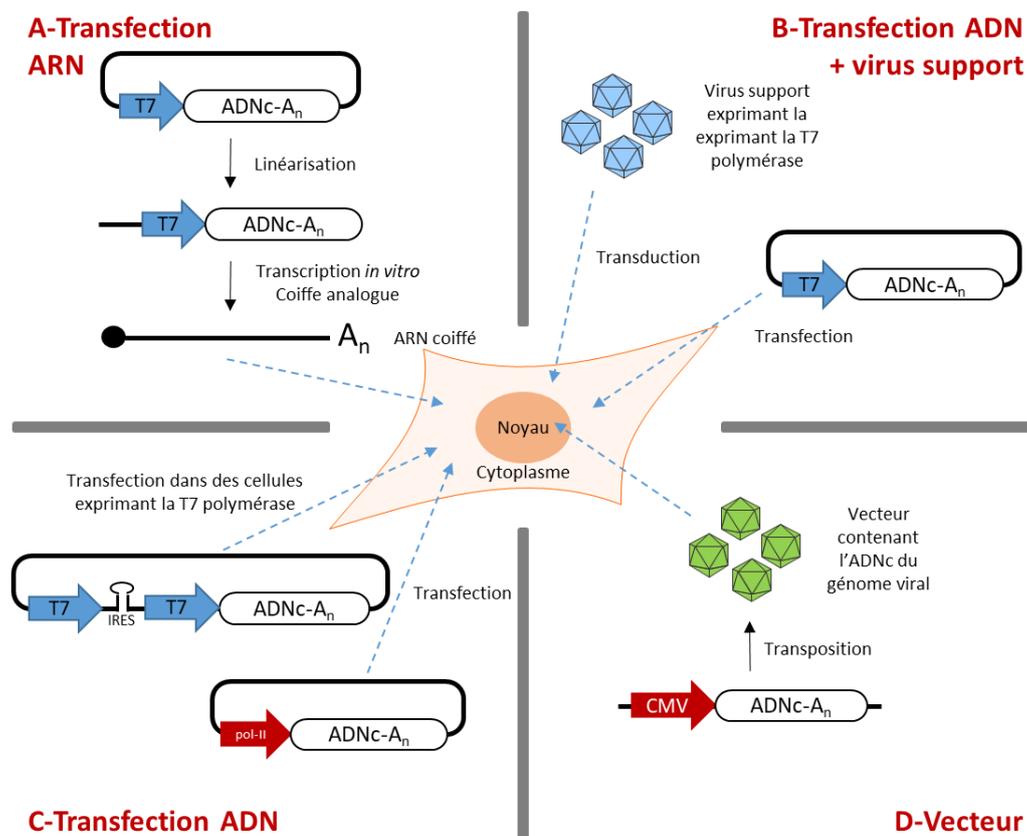
Après avoir démontré que le système de génétique inverse permet la production de particules infectieuses *in vitro*, il faut s'assurer que les particules soient infectieuses *in vivo*, quand cela est possible, et qu'elles aient le même phénotype que la souche de référence. Pour comparer la souche de référence et le virus issu de génétique inverse *in vivo* il faut inoculer des animaux avec une dose infectieuse identique. Différents paramètres peuvent être suivis, avant et après l'essai expérimental, comme les signes cliniques, les lésions macroscopiques et microscopiques, le tropisme et la transmission de chaque virus ainsi que la variabilité génétique des virus après passage sur animaux. Là aussi idéalement, il faut que le virus ait les mêmes propriétés que la souche de référence pour conclure que le système de génétique inverse est capable de régénérer un virus identique à la souche de référence.

Les limites les plus retrouvées dans les études décrites précédemment sont l'absence :

- d'expérimentation animale pour vérifier si le virus régénéré *in vitro* est infectieux *in vivo*
- de séquençage du génome complet du virus issu du système de génétique inverse

C'est deux points sont selon nous indispensables pour valider un système de génétique inverse.

Le tableau bilan en annexe 3 montre aussi que les systèmes de génétique inverse ont évolué. En effet, quatre types de système ont été utilisés pour régénérer des calicivirus (Figure 21).



**Figure 21.** Principaux systèmes de génétique inverse des *Caliciviridae*. (A) Approche fondée sur la transfection de l'ARN transcrit *in vitro* qui est coiffé. (B) Approche basée sur la transfection d'ADNc viral sous le contrôle d'un promoteur T7 dans des cellules transduites avec un virus auxiliaire exprimant la polymérase T7. (C) Approche basée sur la transfection d'un unique plasmide, sans utiliser un virus auxiliaire, en transfectant l'ADNc viral sous le contrôle d'un promoteur recrutant l'ARN polymérase II (pol-II) ou d'un promoteur T7 (pT7). Dans le cas où le plasmide utilise un pT7, les cellules doivent exprimer de façon constitutive la polymérase T7. (D) Transduction d'un vecteur contenant la copie ADN du génome viral sous le contrôle d'un promoteur pol II. D'après Goodfellow et Taube 2016.

Les premiers systèmes de génétique inverse sont basés sur la production d'ARNs transcrits coiffés ou non *in vitro* et la transfection des ARNs dans des cellules cultivées *in vitro* (Sosnovtsev and Green, 1995; Chang et al., 2005; Liu et al., 2006b; Chaudhry et al., 2007; Wei et al., 2008). Les systèmes ont ensuite évolué vers la transfection d'ADN directement dans les cellules chez les calcivirus les plus étudiés. Les premiers plasmides utilisés dans la transfection d'ADN possédaient un pT7. Dans ces systèmes, le plasmide doit être transfecté dans des cellules infectées avec un virus auxiliaire permettant l'expression de la polymérase du bactériophage T7 (Thumfart and Meyers, 2002; Asanaka et al., 2005; Chaudhry et al., 2007; Arias et al., 2012). Les systèmes les plus récents se sont ensuite affranchis de l'utilisation de virus auxiliaire en transfectant des plasmides possédant un promoteur capable de recruter une polymérase eucaryote (Liu et al., 2008a; Katayama et al., 2014; Oka et al., 2014; Oliveira et al., 2018).

#### D. Problématique et objectifs de thèse

Depuis leurs premières détections dans les années 1980, la maladie hémorragique virale du lapin et le syndrome du lièvre brun européen n'ont cessé d'engendrer des taux de mortalité importants dans les populations de léporidés sauvages et d'élevage. Ces deux pathologies ont eu pour conséquences de provoquer des pertes économiques importantes dans les élevages, et de provoquer un déséquilibre écologique dans la faune sauvage et ce, dans de nombreux pays. L'ampleur de ces épizooties dans le monde amène des questions sur l'origine de la pathogénicité des lagovirus, notamment après la récente description d'un nouveau génotype de RHDV, le RHDV2, pour mieux comprendre et prévenir l'émergence des lagovirus pathogènes.

Aujourd'hui deux hypothèses sont étudiées pour mieux comprendre l'origine de la pathogénicité des lagovirus : l'évolution de souches non-pathogènes vers des formes pathogènes et le saut de barrière d'espèce à partir d'une espèce plus vraisemblablement sympatrique des léporidés.

L'objectif de cette thèse est d'apporter des éléments de réponse pour étudier la première hypothèse. Ce travail de thèse est organisé autour de deux axes. Le premier axe vise à étudier les séquences génomiques et les séquences du gène codant la protéine de capsid VP60 des lagovirus non-pathogènes des léporidés afin de compléter nos connaissances sur ces virus jusqu'alors peu étudiés. Cet axe rapportera la caractérisation génomique ainsi que la diversité génétique au niveau du gène codant la VP60 des virus HaCV du lièvre. Par ailleurs, il rapportera la caractérisation de séquences de génome entier et de régions codantes de virus pathogènes RHDV2 et non pathogènes RCV-E1 ainsi que leurs relations phylogéniques. Le second axe traitera de l'étude des bases du pouvoir pathogène des virus RHDV GI.1d *via* le développement d'un nouveau système de génétique inverse des lagovirus. Cette étude rapportera la caractérisation génomique et phénotypique de la souche de référence puis

les travaux préliminaires réalisés pour le développement du système de génétique inverse. Ce système servira ultérieurement à étudier les motifs de pathogénicité des lagovirus pathogènes.

## Travaux personnels

## Chapitre 1 : Étude des séquences génomiques et du gène codant la VP60 des lagovirus non-pathogènes des léporidés

### I. Etude de la diversité génétique des lagovirus HaCV

#### 1. Introduction

Cette partie de nos travaux a été consacrée à la caractérisation de séquences de gène codant la VP60 ainsi qu'à l'obtention d'une première séquence de génome complet d'un lagovirus supposé non-pathogène HaCV.

Le premier lagovirus HaCV a été caractérisé en Italie sur des lièvres nés et élevés dans un élevage et ne présentant aucun signe clinique. Lorsque ce travail a été initié, ce virus était décrit comme proche des EBHSV mais génétiquement (séquence du gène codant la VP60 publiée) et antigéniquement distinct (Cavadini et al. 2015). Dans la première partie de notre travail, nous avons recherché la présence d'HaCV dans 185 prélèvements duodénaux issus de lièvres tués à la chasse sur tout le territoire français en 2015. Des échantillons de foie collectés en 2014 à partir de lièvres morts présentant des lésions compatibles avec l'EBHS mais négatifs pour l'EBHSV en AC-ELISA ont été ajoutés à cette étude (n=14). Une RT-PCR permettant d'amplifier une portion du gène codant la protéine de capsid VP60 de tout génotype de lagovirus (Le Gall-Reculé et al. 2011) a été utilisée pour le criblage des échantillons. L'analyse phylogénétique des séquences issues des fragments amplifiés chez les vingt échantillons positifs a montré que les virus détectés étaient des HaCV. Le gène codant la protéine de capsid VP60 a pu être amplifié et séquencé complètement à partir de onze de ces échantillons, en appliquant une méthode dérivée de la méthode de RT-PCR-séquençage décrite par Le Gall-Reculé et al. (2017). Ces séquences ont confirmé l'identité des HaCV détectés et a permis l'étude de leur diversité génétique. Par ailleurs, une de ces séquences a été utilisée pour prédire la structure de la protéine VP60 par l'équipe de Jacques Le Pendu (Université de Nantes, CNRS, Inserm, CRCINA, Nantes) et pour la comparer avec celle d'un virus EBHSV (Publication 1). D'autre part, l'échantillon présentant la meilleure amplification du gène codant la VP60 a été utilisé pour obtenir la première séquence de génome complet d'une souche HaCV. Pour cela, la méthode de la marche sur le chromosome a été utilisée à l'aide d'amorces générées dans les régions conservées des lagovirus. Une fois amplifié, le génome a été séquencé en séquençage Sanger à l'aide des amorces ayant permis les amplifications. Après avoir été assemblée, la séquence du génome a été analysée avec la plateforme en ligne Blastn, afin de déterminer le génome de lagovirus ayant l'identité nucléotidique la plus élevée avec le génome HaCV. Afin de déterminer la présence de délétions ou d'insertions, l'organisation génomique, ainsi que

les positions et la nature des sites de clivage protéolytiques de la polyprotéine, le génome de la souche HaCV a été traduit. Il a été ensuite aligné avec le génome traduit d'une souche RHDV dont les positions des sites de clivage avaient été déterminées expérimentalement (Meyers et al. 1991). L'ensemble des résultats est présenté dans la publication 2.

Au-delà de ces résultats publiés, une recherche de recombinaison sur le génome de la souche HaCV a été effectuée à l'aide du logiciel RDP4 version 4.4 avec les méthodes RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan et 3Seq (Martin et al. 2015). Pour cela, un jeu de séquences a été constitué, comprenant le génome de la souche HaCV, les génomes complets d'un représentant de chaque génotype de lagovirus, ainsi que les génomes des lagovirus non-classés dans la taxonomie (MRCV, RCV). Ce jeu de données a ensuite été analysé avec le logiciel RDP4, en sachant que pour qu'une recombinaison soit validée, au moins trois méthodes doivent avoir une valeur p inférieure à 0,05.

Publication 1

Genetic diversity and evolution of Hare Calicivirus (HaCV), a recently identified lagovirus from  
*Lepus europaeus*

Publiée dans Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious  
Diseases (MEEGID) 2020



## Short communication

Genetic diversity and evolution of Hare Calicivirus (HaCV), a recently identified lagovirus from *Lepus europaeus*

Clément Droillard<sup>a</sup>, Evelyne Lemaitre<sup>a</sup>, Marina Chatel<sup>a</sup>, Agnès Quémener<sup>b</sup>, François-Xavier Briand<sup>a</sup>, Jean-Sébastien Guitton<sup>c</sup>, Stéphane Marchandeu<sup>c</sup>, Jacques Le Pendu<sup>b</sup>, Nicolas Eterradossi<sup>a</sup>, Ghislaine Le Gall-Reculé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité de Virologie, Immunologie, Parasitologie Aviaires et Cunicoles, BP 53, F-22440, Ploufragan, France

<sup>b</sup> Université de Nantes, CNRS, Inserm, CRCINA, F-44000, Nantes, France

<sup>c</sup> Office Français de la Biodiversité (OFB), Direction de la Recherche et de l'Appui Scientifique, Unité Petite Faune Sédentaire et Espèces Outre-Mer, CS 42355, F-44323, Nantes Cedex 3, France

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Calicivirus  
Lagovirus  
HaCV  
Genetic evolution  
VP60 capsid protein structural model  
Hare  
*Lepus europaeus*

## ABSTRACT

First recognized as highly pathogenic viruses, hare lagoviruses belonging to genotype GII.1 (EBHSV) infect various *Lepus* species. Genetically distinct benign lagoviruses (Hare Calicivirus, HaCV) have recently been identified but few data have been available so far on these strains. The analysis of 199 samples from hunted hares collected throughout France allowed the detection of 20 HaCV and showed that they were widely distributed in this country. Ten HaCV capsid protein gene sequences were characterized. A first HaCV capsid protein structural model was proposed, revealing a global structure similar to that of a pathogenic GII.1 strain. The HaCV sequences showed an even higher genetic diversity than previously appreciated, with the characterization of two genotypes (GII.2, GII.3) and several additional putative genotypes. The most recent common ancestor for HaCV VP60 gene was estimated to be much older than that for GII.1 pathogenic strains. These results give new insights into the phylogenetic relationships of HaCV within the *Lagovirus* genus.

## 1. Introduction

The *Lagovirus* genus (*Caliciviridae* family) groups RNA viruses infecting European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and several hare species (*Lepus* spp.) worldwide. The proposal for a classification system defined a single species *Lagovirus europaeus* (Le Pendu et al., 2017). Based on full-length capsid protein (VP60) gene sequences, the proposed genus was divided into genogroups GI and GII. GI was subdivided into four genotypes: GI.1 and GI.2 that include highly pathogenic viruses for both rabbits and hares related to rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), whereas GI.3 and GI.4 encompass benign viruses infecting rabbits. GII comprises one genotype (GII.1) that includes highly pathogenic viruses related to European brown hare syndrome virus (EBHSV). GII.1, GI.1 and GI.2 pathogenic viruses, first detected in 1980 in Sweden, in 1984 in China and in 2010 in France, respectively (Gavier-Widén and Mörner, 1991; Liu et al., 1984; Le Gall-Reculé et al., 2011a), cause acute necrotizing hepatitis.

The circulation of benign lagoviruses in leporid populations was suspected after identification of GI.1- or GII.1-seropositive samples predating the first outbreak descriptions of (Frölich et al., 2003; Robinson et al., 2002; Rodak et al., 1990). The first benign lagovirus, designated Rabbit Calicivirus (RCV), was described in 1996 in Italy (Capucci et al., 1996). Genetically distinct benign rabbit lagoviruses were subsequently characterized: GI.3/RCV-E1 (Moss et al., 2002; Le Gall-Reculé et al., 2011b), GI.4/RCV-E2 (Le Gall-Reculé et al., 2015) and GI.4/RCV-A1 (Strive et al., 2009). These lagoviruses target the duodenum and cause no mortality in experimentally infected rabbits (Le Gall-Reculé et al., 2011b; Strive et al., 2010). In comparison with rabbits, few data on benign lagoviruses are available in hares. The first presumably benign virus was detected from farmed hares in Italy in 2014 and its VP60 gene sequence was obtained (KR230102). This lagovirus, designated Hare Calicivirus (HaCV), was serologically and phylogenetically distinct from GII.1 viruses (Cavadini et al., 2015). It likely belongs to a new but not yet confirmed genotype (GII.2?; Le

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [clement.droillard@anses.fr](mailto:clement.droillard@anses.fr) (C. Droillard), [evelyne.lemaitre@anses.fr](mailto:evelyne.lemaitre@anses.fr) (E. Lemaitre), [agnes.quemener@univ-nantes.fr](mailto:agnes.quemener@univ-nantes.fr) (A. Quémener), [francois-xavier.briand@anses.fr](mailto:francois-xavier.briand@anses.fr) (F.-X. Briand), [jean-sebastien.guitton@oncs.gouv.fr](mailto:jean-sebastien.guitton@oncs.gouv.fr) (J.-S. Guitton), [stephane.marchandeu@oncs.gouv.fr](mailto:stephane.marchandeu@oncs.gouv.fr) (S. Marchandeu), [jacques.le-pendu@univ-nantes.fr](mailto:jacques.le-pendu@univ-nantes.fr) (J. Le Pendu), [nicolas.eterradossi@anses.fr](mailto:nicolas.eterradossi@anses.fr) (N. Eterradossi), [ghislaine.legall-recule@anses.fr](mailto:ghislaine.legall-recule@anses.fr) (G. Le Gall-Reculé).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104310>

Received 16 December 2019; Received in revised form 16 March 2020; Accepted 30 March 2020

Available online 01 April 2020

1567-1348/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Pendu et al., 2017). Another HaCV strain was detected from an apparently healthy French wild hare in 2015. Its entire genome sequence (MH204883) showed a genomic organization typical of lagoviruses and 79% nucleotide identity with GII.1 viruses (Droillard et al., 2018). That study underlined the high genetic distance between the Italian and French HaCV VP60 sequences (15.3%). Recently, three phylogenetically distinct HaCV were characterized from apparently healthy Australian wild hares in 2016–2017. Genomic sequences (MK138383-MK138385; Mahar et al., 2019) shared between 74 and 78% nucleotide identity across sequenced regions and the authors suggested that they could belong to three putative genotypes.

We aimed at characterizing new HaCV from wild *Lepus europaeus* collected in France to improve our knowledge of the genetic diversity and evolutionary pattern within the *Lagovirus* genus. Ten new VP60 gene sequences were used to establish the phylogenetic relationships between hare lagoviruses and to estimate the substitution rate and TMRCA in capsid genes. We obtained the first structural model of a HaCV VP60 and compared it with that of a pathogenic hare lagovirus.

## 2. Materials and methods

Duodenum samples from 199 hunted and apparently healthy hares collected throughout France during the hunting season 2014–2015 and one liver from a dead hare collected in 2014 were analyzed. No animals were killed for the purpose of this study. Total RNAs were extracted from duodenum or liver samples as previously described (Le Gall-Reculé et al., 2011b). Screening for lagovirus RNA was performed from duodenum samples by one-step RT-PCR using U38 and L337 as primers (Le Gall-Reculé et al., 2011b) and SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum Taq HiFi (Invitrogen). For the liver sample, RNAs were reverse transcribed and amplified using the U38/EBHS9 PCR (Lopes et al., 2013). Complete VP60 genes were amplified by PCR or semi-nested PCR using a set of primers (Table S1). Sequencing of the PCR products, compilation of the consensus sequences and their genotyping were performed as described in Le Gall-Reculé et al. (2017).

For homology modelling of HaCV VP60, sequence alignment of selected templates and VP60 sequences from HaCV E15–219 (MH992074) and GII.1 O282/Sweden/1984 (KJ679522) was calculated from pairwise structure alignment (Align123 algorithm, Discovery Studio 2017, Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego) and manually optimized (Fig. S1). Conditions for the structure model determination are indicated in the Fig. S2 caption.

Complete and nearly complete lagovirus VP60 sequences available in nucleotide databases were aligned with the characterized HaCV sequences using ClustalW (MEGA software version 7; Kumar et al., 2016). The phylogenetic relationships among the selected sequences were estimated using the maximum likelihood method (MEGA7). Pairwise nucleotide distance comparisons based on the p-distance model, complete deletion option, were conducted in MEGA7 with 25 HaCV VP60 sequences.

The rate of both nucleotide substitution per site and the time to most recent common ancestor (TMRCA) were estimated for HaCV and GII.1 VP60 genes by using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach (BEAST package version 1.8.4; Drummond et al., 2012). Complete HaCV sequences were analyzed (19/25) and a selection of GII.1 sequences representing the genetic diversity was used.

## 3. Results and discussion

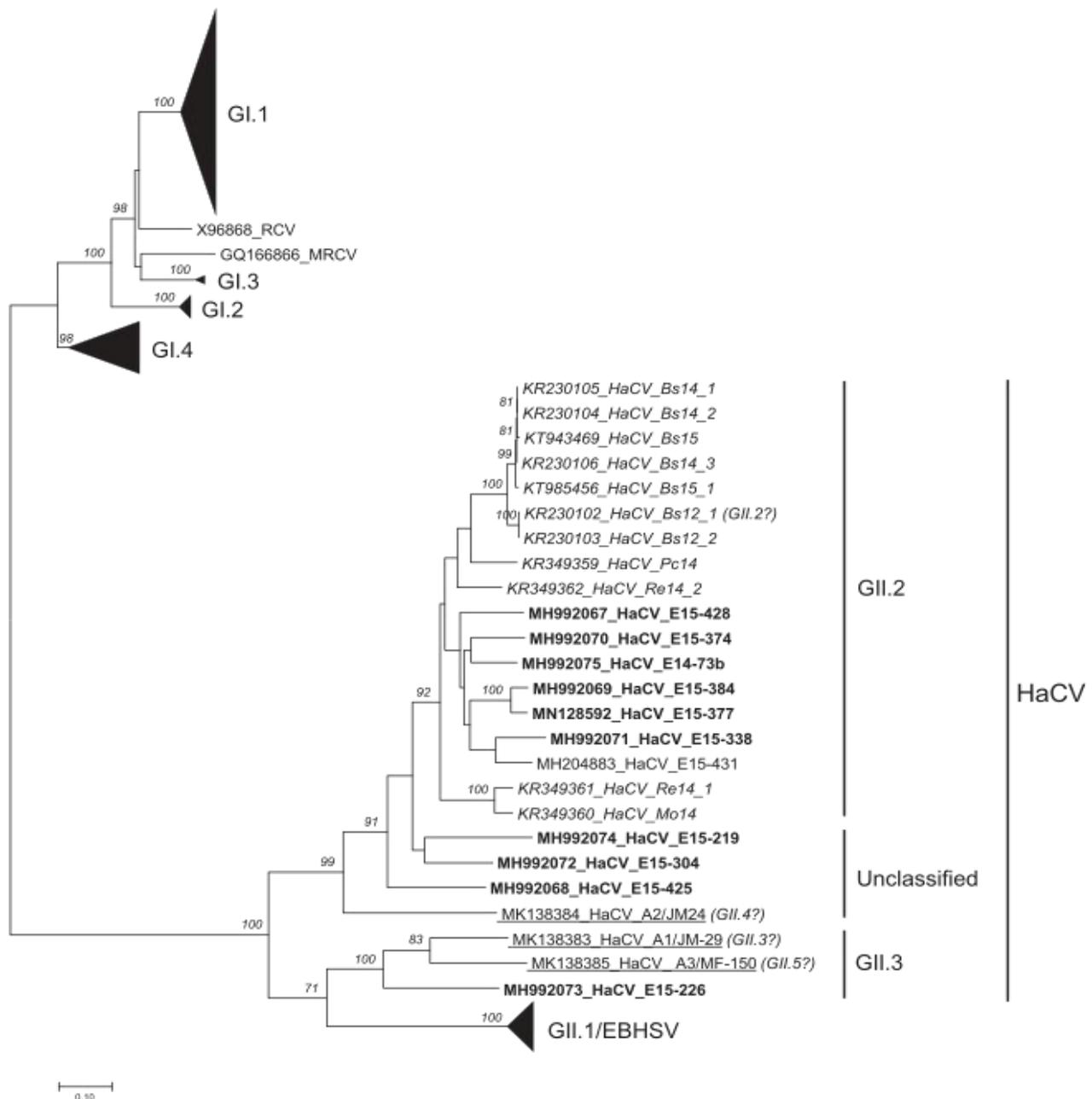
Twenty HaCV were detected from samples collected in different French regions revealing that they are well represented in *Lepus europaeus* populations. In addition to the French HaCV/E15–431 previously characterized (Droillard et al., 2018), ten VP60 genes were sequenced (MH 992067-MH992075, MN128592), which constitutes a significant contribution to the knowledge of the genetic diversity and distribution range of HaCV.

HaCV VP60 sequences were 1731 nucleotides long (576 aa long) except HaCV/E15–226 that was 1728 nucleotides long (575 aa long) due to a deletion of three nucleotides in frame (nt 1224–1226, aa 408). The average nucleotide genetic distance between the French HaCV and GII.1 was 25%. The closest rabbit lagovirus genotypes were GI.4 (28%), then both GI.1 and GI.2 (30%), and GI.3 (31%). Between themselves, the French HaCV sequences exhibited between 6.0% and 26.8% divergence (between 2.2% and 14.6% at aa level). Except HaCV/E15–226, the French sequences had a 17% average genetic distance with the Italian HaCV, 22% with the Australian HaCV-A2 and 26% with the Australian HaCV-A1 and HaCV-A3 sequences. The HaCV/E15–226 sequence exhibited an average genetic distance of 26% with the Italian HaCV and HaCV-A2 sequences, but 20% with the HaCV-A1 and HaCV-A3 sequences and the same deletion.

The HaCV/E15–219 VP60 was predicted to have the same structural organization as other lagovirus VP60 (Fig. S2) and comparison with that of EBHSV/O282/Sweden/1984 VP60 showed overall homology despite some differences especially in the flexible loops of the protrusion P2 subdomain.

The proposal for lagovirus taxonomy defines as a new genotype any well-supported phylogenetic group (bootstrap value > 70), gathering at least three VP60 nucleotide sequences from epidemiologically independent strains and with an average genetic distance between sequences > 15% with the other phylogenetic groups (Le Pendu et al., 2017). Thus, phylogenetic analyses based on the lagovirus VP60 sequences including the 15 HaCV previously characterized and the 10 HaCV from this study revealed that HaCV formed two genotypes, GII.2 and GII.3 (Fig. 1). Both were genetically distant from known lagovirus genotypes but were more related to GII.1. GII.2 was highly supported (bootstrap value 92) and included sequences of the 11 Italian HaCV and of seven French HaCV. GII.3 was highly supported (bootstrap value 100) and included the sequences of the Australian HaCV-A1 and HaCV-A3 with that of the French HaCV/E15–226. The three French HaCV/E15–219, HaCV/E15–304 and HaCV/E15–425 as well as the Australian HaCV-A2 remained unclassified (Fig. 1). However, the high genetic diversity displayed by the HaCV strains strongly suggests that more genotypes could later be defined including the four putative genotypes previously identified (Le Pendu et al., 2017; Mahar et al., 2019). In comparison with rabbit benign lagoviruses divided into two genotypes (GI.3, GI.4), the higher genetic diversity among hare lagoviruses might suggest that HaCV viruses evolved in hares during a longer time span than benign viruses did in rabbits. Of note, GII.3 contains two Australian and one French strains, confirming that the Australian HaCV do not cluster into a lineage separate from that of the European viruses (Mahar et al., 2019). These sequences shared the same residue deletion, a feature not found in any other lagovirus sequences. These findings suggest a common genetic origin of European and Australian HaCV strains and support the hypothesis of the introduction of HaCV in Australia with the introduction of HaCV-infected hares from Europe.

The MCC tree was performed with 19 HaCV and 20 selected GII.1 complete VP60 nucleotide sequences (Fig. 2). MCMC analysis revealed that the mean rate of evolutionary change in GII VP60 gene was  $2.71 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions per site per year (subs/site/year) with a variation across coalescent model of  $1.98\text{--}3.43 \times 10^{-3}$  subs/site/year (95% HPD values). It was similar to the GII.1 and GI.1 VP60 genes and slightly higher than that of GI.2 (Table 1). Thus, the TMRCA for GII.1 VP60 gene was estimated in 1974 (1969–1980) (Table 2), consistent with the time of emergence of EBHS in Europe and validates the mean rate of evolutionary change determined in GII VP60 gene. The TMRCA for GII.2 and unclassified HaCV VP60 genes and for GII.3 VP60 gene were estimated before that of GII.1 (1879 and 1923, respectively; Table 2). With the current dataset, it is not possible to firmly conclude that GII.1 appeared after HaCV, but the characterization of GII.1 together with the first reports of outbreaks in 1980 strongly suggest that HaCV circulated earlier. The estimated TMRCA for HaCV and GII.1 VP60 genes (1813) also suggests that HaCV have evolved in hares on a



**Fig. 1.** Maximum likelihood phylogenetic tree of complete and nearly complete lagovirus VP60 gene nucleotide sequences ( $n = 190$ ). The maximum likelihood method (MEGA software version 7; Kumar et al., 2016) was implemented with the GTR +  $\Gamma$  model of nucleotide substitution and a NNI branch-swapping. The Jalview2 software (Waterhouse et al., 2009) was used to reduce the number of available sequences in nucleotide databases (redundancy threshold of 98). The final dataset is 190 sequences. The tree was rooted using GI viruses. Significant bootstrap values greater than 70 for 1000 replicates are shown in italic after each node. Lagovirus genotypes GI.1–4 and GII.1 are represented as collapsed in order to reduce the tree size and highlight the HaCV sequences. French HaCV sequenced in this study are shown in bold, Italian HaCV in italics and Australian HaCV are underlined. The four putative HaCV genotypes (GII.2–4?) previously suggested by Le Pendu et al. (2017) and Mahar et al. (2019) are indicated in italics for the corresponding HaCV strains.

longer time span than GII.1 (Table 2). These results suggest that one unique event occurred before 1980, associated with appearance of pathogenic lagoviruses in hares. However, the current dataset is not sufficient to determine whether pathogenic lagoviruses were generated because of mutations of a benign virus and/or from a species jump as hypothesized by Esteves et al. (2015).

More HaCV VP60 sequences from a broader geographic range are needed to confirm the putative genotypes and improve the accuracy of the TMRCA analysis. Obtaining the complete genomic sequences of the characterized HaCV would help to understand their evolutionary history. Animal experiments are also required to ascertain the phenotype

of these HaCV viruses presently considered as benign.

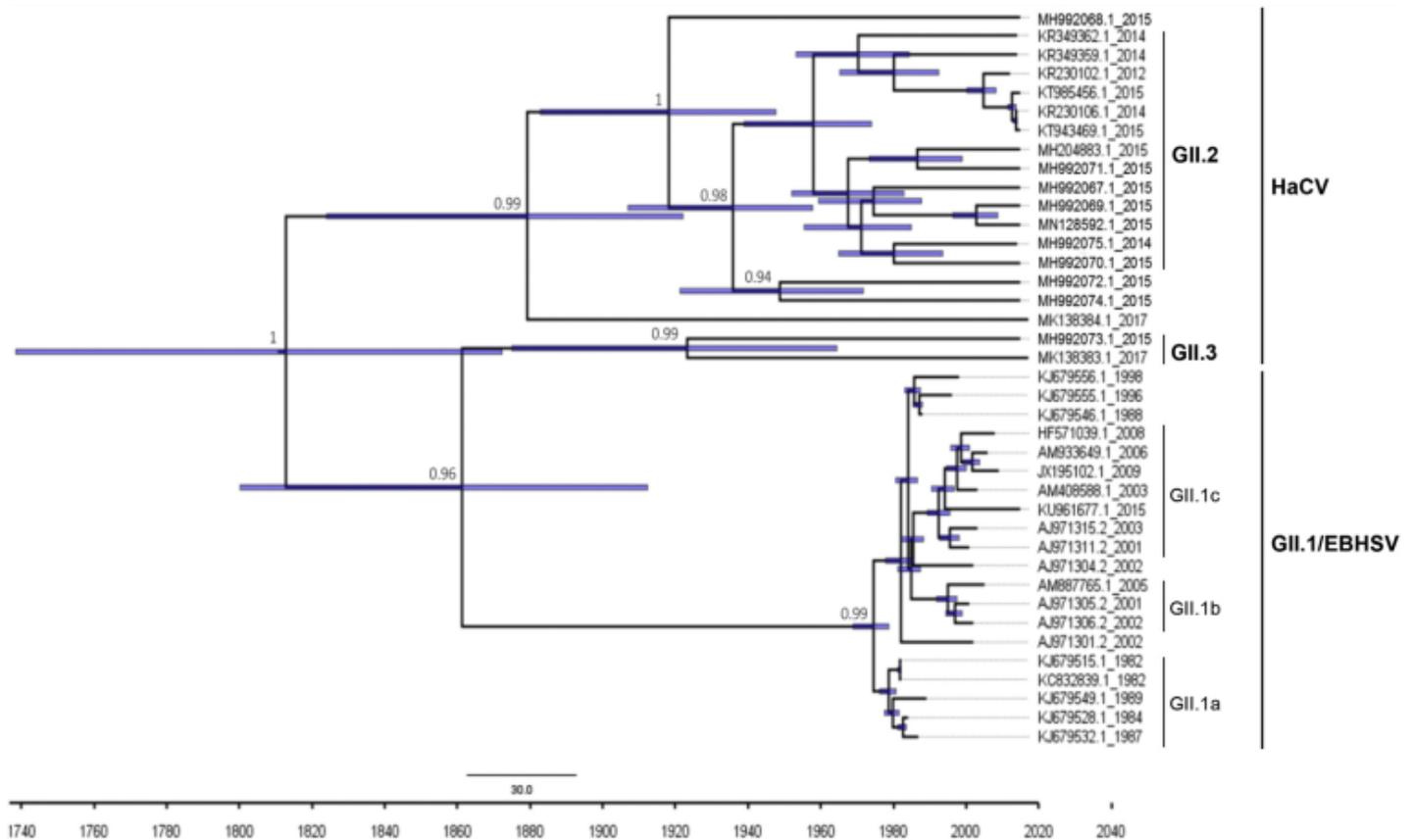
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104310>.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interests.

#### Acknowledgements

We are grateful to R. Bouteiller (FDC 80), G. Chavas (FDC 42), B.



**Fig. 2.** Maximum Clade Credibility (MCC) tree of complete HaCV VP60 sequences ( $n = 19$ ) and a selection of complete GII.1 sequences ( $n = 20$ ) representing the genetic diversity (GII.1a-c). The time-scale (x-axis) is given in years. The node bars depict 95% HPD values on node height (age) and Bayesian posterior probability values  $> 0.9$  are shown for major nodes. In all cases, tip times reflect the collection date of the sample. Relaxed (uncorrelated lognormal) molecular clocks and a substitution model using the Hasegawa, Kishino and Yano HKY +  $\Gamma$  + I substitution model with a different rate assigned to each codon position were used. Constant coalescent population size was used in all cases. MCMC chains were run for 100 million generations (assessed by using the TRACER program: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) with uncertainty in parameter estimates reflected in values of the 95% highest probability density (HPD). Maximum Clade Credibility (MCC) tree from all of the plausible trees created was obtained using the TreeAnnotator program with the first 10% trees removed as burn-in.

**Table 1**  
Mean rates of evolutionary change determined for VP60 genes of lagovirus genotypes.

VP60 gene	Mean rate of evolutionary change (substitution/site/year)	95% highest posterior density (HPD) interval	Reference
GII	$2.71 \times 10^{-3}$	$1.98\text{--}3.43 \times 10^{-3}$	This study
GII.1	$3.00 \times 10^{-3}$	$2.60\text{--}3.60 \times 10^{-3}$	Lopes et al., 2014
GI.1	$2.77 \times 10^{-3}$	$2.47\text{--}3.08 \times 10^{-3}$	Eden et al., 2015
GI.2	$3.93 \times 10^{-4}$	$3.32\text{--}4.58 \times 10^{-4}$	Silvério et al., 2018
GI.4/RCV-A1	$5.60 \times 10^{-3}$	$4.60\text{--}7.00 \times 10^{-3}$	Mahar et al., 2016

**Table 2**  
Estimation of the time to most recent common ancestor (TMRCA) for GII VP60 genes.

VP60 gene	TMRCA	95% highest posterior density (HPD) interval	Bayesian posterior probability (BPP)
GII.1	1974	1969–1980	0.99
GII.2 and unclassified HaCV	1879	1824–1922	0.99
GII.3	1923	1876–1964	0.99
GII.3 and GII.1	1861	1800–1915	0.96
HaCV and GII.1	1813	1738–1872	1.00

Degrange (FDC 69), T. Delhorme (FDC 56), F. Ehanno (FDC 33), F. Etienne (FDC 07), D. Goudenèche (FDC 47), A. Gouineau (FDC 17) as well as L. Benoit, F. Berger, L. Fruitet, Y. Léonard, J. Letty, N. Mathevet, B. Mauvy, F. Millot and G. Thébaud (OFB) who contributed to hare sampling. We thank the laboratory “Inovalys-Angers” (Angers, France) which sent us the hare liver sample.

This work was supported by a grant from the French National Research Agency (ANR, Agence Nationale de la Recherche) (contracts

ANR-14-ANWA-0004-01 and ANR-14-ANWA-0004-02) within the framework of the ECALEP project selected during the 2nd joint call of the ERA-Net Anihwa (Animal Health and Welfare), a Coordination Action funded under the European Commission’s ERA-Net scheme within the Seven Framework Programme (contract No. 291815). Clément Droillard enjoyed a doctoral fellowship co-funded by the Conseil Général des Côte-d’Armor and by Saint-Brieuc Armor Agglomération.

## References

- Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., Rossi, C., 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* 70, 8614–8623.
- Cavadini, P., Molinari, S., Pezzoni, G., Chiari, M., Brocchi, E., Lavazza, A., Capucci, L., 2015. Identification of a new non-pathogenic lagovirus in *Lepus europeus*. In: Albina, E. (Ed.), Changing viruses in a changing world. Proceedings of the Xth international congress for veterinary virologypp. 76–77.
- Droillard, C., Lemaitre, E., Chatel, M., Guitton, J.-S., Marchandeau, S., Eterradosi, N., Le Gall-Reculé, G., 2018. First complete genome sequence of a hare calicivirus strain isolated from *Lepus europaeus*. *Microbiol. Resour. Announc.* 7 e01224–18.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.
- Eden, J.S., Read, A.J., Duckworth, J.A., Strive, T., Holmes, E.C., 2015. Resolving the origin of rabbit hemorrhagic disease virus: insights from an investigation of the viral stocks released in Australia. *J. Virol.* 89, 12217–12220.
- Esteves, P.J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Cavadini, P., Gavier-Widén, D., Guitton, J.-S., Lavazza, A., Lemaitre, E., Letty, J., Lopes, A.M., Neimanis, A.S., Ruvoën-Clouet, N., Le Pendu, J., Marchandeau, S., Le Gall-Reculé, G., 2015. Emergence of pathogenicity in Lagoviruses: evolution from pre-existing nonpathogenic strains or through a species jump? *PLoS Pathog.* 11, e1005087.
- Frölich, K., Graf Kujawski, O.E.J., Rudolph, M., Ronsholt, L., Speck, S., 2003. European brown hare syndrome virus in free-ranging European brown hares from Argentina. *J. Wildl. Dis.* 39, 121–124.
- Gavier-Widén, D., Mörner, T., 1991. Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries: a review. *Rev. Sci. Tech.* 10, 453–458.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decors, A., Bertagnoli, S., Guérin, J.-L., Marchandeau, S., 2011a. Detection of a new variant of rabbit hemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* 168.
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Fages, M.-P., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Aubineau, J., Roobrouck, A., Botti, G., Lavazza, A., Marchandeau, S., 2011b. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* 410, 395–402.
- Le Gall-Reculé, G., Lemaitre, E., Briand, F.-X., Marchandeau, S., 2015. Characterization in France of non-pathogenic lagoviruses closely related to the Australian rabbit calicivirus RCV-A1: confirmation of the European origin of RCV-A1. In: Albina, E. (Ed.), Changing viruses in a changing world. Proceedings of the Xth international congress for veterinary virologypp. 183–185.
- Le Gall-Reculé, G., Lemaitre, E., Bertagnoli, S., Hubert, C., Top, S., Decors, A., Marchandeau, S., Guitton, J.-S., 2017. Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Res.* 48, 70.
- Le Pendu, J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Guitton, J.-S., Le Gall-Reculé, G., Lopes, A.M., Marchandeau, S., Alda, F., Almeida, T., Celio, A.P., Barcena, J., Burmakina, G., Blanco, E., Calvete, C., Cavadini, P., Cooke, B., Dalton, K., Delibes Mateos, M., Deptula, W., Eden, J.S., Wang, F., Ferreira, C.C., Ferreira, P., Foronda, P., Goncalves, D., Gavier-Widén, D., Hall, R., Hukowska-Szematowicz, B., Kerr, P., Kovaliski, J., Lavazza, A., Mahar, J., Malogolovkin, A., Marques, R.M., Marques, S., Martin-Alonso, A., Monterroso, P., Moreno, S., Mutze, G., Neimanis, A., Niedzwiedzka-Rystwej, P., Peacock, D., Parra, F., Rocchi, M., Rouco, C., Ruvoën-Clouet, N., Silva, E., Silverio, D., Strive, T., Thompson, G., Tokarz-Deptula, B., Esteves, P., 2017. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 98, 1658–1666.
- Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Qian, N.H., 1984. A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 16, 253–255.
- Lopes, A.M., Gavier-Widén, D., Le Gall-Reculé, G., Esteves, P.J., Abrantes, J., 2013. Complete coding sequences of European brown hare syndrome virus (EBHSV) strains isolated in 1982 in Sweden. *Arch. Virol.* 158, 2193–2196.
- Lopes, A.M., Capucci, L., Gavier-Widén, D., Le Gall-Reculé, G., Brocchi, E., Barbieri, I., Quemener, A., Le Pendu, J., Geoghegan, J.L., Holmes, E.C., Esteves, P.J., Abrantes, J., 2014. Molecular evolution and antigenic variation of European brown hare syndrome virus (EBHSV). *Virology* 468–470, 104–112.
- Mahar, J.E., Nicholson, L., Eden, J.S., Duchene, S., Kerr, P.J., Duckworth, J., Ward, V.K., Holmes, E.C., Strive, T., 2016. Benign rabbit caliciviruses exhibit evolutionary dynamics similar to those of their virulent relatives. *J. Virol.* 90, 9317–9329.
- Mahar, J.E., Hall, R.N., Shi, M., Mourant, R., Huang, N., Strive, T., Holmes, E.C., 2019. The discovery of three new hare lagoviruses reveals unexplored viral diversity in this genus. *Virus Evol.* 5, vez005.
- Moss, S.R., Turner, S.L., Trout, R.C., White, P.J., Hudson, P.J., Desai, A., Armesto, M., Forrester, N.L., Gould, E.A., 2002. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 83, 2461–2467.
- Robinson, A.J., Kirkland, P.D., Forrester, R.L., Capucci, L., Cooke, B.D., Philbey, A.W., 2002. Serological evidence for the presence of a calicivirus in Australian wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, before the introduction of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): its potential influence on the specificity of a competitive ELISA for RHDV. *Wildl. Res.* 29, 655–662.
- Rodak, L., Smid, B., Valicek, L., Vesely, T., Stepanek, J., Hampl, J., Jurak, E., 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J. Gen. Virol.* 71, 1075–1080.
- Silvério, D., Lopes, A.M., Melo-Ferreira, J., Magalhães, M.J., Monterroso, P., Serronha, A., Maio, E., Alves, P.C., Esteves, P.J., Abrantes, J., 2018. Insights into the evolution of the new variant rabbit haemorrhagic disease virus (GL2) and the identification of novel recombinant strains. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 983–992.
- Strive, T., Wright, J.D., Robinson, A.J., 2009. Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 384, 97–105.
- Strive, T., Wright, J., Kovaliski, J., Botti, G., Capucci, L., 2010. The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. *Virology* 398, 125–134.

## Supplementary Information

**Authors:** Clément Droillard, Evelyne Lemaitre, Marina Chatel, Agnès Quémener, François-Xavier Briand, Jean-Sébastien Guitton, Stéphane Marchandeu, Jacques Le Pendu, Nicolas Eterradosi, Ghislaine Le Gall-Reculé

**Title:** Genetic diversity and evolution of Hare Calicivirus (HaCV), a recently identified lagovirus from *Lepus europaeus*

Table S1. List of primers used to amplify and/or to sequence the gene encoding the capsid protein VP60 of the HaCV strains.

Primer	Primer sequence (5'-3')	Position (relative to GenBank accession number MH204883)
U38	CAGCGGGCACTGCTACCACAGCATC	5312-5336
L337	GAAGCGAAACTGCATGCCACCRGCCCA	5611-5637
EBHS9	CCAGCCCAACCAGCATAACAT	5599-5618
12u2	GGATCGTCTCGGTAGTACC	5246-5264
7255rev	CTACACTAGCATCATTATGCAT	7223-7244
U644	AGGCCAAGTGAGGACTTTGAGT	5920-5941
L1015	ATGTCAGGAAAGCCATCTGGTG	6269-6290
EBHS-like 1F	GCAAACACAGATGTTGTCAACC	5380-5401
EBHS-22Fwd	GGACGATAGTTTTGTGAATGT	5265-5285
HaCV-1000Rev	GAATCCAATTGCACCCATGTC	6286-6306
HaCV-1076Fwd	GTTCGGTGAGGTTTGGAACA	6342-6361
HaCV-811Rev	CATTCATGTTCCAGTGCCTGTT	6097-6118
HaCV-824Fwd	ACGTGCAACAGGCACTGGAA	6091-6110

1		50	
4EJR_4EGT	-----	-----	-----
4X1W	-----	-----	-----
O282_Sweden_1984	MEGKPRADAP	GTATTASVPG	TTTDGMDPGV
E15_219_2015_1	MEGKSRADAP	GTQTTASVPG	TTTDGMDPGA
			-----
	51		100
4EJR_4EGT	-----	--TWRTNFYY	NDVFTWSVAD
4X1W	-----	-----	APGSILYTVQ
O282_Sweden_1984	IGGPPQQASP	QESWRVNFY	NDVFTWSVTD
E15_219_2015_1	IGGPPQQVAP	QESWRVNFY	NDVFTWSVSD
			-----
	101		150
4EJR_4EGT	VLSQMYAGWA	GGMQFRFIVA	GSGVFGGRLV
4X1W	-----	-----	AAVIPPGEI
O282_Sweden_1984	VLSQMYAGWA	GGMQFRFIVA	GSGIFGGRLV
E15_219_2015_1	VLSQMYAGWA	GGMQFRFIVA	GSGIFGGRLV
			-----
	151		200
4EJR_4EGT	HVVIDARSLE	PVTITMPDLR	PNMYHPTGDP
4X1W	-----	-----	GLVPTLVLSV
O282_Sweden_1984	HVVIDARSLE	PVTITMPDLR	PENYHPTGDP
E15_219_2015_1	HVVIDARSLE	PVTITMPDLR	PENYHPTGEP
			-----
	201		250
4EJR_4EGT	STNAIQVTVE	TRPSDDFEFV	MIRAPSSKTV
4X1W	-----	-----	DSISPAGLLT
O282_Sweden_1984	TTSAIQVTVE	TRPSEDFEFV	LIRAPSSRTV
E15_219_2015_1	TTSAIQVTVE	TRPCEDFEFV	MIRAPSSRTV
			-----
	251		300
4EJR_4EGT	NRWNGQIVRL	QPVPGGFSTC	NRHWNLNGST
4X1W	NRWNGEIVGL	QPVPGGFSTC	NRHWNLNGST
O282_Sweden_1984	NRWGAPIVGL	QPVPGGFSTC	NRHWNMNGAT
E15_219_2015_1	NRWGTQISAL	QPVPGGFSTC	NRHWNMNGST
			-----
	301		350
4EJR_4EGT	SGNSSTNVLQ	FWYANAGSAI	DNPISQVAPD
4X1W	PGSSSNVLE	LWYASAGSAA	DNPISQIAPD
O282_Sweden_1984	PTGSATNTIE	TWYASAGTAT	TNPISNIAPD
E15_219_2015_1	TGPGSTNVIE	TWYASTGTAT	NNPISNIAPD
			-----
	351		400
4EJR_4EGT	VGFGGIWNSN	NGAPAATTVQ	AYELGFATGA
4X1W	VGFGGIWNSN	NGAPFVTTVQ	AYELGFATGA
O282_Sweden_1984	VGFGQVWNA	NGTPYVGTVQ	AYELGFALGA
E15_219_2015_1	VGFGVWNTS	NGAPYNGTVQ	AYELGFATGA
			-----
	401		450
4EJR_4EGT	YAVVTGTNQN	PTGLFVMASG	VISTPNASAV
4X1W	YGVAATGINQA	TAGLFVMSAG	VISTPNSSAI
O282_Sweden_1984	YGVAIAQSQS	SAGIIFLSKG	MVSTPGVAAT
E15_219_2015_1	YGVASGQSNV	AAGLFILSTG	IVSTSGPNAT
			-----
	451		500
4EJR_4EGT	VGKNTPIMFA	SVVVRTGDVN	AAAGSTNGTQ
4X1W	IGKNTPIMFA	SVVVRTGDIN	AEAGSTNGTQ
O282_Sweden_1984	IGKNTPIMFS	AVVVRTGDVN	AGAGSDNGTQ
E15_219_2015_1	VGRNVPMFA	GVIRRAGDIN	AGAGSVNGTQ
			-----
	501		550
4EJR_4EGT	SALMPGQFFV	WQLTFASGFM	EIGLSVDGYF
4X1W	SALMPGQFFV	WQLNFASGFM	ELGLSVDGYF
O282_Sweden_1984	SALPGQFFV	WQLNFASGFM	EVMNTDGYF
E15_219_2015_1	ASLQPGQFFV	WQLNFASGFL	EIGINVDGYF

```

                551                               576
                |                               |
4EJR_4EGT      PVGPRPSKST LVFNLGG-TT NGFSYV
                |                               |
4X1W           PVGPRPSTST LVYNL-----
O282_Sweden_1984 PVGVRPNTST LVFNLAGVAT TGYSYV
E15_219_2015_1 PVGVRPNTST LVFNLAGAAA TGFAYV

```

Fig.S1. Sequence alignment for the major capsid protein from Rabbit hemorrhagic disease virus GI.1a/RHDVa (PDB codes: 4EJR and 4EGT, respectively) and GI.2/RHDV2/b (PDB code 4X1W), European brown hare syndrome virus GII.1/EBHSV (O282\_Sweden\_1984; Lopes et al., 2014) and French Hare calicivirus HaCV (E15\_219\_2015\_1).

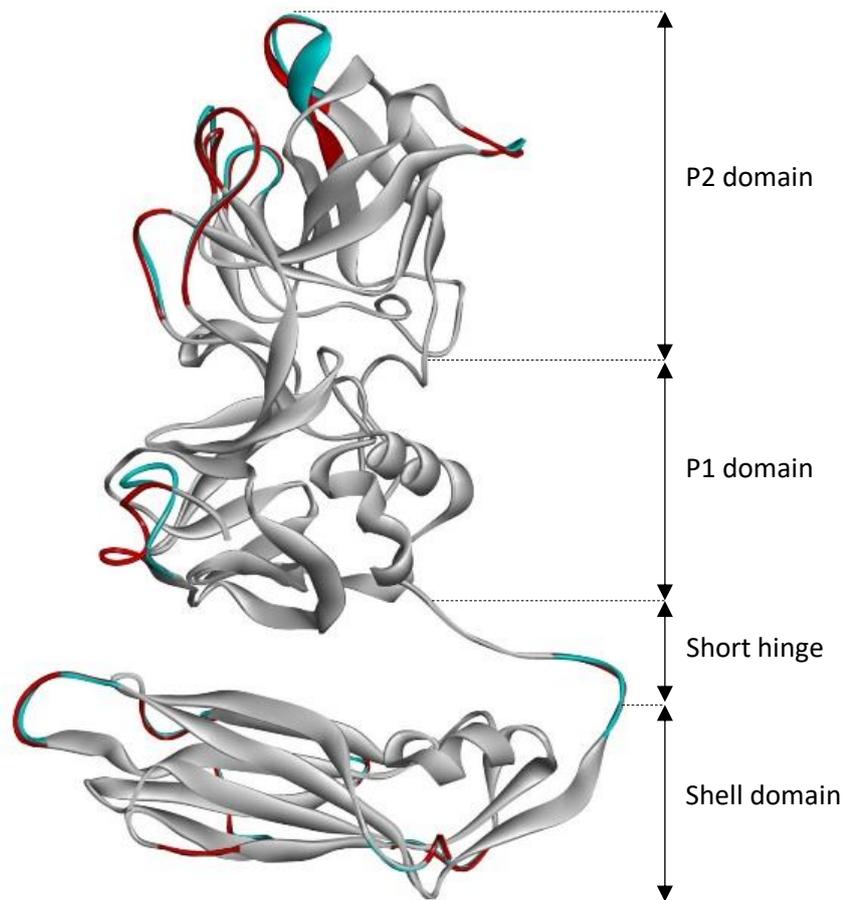


Fig.S2. Superposition and close up view of the capsid protein VP60 of HaCV (strain E15-219, Accession Number MH992074) and GII.1 (strain O282\_Sweden\_1984, Accession Number KJ679522). The perfect match between the two structures is shown here in grey, the HaCV VP60 in red and the GII.1 one in blue. Homology modelling was performed with Modeller program under DS 2017 using X-ray crystallographic structures of domain S (shell) and P (protrusion) of the VP60 from GI.1a (PDB codes: 4EJR and 4EGT, respectively) and the structure of domain P of GI.2 (PDB code 4X1W). The structures of both domains S and P of GI.1a were first superimposed into the atomic model of RHDV (PDB code 3J1P) to correctly position the two domains relative to each other. Structures were prepared by adding hydrogen atoms, removing water molecules, and inserting the missing loop region using the Prepare Protein tool within DS. The generated models were checked using Verify\_3D ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D](http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D)), ProsaII (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) and Procheck (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>) programs. The structures with the best stereochemical and folding qualities were retained. A series of energy minimizations was carried out with CHARMM force field implemented under DS 2017 in a two-step procedure to relax progressively the structures (1: all heavy atoms fixed; 2: heavy atoms of the backbone fixed) using 200 steepest descent steps with convergence obtained at 0.1rmsg, followed by conjugate gradient steps with convergence obtained at 0.001rmsg.

Publication 2

First Complete Genome Sequence of a Hare Calicivirus Strain Isolated from *Lepus europaeus*

Publiée dans *Microbiology Resource Announcements* 2018



# First Complete Genome Sequence of a Hare Calicivirus Strain Isolated from *Lepus europaeus*

Clément Droillard,<sup>a</sup> Evelyne Lemaitre,<sup>a</sup> Marina Chatel,<sup>a\*</sup> Jean-Sébastien Guitton,<sup>b</sup> Stéphane Marchandeau,<sup>b</sup> Nicolas Eterradosi,<sup>a</sup>  Ghislaine Le Gall-Reculé<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Avian and Rabbit Virology Immunology Parasitology Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses), Ploufragan, France

<sup>b</sup>Sedentary Small Fauna Unit, Research and Expertise Department, National Hunting and Wildlife Agency (ONCFS), Nantes, France

**ABSTRACT** The first full-genome sequence of a hare calicivirus (HaCV), recently characterized as a novel member of the *Caliciviridae*, is described. This presumed nonpathogenic lagovirus is 7,433 nucleotides long, shows the same genomic organization as that of other lagoviruses, and has the highest nucleotide identity (79%) with pathogenic European brown hare syndrome viruses.

The *Caliciviridae* family comprises five assigned genera, *Norovirus*, *Vesivirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, and *Nebovirus* (1). The *Lagovirus* genus contains a single species, named *Lagovirus europaeus*, which infects leporids. Its isolates are divided into two genogroups, with GI corresponding to rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)-related viruses, and GII. GII contains the pathogenic European brown hare syndrome virus (EBHSV, GII.1 genotype) and the hare calicivirus (HaCV), an unassigned genotype because still based on a single available capsid protein (VP60) sequence (2). HaCV, first detected in 2014 from healthy hares (*Lepus europaeus*) born and reared in an Italian farm, is presumed to be nonpathogenic (3).

In 2015 in France, HaCV strain E15-431 was detected by reverse transcription-PCR (RT-PCR) using PCR primers located in conserved regions for lagoviruses within the VP60 gene (4), in a hunted wild hare collected as part of the ECALEP European project. This project aimed at understanding the origin of pathogenic lagoviruses (5). Viral RNA was extracted from a piece of duodenum (tissue and content) and was reverse transcribed to cDNA using oligo(dT) and Maxima reverse transcriptase (Thermo Scientific). The genome was PCR amplified with the Expand high-fidelity PCR system (Roche) using combinations of primers designed in conserved regions of the lagovirus genomes or by using a genome-walking strategy. Eight overlapping fragments between 800 and 3,000 bp in length were generated. They covered the entire coding sequence. PCR products were sequenced with an Applied Biosystems 3130 Sanger-based genetic analyzer in both directions, and the consensus sequence was compiled using Vector NTI Advance 11. To confirm the obtained sequence, the amplification process was repeated but this time using primer pairs designed on the consensus. Five overlapping fragments were generated of approximately 2,000 bp, and these were again sequenced in both directions using Sanger technology. The genome extremities were acquired using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method (6). The complete genome sequence was compiled using Vector NTI Advance 11. Pairwise distance analysis was performed using the MEGA7 software (7).

The E15-431 genome sequence is 7,433 nucleotides (nt) in length, excluding the poly(A) tail. BLAST analysis of the entire genome shows that the most closely related viruses are the GII.1 lagoviruses, with 79% identity with the four characterized GII.1 entire genomes (GenBank accession numbers [KC832838](#), [KC832839](#), [Z69620](#), and [MF356366](#)). The nearest GI lagovirus shows 73% identity (GenBank accession number [KX357675](#)). The genomic RNA is organized into two open reading frames (ORFs). ORF1 is 7,008 nt long and encodes a 2,335-amino-acid (aa)-long protein, and ORF2 is 345 nt long and encodes a

Received 7 September 2018 Accepted 5 November 2018 Published 6 December 2018

**Citation** Droillard C, Lemaitre E, Chatel M, Guitton J-S, Marchandeau S, Eterradosi N, Le Gall-Reculé G. 2018. First complete genome sequence of a hare calicivirus strain isolated from *Lepus europaeus*. *Microbiol Resour Announc* 7:e01224-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01224-18>.

**Editor** Jelle Matthijnsens, KU Leuven

**Copyright** © 2018 Droillard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#).

Address correspondence to Ghislaine Le Gall-Reculé, [ghislaine.legall-recule@anses.fr](mailto:ghislaine.legall-recule@anses.fr).

\* Present address: Marina Chatel, Independent Researcher, Biéville-Quétieville, France.

114-aa-long protein. The length of the 5' untranslated region (UTR) is 9 nt, and that of the 3' UTR is 79 nt, excluding the poly(A) tail. The deduced ORF1 protein sequence was compared with a GI.1 polyprotein sequence for which cleavage sites have been experimentally described (8). From this comparison, it was clear that the deduced ORF1 of HaCV had the same order of nonstructural and structural proteins obtained after the proteolytic processing of the polyprotein. The nonstructural proteins p16, p23, helicase, p29, VPg, 3C-like protease, and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) are 139, 224, 349, 275, 115, 143, and 516 aa long, respectively. The major structural protein VP60 is 574 aa long. However, one out of the seven cleavage sites is different, since the E<sup>1251</sup>-T<sup>1252</sup> site is replaced by E<sup>1245</sup>-N<sup>1246</sup>, as reported for some GI.1 sequences (9, 10). In addition, the comparison of the E15-431 polyprotein with the four GI.1 ones shows a single amino acid insertion in HaCV p16. ORF2 encodes a protein similar to the GI.1 minor structural protein VP10. Pairwise distance analysis with the available HaCV VP60 sequence (GenBank accession number [KR230102](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR230102)) shows 84.7% nucleotide identity, underlying the high genetic distance between the two HaCV sequences. This study adds a new genomic sequence to the few sequences available on GI.1 lagoviruses and will facilitate research on the phylogenetic relationships of lagoviruses and on the origin of their pathogenicity.

**Data availability.** The full-genome sequence of HaCV E15-431 has been deposited in GenBank under the accession number [MH204883](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH204883).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Bouteiller (FDC 80), G. Chavas (FDC 42), B. Degrange (FDC 69), T. Delhomme (FDC 56), F. Ehanno (FDC 33), F. Etienne (FDC 07), D. Goudenèche (FDC 47), and A. Gouineau (FDC 17), as well as L. Benoit, F. Berger, L. Fruitet, Y. Léonard, J. Letty, N. Mathevet, B. Mauvy, F. Millot, and G. Thébaud (ONCFS) who contributed to hare sampling. We are grateful to P. Brown for correcting the English in the manuscript.

This work was supported by a grant from the French National Research Agency (Agence Nationale de la Recherche [ANR]) (contracts ANR-14-ANWA-0004-01 and ANR-14-ANWA-0004-02) within the framework of the ECALEP project selected during the 2nd joint call of the ERA-Net Anihwa (Animal Health and Welfare), a coordination action funded under the European Commission's ERA-Net scheme within the Seventh Framework Program (contract number 291815).

## REFERENCES

- Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, Koopmans MK, Matson DO, Meyers G, Neill JD, Radford A, Smith AW, Studdert MJ, Thiel H-J, Vinjé J. 2012. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (ed), Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, London, United Kingdom.
- Le Pendu J, Abrantes J, Bertagnoli S, Guitton JS, Le Gall-Reculé G, Lopes AM, Marchandeu S, Alda F, Almeida T, Celio AP, Barcena J, Burmakina G, Blanco E, Calvete C, Cavadini P, Cooke B, Dalton K, Delibes Mateos M, Deptula W, Eden JS, Wang F, Ferreira CC, Ferreira P, Foronda P, Goncalves D, Gavier-Widén D, Hall R, Hukowska-Szematowicz B, Kerr P, Kovaliski J, Lavazza A, Mahar J, Malogolovkin A, Marques RM, Marques S, Martin-Alonso A, Monterroso P, Moreno S, Mutze G, Neimanis A, Niedzwiedzka-Rystwek P, Peacock D, Parra F, Rocchi M, Rouco C, Ruvoën-Clouet N, Silva E, Silverio D, Strive T, Thompson G. 2017. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J Gen Virol* 98:1658–1666. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000840>.
- Cavadini P, Molinari S, Pezzoni G, Chiari M, Brocchi E, Lavazza A, Capucci L. 2015. Identification of a new non-pathogenic lagovirus in *Lepus europeus*, p 76–77. In Albina E (ed), Changing viruses in a changing world. Xth International Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France.
- Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Fages MP, Bertagnoli S, Gelfi J, Aubineau J, Roobrouck A, Botti G, Lavazza A, Marchandeu S. 2011. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* 410:395–402. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.001>.
- Esteves PJ, Abrantes J, Bertagnoli S, Cavadini P, Gavier-Widén D, Guitton JS, Lavazza A, Lemaitre E, Letty J, Lopes AM, Neimanis AS, Ruvoën-Clouet N, Le Pendu J, Marchandeu S, Le Gall-Reculé G. 2015. Emergence of pathogenicity in lagoviruses: evolution from pre-existing nonpathogenic strains or through a species jump? *PLoS Pathog* 11:e1005087. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005087>.
- Lemaitre E, Zwingelstein F, Marchandeu S, Le Gall-Reculé G. 2018. First complete genome sequence of a European non-pathogenic rabbit calicivirus (lagovirus GI.3). *Arch Virol* 163:2921–2924. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3901-z>.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO. 2000. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 276:349–363. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0545>.
- Le Gall G, Huguet S, Vende P, Vautherot JF, Rasschaert D. 1996. European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. *J Gen Virol* 77:1693–1697. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-8-1693>.
- Lopes AM, Gavier-Widén D, Le Gall-Reculé G, Esteves PJ, Abrantes J. 2013. Complete coding sequences of European brown hare syndrome virus (EBHSV) strains isolated in 1982 in Sweden. *Arch Virol* 158:2193–2196. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1714-7>.

## 2. Conclusions

La première publication décrit la diversité génétique des lagovirus HaCV et la première prédiction de structure de la protéine VP60 d'une souche HaCV. Comme il a été dit dans l'introduction de cette partie, 20 souches HaCV ont été détectées sur les 199 prélèvements duodénaux de lièvres collectés. Du fait des faibles charges virales des prélèvements, seules les séquences du gène VP60 de 11 HaCV (incluant celle du HaCV dont il a été possible de caractériser la séquence du génome entier, cf. publication 2) ont pu être caractérisées.

La prédiction de structure de la protéine VP60 a révélé avoir une organisation identique à celle des VP60 des autres lagovirus, à savoir un bras N-terminal (NTA), un domaine S (Shell), une courte charnière et un domaine P (Protrusion) subdivisé en deux sous-domaines, P1 et P2. La comparaison de cette structure avec la prédiction de structure d'une protéine VP60 d'EBHSV, a seulement montré une différence d'orientation d'une boucle du domaine P2.

Les séquences obtenues partagent entre 0,6 % et 26,8 % de distance génétique. L'identité nucléotidique moyenne entre les 11 séquences HaCV et les EBHSV est de 75 %. Les lagovirus du lapin les plus proches sont les RCV-E2 et RCV-A1 avec une identité nucléotidique moyenne de 72 %. Les séquences HaCV partagent en moyenne 70 % d'identité nucléotidique avec les RHDV et les RHDV2, et 69 % avec les RCV-E1.

Les analyses phylogénétiques des séquences de gène codant les VP60 des souches HaCV (les 11 HaCV français et 14 HaCV étrangers) couplées aux distances génétiques obtenues, ont permis de définir deux nouveaux génotypes, GII.2 et GII.3, ainsi que quatre séquences non-classées dans le génogroupe GII, d'après la proposition de taxonomie de Le Pendu et al. (2017). Deux particularités ont été observées sur les séquences des GII.3. La première est une délétion en position 1224-1226 du gène VP60 (aa 408). La seconde est l'origine géographique des souches composant le génotype GII.3. En effet, ce génotype est composé d'une souche collectée en France et de deux souches collectées en Australie. Ce résultat suggère une origine commune de ces virus et soutient l'hypothèse de l'arrivée du HaCV en Australie lors des nombreuses introductions de lièvres infectés en provenance d'Europe. Ces lièvres ont été introduits comme espèce de gibier en Australie entre les années 1830 et 1870 (Chapman and Flux, 1990).

L'obtention de nouvelles séquences a permis l'étude de la fréquence d'évolution du gène codant la VP60 du génogroupe GII. Elle a été estimée à  $2,71 \times 10^{-3}$  substitution/site/an (1,93-3,43  $\times 10^{-3}$ , 95 % HPD) et correspond à la fréquence du gène codant la VP60 des autres génotypes de lagovirus. Cette étude a aussi permis d'estimer l'âge de l'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) des EBHSV et

des HaCV. Le tMRCA des EBHSV a été estimé entre 1969-1980. Cette période correspond au précédent tMRCA des EBHSV estimé par Lopes et al. (2014) et correspond aussi à la première détection de ces virus (Gavier-Widen et al. 1991).

Pour ce qui des HaCV, le tMRCA du gène codant la VP60 du génotype GII.2 a été estimé à 1824-1922 (95 % HPD) et celui du GII.3 a été estimé à 1876-1964 (95 % HPD). Ces résultats suggèrent que les ancêtres communs des virus HaCV circulaient bien avant les premières souches d'EBHSV détectées dans les années 1980.

La seconde publication décrit la première séquence de génome complet d'un virus HaCV. Un seul génome de virus HaCV a pu être amplifié et séquencé du fait de la faible charge virale présente dans les prélèvements duodénaux collectés. Le génome séquencé a révélé avoir la même organisation génomique que celle des autres lagovirus. Le lagovirus le plus proche de ce virus HaCV appartient au génotype GII.1 (EBHSV) et partage 79% d'homologie de séquence nucléotidique avec celui-ci. Cependant, quand comparé aux séquences génomiques d'EBHSV connues, le génome HaCV présente une insertion d'un acide aminé dans la protéine non structurale p16, tandis que l'un des sites de clivage de la polyprotéine est similaire à celui trouvé uniquement dans certains EBHSV.

Les analyses de recombinaison menées en parallèle de cet article n'ont pas permis d'identifier d'évènements de recombinaison sur le génome HaCV avec le jeu de données analysé, composé d'un représentant de chaque génotype de lagovirus et des génomes des virus non-classés.

L'ensemble de ces résultats a mis en évidence une diversité génétique des HaCV bien plus grande que celle connue avant nos travaux. L'obtention d'autres séquences VP60 d'HaCV, et notamment de différentes origines géographiques, sera nécessaire pour confirmer les génotypes putatifs identifiés dans la première publication, mais aussi pour compléter nos connaissances sur ces virus potentiellement non-pathogènes, et plus généralement nos connaissances sur les lagovirus. De même, il sera nécessaire de confirmer le phénotype non-pathogène des HaCV au travers d'expériences d'infection *in vivo*. Enfin, l'acquisition de plus de séquences de génomes complets d'HaCV pourra servir à étudier l'émergence des lagovirus pathogènes, comme cela a été le cas avec l'obtention et l'étude des séquences génomiques de RCV-E1 et de RHDV2 décrites dans la publication 3.

## II. Etude des liens évolutifs entre les lagovirus non-pathogènes RCV-E1 (GI.3) et les lagovirus pathogènes RHDV2 (GI.2)

### 1. Introduction

De nombreuses études ont eu pour but de caractériser le génome des lagovirus. Le premier génome caractérisé fut celui d'un virus GI.1/RHDV séquencé en 1991 (Meyers et al. 1991). Au début de nos travaux, près de 180 séquences de génome complet étaient disponibles dans la base de données Genbank. Parmi ces séquences, 45 génomes de lagovirus non-pathogènes, tous collectés en Australie, appartenant au génotype GI.4/RCV-A1 et partageant au moins 90,6 % d'identité nucléotidique (Strive et al. 2009; Mahar et al. 2016). Afin de mieux apprécier la diversité génétique existant chez les lagovirus non-pathogènes, notamment en dehors de l'Australie, et si possible de déterminer si les lagovirus pathogènes proviendraient de l'évolution de lagovirus non-pathogènes (par mutations progressives et/ou par recombinaison), des génomes complets et des régions codantes de lagovirus non-pathogènes GI.3/RCV-E1 et pathogènes GI.2/RHDV2 collectés en France ont été caractérisés.

Un précédent travail publié par l'équipe a en effet permis de caractériser le premier génome complet d'un lagovirus non-pathogène RCV-E1 collecté en France en 2006 (Lemaitre et al., 2018). Cette première séquence a révélé que ce virus était plus proche des lagovirus pathogènes RHDV2 que des autres lagovirus. Le RHDV2 a été décrit comme ayant rapidement recombinaison avec les lagovirus non-pathogènes RCV-A1 (Lopes et al., 2015, Silvério et al., 2017) mais aussi avec des lagovirus pathogènes GI.1b/RHDV (Lopes et al., 2015) et GI.1a/RHDV (Hall et al., 2018). Ces résultats nous ont poussés à caractériser d'autres génomes complets de lagovirus français RCV-E1 et RHDV2 pour lesquelles les séquences VP60 avaient été obtenues antérieurement au laboratoire afin de déterminer les liens évolutifs entre ces deux génotypes de lagovirus. Dans cette étude, les séquences de la région codante de quatre RCV-E1 récoltés entre 2007 et 2009, de deux génomes entiers et de deux régions codantes de RHDV2 (deux souches récoltées en 2010 lors de la découverte du RHDV2 et deux autres en 2016) ont été obtenues. Ces séquences ont été analysées avec des outils bioinformatiques afin de générer des arbres phylogéniques à partir de leurs régions structurales, non-structurales et du gène codant la protéine p16, trois régions génomiques décrites comme pouvant recombiner chez les lagovirus (Silvério et al. 2018). Pour identifier les recombinaisons, le logiciel RDP4 version 4.4 (méthodes RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan et 3Seq) (Martin et al. 2015) a été utilisé sur un jeu de données constitué de 221 séquences de génome complet de lagovirus. L'analyse bio-informatique de ces séquences est décrite dans la publication 3.

Publication 3

Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus *Lagovirus europaeus*/GI.2

Publié dans *Scientific Reports* 2020



OPEN

# Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus *Lagovirus europaeus*/GI.2

Joana Abrantes<sup>1,2</sup>✉, Clément Droillard<sup>3</sup>, Ana M. Lopes<sup>1,4</sup>, Evelyne Lemaitre<sup>3</sup>, Pierrick Lucas<sup>5</sup>, Yannick Blanchard<sup>5</sup>, Stéphane Marchandeau<sup>6</sup>, Pedro J. Esteves<sup>1,2</sup> & Ghislaine Le Gall-Reculé<sup>3</sup>

Rabbit haemorrhagic disease is a viral disease that emerged in the 1980s and causes high mortality and morbidity in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). In 2010, a new genotype of the rabbit haemorrhagic disease virus emerged and replaced the former circulating *Lagovirus europaeus*/GI.1 strains. Several recombination events have been reported for the new genotype *Lagovirus europaeus*/GI.2, with pathogenic (variants GI.1a and GI.1b) and benign (genotype GI.4) strains that served as donors for the non-structural part while GI.2 composed the structural part; another recombination event has also been described at the p16/p23 junction involving GI.4 strains. In this study, we analysed new complete coding sequences of four benign GI.3 strains and four GI.2 strains. Phylogenetic and recombination detection analyses revealed that the first GI.2 strains, considered as non-recombinant, resulted from a recombination event between GI.3 and GI.2, with GI.3 as the major donor for the non-structural part and GI.2 for the structural part. Our results indicate that recombination contributed to the emergence, persistence and dissemination of GI.2 as a pathogenic form and that all described GI.2 strains so far are the product of recombination. This highlights the need to study full-genomic sequences of lagoviruses to understand their emergence and evolution.

Since the 1980s, European rabbits worldwide, either domestic or wild, have been affected by rabbit haemorrhagic disease<sup>1</sup>. This highly contagious and fatal disease is caused by the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV), a single-stranded positive-sense RNA virus that belongs to the family *Caliciviridae*, genus *Lagovirus*. Benign rabbit caliciviruses that confer more or less protection against pathogenic strains, as well as moderately pathogenic strains, including Michigan rabbit calicivirus (MRCV), have also been described<sup>2-7</sup>.

In 2010, a new pathogenic lagovirus was identified in France<sup>8</sup>, formerly designated as RHDV2 or RHDVb and now as *Lagovirus europaeus*/GI.2 according to a proposal for a unified nomenclature for lagoviruses<sup>9</sup>. GI.2 caused unusual mortalities in rabbits vaccinated against GI.1 (former G1-G6) strains<sup>8,10</sup>. Further analysis revealed genetic differences that were reflected in its positioning in a phylogenetic tree based on capsid protein (VP60) sequences. GI.2 constituted a new phylogenetic group<sup>8,11</sup> with more than 15% divergence from all known benign and pathogenic lagoviruses. Other unique characteristics include its ability to fatally infect rabbits younger than two months (previously resistant to the disease)<sup>11,12</sup> and several hare species (*Lepus* spp.)<sup>13-17</sup>. Differences in disease duration, mortality rates, and in the frequency of occurrence of subacute/chronic forms have also been

<sup>1</sup>CIBIO/InBio-UP, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Research Network in Biodiversity and Evolutionary Biology, Universidade do Porto, Campus de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal. <sup>2</sup>Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal. <sup>3</sup>Unité de Virologie, Immunologie, Parasitologie, Aviaires et Cunicoles, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Ploufragan, France. <sup>4</sup>Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS)/Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), Universidade do Porto, Porto, Portugal. <sup>5</sup>Unité de Génétique Virale et Biosécurité, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Ploufragan, France. <sup>6</sup>Unité Petite Faune Sédentaire et Espèces Outre-Mer, Direction de la Recherche et de l'Appui Scientifique, Office Français de la Biodiversité (OFB), Nantes, France. ✉email: jabrantes@cibio.up.pt

documented<sup>11</sup>; moreover, since 2016, virulence of some GI.2 strains has increased to reach that of GI.1 viruses<sup>18</sup>. As for the other lagoviruses, the origin of GI.2 is still unknown.

Following its detection in France, GI.2 rapidly migrated through Europe, but also reached more distant places such as Oceania, Africa, and North America<sup>19</sup>, revealing an efficient dispersal and establishment. Replacement of the former circulating GI.1 strains was also reported<sup>11, 20–23</sup>. In the Iberian Peninsula, emergence of GI.2 was accompanied by several recombination events<sup>24, 25</sup>. These events involved the pathogenic GI.1b variant that circulated only in Iberian rabbit populations, and benign GI.4 strains (RCV-A1). In Australia, a recombinant GI.1a/GI.2 strain was recently characterised in rabbit and hare samples<sup>26</sup>. A recurrent recombination breakpoint was found at the boundary of the non-structural and structural encoding genes (between RdRp and VP60). A second recombination breakpoint was further detected at the junction of the two genes encoding the non-structural proteins p16 and p23<sup>25</sup>. While the biological implications of the different genomic composition of the recombinant strains remains to be assessed, it is clear that recombination plays a central role in the evolution of GI.2. Recombination might have also precipitated the emergence of GI.1 as a pathogenic form<sup>27</sup>, although this still remains under debate. Indeed, two hypotheses had been suggested for the emergence of pathogenic lagoviruses: either from a pre-existing benign lagovirus or following a species jump<sup>28, 29</sup>. Both hypotheses are sustained by multiple pieces of evidence and are not mutually exclusive, but they require further confirmation, especially following the recent emergence of the new pathogenic genotype GI.2.

In this study, and in order to disclose the emergence of pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus *Lagovirus europaeus*/GI.2, we sequenced the full-length genomic sequences of two GI.2 strains collected in the earliest outbreaks<sup>11</sup> and the coding sequences of two GI.2 strains collected more recently. We obtained also four new full coding sequences of benign GI.3 (RCV-E1) strains collected in France between late 2007 and early 2009, since GI.3 appears to have a closer relationship with GI.2<sup>30</sup>. Maximum-likelihood (ML) analyses were performed considering the recombination breakpoint identified by recombination detection methods<sup>24, 25</sup>.

## Results

In this study, we obtained eight new genome sequences: four for GI.3 and four for GI.2. These included four strains previously identified based on their capsid sequences as GI.3 (JA10/08-10, BO25/08-133, JA34/09-48 and CHA20/09-100; GenBank accession numbers: LT708119, LT708122, LT708127 and LT708128, respectively) and two strains as GI.2 (10-28 and 10-32; GenBank accession numbers: HE800531 and HE800532, respectively)<sup>9, 11</sup>. We obtained the full-length genomic sequences of strains 10-28 and 10-32, the complete coding sequences (CDS) of strains 16-35 and 16-36, and the CDS along with the 3' untranslated region (UTR) of the strains JA10/08-10, BO25/08-133, JA34/09-48 and CHA20/09-100.

The genomes of the earliest GI.2 strains 10-28 and 10-32 were 7,448 nucleotides (nt) long and shared 94.6% nucleotide identity. The length of the 5' UTR sequences is 9 nt and that of the 3' UTR is 70 nt. The closest strains were GI.3 strains with an average nucleotide identity of 93.8% (94.3% for the non-structural part of the genomes), while the average identity with GI.1 strains was 85% (86.4% for the non-structural part of the genomes). The genomes of the GI.3 strains were 7,427 nt long (excluding the 5' UTR), except the CHA20/09-100 strain that was 7,424 nt long. The 3' UTR sequences had the same length (64 nt). When including the GI.3 06-11 sequence (GenBank accession number MN737115), the average nucleotide identity between the five GI.3 strains was 97.1%. The CDS of the four GI.2 showed between 93.2% and 94.5% of nucleotide identity (93.2% between 16-35 and 16-36 strains), and when compared to GI.1 CDS presented no deletions or insertions (7,369 nt long), while the GI.3 CDS presented a deletion of six consecutive nucleotides within the capsid gene (7,363 nt long instead of 7,369 nt). This deletion is present in the benign strains 06-11, Ashington and the Italian RCV (GenBank accession numbers: EF558587 and X96868)<sup>2, 4, 7</sup> and comprises a codon putatively under positive selection in GI.1 strains<sup>31</sup>. The strain CHA20/09-100 had a further three nucleotide deletion in the minor structural protein VP10 (positions 193–195, amino acid 65).

The complete dataset (221 sequences; 7,368 nucleotides) was screened for recombination with RDP (Recombination Detection Program)<sup>32</sup>. The different methods available in RDP detected as recombinants, with strong statistical support (p-values < 0.05; Table 1), all the strains from the early GI.2 outbreaks (strains 10-28, 10-32 and N11), all the GI.2 strains previously identified as non-recombinants (strains CBVal16, Zar11-11, Rij06-12, Tar06-12, Zar06-12 and Seg08-12) and GI.2 strains more recently detected (16PLM1, NL2016, Canada2016, 16-35, 16-36). A single recombination breakpoint was determined at the non-structural/structural parts boundary (Table 1). For most of these strains, the GI.3 strain 06-11 was identified as the most likely donor for the non-structural part, with the exception of strain 16-36 for which the most likely donor is CHA20/09-100. A GI.2 strain (7-13\_Barrancos\_Portugal\_2013 or SOS155\_Portugal\_2015, GenBank accession numbers KF442963 and MG763946, respectively) was the most likely donor for the structural part. Thus, according to RDP all these sequences (GI.2 strains from the early outbreaks and GI.2 non-recombinant strains) are GI.3/GI.2 recombinants. The tanglegram based on the alignments for the non-structural and the structural genome partitions also evidenced as recombinants the strains identified by RDP (Fig. 1).

The phylogenetic analysis was performed taking into account the location of the recombination breakpoint detected by RDP at the junction of the non-structural and structural parts. In the ML tree of the structural part, which includes VP60 and VP10 (Fig. 2i), the GI.3 strains formed a strongly supported group (bootstrap value 100), that was a sister group to GI.1 (bootstrap value 100). The MRCV strain, a GI.4-like/GI.3-like recombinant<sup>33</sup>, also grouped with the GI.3 strains (bootstrap value 77). According to the nomenclature recently proposed for lagoviruses, MRCV does not meet the criteria to be considered as a member of the GI.3 group and is currently unclassified<sup>9</sup>. Indeed, the genetic distance between MRCV and GI.3 VP60 gene sequences is > 15% (data not shown) and no other similar strains (from independent outbreaks) had been identified. As for the four GI.2 sequences obtained in this study, they clustered within a highly supported group (bootstrap value 100) formed

Strains	Recombination breakpoint (nucleotide positions) <sup>a</sup>	Most likely donor strain		Methods and average p-value						
		Non-structural proteins	Structural proteins	RDP	GENECONV	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	3Seq
10-28 10-32 N11 CBVal16 Zar11-11 Tar06-12 Zar06-12 Rjj06-12 Seg08-12 16PLM1 NL2016 Canada2016 16-35	5,242–5,319	06-11 (GI.3; accession number MN737115)	7-13 Barrancos (GI.2; accession number KF442963)	$1.061 \times 10^{-126}$	$8.713 \times 10^{-70}$	$6.006 \times 10^{-125}$	$2.539 \times 10^{-27}$	$9.056 \times 10^{-36}$	$1.075 \times 10^{-44}$	$1.604 \times 10^{-10}$
16-36	5,231–5,423	CHA20/09-100 (GI.3; accession number LT708128)	SOS155 (GI.2; accession number MG763946)	$2.991 \times 10^{-108}$	$2.061 \times 10^{-91}$	–	$1.196 \times 10^{-32}$	$3.575 \times 10^{-32}$	$3.432 \times 10^{-39}$	$3.401 \times 10^{-10}$

**Table 1.** Results of the RDP recombination analysis. \*99% confidence interval.

by all the strains previously identified as having a GI.2 capsid, and that is more closely related to GI.1 and GI.3 than to GI.4. Two strains collected in the Netherlands<sup>34</sup> and Canada in 2016 and that were recently made available (GenBank accession numbers MN061492 and KY235675, respectively) were also part of the GI.2 cluster.

Regarding the ML tree of the non-structural part except p16 (Fig. 2ii), the four GI.2 strains obtained in this study 10-28, 10-32, 16-35 and 16-36 clustered with the GI.3 strains. This highly supported cluster (bootstrap value 100) further includes strains SOS148, SOS149, SOS151, SOS173, SOS404 and SOS468 previously identified as GI.4/GI.2/GI.2 (GI.4 for p16, and GI.2 for the remaining genome regions)<sup>25</sup>, GI.2 strains previously considered as non-recombinants (marked with an \*), and the 2016 strains from Canada (Canada2016) and the Netherlands (NL2016).

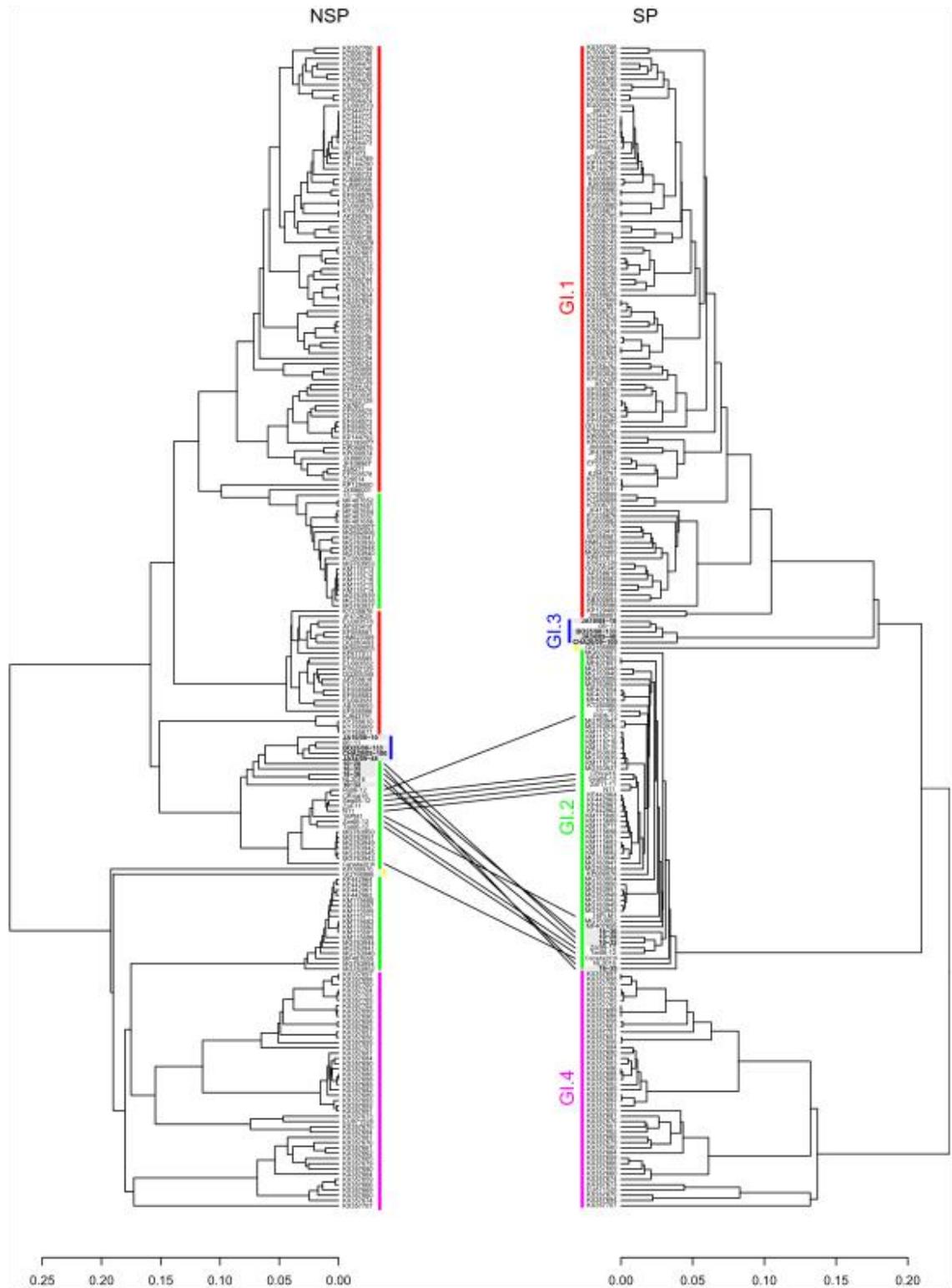
The ML tree for the non-structural protein p16 (see supplementary information), recapitulated most of the results observed in the ML tree for the non-structural part with the exception of the positioning of the Portuguese strains SOS137, SOS164, SOS148, SOS149, SOS151, SOS173, SOS404 and SOS468, that appear clustered with GI.4. Strains SOS137 and SOS164 were previously shown to be triple recombinants between GI.4, GI.1b and GI.2 (GI.4 for p16, GI.1b for the remaining non-structural proteins and GI.2 for the structural proteins)<sup>25</sup> which is in agreement with the results obtained in this study. As for strains SOS148, SOS149, SOS151, SOS173, SOS404 and SOS468, the tree suggests that their genome also originated from three different strains: GI.4 for p16, GI.3 for the remaining non-structural proteins and GI.2 for the structural proteins. In this case, it most likely involved recombination between a GI.4 strain and a GI.3/GI.2 recombinant strain. A tanglegram analysis and RDP further confirmed these results (see supplementary information).

## Discussion

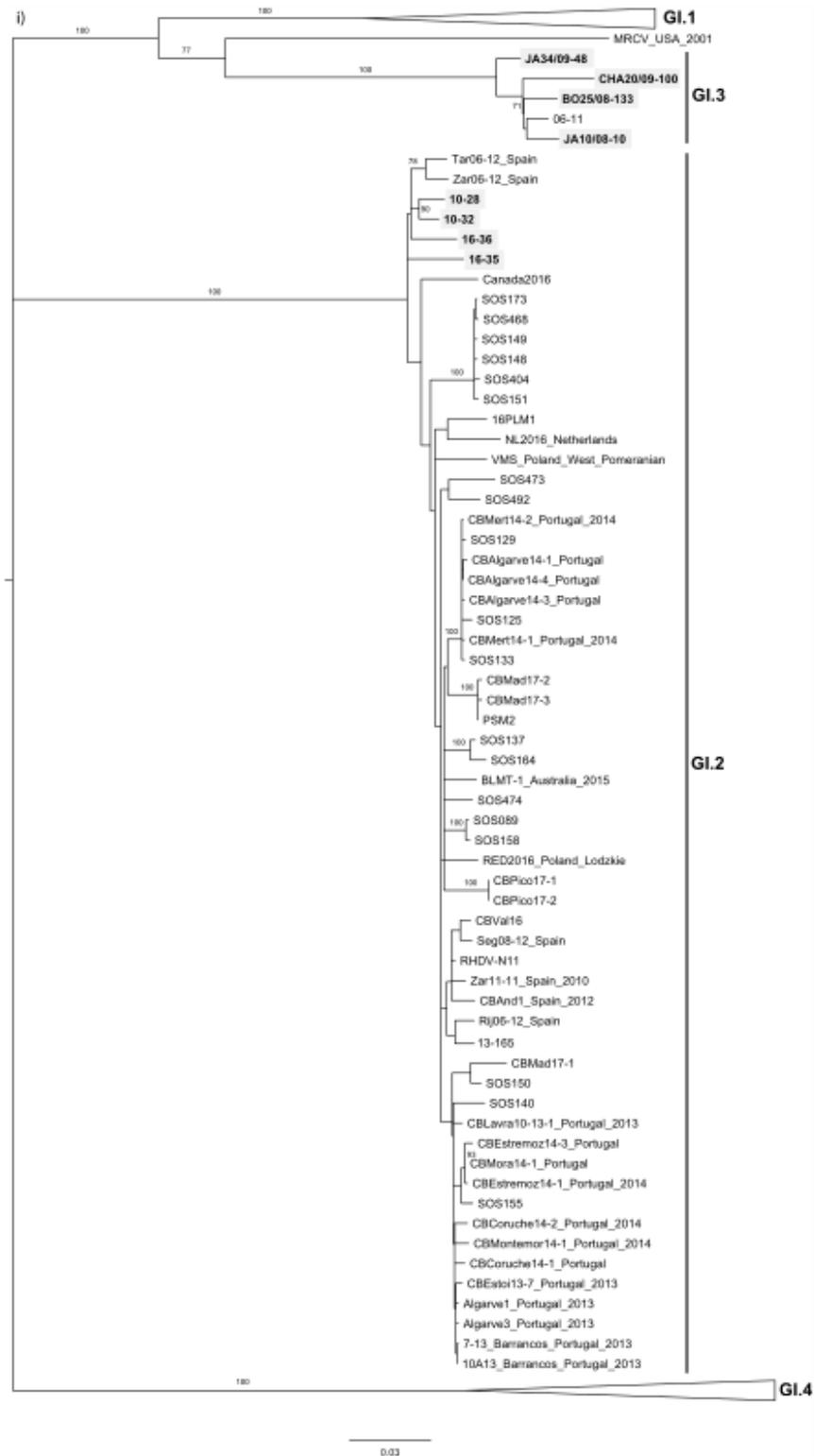
GI.2 was identified as a novel pathogenic form of lagovirus in France in 2010<sup>8</sup>. Field observations and further characterisation of the strains revealed unique characteristics in comparison with former strains such as the ability to cross the species boundaries<sup>13–17</sup> and to kill young rabbits<sup>11, 12</sup>. Previous studies also revealed the occurrence of recombination of GI.2 strains with non-pathogenic (GI.4) and pathogenic (GI.1a and GI.1b) strains<sup>24–26</sup>, showing an important role of recombination in generating diversity in GI.2 and confirming the high capacity of recombination within lagoviruses.

Our results show that the strains circulating at the time of the first noticed GI.2 outbreaks were already recombinants between a European non-pathogenic strain (GI.3), that was donor for the non-structural part, and the new lagovirus genotype, GI.2, that formed the structural part. Indeed, in our ML tree for the non-structural part, the strains from the first GI.2 outbreaks (10-28 and 10-32) grouped with the non-pathogenic GI.3 group, while for the structural part these strains clustered with all the strains of the newly emerged GI.2 genotype. Strains from the earliest outbreaks in Spain and Portugal in 2011–2012<sup>24</sup>, and strains collected in the Canary Islands (Spain)<sup>35</sup>, France, the Netherlands<sup>34</sup> and Canada in 2016 are also GI.3/GI.2 recombinants. These results, that were confirmed by the RDP, the ML trees and the tanglegram analyses, demonstrate that all the GI.2 strains described so far, including those that were considered non-recombinants and that in some instances co-circulated with other recombinant GI.2 strains<sup>24</sup>, resulted from recombination. Several recombination events are thus associated with the evolution of this new genotype: with GI.3, GI.4, GI.1b and GI.1a, with a recombination breakpoint at the non-structural/structural boundary<sup>24, 26</sup>. An additional recombination event was further previously reported with a breakpoint at the p16/p23 boundary and involved GI.4 as the donor of p16, while GI.3/GI.2 (see also supplementary information) or GI.1b/GI.2 recombinants were the donors for the remaining viral genome<sup>25</sup>.

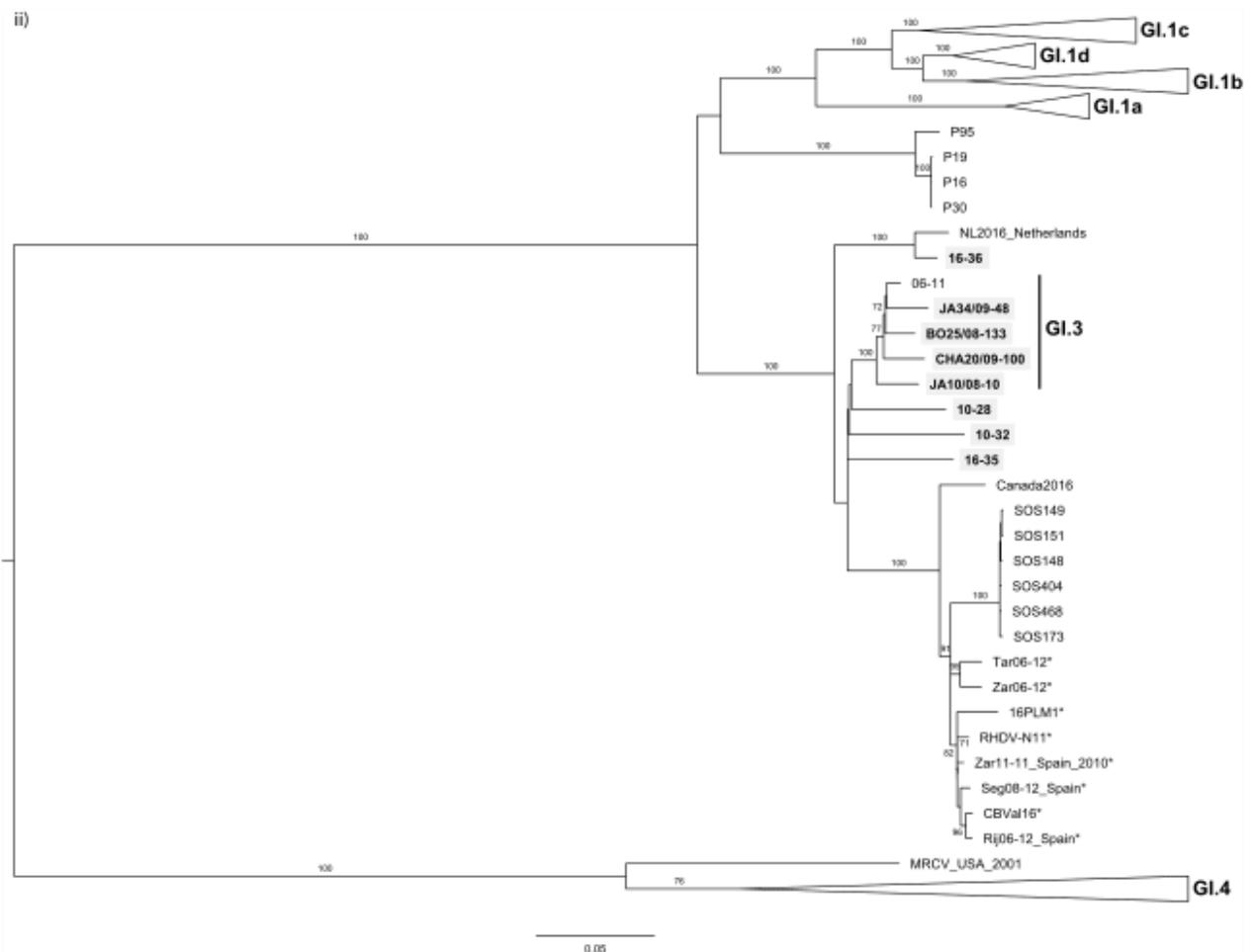
Notably, the pattern described here for lagoviruses, with a recombination hotspot at the start of the major structural gene that encodes the capsid, is typical of caliciviruses<sup>36–38</sup>. Indeed, the combination of low sequence divergence<sup>39</sup>, presence of complex RNA secondary structures<sup>39</sup> that may promote template switching by the virus polymerase, and the existence of a subgenomic RNA<sup>40</sup> that may act as a secondary template when RNA replication



**Figure 1.** Tanglegram for the non-structural (NSP) and structural genes (SP) of the 221 lagovirus sequences. For the tanglegram for the non-structural genes (NSP), colouring of the sequences is according to the genotype to which the strains belong to for the structural genes (SP): GI.1 (red); GI.2 (green); GI.3 (blue); GI.4 (purple); MRCV (yellow). Lines highlight the recombinant GI.3/GI.2 strains that were identified in the RDP recombination analysis. Sequences obtained in this study appear boxed in grey.



**Figure 2.** Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees for (i) the structural genes VP60 + VP10 (n = 221 sequences; nucleotides 5,296–7,369; nucleotide substitution model GTR + G +  $\Gamma_4$ ), and (ii) the non-structural genes except p16 (n = 221 sequences; nucleotides 430–5,295; nucleotide substitution model GTR + G +  $\Gamma_4$ ). Horizontal branch lengths are drawn to scale of nucleotide substitutions per site and the trees are mid-point rooted. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together was determined from 1,000 bootstrap replicates and is shown next to the branches (only bootstrap values  $\geq 70$  are shown). Genotype or variant assignment is according to the ML tree for the structural genes. Sequences obtained in this study appear boxed in grey. \* indicates strains considered previously non-recombinant GI.2, but now identified as GI.3/GI.2 recombinants. GenBank accession numbers of the sequences used are listed in supplementary information.



**Figure 2.** (continued)

is resumed upon template switching, seem to contribute for the high rates of recombination observed in this region in the genome of caliciviruses and that likely constitutes an important survival strategy in the evolution of this family<sup>41</sup>. This strategy, that resembles antigenic shift in Influenza virus<sup>41</sup>, allows caliciviruses to rapidly generate diversity by producing new genomic combinations, which might be beneficial for the adaptation to new hosts and environments, and to overcome selective pressures. Recombination is important in shaping the evolution of RNA viruses, including the closely related picornaviruses<sup>42</sup> and coronaviruses<sup>43</sup> and, more importantly, is often associated with the emergence of new viruses<sup>44</sup> and even families, e.g. the *Hepeviridae* family<sup>45</sup>. As for the recombination involving the breakpoint at the p16/p23 boundary, it may have originated from a non-replicative recombination mechanism where RNA strands are randomly self-ligated or joined by cellular ligases<sup>46</sup>. Atypical recombination breakpoints such as this have been also observed for other caliciviruses and a similar mechanism proposed<sup>47</sup>.

Estimation of the time to the most recent common ancestor (tMRCA) of GI.2 by using capsid sequences pointed to an emergence in July 2008<sup>25</sup>. Although the estimated substitution rates may be inaccurate due to limited sampling, reduced sequence variation and low temporal spread, they tend to underestimate rather than overestimate the real tMRCA<sup>48, 49</sup>. Thus, it is possible that despite surveillance efforts, GI.2 circulated unnoticed in wildlife prior to its detection<sup>50</sup>. The virus that recombined with GI.3 to produce this new genotype is currently unknown and undetected, even with the molecular surveys of lagoviruses performed in European leporids and our improved knowledge of the complete coding sequences of both pathogenic and benign lagoviruses. The same occurs for some older recombinant Iberian strains where the virus that originated the non-structural part has never been detected<sup>51</sup>. Both viruses, the one originating GI.2 and the one of these Iberian strains, could have either circulated harmlessly prior to their detection, thus making difficult to detect them, or have become extinct due to their lower fitness as a non-recombinant form, as suggested for noroviruses that recombined and whose partial sequences were never found<sup>52</sup>.

The evidence for recombination with GI.1a<sup>26</sup>, GI.1b<sup>24</sup>, GI.3 and GI.4<sup>24, 25</sup> (see also supplementary information) reveals that GI.2 successfully recombines with a great diversity of pathogenic and non-pathogenic lagoviruses. This, together with the tMRCA estimates and the hypothesis of circulating harmlessly before its emergence, supports an evolution from a non-pathogenic form that acquired pathogenicity<sup>28</sup>. We suggest that evolution of

pathogenicity was not driven solely by point mutations, but was aided by recombination events. Similarly to other RNA viruses, lagoviruses genomes may function as interchangeable modules rather than as strict genomes, which leads to the appearance of mosaic-like genomes through recombination, resulting in a semi-independent evolution of structural and non-structural genes<sup>53,54</sup> and with low-fitness regions being eliminated by recombination<sup>55</sup>. This might help to explain how a non-pathogenic strain (GI.3), combined with a potentially benign strain (GI.2), gave rise to a highly lethal, pathogenic strain. Non-pathogenic forms are thus likely to be involved in the evolution of pathogenic forms and recombination might have precipitated the emergence of *Lagovirus europaeus*/GI.2. The hypothesis of a species jump may not be discarded. Indeed, reservoir species could have acted as source for the original virus that jumped to the final host, the European rabbit<sup>28</sup>. Whether recombination occurred in the reservoir species or in the final host is unknown. Nonetheless, reservoir species have yet to be identified in which lagoviruses could have evolved and replicated without being detected before “jumping” into the European rabbit (Le Gall-Reculé, personal communication)<sup>56–59</sup>. Genetic mechanisms such as recombination require co-infection of a host cell by two (or more) viruses. The high frequency of recombination detected in lagoviruses also implies a high frequency of co-infection, either in the host population or in the reservoir species. Leeks and colleagues established a link between co-infection and viral diversity, as more diverse populations can produce more virulent infections and better adapt to new hosts<sup>60</sup>. This might explain the array of hare species infected by GI.2<sup>13–17</sup>, which constitutes a novelty in relation to GI.1.

Our results add complexity to the diversity of lagoviruses, but help to elucidate our current understanding on the emergence of pathogenic forms. In addition, they show that full genomic sequences of lagoviruses are crucial to understand their evolutionary history and genetic relationships. Future studies should focus on unravelling the role of the structural and the non-structural parts in the emergence of pathogenicity in lagoviruses.

## Methods

**Virus samples and full-length genome sequencing.** No animals were captured, handled or killed specifically for the purpose of this study. Duodenum samples were collected from four hunted French rabbits by the National Hunting and Wildlife Agency (ONCFS) during the hunting seasons in 2007–2008 and 2008–2009. Presence of lagoviruses had previously been detected in these samples and phylogenetic relationships of the obtained capsid VP60 gene sequences had been determined<sup>9</sup>; these were identified as GI.3 strains. Four liver samples were further collected in France from dead rabbits collected in three rabbitries affected by RHD, two on November 2010 (10-28 and 10-32 GI.2 strains<sup>11</sup>) and one in June 2016 (strain 16-35), and in the field on June 2016 (strain 16-36). The presence of GI.2 in the 16-35 sample was diagnosed by Labovet Conseil (Les Herbiers, France). We characterised this strain as well as the 16-36 one based on their complete VP60 gene sequences, confirming that they belong to the GI.2 genotype.

For the sequencing of the complete coding genome of GI.3 strains, ~30 mg of duodenal tissue were homogenized in a mixer-mill disruptor (TissueLysed, Qiagen, Hidden, Germany). RNAs were first extracted with TRIzol<sup>®</sup> (TRIzol LS Reagent, Ambion, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) before using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) to increase sensitivity<sup>3</sup>. For GI.2 strains, RNA was extracted from 100 µL of liver exudate using the RNeasy Mini kit. Except for two GI.2 strains (16-35 and 16-36) for which the coding sequence was obtained using NGS (see below) from purified and quantified RNA using the RNeasy MinElute cleanup kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the Qubit RNA HS Assay Kit with the Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), respectively, RNAs were reverse-transcribed using oligo-dT as a primer and Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Protocols were performed as recommended by the manufacturers.

According to the strains, different PCR strategies were attempted for genome sequencing either by using combinations of newly designed primers (primer sequences available upon request) or primers previously published<sup>3, 11, 14</sup>. Thus, cDNAs of JA10/08-10, BO25/08-133 and CHA20/09-100 GI.3 strains were amplified using several overlapping PCRs, including one that covered the recombinant breakpoint between the non-structural and structural encoding genes, using Expand High-fidelity PCR System (Roche, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). For JA34/09-48 GI.3 strain, due to lower viral loads, after two first PCRs that amplified two overlapping fragments of about 5,700 and 6,700 bp, respectively, several nested or semi-nested overlapping PCRs were performed. The complete coding sequences of the four GI.2 genomes were obtained following either one PCR amplification of about 7,300 bp using the primers 1U<sup>14</sup> and 15L<sup>11</sup> followed by smaller overlapping PCRs for sequence confirmation (10-28 and 10-32; primer sequences available upon request), or NGS (16-35 and 16-36, see below). For these two last strains, the 5' end sequence of the CDS (530 bp) was confirmed using the PCR primers 1U and 1L as described in Le Gall-Reculé et al. (2017)<sup>14</sup>. PCRs were performed using Expand High Fidelity enzyme (Roche-Applied-Science). The different PCR products were analysed by electrophoresis, purified using the MinElute PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using the Qubit dsDNA HS Assay Kit with the Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). DNA sequences were determined with an ABI Prism 3100 Genetic or a 3500 Series Genetic Analysers in both directions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the PCR and several inner primers and Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies) as recommended by the manufacturer. The 5' and 3' ends of the 10-28 and 10-32 strains were obtained using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method following the protocol developed in Lemaitre et al. (2018)<sup>30</sup>. PCR products were purified and sequenced as described above. Consensus sequences were compiled using Vector NTI Advance software (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

For NGS, cDNA libraries were prepared using the Ion Total RNA-Seq Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to a protocol adapted from the supplier's instructions (available upon request from the authors). Sequencing was performed using Ion Proton Sequencer (Life Technologies). The reads were cleaned with the

Trimomatic<sup>61</sup> (version 0.36) software (ILLUMINACLIP: oligos.fasta: 2:30:5:1: true; LEADING: 3; TRAILING: 3; MAXINFO: 40:0.2; MINLEN: 36). Then a Bowtie2<sup>62</sup> (version 2.2.5) alignment was performed with cleaned reads on local nucleotide databank to identify lagovirus references. All cleaned reads aligned by BWA<sup>63</sup> (version 0.7.15-r1140) on "*Oryctolagus cuniculus*" (reference genome from Ensembl) were excluded from further analysis. The references with the highest number of matching reads were used for a new alignment with BWA-MEM. The aligned reads of this third alignment were collected and then down-sampled to fit a global coverage depth estimation of 80x. These cleaned reads were submitted to the SPAdes<sup>64</sup> (version 3.10.0) de novo assembler and their raw related reads to the Mira<sup>65</sup> (version 4.0.2) de novo assembler. The *de novo* contigs were then submitted to MegaBLAST<sup>66</sup> on a local copy of nucleotide databank. The best lagovirus reference identified with MegaBLAST was used in a last BWA alignment of cleaned reads.

The genomic sequences produced in this study have been deposited in GenBank under the accession numbers: MN746288, MN746289, MN737116, MN737117 (GI.3 strains JA10/08-10, BO25/08-133, JA34/09-48 and CHA20/09-100, respectively); MN737113, MN737114, MN738377, MN786321 (GI.2 strains 10-28, 10-32, 16-35 and 16-36, respectively).

**Recombination analysis.** Complete coding sequences obtained in this study were aligned with publicly available complete coding sequences of *Lagovirus europaeus* representing genotypes GI.1, GI.2, GI.3 and GI.4 in BioEdit software version 7.0.3<sup>67</sup>. The final dataset included 221 sequences, 7,369 nucleotides in length (see supplementary information for the list of the sequences used). The dataset was screened for recombination by seven methods available in the RDP software version 4.4 (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan and 3Seq)<sup>32</sup> with the following parameters: sequences were set to linear, Bonferroni correction, highest acceptable p-value of 0.05 and 500 permutations. Only recombination events detected by three or more methods were considered.

Recombinant strains were visualized by plotting a tanglegram using the "dendextend package"<sup>68</sup> in the RStudio software (version 3.6.1)<sup>69</sup>.

**Phylogenetic analysis.** Pairwise nucleotide distance comparison (p-distance model) was computed using MEGA6<sup>70</sup>.

Following the results obtained with RDP, phylogenetic analyses were carried out separately for the following genome partitions: nucleotide positions (i) 1–429 (p16; supplementary information), (ii) 430–5,295 (p23, p37, p29, VPg, protease and RdRp), and (iii) 5,296–7,369 (VP60 and VP10). Maximum-likelihood phylogenetic trees were inferred in MEGA6<sup>70</sup> using the best model of nucleotide substitution determined in the same software for the different genome partitions, according to the lowest AICc value (Akaike information criterion, corrected). Support for each cluster was obtained from 1,000 bootstrap replicates.

Received: 9 January 2020; Accepted: 10 August 2020

Published online: 02 September 2020

## References

- Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J. & Esteves, P. J. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet. Res.* **43**, 12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-12> (2012).
- Le Gall-Reculé, G. *et al.* Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* **410**, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.001> (2011).
- Strive, T., Wright, J. D. & Robinson, A. J. Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* **384**, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.004> (2009).
- Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M. L. & Rossi, C. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* **70**, 8614–8623 (1996).
- Forrester, N. L., Trout, R. C. & Gould, E. A. Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology* **358**, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.011> (2007).
- Bergin, I. L. *et al.* Novel calicivirus identified in rabbits, Michigan, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1955–1962. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090839> (2009).
- Moss, S. R. *et al.* Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* **83**, 2461–2467. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2461> (2002).
- Le Gall-Reculé, G. *et al.* Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* **168**, 137–138. <https://doi.org/10.1136/vr.d697> (2011).
- Le Pendu, J. *et al.* Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* **98**, 1658–1666. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000840> (2017).
- Dalton, K. P., Nicienza, I., Abrantes, J., Esteves, P. J. & Parra, F. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* **169**, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.015> (2014).
- Le Gall-Reculé, G. *et al.* Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* **44**, 81. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81> (2013).
- Dalton, K. P. *et al.* Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 2009–2012. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120341> (2012).
- Camarda, A. *et al.* Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Res. Vet. Sci.* **97**, 642–645. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.10.008> (2014).
- Le Gall-Reculé, G. *et al.* 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**, 70. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0473-y> (2017).
- Neimanis, A. S. *et al.* Overcoming species barriers: an outbreak of *Lagovirus europaeus* GI.2/RHDV2 in an isolated population of mountain hares (*Lepus timidus*). *BMC Vet. Res.* **14**, 367. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1694-7> (2018).
- Puggioni, G. *et al.* The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.* **44**, 96. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-96> (2013).

17. Velarde, R. *et al.* Spillover events of infection of Brown hares (*Lepus europaeus*) with rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) caused sporadic cases of an European brown hare syndrome-like disease in Italy and Spain. *Transbound. Emerg. Dis* **64**, 1750–1761. <https://doi.org/10.1111/tbed.12562> (2017).
18. Capucci, L., Cavadini, P., Schiavitto, M., Lombardi, G. & Lavazza, A. Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2). *Vet. Rec.* **180**, 426. <https://doi.org/10.1136/vr.104132> (2017).
19. Rouco, C., Aguayo-Adan, J. A., Santoro, S., Abrantes, J. & Delibes-Mateos, M. Worldwide rapid spread of the novel rabbit haemorrhagic disease virus (GI2/RHDV2/b). *Transbound. Emerg. Dis.* **66**, 1762–1764. <https://doi.org/10.1111/tbed.13189> (2019).
20. Calvete, C., Sarto, P., Calvo, A. J., Monroy, F. & Calvo, J. H. Could the new rabbit haemorrhagic disease virus variant (RHDVb) be fully replacing classical RHD strains in the Iberian Peninsula?. *World Rabbit Sci.* **22**, 91. <https://doi.org/10.4995/wrs.2014.1715> (2014).
21. Lopes, A. M. *et al.* Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations?. *Viruses* **7**, 27–36. <https://doi.org/10.3390/v7010027> (2015).
22. Mahar, J. E. *et al.* Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.01374-17> (2017).
23. Rouco, C. *et al.* Epidemiology of RHDV2 (*Lagovirus europaeus*/GI.2) in free-living wild European rabbits in Portugal. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, e373–e382. <https://doi.org/10.1111/tbed.12767> (2018).
24. Lopes, A. M. *et al.* Full genomic analysis of new variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus revealed multiple recombination events. *J. Gen. Virol.* **96**, 1309–1319. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000070> (2015).
25. Silvério, D. *et al.* Insights into the evolution of the new variant rabbit haemorrhagic disease virus (GI.2) and the identification of novel recombinant strains. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, 983–992. <https://doi.org/10.1111/tbed.12830> (2018).
26. Hall, R. N. *et al.* A strain-specific multiplex RT-PCR for Australian rabbit haemorrhagic disease viruses uncovers a new recombinant virus variant in rabbits and hares. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, e444–e456. <https://doi.org/10.1111/tbed.12779> (2018).
27. Forrester, N. L., Moss, S. R., Turner, S. L., Schirrmeyer, H. & Gould, E. A. Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: possible impact on evolution and epidemiology. *Virology* **376**, 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.virus.2008.03.023> (2008).
28. Esteves, P. J. *et al.* Emergence of pathogenicity in lagoviruses: evolution from pre-existing nonpathogenic strains or through a species jump?. *PLoS Pathog.* **11**, e1005087. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005087> (2015).
29. Kocher, J. F. *et al.* Bat caliciviruses and human noroviruses are antigenically similar and have overlapping histo-blood group antigen binding profiles. *MBio* <https://doi.org/10.1128/mBio.00869-18> (2018).
30. Lemaitre, E., Zwingelstein, F., Marchandeu, S. & Le Gall-Recule, G. First complete genome sequence of a European non-pathogenic rabbit calicivirus (lagovirus GI.3). *Arch. Virol.* **163**, 2921–2924. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3901-z> (2018).
31. Esteves, P. J. *et al.* Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res.* **137**, 253–256. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.025> (2008).
32. Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* **1**, vev003. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003> (2015).
33. Mahar, J. E. *et al.* Benign rabbit caliciviruses exhibit similar evolutionary dynamics to their virulent relatives. *J. Virol.* **90**, 9317–9329. <https://doi.org/10.1128/JVI.01212-16> (2016).
34. Miao, Q. *et al.* Immunogenicity in rabbits of virus-like particles from a contemporary rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (GI2/RHDV2/b) isolated in the Netherlands. *Viruses* <https://doi.org/10.3390/v11060553> (2019).
35. Lopes, A. M. *et al.* Full genome sequences are key to disclose RHDV2 emergence in the Macaronesian islands. *Virus Genes* **54**, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1523-2> (2018).
36. Bull, R. A. *et al.* Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1079–1085. <https://doi.org/10.3201/eid1107.041273> (2005).
37. Katayama, K. *et al.* Novel recombinant sapovirus. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1874–1876. <https://doi.org/10.3201/eid1010.040395> (2004).
38. Coyne, K. P. *et al.* Recombination of Feline calicivirus within an endemically infected cat colony. *J. Gen. Virol.* **87**, 921–926 (2006).
39. Simmonds, P. *et al.* Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2530–2546. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn096> (2008).
40. Meyers, G., Wirblich, C. & Thiel, H.-J. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* **184**, 677–686. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90437-G](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90437-G) (1991).
41. Bull, R. & White, P. A. In *Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology* (eds Hansman, G. S. *et al.*) 45–63 (Caister Academic Press, Norfolk, 2010).
42. Simmonds, P. Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses. *J. Virol.* **80**, 11124–11140. <https://doi.org/10.1128/JVI.01076-06> (2006).
43. Graham, R. L. & Baric, R. S. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* **84**, 3134. <https://doi.org/10.1128/JVI.01394-09> (2010).
44. Hon, C.-C. *et al.* Evidence of the recombinant origin of a bat severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronavirus and its implications on the direct ancestor of SARS coronavirus. *J. Virol.* **82**, 1819–1826. <https://doi.org/10.1128/JVI.01926-07> (2008).
45. Kelly, A. G., Netzler, N. E. & White, P. A. Ancient recombination events and the origins of hepatitis E virus. *BMC Evol. Biol.* **16**, 210–210. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0785-y> (2016).
46. Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H. J. & Becher, P. RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *J. Virol.* **78**, 6271–6281. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6271-6281.2004> (2004).
47. Ludwig-Begall, L. F., Mauroy, A. & Thiry, E. Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab—a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J. Gen. Virol.* **99**, 970–988. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001103> (2018).
48. Duchêne, S., Holmes, E. C. & Ho, S. Y. W. Analyses of evolutionary dynamics in viruses are hindered by a time-dependent bias in rate estimates. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281**, 20140732. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0732> (2014).
49. Duchêne, S., Duchêne, D., Holmes, E. C. & Ho, S. Y. W. The performance of the date-randomization test in phylogenetic analyses of time-structured virus data. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 1895–1906. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv056> (2015).
50. Westcott, D. G. & Choudhury, B. Rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant in Great Britain. *Vet. Rec.* **176**, 74. <https://doi.org/10.1136/vr.102830> (2015).
51. Lopes, A. M. *et al.* Characterization of old RHDV strains by complete genome sequencing identifies a novel genetic group. *Sci. Rep.* **7**, 13599. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13902-2> (2017).
52. Bull, R. A., Tanaka, M. M. & White, P. A. Norovirus recombination. *J. Gen. Virol.* **88**, 3347–3359. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83321-0> (2007).
53. Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A. & Martin, D. P. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J. Virol.* **80**, 11827–11832. <https://doi.org/10.1128/JVI.01100-06> (2006).
54. Lukashev, A. N. *et al.* Recombination in circulating human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* **86**, 3281–3290 (2005).
55. Korotkova, E. *et al.* Pressure for pattern-specific intertypic recombination between sabin polioviruses: evolutionary implications. *Viruses* **9**, 353. <https://doi.org/10.3390/v9110353> (2017).



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

## Supplementary Information

**Authors:** Joana Abrantes, Clément Droillard, Ana M. Lopes, Evelyne Lemaitre, Pierrick Lucas, Yannick Blanchard, Stéphane Marchandeau, Pedro J. Esteves, Ghislaine Le Gall-Reculé

**Title:** Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus *Lagovirus europaeus*/GI.2

Table. List of the 221 sequences used in the study and the genotype/variant they belong to according to their VP60.

GenBank accession number	Strain name	Genotype/Variant (VP60)
AB300693	Hokkaido/2002/JPN_2002	GI.1a
AF258618	Iowa2000 USA	GI.1a
AF295785	Mexico89_1989	GI.1c
AY523410	CD/China	GI.1a
DQ189077	Bahrain_2001	GI.1d
DQ189078	Saudi Arabia	GI.1c
DQ205345	JX/CHA/97_China_1997	GI.1a
DQ280493	ChinaWHNRH	GI.1a
EF363035	clonepJG-RHDV-DD06_Ramsay Island_1999	GI.1d
EF558572	Frankfurt12_Germany_1996	GI.1d
EF558573	Frankfurt5_Germany	GI.1d
EF558574	Wika_Germany_1996	GI.1d
EF558575	Ascot_UK_1992	GI.1d
EF558576	Jena_Germany	GI.1d
EF558577	Meiningen_Germany_1993	GI.1d
EF558578	Eisenhüttenstadt_Germany_1989	GI.1b
EF558579	NZ54_New Zealand_2003	GI.1c
EF558580	NZ61_New Zealand_2003	GI.1c
EF558581	Erfurt_Germany_2000	GI.1a
EF558582	Dachswald_Germany_2000	GI.1a
EF558583	Triptis_Germany_1996	GI.1a
EF558584	Rossi_Germany_2002	GI.1a
EF558585	Hagenow_Germany_1990	GI.1a
EF558586	Hartmannsdorf_Germany_1989	GI.1a
EU003578	IN-05_USA_2005	GI.1a
EU003579	Italy90_1990	GI.1c
EU003580	Korea90_1990	GI.1c
EU003581	NY-01_2001	GI.1a
EU003582	UT-01_2001	GI.1a
EU871528	RCV-A1_Australia_2007	GI.4
GQ166866	MRCV_USA_2001	GI.3
HM623309	NJ-2009_China_2009	GI.1a
JF412629	HYD_China_Heilongjiang_2005	GI.1a
JF438967	CB156_Portugal_1997	GI.1b
JX886001	CB194_Portugal_2006	GI.1b

JX886002	CB137 Portugal 1995	GI.1b
KF442961	Algarve1 Portugal 2013	GI.2
KF442962	Algarve3 Portugal 2013	GI.2
KF442963	7-13Barrancos Portugal 2013	GI.2
KF442964	10A13Barrancos Portugal 2013	GI.2
KF594473	Czechoslovakia-V351 1987	GI.1c
KF594474	Turretfield 06 Australia 2006	GI.1c
KF594475	Turretfield 07 Australia 2007	GI.1c
KF594476	Turretfield 09 Australia 2009	GI.1c
KF677011	STR2012 Poland/2012	GI.1a
KJ606958	Gungahlin Australia 1998	GI.1c
KJ606959	Parkwood Australia 1998	GI.1c
KJ943791	P95 Portugal 1996	GI.1b
KM115680	CBEstoi13-7 Portugal 2013	GI.2
KM115681	CBEstremoz14-1 Portugal 2014	GI.2
KM115682	CBEstremoz14-3 Portugal	GI.2
KM115683	CBMora14-1 Portugal	GI.2
KM115689	CBMontemor14-1 Portugal 2014	GI.2
KM115697	BCCoruche14-1 Portugal	GI.2
KM115698	BCCoruche14-2 Portugal 2014	GI.2
KM115711	CBLavra10-13-1 Portugal 2013	GI.2
KM115712	CBMert14-1 Portugal 2014	GI.2
KM115713	CBMert14-2 Portugal 2014	GI.2
KM115714	CBA Algarve14-1 Portugal	GI.2
KM115715	CBA Algarve14-3 Portugal	GI.2
KM115716	CBA Algarve14-4 Portugal	GI.2
KM878681	N11 Spain 2011	GI.2
KM979445	CBVal16 Portugal 2012	GI.2
KP090974	CB110 Portugal 1994	GI.1b
KP090975	CB154 Portugal 1997	GI.1b
KP090976	CBAnd1 Spain 2012	GI.2
KP129395	Rij06-12 Spain	GI.2
KP129396	Seg08-12 Spain	GI.2
KP129397	Tar06-12 Spain	GI.2
KP129398	Zar11-11 Spain 2010	GI.2
KP129399	Zar06-12 Spain	GI.2
KP129400	Bar01-11 Spain 2011	GI.1b
KP144789	Pd Poland/1989	GI.1c
KP144790	KGM Poland/1988	GI.1c
KP144792	BLA Poland/1994	GI.1d
KT006721	NZL/Canterbury/Lincoln/517/2013	GI.1c
KT006722	NZL/Canterbury/MackenzieBasin/95/2012	GI.1c
KT006723	NZL/HawkesBay/BoundaryStream/94/2012	GI.1c
KT006724	NZL/Canterbury/Hawarden/320/2013	GI.1c
KT006725	NZL/Otago/Queensberry/74/2013	GI.1c
KT006726	NZL/Otago/Taras/61/2014	GI.1c
KT006727	NZL/Otago/Luggate/67/2014	GI.1c
KT006728	NZL/Otago/Alexandra/64/2014	GI.1c
KT006729	NZL/Otago/Wanaka/63/2014	GI.1c
KT006730	NZL/Canterbury/MackenzieBasin/322/2013	GI.1c
KT006731	AUS/NSW/Hall/WAT1-13/2007	GI.1c
KT006732	AUS/NSW/Murrumbateman/BlueGums/2014	GI.1c
KT006733	AUS/WA/Gnowangerup/1999	GI.1c

KT006734	AUS/SA/FlindersRanges/1999	GI.1c
KT006735	AUS/WA/Bunbury/2000	GI.1c
KT006736	AUS/SA/Robe/2000	GI.1c
KT006737	AUS/SA/FlindersRanges/2002	GI.1c
KT006738	AUS/SA/OneTreeHill/2003	GI.1c
KT006739	AUS/SA/Coorong/2004	GI.1c
KT006740	AUS/SA/BillaKallina/2004	GI.1c
KT006741	AUS/SA/Woodcroft/2005	GI.1c
KT006742	AUS/SA/FlindersRanges/2006	GI.1c
KT006743	AUS/TAS/SouthArm/2007	GI.1c
KT006744	AUS/SA/Hillbank/2008	GI.1c
KT006745	AUS/SA/Bulgania/2009	GI.1c
KT006746	AUS/WA/WonganHills/2012	GI.1c
KT006747	AUS/NSW/Grafton/2013	GI.1c
KT280058	BlueGums-2 Australia 2015	GI.1c
KT280059	BLMT-2 Australia 2015	GI.1c
KT280060	BLMT-1 Australia 2015	GI.2
KT344770	AUS/CSIRO/Master	GI.1c
KT344771	AUS/CSIRO/Working	GI.1c
KT344772	AUS/CSIRO/Release	GI.1c
KT344773	AUS/EMAI/Batch-1A	GI.1c
KT344774	AUS/EMAI/Batch-1D	GI.1c
KT344775	NZL/V351/Control	GI.1c
KX357653	AUS/ACT/AIN-1/2009	GI.1c
KX357654	AUS/ACT/AIN-2/2009	GI.1c
KX357655	AUS/ACT/Gudg-26/2013	GI.4
KX357656	AUS/ACT/Gudg-79/2014	GI.4
KX357657	AUS/ACT/Gudg-89/2014	GI.4
KX357658	AUS/ACT/GUN_1-240/2012	GI.4
KX357659	AUS/ACT/GUN_1-29/2008	GI.4
KX357660	AUS/ACT/GUN-121/2010	GI.4
KX357661	AUS/ACT/GUN-159/2011	GI.4
KX357662	AUS/ACT/GUN-160/2011	GI.4
KX357663	AUS/ACT/GUN-238/2012	GI.4
KX357664	AUS/ACT/GUN-343/2014	GI.4
KX357665	AUS/ACT/GUN1-11/2007	GI.4
KX357666	AUS/ACT/GUN1-22/2008	GI.4
KX357667	AUS/ACT/GUN1-37/2009	GI.1c
KX357668	AUS/ACT/GUN1-52/2009	GI.1c
KX357669	AUS/ACT/GUN1-60/2010	GI.4
KX357670	AUS/ACT/MtPt-2/2010	GI.1c
KX357671	AUS/ACT/MtPt-4/2010	GI.1c
KX357672	AUS/ACT/PI-1/2009	GI.1c
KX357673	AUS/NSW/BUR1-1/2007	GI.4
KX357674	AUS/NSW/CAT_2-12/2007	GI.4
KX357675	AUS/NSW/CAT_3-4/2007	GI.4
KX357676	AUS/NSW/LWR-1/2010	GI.4
KX357677	AUS/NSW/M2/2007	GI.1c
KX357678	AUS/NSW/M9/2007	GI.1c
KX357679	AUS/NSW/MIC3-3/2007	GI.4
KX357680	AUS/NSW/MIC5-8/2007	GI.4
KX357681	AUS/NSW/OAK_NT-12/2011	GI.4
KX357682	AUS/NSW/OC-13/2007	GI.4

KX357683	AUS/NSW/OC-15/2007	GI.4
KX357684	AUS/NSW/OC-18/2007	GI.4
KX357685	AUS/NSW/OC-20/2007	GI.4
KX357686	AUS/NSW/OC-26/2007	GI.4
KX357687	AUS/NSW/OC-33/2007	GI.4
KX357688	AUS/NSW/OC-36/2007	GI.4
KX357689	AUS/NSW/OC-39/2007	GI.4
KX357690	AUS/NSW/OC-7/2007	GI.4
KX357691	AUS/NSW/V-4/2007	GI.4
KX357692	AUS/NSW/V-5/2007	GI.4
KX357693	AUS/NSW/V-8/2007	GI.4
KX357694	AUS/NSW/WAU-1/2009	GI.4
KX357695	AUS/SA/ORA383/2008	GI.1c
KX357696	AUS/VIC/BEN-10/2009	GI.4
KX357697	AUS/VIC/BEN-115/2010	GI.4
KX357698	AUS/VIC/BEN-124/2010	GI.4
KX357699	AUS/VIC/BEN-35/2009	GI.4
KX357700	AUS/VIC/BEN-52/2010	GI.4
KX357701	AUS/VIC/BM-2/2007	GI.4
KX357702	AUS/VIC/BM-35/2009	GI.4
KX357703	AUS/VIC/BM-45/2009	GI.4
KX357704	AUS/VIC/BM-49/2009	GI.4
KX357705	AUS/VIC/BM-60/2009	GI.4
KX357706	AUS/WA/B.Hill/2013	GI.1c
KX357707	NZ/Southland/Gore-425A/2013	GI.4
KY235675	QC/Canada/WIN-AH-2016-OTH-0018_2016	GI.2
KY235676	MB/Canada/WIN-AH-2011-OTH-026_2011	GI.1a
KY235677	Mexico/2718_Mexico	GI.1c
KY235678	Korea/2719_Korea	GI.1c
KY622127	P158_Portugal_1998	GI.1d
KY622128	P165_Portugal_1998	GI.1d
KY622129	P175_Portugal_1999	GI.1a
KY765609	P16_Portugal_1994	GI.1b
KY765610	P19_Portugal_1994	GI.1b
KY765611	P30_Portugal_1994/1995	GI.1b
LT168844	13-165_France_2013	GI.2
M67473	FRG_Germany_1989	GI.1c
MF407651	CBPico17-1_Portugal_2017	GI.2
MF407652	CBPico17-2_Portugal_2017	GI.2
MF407653	16PLM1_Spain_2016	GI.2
MF407654	PSM2_Portugal_2016	GI.2
MF407655	CBMad17-1_Portugal_2017	GI.2
MF407656	CBMad17-2_Portugal_2017	GI.2
MF407657	CBMad17-3_Portugal_2017	GI.2
MG602005	BBI_Poland_Mazowieckie	GI.1a
MG602006	RED2016_Poland_Lodzkie	GI.2
MG602007	VMS_Poland_West_Pomeranian	GI.2
MG763936	SOS089_Portugal_2014	GI.2
MG763937	SOS125_Portugal_2014	GI.2
MG763938	SOS129_Portugal_2014	GI.2
MG763939	SOS133_Portugal_2014	GI.2
MG763940	SOS137_Portugal_2015	GI.2
MG763941	SOS140_Portugal_2015	GI.2

MG763942	SOS148 Portugal 2015	GI.2
MG763943	SOS149 Portugal 2015	GI.2
MG763944	SOS150 Portugal 2015	GI.2
MG763945	SOS151 Portugal 2015	GI.2
MG763946	SOS155 Portugal 2015	GI.2
MG763947	SOS158 Portugal 2015	GI.2
MG763948	SOS164 Portugal 2015	GI.2
MG763949	SOS173 Portugal 2015	GI.2
MG763950	SOS404 Portugal 2015	GI.2
MG763951	SOS468 Portugal 2015	GI.2
MG763952	SOS473 Portugal 2015	GI.2
MG763953	SOS474 Portugal 2015	GI.2
MG763954	SOS492 Portugal 2016	GI.2
MN061492	NL2016 Netherlands	GI.2
U54983	RHDV-V351 1987	GI.1c
X87607	BS89 Italy 1989	GI.1d
Z29514	SD France 1989	GI.1b
Z49271	RHDV-AST89 1989	GI.1b
MN737113*	10-28 France 2010	GI.2
MN737114*	10-32 France 2010	GI.2
MN737115	06-11 France 2006	GI.3
MN737116*	JA34/09-48 France 2009	GI.3
MN737117*	CHA20/09-100 France 2009	GI.3
MN746289*	BO25/08-133 France 2008	GI.3
MN746288*	JA10/08-10 France 2008	GI.3
MN738377*	16-35 France 2016	GI.2
MN786321*	16-36 France 2016	GI.2

\*strains obtained in this study.

Figure. Tanglegram for p16 and non-structural genes except p16 (NSP-p16) of the 221 lagoviruses sequences. Colouring of the sequences is according to the genotype to which the strains belong to for the structural genes: GI.1 (red); GI.2 (green); GI.3 (blue); GI.4 (purple); MRCV (yellow). Lines highlight the recombinants at the p16/p23 boundary. Sequences obtained in this study appear in bold.

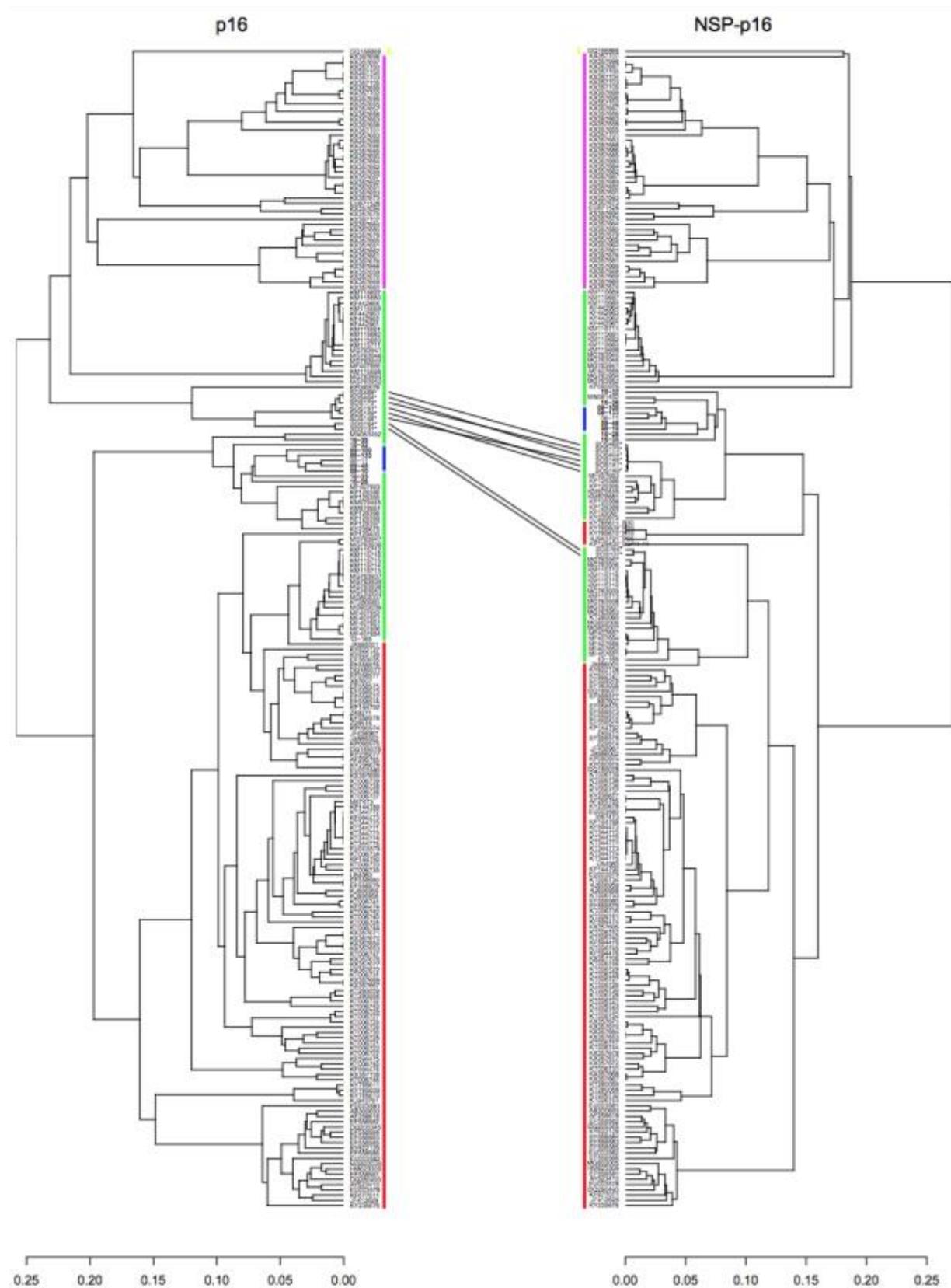


Table. Results of the RDP recombination analysis at the p16/p23 boundary.

Strains	Recombination breakpoint (nucleotide positions) <sup>a</sup>	Most likely donor strain		Methods and average p-value						
		p16	Non-structural proteins	RDP	GENECONV	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	3Seq
SOS137, SOS164	Undetermined-369 (355-374)	SOS173 (GL4)	CBA Algarve14-3 (GL1b)	2.417x10 <sup>-34</sup>	1.219x10 <sup>-28</sup>	7.549x10 <sup>-34</sup>	5.432x10 <sup>-8</sup>	5.017x10 <sup>-8</sup>	2.925x10 <sup>-7</sup>	1.489x10 <sup>-18</sup>
SOS148, SOS149, SOS151, SOS173, SOS404, SOS468	112-447 (446-470)	CBAnd1 (GL4)	Seg08-12 (GL3)	1.341x10 <sup>-28</sup>	3.518x10 <sup>-13</sup>	1.393x10 <sup>-29</sup>	1.711x10 <sup>-8</sup>	3.928x10 <sup>-8</sup>	1.351x10 <sup>-3</sup>	1.238x10 <sup>-12</sup>

<sup>a</sup> 99% confidence interval.

Figure. ML tree for the structural gene p16 (n=221 sequences; nucleotides 1-429; nucleotide substitution model K2+Γ4). Sequences obtained in this study appear in bold and \* mark the recombinants at the p16/p23 boundary.

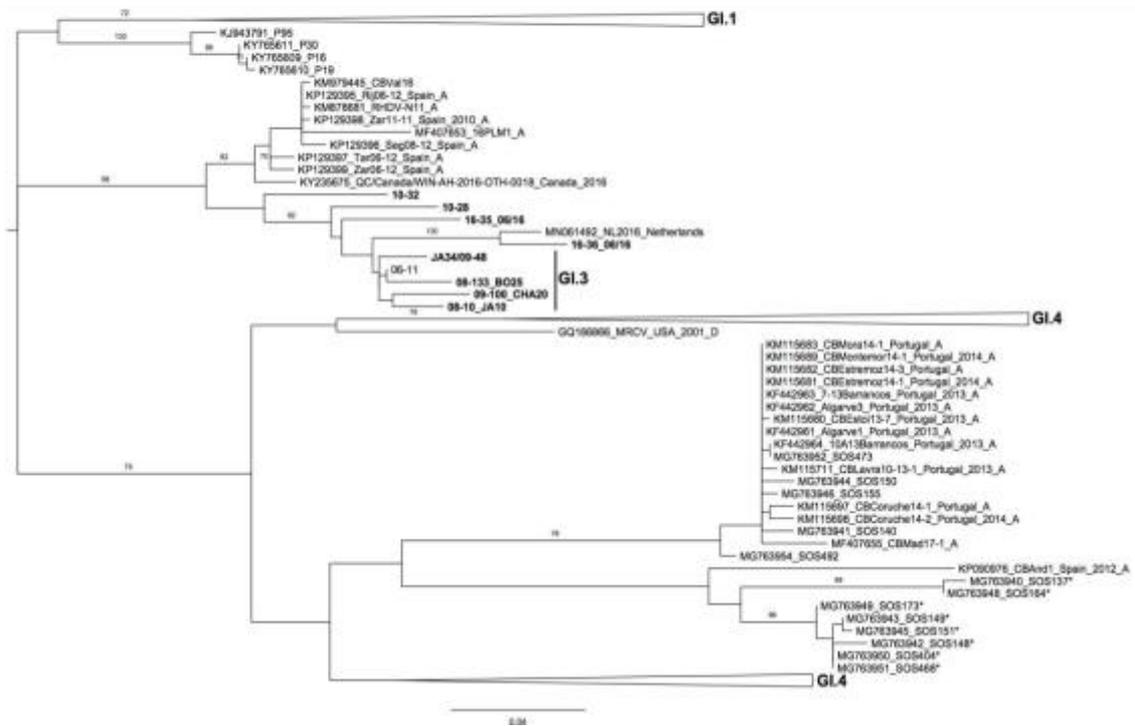


Table. Summary of the genomic composition of the GI.2 strains.

Strains	Genomic partition		
	p16	NSP-p16*	SP**
10-28, 10-32, 16-35, 16-36 (France, 2010 and 2016); N11, Zar11-11, Tar06-12, Zar06-12, Rij06-12, Seg08-12 (Spain, 2011-2012); CBVal16 (Portugal, 2012); 16PLM1 (Canary Islands, Spain, 2016); RHDV2-NL2016 (Netherlands, 2016); QC/Canada/WIN-AH-2016-OTH-0018 (Canada, 2016)	GI.3	GI.3	GI.2
CBAnd1 (Spain, 2012); Algarve1, Algarve3, 7-13_Barrancos, 10A13_Barrancos, CBEstoi13-7, CBEstremoz14-1, CBEstremoz14-3, CBMora14-1, CBMontemor14-1, CBCoruche14-1, CBCoruche14-2, CBLavra10-13-1, CBMad17-1, SOS140, SOS150, SOS155, SOS473, SOS492 (Portugal, 2013-2017)	GI.4	GI.4	GI.2
13-165 (France, 2013); CBMert14-1, CBMert14-2, CBA Algarve14-1, CBA Algarve14-3, CBA Algarve14-4, SOS089, SOS125, SOS129, SOS133, SOS158, SOS474, PSM2, CBPico17-1, CBPico17-2, CBMad17-2, CBMad17-3 (Portugal, 2014-2017); BLMT-1 (Australia, 2015); RED2016_Poland_Lodzkie_Set-2016, VMS_Poland_West Pomeranian_Jun-2017 (Poland 2016-2017)	GI.1b	GI.1b	GI.2
SOS137, SOS164 (Portugal, 2015)	GI.4	GI.1b	GI.2
SOS148, SOS149, SOS151, SOS173, SOS404, SOS468 (Portugal, 2015)	GI.4	GI.3	GI.2
AUS/NSW/2016_10_10/CAR-3 (Australia, 2016)	GI.1a	GI.1a	GI.2

\* Non-structural proteins other than p16.

\*\* Structural proteins.

## 2. Conclusions

L'objectif de ces travaux était de déterminer la séquence de régions codantes et de génomes complets de GI.3/RCV-E1 et GI.2/RHDV2 afin de compléter nos connaissances sur ces lagovirus et d'étudier l'hypothèse que les RHDV2 proviendraient de l'évolution de lagovirus non-pathogènes appartenant au génotype GI.3, que ce soit par mutations progressives et/ou par recombinaison.

La troisième publication décrit les liens évolutifs entre les virus non-pathogènes RCV-E1, pour lesquels quatre nouvelles séquences comprenant la phase codante et le 3' UTR ont été obtenues, et les virus pathogènes RHDV2, où là aussi deux nouvelles séquences de génome complet et deux séquences comprenant la phase codante et le 3' UTR ont été obtenues. L'analyse des séquences RCV-E1 avec le logiciel RDP4 a permis de déterminer que les premières souches RHDV2 détectées en France, en Italie, en Espagne et au Portugal entre 2010 et 2012 étaient recombinantes. En effet, ces souches possèdent une région non-structurale génétiquement proche des souches RCV-E1 et une région structurale homologue aux souches RHDV2. Ainsi, les souches RHDV2 initialement considérées comme non recombinantes dans les premières publications décrivant des séquences de génome entier (Lopes et al., 2015 ; Silverio et al., 2018 ; Hall et al., 2018) étaient en fait recombinantes. Les analyses bio-informatiques ont aussi montré que ces premières souches recombinantes RCV-E1/RHDV2 (GI.3/GI.2) n'avaient pas disparu puisque des souches RHDV2 récoltées en 2016 en France, dans les Iles Canaries, au Canada et aux Pays Bas étaient recombinantes GI.3/GI.2. Par ailleurs, les différents arbres phylogéniques générés lors de cette étude ont suggéré que certaines souches étaient recombinantes à la fois au niveau du gène codant la protéine p16 et au niveau du reste de la région structurale. Ces souches pourraient correspondre à des souches triples recombinantes entre RCV-A1, RCV-E1 et RHDV2 (GI.4/GI.3/GI.2). Cependant, la recombinaison au niveau du gène codant la protéine p16 n'a pas été confirmée avec l'analyse RDP4. L'obtention d'autres séquences de génome complet sera donc nécessaire pour confirmer ces résultats de phylogénie. L'ensemble de ces résultats, couplé aux descriptions de recombinaisons entre RCV-A1 et RHDV2 ou entre RHDV et RHDV2 (Lopes et al., 2015 ; Silvério et al., 2018 ; Hall et al., 2018), suggèrent que l'émergence des souches RHDV2 ne provient pas d'un ensemble de mutations progressives de souches non pathogènes mais d'un ou de plusieurs évènements de recombinaison. Malgré les recherches, le virus donneur de la région structurale RHDV2 n'a pas été caractérisé.

Ces résultats n'excluent pas l'hypothèse de l'émergence des souches pathogènes *via* un saut de la barrière d'espèce. En effet, les espèces réservoirs peuvent agir comme une source de diversité virale, qui associée à la recombinaison, permet au virus de passer de l'espèce réservoir à l'*O. cuniculus*. Il est donc possible que le virus donneur de la région structurale des virus RHDV2 ait pour hôte une autre espèce que l'*O. cuniculus*. Cela pourrait expliquer pourquoi ce virus n'a toujours pas été détecté

chez *O. cuniculus*. Cette étude montre l'importance de la caractérisation des génomes complets des lagovirus afin de comprendre leurs évolutions et leurs relations génétiques.

## Chapitre 2 : Avancées dans le développement d'un nouveau système de génétique inverse pour caractériser les motifs de pathogénicité des lagovirus

Le second objectif de cette thèse était d'étudier les bases du pouvoir pathogène des lagovirus *via* le développement d'un système de génétique inverse. L'analyse génomique de souches pathogènes recombinantes peut en effet laisser supposer que les motifs de pathogénicité des lagovirus seraient portés par la région structurale du génome et l'utilisation d'un système de génétique inverse pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

Tous les Lagovirus ont un génome et un subgénome à ARN positif simple brin linéaire polyadénylé qui ont une protéine, la VPg, liée de façon covalente à l'extrémité 5'. Le génome viral est organisé en deux parties : une région non-structurale allant de l'extrémité 5' non-codante à la fin du gène codant la RdRp, et une région structurale allant du gène codant la VP60 à la queue polyA. Ces régions génomiques peuvent recombiner entre lagovirus. Ce type de recombinaison a été détecté entre deux génotypes de lagovirus pathogènes, comme par exemple entre la région non-structurale d'un GI.1b/RHDV et la région structurale d'un RHDV2 (Lopes et al.2015). Il a aussi été décrit entre la région non-structurale des lagovirus non-pathogènes de génotype GI.3/RCV-E1 ou GI.4/RCV-A1 et la région structurale d'un lagovirus pathogène RHDV2 (Lopes et al.2015 ; Silvério et al., 2018 ; publication 3) ou GI.1d/RHDV (Ghislaine Le Gall-Reculé comm. pers.). Pour ce dernier, alors que les variants GI.1d de RHDV initialement détectés en France en 1990 n'ont pas révélé de recombinaison avec les lagovirus connus, à partir des années 2000, des souches recombinantes GI.3/GI.1d (RCV-E1/RHDV) ont été caractérisées au laboratoire. Bien que ces différents virus recombinants possèdent un génome dont la totalité de la région non structurale, soit près de 70 % du génome, provient d'un virus non-pathogène, ils présentent tous un phénotype pathogène. Pour vérifier l'hypothèse que les motifs de pathogénicité des lagovirus sont portés par la région structurale du génome, nous avons tenté de développer un système de génétique inverse pour les lagovirus, ceci afin de construire deux types de virus chimères, le premier ayant une région non-structurale de lagovirus non-pathogène et une région structurale de lagovirus pathogène, et le second l'inverse, puis d'en vérifier le phénotype. L'analyse du développement et de l'utilisation des systèmes de génétique inverse précédemment décrits pour les lagovirus ayant fait apparaître un certain nombre de limites (cf. Introduction – C. Génétique inverse – III.6. RHDV), nous avons préféré tenter de développer un nouveau système.

## I. Caractérisation génomique et phénotypique de la souche de référence

La publication 4 en cours de rédaction et destinée au journal « Veterinary Microbiology » rapporte les résultats des expérimentations effectuées pour caractériser le génotype et le phénotype de la souche GI.1d/00-21 choisie comme souche de référence pour le développement du système de génétique inverse pour le RHDV.

### 1. Introduction

La souche pathogène sélectionnée pour développer le système de génétique inverse est la souche 00-21, variant GI.1d/RHDV, non recombinante. Cette souche a été collectée en France en 2000, dans le foie d'un lapin *Oryctolagus cuniculus* trouvé mort dans la faune sauvage par le réseau de surveillance épidémiologique des maladies et empoisonnements de la faune sauvage « SAGIR ». Le génome de cette souche avait été séquencé (séquençage Sanger) avant le début de l'étude (numéro d'accèsion Genbank MH190418).

La souche GI.1d/00-21 a dans un premier temps été multipliée sur lapins EOPS au cours d'un essai expérimental réalisé dans une animalerie de niveau de confinement 2 afin d'augmenter la quantité de matériel biologique disponible pour la réalisation des études *in vivo*. Il a été vérifié par séquençages haut débit et Sanger que le génome viral de la souche multipliée possédait une identité nucléotidique de 100% avec la séquence consensus du génome viral de la souche collectée sur le lapin de garenne.

Deux essais sur lapins EOPS ont ensuite été réalisés pour caractériser le phénotype de la souche pathogène :

- Essai 1 : pour déterminer le taux de mortalité et la cinétique de réplication de la souche GI.1d/00-21 dans les organes
- Essai 2 : pour déterminer la dose minimale infectieuse de la souche GI.1d/00-21

Dans l'essai 1, 24 lapins EOPS ont été hébergés dans une même cage dans une animalerie de confinement 2. Deux lapins EOPS ont été hébergés dans une autre animalerie de confinement 2 pour la condition témoin. L'inoculum a été préparé à partir d'un homogénat de foie (2% pds/vol dans du PBS) provenant d'un lapin infecté lors de l'essai de multiplication.

Après une centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes, le surnageant a été prélevé puis dilué dans du PBS pour obtenir 32 mL d'inoculum final. Deux mL de cet inoculum ont été sauvegardés pour quantifier le génome viral après avoir purifié et concentré les particules virales en utilisant un gradient de densité Optiprep™ comme décrit dans Teixeira et al. (2011). L'extraction des ARNs et une RT-qPCR ciblant une région non-structurale de l'ARN génomique viral ont été réalisées. Les 24 lapins ont été inoculés avec 1 mL d'inoculum contenant  $10^{11}$  copies d'ARN génomique par voie orale.

Pour étudier la cinétique de répllication de la souche GI.1d/00-21, deux lapins ont été euthanasiés à 16, 20, 24, 39 et 45 hpi. Les 14 derniers lapins ont permis de déterminer le taux de mortalité et ont été inclus dans l'essai 2 en tant que dose infectieuse élevée. Les deux premiers lapins morts par infection virale (dans cette étude à 60 hpi) ont été inclus à la fois dans la cinétique de répllication et dans l'essai 2. Tous les lapins survivants ont été euthanasiés 8 jours après l'infection (jpi). Les échantillons qui ont été prélevés à l'autopsie pour l'étude de la cinétique de répllication sont : sang, thymus, poumons, foie, rate, reins, duodénum, fèces et écouvillonnage rectal. Seul le foie a été prélevé sur les 12 autres lapins.

Dans l'essai 2, trois animaleries de confinement 2 (A1-A3) ont hébergé des lapins inoculés et une quatrième (A4) a hébergé deux lapins témoins. Dix lapins EOPS ont été logés dans la même cage en A1, A2 et A3. L'inoculum est constitué de virus GI.1d/00-21 préparé à partir d'un surnageant de broyat de foie du lapin infecté lors de l'essai de multiplication virale (15% pds/vol dans du PBS) puis purifié sur gradient de densité Optiprep™. L'ARN du virus purifié a été extrait et la quantité de génome viral a été estimé en RT-qPCR comme précédemment. Neuf lapins sur dix ont été inoculés par voie orale avec 0,1 (dose très faible),  $10^4$  (dose faible) et  $10^7$  (dose moyenne) copies d'ARN génomique en A1, A2, A3 respectivement. Dans chacune de ces animaleries, lorsque le lapin non inoculé est mort, montrant la diffusant horizontale du virus, les autres lapins de l'animalerie ont été euthanasiés et n'ont pas été inclus dans le calcul du taux de mortalité. Les lapins survivants ont été euthanasiés à 11 jpi et autopsiés. Le foie et le sang de chaque animal ont été collectés. L'ARN total a été extrait et la charge virale de chaque échantillon a été estimée en RT-qPCR.

Publication 4

Characterization of a GI.1d strain of rabbit haemorrhagic disease virus by genome sequencing, *in vivo* virus replication kinetics and viral dose effect

Article destiné au journal Veterinary Microbiology : en cours de rédaction

## **Characterization of a GI.1d strain of rabbit haemorrhagic disease virus by genome sequencing, *in vivo* virus replication kinetics and viral dose effect**

Clément Droillard <sup>a</sup>, Evelyne Lemaitre <sup>a</sup>, Michel Amelot <sup>b</sup>, Yannick Blanchard <sup>c</sup>, Nicolas Etteradossi <sup>a</sup>, Ghislaine Le Gall-Reculé <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Virologie, Immunologie, Parasitologie Aviaires et Cunicoles, BP 53, F-22440, Ploufragan, France

<sup>b</sup> Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Service d'élevage et d'expérimentation avicole et cunicole, BP 53, F-22440, Ploufragan, France

<sup>c</sup> Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Génétique virale et biosécurité, BP 53, F-22440, Ploufragan, France

\* corresponding author

### **1. Introduction**

Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) is a highly pathogenic virus that causes viral hemorrhagic disease (RHD) in wild and domestic European rabbits of the species *Oryctolagus cuniculus* (reviewed in Abrantes et al., 2012). RHD was first detected in 1984 in the Jiangsu Province of the People's Republic of China in Angora rabbits that had been imported from Germany (Liu et al., 1984). The disease rapidly spread through Chinese rabbitries where it killed 140 million domestic rabbits, before spreading worldwide. It was reported in Europe, where the disease was first described in 1984 in Italy (Cancellotti and Renzi, 1991), then in the Americas in 1988 in Mexico (Gregg et al., 1991) and at the same time in North Africa (Bousslama et al., 1996). RHDV was detected in France in 1988 (Morisse et al., 1991). RHD was also reported in Australia in 1995 and New Zealand in 1997 further to its introduction as a biocontrol agent to eradicate rabbits considered as pest (Cooke and Fenner, 2002). Its high pathogenicity caused important economic losses in the rabbit industry as well as a significant ecological impact in wildlife in several countries (Delibes-Mateos et al., 2008; Delibes-Mateos et al., 2014; McIntosh et al., 2007; Mitro and Krauss, 1993). RHD is characterized by acute fulminant hepatitis, splenomegaly, hyperaemic trachea, hemorrhages and congestions in several organs such as the lungs, heart and kidneys, mainly associated with a massive disseminated intravascular coagulation (Marcato et al., 1991; Ueda et al., 1992; Abrantes et al., 2012). Infected rabbits over 8 weeks of age succumb within

12 h to 36 hours post infection (hpi) with mortality rates between 70 to 90% (Lavazza and Capucci, 2016). Whereas kittens less than 4-week-old are resistant, the sensitivity of young rabbits between 4 to 9 weeks of age progressively increases (Morisse et al., 1991). In 2010, a new genotype designated RHDV2 (or RHDVb) was detected in France in both RHDV-vaccinated and unvaccinated domestic rabbits together with wild rabbits (Le Gall-Reculé et al., 2011). It rapidly spread through Europe and then migrated in Oceania, Africa, and North America (Rouco et al., 2019). In several countries, it replaced the former circulating strains (Le Gall-Reculé et al., 2013; Calvete et al., 2014; Lopes et al., 2015; Mahar et al., 2017; Rouco et al., 2018). RHDV2 causes a disease similar to that due to RHDV except that the course of the disease and mortality rates appeared to be more variable (Dalton et al., 2012; Le Gall-Reculé et al., 2013). In addition, unlike RHDV, RHDV2 can infect kits under 4-week-old and hares (Neimanis et al., 2018).

The etiological agent of the disease is a non-enveloped icosahedral virus (Parra and Prieto, 1990) that belongs to the *Lagovirus* genus of the *Caliciviridae* family (Green et al., 2000). This genus also comprises the pathogenic European brown hare syndrome virus (EBHSV), first detected in Sweden in 1980 (Gavier-Widen and Mörner, 1991) that affects both European brown hares (*Lepus europaeus*) and mountain hares (*Lepus timidus*). Several benign lagoviruses related to RHDV or EBHSV but genetically distinct have been subsequently described (Abrantes et al., 2012, Le Pendu et al., 2017; Mahar et al., 2019, Droillard et al., 2019, Droillard et al., 2020). RHDV has a polyadenylated positive-sense single-stranded RNA genome of about 7.5 kb comprising two open reading frames (ORFs) (Wirblich et al., 1996). ORF1 codes for a polyprotein that is cleaved by the virus-encoded trypsin-like cysteine protease to give nine proteins: seven non-structural proteins (p16, p23, helicase, p29, VPg, Protease, RdRp) and the major structural protein corresponding to the capsid protein (VP60). ORF2 codes for a minor structural protein, the VP10. A subgenomic polyadenylated RNA (sgRNA) of about 2.2 kb and collinear with the 3' end of the gRNA is also encapsidated. It comprises two ORFs that code for the VP60 and the VP10 proteins, respectively. The 5' region of both RNAs is covalently linked to the VPg (virus genome-linked) protein (Meyers et al., 1991; Meyers et al., 2000).

A recent proposal for a unified classification system for lagoviruses defined a single species of lagovirus called *Lagovirus europaeus* (Le Pendu et al., 2017). Based on the complete capsid protein (VP60) gene sequences, the species was divided into two genogroups GI and GII. GI contains four genotypes related to RHDV: GI.1 (initially named RHDV) and GI.2 (initially named RHDV2) are composed of pathogenic viruses for one or several hosts, whereas GI.3 and GI.4 are composed of benign viruses infecting rabbits. GII contains viruses related to EBHSV and comprises one genotype encompassing EBHSV (GII.1) as well as two genotypes (GII.2 and GII.3) and several putative genotypes that group presumably benign hare lagoviruses (Droillard et al., 2020). GI.1 and GII.1 are subdivided into several variants (G1.1a-G1.1d and GII.1a-GII.1c; Le Pendu et al., 2017).

Initially for GI.1, two variants, GI.1b and GI.1c (previously classified into G1 and G2 genetic groups, respectively, in Le Gall et al., 1998), co-circulated in Asia and Europe and notably in France

between 1988 and 1990 (Le Gall et al., 1998). While these variants only persisted in the Iberian Peninsula (GI.1b) and Asia/Australasia (GI.1c) probably thanks to natural barriers that limited the circulation of rabbits and thus the dispersion of viruses (Müller et al., 2009), they were quickly replaced in the other European countries by a new variant, GI.1d, notably in France since 1990 and in Poland since 1994 (Le Gall-Recule et al., 2003; Fitzner and Niedbalski, 2017). GI.1d was previously distinguished in France into G3, G4 and G5 independent genetic groups, G4 having evolved from G3, whereas G5, first detected in 1994, formed a new genetic group. G5 viruses co-existed with G4 viruses until 1999 before becoming the most prevalent genetic group (Le Gall-Recule et al., 2003). In Portugal, GI.1d mainly circulated in Azores Island from at least 1998 to 2013 with strains closely related with those previously identified as G5 (Duarte et al., 2014; Lopes et al., 2017). GI.1d had only been detected once in mainland Portugal in 1998 showing that it did not replace GI.1b strains there (Lopes et al., 2017). GI.1a (initially designated RHDVa) corresponds to an antigenic variant initially detected in China in 1985 (Abrantes et al., 2012) and characterised in Italy and Germany between 1995 and 1997 (Capucci et al., 1996; Schirrneier et al., 1997).

Currently, no cell culture that supports lagovirus replication exists and certain aspects of disease can only be analysed *in vivo*. In natural GI.1 infection, the oral route is considered as a major way for transmission (Parkes et al., 2001) as well as the nasal route (Kimura et al., 2001). The main target organs of the virus are the liver, the spleen and the lungs, but hepatocytes were shown to be the primary target cells for viral replication (Prieto et al., 2000). The replication kinetics and the minimum infectious dose are poorly studied. Thus, the early stages of GI.1 lagovirus infection were only described in a few studies from rabbits experimentally infected with earlier strains (GI.1b or GI.1c) (Alonso et al., 1998; Guittre et al., 1996; Prieto et al., 2000). These studies monitored the time course distribution, from 2 h post-infection (hpi) or 12 hpi according to the studies, in several organs of rabbits infected by nasal or muscular route, and by using RT-PCR, Western-blot or immunohistochemistry methods. However, no information was given on the minimum infectious dose in rabbits. In addition, no study of pathogenicity and replication kinetics were performed with GI.1d strains although these strains have replaced the earlier GI.1b and GI.1c strains in France, which could suggest a selective advantage.

In this study, we obtained the full-length genome sequence of a GI.1d strain collected in France in 2000 and characterized its genomic organization. Beside, we characterized its phenotype and we followed its replication kinetics *in vivo*. We also estimated the minimum infectious dose of this strain to better understand the GI.1d infection in rabbits.

## **2. Material and method**

### *2.1. GI.1/00-21 strain origin and molecular characterization*

#### *2.1.1. Sample collection and virus detection*

The GI.1d/00-21 sample was collected from a rabbit found dead by the French epidemiological surveillance of wildlife diseases and poisoning network (SAGIR) in 2000. The sample was screened and detected positive for RHDV by the Inovalys-Angers laboratory (Angers, France) using an RHDV sandwich-ELISA test (Guittre et al., 1995). One mL of liver exudate was sent to Anses' laboratory and stored at -20°C for further molecular analyses.

### *2.1.2. Genome amplification and sequencing*

Total RNAs were extracted from 100 µL of liver exudate using the RNeasy Mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. RNAs were reverse transcribed using oligo-dT (Invitrogen) as primer and SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). cDNA were amplified using the AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). For the complete coding genome sequencing of RHDV, five overlapping PCRs were used to amplify cDNA using a set of primers (Table 1). The genome extremities were acquired using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method as described by Lemaitre et al. (2018). All PCR products were visualized by electrophoresis on agarose gel and when present, they were purified using MinElute™ PCR Purification Kit (Qiagen).

Sequencing was performed in both directions using the PCR primers and Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies) as recommended by the manufacturer, and analyzed with an “ABI Prism 3130 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems). The consensus sequences, then the complete genome sequence were compiled using Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen). For the genotyping, the sequence of the gene encoding the capsid protein (VP60) was aligned against the nucleotide sequences available in databases using the standard nucleotide BLAST (blastn) program from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) web BLAST service. For the cleavage site determinations and the gene identifications, the deduced ORF1 polyprotein sequence was compared with a GI.1 polyprotein sequence for which cleavage sites have been experimentally described (Meyers et al., 2000).

### *2.1.3. Phylogenetic and recombination analyses*

The GI.1 VP60 gene sequences available in nucleotide databases were aligned using ClustalW in MEGA software version 7 (Kumar et al., 2016). The Jalview2 software (Waterhouse et al., 2009) was used to reduce the number of sequences with a redundancy threshold of 98%. The final data set included 117 VP60 gene sequences. The phylogenetic relationships among lagovirus capsid sequences selected were estimated using the maximum likelihood (ML) method with MEGA7. This analysis utilized the GTR+Γ model of nucleotide substitution and a NNI branch-swapping. The tree was rooted using a GII.1 (EBHSV) VP60 sequence (Accession Number AM933650). Reliability of the trees was assessed by bootstrap with 1,000 replicates.

The entire GI.1d/00-21 genome sequence was screened for recombination using seven methods (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan and 3Seq) available in the RDP software, version 4.97 (Martin et al., 2015).

## 2.2. *In vivo studies*

### 2.2.1. *Ethical statement*

All animal experiments were performed in agreement with the national regulations on animal welfare from the French Ministry for higher education and research (project number APAFIS#2018020900265030v3) and after approval from the Anses/ENVA/UPEC ethical committee (registered under N°016 with the “Comité National de Réflexion Ethique sur l’Expérimentation Animale”),

In all trials, ten-week-old SPF New Zealand White rabbits were housed under BSL2 biosafety conditions and were monitored three times a day for signs of terminal disease after the viral inoculation, indicated by animal isolation, lethargy and anoxeria. When these humane endpoints were reached, the rabbits were euthanized. All rabbits had *ad libitum* access to water and commercial rabbit pellet feed throughout the entire experiment. To confirm their serological status against GI.1/RHDV, sera were collected before the inoculation (D0) and blood samples were screened for the presence of GI.1/RHDV antibodies.

### 2.2.2. *Virus multiplication and sequence confirmation*

In order to generate identical viral material available in large quantities for animal experiments, we first had to perform an experimental infection with the remaining GI.1d/00-21 liver exudate (50  $\mu$ L) to multiply the virus. For this purpose, ten rabbits were housed in the same cage, of which one rabbit was inoculated via the intramuscular route with 200  $\mu$ L of inoculum composed of 50  $\mu$ L of liver exudate diluted in 150  $\mu$ L of PBS and then treated with 10% of Penicilline/Streptomycine, 5% of Fungizone, and 0.625% of Gentamicine for 1h15 in ice. Rabbits euthanized after the observation of signs of terminal disease and surviving rabbits euthanized eight days post-infection were necropsied. Blood and liver samples were collected.

To check the presence of lagovirus in each liver sample, total RNA was extracted from 100  $\mu$ L of liver exudate using the NucleoSpin® RNA kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer’s instructions. One-step reverse transcriptions and amplifications were performed using U38 and L337 as primers that can amplify a part of the capsid protein gene (Le Gall-Reculé et al., 2011) and SuperScript™ III One-Step Plantinium Taq HiFi (Invitrogen). The viral genomes of the PCR-positive samples were sequenced at the Next-Generation Sequencing platform located in the Anses laboratory.

The liver that contained the highest amount of virus with a genome sequence identical to the wild-type virus consensus sequence was stored at -20°C and used for the experimental studies. In addition, sequences of the genomic ends of the amplified virus were acquired using the 5' and 3' RACE methods as described by Lemaitre et al. (2018) to confirm its complete genomic sequence with that of the wild-type strain.

### *2.2.3. Phenotyping and replication kinetics assay*

Twenty-four rabbits were housed in the same cage in a containment cell. Two negative control rabbit were housed in the same cage in another containment cell. The 24 rabbits were inoculated via the oral route with 1 mL of a about 2% w/v GI.1d/00-21 liver homogenate in PBS previously homogenized using a mixer-mill disruptor (TissueLyser, QIAGEN), then clarified at 10,000g for 10 min and diluted. The negative control rabbits were inoculated with 1 mL of PBS. Two mL of the inoculum were stored for later estimation of the genome equivalent after a viral purification step. For this purpose, we used a centrifugation through an iodixanol gradient (Optiprep™ solution, Stemcell Technologies) as described in Teixeira et al. (2011), except that the gradient with the clarified liver homogenate was centrifuged at 304,000 g for 1 h 31 min with a SW 55 Ti swinging-bucket rotor in a Beckman ultracentrifuge. RNA extraction and RT-qPCR were performed on the purified fraction. Thus, each rabbit was inoculated with about 10<sup>11</sup> genomic RNA copies corresponding to a high infectious dose.

To determine the replication kinetics of GI.1d/00-21, two rabbits were euthanized at 16, 20, 24, 39, 45 hours post-infection (hpi), that is, 12 rabbits. The mortality rate was calculated from the 14 last rabbits. These rabbits were also included in the dose effect assay as being infected with the high dose of virus. The two first rabbits that died from the viral infection (at 60 hpi in this study) were included both in the replication kinetic and in dose effect assays. For the replication kinetic assay, samples collected at necropsy were blood, thymus, lungs, liver, spleen, kidney, duodenum, faeces and rectal swab. Only the liver was collected from the dead rabbits. The surviving rabbits including the negative controls were euthanized at the end of the trial planned at eight days post-infection (dpi) and were necropsied. Except for one control for which the same tissue samples than those of the infected rabbits used for the kinetic assay were collected, only the liver was collected from rabbits.

### *2.2.4. Viral dose effect assay*

Three BSL2 containment cells (C1-C3) were allocated to infection studies and a fourth (C4) for mock-inoculation. Ten rabbits were housed in the same cage in C1, C2 and C3 respectively and two rabbits were housed in the same cage in C4. To prepare the inoculums, a GI.1d/00-21 infected liver homogenate (15% w/v) was purified through an iodixanol gradient as described above. RNA from the purified virus was extracted as described below and genome equivalent of the purified virus was

estimated by RT-qPCR. Serial dilutions were then prepared in PBS. Nine out of ten rabbits were inoculated by the oral route with 0,1 (very weak dose),  $10^4$  (weak dose) and  $10^7$  (middle dose) viral RNA copies in C1, C2 and C3, respectively.

When the contact rabbit died, the other rabbits in the containment cell were sacrificed and have not been included in the mortality rate. At the end of the trial planned at 11 days post-infection (dpi), if they existed, the surviving rabbits were sacrificed and autopsied. Samples collected at autopsy were blood and liver. RT-qPCR was used to monitor viral RNA load in each liver sample.

### 2.2.5. RNA extraction and viral quantification by quantitative reverse-transcriptase PCR (RT-qPCR)

Around 30 mg of each tissue collected from died or euthanized rabbits during the phenotype, replication kinetic and dose effect assays were homogenized using a mixer-mill disruptor (TissueLyser, QIAGEN). To quantify the viral ARN in the inoculums, 100  $\mu$ L of GI.1d/00-21 liver homogenate or of purified virus fractions were used. Total RNAs were extracted using the NucleoMag Vet kit (Macherey Nagel) in a KingFisher Flex™ (Thermo Fisher Scientific) automated magnetic collection device according to the manufacturer's instructions.

RNA transcripts for GI.1d/00-21 strain were produced to determine the limit of detection and the limit of quantification of the RT-PCR. *In vitro* transcription reactions were used to synthesize RNA transcripts from DNA templates using a T7 promoter system. cDNA were amplified with the primers T7+1317fwd (5' TTAATAATACGACTCACTATAGGGGTGGCCAAGGACCTCAC 3'), incorporating a T7 polymerase recognition sequence at the immediate 5' end, and the reverse primer 1444rev (5' AGGTGTTGGTTGTATGATGG 3') using the Phusion Green Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific). These primers were designed in the non-structural part of the genome to amplify the genomic RNA (gRNA) only. PCR products were visualized by electrophoresis on agarose gel then purified using MinElute® TM PCR Purification Kit (QIAGEN) and quantified by Qubit® Fluorometer (Life Technology). *In vitro* transcription using three  $\mu$ g of DNA template was done at 37°C for 4 h using RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (Promega). Products were then treated twice with 7.5U of DNaseI using the RNase-free DNase Set (Qiagen) to remove template DNA. Purification of RNA transcripts was then performed using RNeasy® Mini Kit (Qiagen) followed by quantification using Qubit® Fluorometer. RNA concentrations were converted to copy number using the formula provided by the supplier.

Genomic RNA were detected and quantified using Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step kit (Thermo Fisher Scientific). The primer 1342Fwd (5' ATACAGCAAAAGGTTATGACAG 3') and 1444rev were used and serial dilutions of *in vitro* RNA transcribed were used as standards in RT-qPCR. The detection limit for GI.1d/00-21 was estimated at 100 copies per reaction. The negative samples in RT-qPCR were analyzed again with one-step reverse transcriptions and amplifications performed using

U38 and L337 as primers (Le Gall-Reculé et al., 2011) and SuperScript™ III One-Step Plantinimum Taq HiFi (Invitrogen) in order to confirm or not the results.

### 2.2.6. Serology

Blood sample collected during the assay were centrifuged at 3,000 rpm, 15 min at 4°C to separate the plasma. Sera were analyzed in duplicate for the presence of anti-VP60 RHDV antibodies by the commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Ingezim RHDV 17.RHD.K1 kit, using manufacturer instructions.

### 2.2.7. Statistics

The time interval to death was investigated with Kaplan–Meier Survival Plots and compared statistically between groups using log rank tests in RStudio version 1.1.463.

## 3. Results

### 3.1 *GI.1d/00-21 strain genome characterization*

The GI.1d/00-21 genome sequence (Accession Number MH190418) was 7,437 nucleotide (nts) in length excluding the poly(A) tail. When compared with the other GI.1 genomes, a substitution T/C was detected at the position 8 of the 5' UTR. The genome organization and the expected cleavage sites previously described for the GI.1 polyprotein proteolytic processing (Meyers et al., 2000) are illustrated in the Fig. 1. ORF1 has the same order of nonstructural proteins (p16, p23, 2C-like helicase, p29, VPg, 3-C like protease and RNA-dependent RNA polymerase RdRp) and major structural protein (capsid protein VP60) obtained after the proteolytic processing of the polyprotein. ORF2 contains the minor structural protein VP10. However, a change in the potential p23/2C-like helicase cleavage site (dipeptide E367/N368 instead of E/D) was observed. No recombination events with known lagovirus were detected (data not shown).

Results of the phylogenetic analyses based on the VP60 gene nucleotide sequences of 117 GI.1 selected lagoviruses are shown in the Fig. 2. The results revealed that the strain belonged to the GI.1d variant according to the nomenclature proposed by Le Pendu et al. (2017).

### 3.2. *In vivo replication kinetics and mortality rate*

No macroscopic lesions were observed at necropsy in rabbits sacrificed between 16 and 45 hpi. The first macroscopic lesions were reported in the two rabbits that died at 60 hpi. In both rabbits, typical

lesions such as hemorrhagic liver, lungs and trachea, as well as splenomegaly were observed (Plassiart et al., 1992).

Viral genome was detected by RT-qPCR in the liver, duodenum and the rectal swab supernatant from one rabbit sacrificed at 16 hpi and one rabbit sacrificed at 20 hpi. Only the duodenum sample from the second rabbit sacrificed at 16 was found to be positive by RT-qPCR and no viral genome were detected in the tissue samples from the rabbit sacrificed at 20 hpi. At 24 hpi, viral genome was detected in the duodenum sample from one rabbits and both duodenum and liver samples from the other rabbit. At 39 hpi, viral genome was detected in liver, duodenum and rectal swab supernatant from one rabbit and in all the tissues from the other rabbit. After this point, all the tissue samples from the rabbits sacrificed at 45 and 60 hpi were found to be positive by RT-qPCR. The numbers of viral RNA copies/ $\mu\text{L}$  (log 10) were presented in the Table 2, and the replication kinetics was illustrated in the Fig. 3.

Eight out of 14 rabbits died of the disease and showed lesions at necropsy typical to RHD as described above. The six surviving rabbits sacrificed at the end of the trial at eight dpi showed no macroscopic lesions. The mortality rate was estimated at 57%. The corresponding survival curve for the highest viral dose (estimated at  $10^{11}$  gRNA copies) is illustrated in red in the Fig. 4. Viral genome was detected in the 14 liver samples by RT-qPCR. Only two sera could be analyzed and one was found positive by RHDV-ELISA.

No mortality was observed in negative controls housed in C4. At the end of the trial, no macroscopic lesions were observed at necropsy and the tissue samples collected from one rabbit remained free of GI.1d/00-21 RNA (Table 2). Both blood samples were found negative by RHDV-ELISA.

### 3.3. *In vivo* viral genome dose effect

No mortality was observed in the nine rabbits inoculated with the weak or very weak dose, estimated at  $10^4$  and 0.1 viral genome equivalent, respectively. The survival rates were estimated at 100% with these doses and the survival curves were illustrated in blue in the Fig. 4. There was a significant statistical difference in log rank test between both survival curves and that of the rabbit inoculated with the high dose ( $p=0.05$ ). No macroscopic lesions were observed at the necropsy and all liver samples were found negative by RT-qPCR. However, a liver sample was found weakly positive by RT-PCR in a rabbit inoculated with the weak dose. Sera collected at the beginning and at the end of the trial (11 dpi) were found to be negative by ELISA.

Mortality was observed in the nine rabbits inoculated with the middle dose estimated at  $10^7$  gRNA copies. Eight rabbits died of the disease including the contact rabbit and two rabbits were sacrificed after observation of signs of terminal disease before the end of the trial (10 dpi). The mortality rate was then estimated at 80%. The survival curve was illustrated in green in the Figure 4. A significant statistical difference was shown between the survival curve of the rabbits inoculated with this middle dose and those of the rabbits inoculated with the weak or the very weak doses ( $p=4\text{E}-06$ ) but not with that of the

rabbits inoculated with the high dose ( $p=0.4$ ). All rabbits had typical lesions due to RHDV infection. All liver samples were positive by RT-qPCR. Blood samples collected at the beginning of the trial and those collected from the two sacrificed rabbits were found negative in ELISA.

#### 4. Discussion

The 00-21 strain belongs to GI.1d variant according to the proposal for a unified classification system for lagoviruses (Le Pendu et al., 2017). GI.1d that mainly circulated in France since 1990 contains strains previously assigned into three genetic groups (G3, G4 and G5) following spatiotemporal distribution (Le Gall-Reculé et al., 2003), but further phylogenetic studies revealed that they could not be distinguished (Kerr et al., 2007). Thus, the GI.1d/00-21 strain was initially characterized as belonging to G5. Some GI.1d complete or almost complete (without complete UTR sequences) genome sequences from Barhain in 2001 and from European countries except from France, collected between 1994 and 2004 were previously obtained (Forrester et al., 2008; Fitzner and Niedbalski, 2017; Lopes et al., 2017). Thus, this study has allowed the characterization for the first time of the complete genome sequence of a French GI.1d strain. GI.1d/00-21 genome organization is typical to that of lagovirus. Nevertheless, the potential p23/2C-like helicase cleavage site (dipeptide E367/N368) is unique since that of other lagoviruses is E/D or E/E at this position. However, the E/N cleavage site has been identified between 3C-like protease and RdRp for GII.1/EBHSV (Le Gall et al., 1996; Lopes et al., 2013) and GII.2/HaCV (Droillard et al., 2018), suggesting that the efficacy of p23/2C-like helicase cleavage should not to be affected. Although not all GI.1 5' UTR sequences are available, the T/C nucleotide substitution observed at position 8 of the 5' UTR is not shared with any other. However, the first six nucleotides conserved among all lagovirus sequences are also conserved for GI.1d/00-21. A nucleotide substitution localized in a very conserved position was observed in the 5' UTR. Although few GI.1 5' UTR sequences are available, none shares this feature. The 5' UTR was described to interact with host factors in other caliciviruses (Alhatlani et al., 2015) but the role of lagovirus 5' UTR is unknown.

In order to estimate the infectious virus load of the inoculums used for the *in vivo* assays by reducing the bias induced by the direct quantification of viral RNA from infected liver homogenates, a viral purification step was realized. For this purpose, we performed a centrifugation through an iodixanol gradient using the method developed by Teixeira et al. (2011) for RHDV. This purification method was shown to offer a high degree of purity and to not affect virus viability. In addition, the RT-qPCR developed in this study targeted the non-structural part of the genome in contrast to the RT-qPCR described in the literature that targeted the VP60 gene (Duarte et al., 2015; Gall et al., 2007; Liu et al., 2015). Since the VP60 gene is located in both genomic and subgenomic RNAs (Meyers et al., 1991), targeting this gene may allow for better RT-qPCR sensitivity in particular for diagnostic purposes, but may overestimate the infectious virus load. A better correlation between the number of viral genomes detected and the number of infectious particles present in the sample is important to quantify as

accurately as possible the number of viral particles inoculated or contained in tissue samples of infected rabbits.

In this study, GI.1d/00-21 genomes were detected from the first two killed rabbits at 16 hpi, in small amounts in the liver and the rectal swab supernatant for one rabbit, and in larger amounts in the duodenum for both. The detection of viral genome in the duodenum and the rectal swabs supernatant was not surprising after an inoculation via the oral route. However, we showed that the virus quickly spread in the liver and was present at 16 hpi. This observation is consistent with studies on RHD performed by Guitré et al. (1996) who detected RHDV RNA by RT-PCR in the liver of infected rabbits killed at 18 hpi, and by Prieto et al. (2000) who detected VP60 proteins within a few hepatocytes of the first rabbit sacrificed at 12 hpi. On the contrary, Alonso et al. (1998) were not able to detect VP60 in infected rabbits killed at 12 and 24 hpi, perhaps due to the use of different assay conditions (Prieto et al., 2000). Nevertheless, we did not detect GI.1d/00-21 genomes in the spleens of rabbits at 16 hpi, unlike Guitré et al. (1996) at 18 hpi. At 20 and 24 hpi, when detected, the viral genome load in duodenum samples decreased, in contrast to the viral load in liver samples. However at 20 hpi, these results were obtained only from a single rabbit. Samples collected from the other rabbit were negative for viral RNA, suggesting natural resistance or inoculation problems. The decrease in viral genome load in the duodenum could be explained by the elimination of the inoculum in the rabbit organism, whereas the larger amounts of viral RNA in the liver could indicate the beginning of viral replication in this organ. Indeed, previous studies on RHD showed that the liver was the target organ of pathogenic strains with notably the histological observation of hepatitis lesions starting at 30 hpi (Plassiart et al., 1992). From 39 hpi, all tissue samples were found to be positive by RT-qPCR for all rabbit except for the second rabbit euthanized at 39 hpi, for which only the liver, duodenum and rectal swab supernatant were positive for viral RNA. Guitré et al. (1996) also reported this individual variability at 36 hpi and no longer at 48 hpi. In our study, the first rabbits were spontaneously died at 60 hpi and between 24 and 45 hpi, the virus spread in all tissues collected without causing macroscopic lesions in organs. As previously showed for the liver (Guitré et al., 1996), our study furthermore demonstrated that the viral genome load increased in all organs collected from infected rabbits.

Regarding the estimation of the minimum dose of infectious GI.1d/00-21 virus inducing mortality, no mortality was observed with the doses 0.1 and  $10^4$  gRNA copies inoculated to rabbits. However, a liver sample was found to be weakly positive by RT-PCR in a rabbit inoculated with the  $10^4$  viral genome dose revealing that the virus replicated in the liver without causing mortality. These results were expected for the lowest dose but not a priori for the  $10^4$  gRNA copy dose. Indeed, previous studies showed that the amounts of viable GI.1/RHDV in oral and/or anal excretions of flies were sufficient to cause RHD in rabbits (Agashi et al., 1998). Nystrom et al. (2011) infected 10 rabbits with one inoculum containing  $10^5$  GI.1d RNAs (VP60 gene copies) and obtained a 30% mortality rate. The  $10^5$  gRNA copies could correspond to the minimum genome equivalent virus dose for a GI.1d variant to cause mortality in rabbits but comparison with our study is difficult due to the differences of strain and

inoculum preparation. Indeed in our study, 0.1 and  $10^4$  genome copies were estimated from purified virus and not from infected liver homogenates. When inoculating  $10^7$  genome copies, 80% mortality rate was obtained. This mortality rate was generally described for RHD (Lavazza and Capucci, 2016). Finally, the high dose ( $10^{11}$  gRNA copies) caused only 57% of mortality rate. This result could be explained by the too short assay duration due to the availability of BSL2 rooms for this trial during which all rabbits were sacrificed at 8 dpi instead of 11 dpi in the other trials. However, no statistical differences were observed between the corresponding survival curve and that of the middle dose at  $10^7$  genome copies. Thus, the results of the *in vivo* viral genome dose assay showed that GI.1d/00-21 needed at least between  $10^4$  and  $10^7$  gRNA copies to cause mortality in susceptible rabbits.

*In vivo* assays in normalized conditions were required to estimate the pathogenicity and to better understand the early stages of GI.1d infection in rabbits. Our results showed that pathogenicity of GI.1d/00-21 and its replication kinetics in the organs of infected rabbits were very close to those published for the GI.1b and GI.1c strains and cannot by themselves explain a selective advantage of GI.1d. It would be interesting to search for the presence of genomic RNA in liver tissue samples from infected rabbits before 16 hpi to know more precisely when this target organ of pathogenic lagoviruses was infected. A higher frequency of collection points between 24 and 39 hpi would also provide information on the order in which the other organs were infected. The minimum infectious viral particle dose from GI.1d/00-21 to cause mortality in rabbits is higher than expected, but the molecular method developed in this study to quantify infectious viral particles present in the inoculums provides a better estimation than previously published methods. Thus, the determination of the minimum infectious viral dose of this strain will be useful for subsequent studies requiring its multiplication *in vivo*. Besides, it may be interesting to follow the viral distribution in rabbits infected with different viral doses to see their impact on virus replication *in vivo*.

## References

- Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., Esteves, P.J., 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* 43, 12.
- Alhatlani, B., Vashist, S., Goodfellow, I., 2015. Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus research* 206, 134-143.
- Alonso, C. Oviedo, J. M., Martín-Alonso, J. M., Díaz, E., Boga, J. A., Parra, F., 1998. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 143, 321–332.
- Asgari, S., Hardy, J.R., Sinclair, R.G., Cooke, B.D., 1998. Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera:Calliphoridae) among wild rabbits in Australia. *Virus Res* 54, 123–132.
- Bousslama, A., De Mia, G.M., Hammami, S., Aouina, T., Soussi, H., Frescura, T., 1996. Identification of the virus of rabbit haemorrhagic disease in Tunisia. *Vet. Rec.* 138, 108-110.
- Calvete, C., Sarto, P., Calvo, A. J., Monroy, F. & Calvo, J. H., 2014. Could the new rabbit haemorrhagic disease virus variant (RHDVb) be fully replacing classical RHD strains in the Iberian Peninsula? *World Rabbit Science* 22, 91.

- Cancellotti, F.M., Renzi, M., 1991. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Rev Sci Tech* 10, 409-422.
- Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., and Rossi, C., 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol* 70, 8614-8623.
- Cooke, B.D., Fenner, F., 2002. Rabbit haemorrhagic disease and the biological control of wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Australia and New Zealand. *Wildl Res*, 29:689-706
- Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P., Villafuerte, R., 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conserv Biol* 22, 1106-1117.
- Delibes-Mateos, M., Ferreira, C., Carro, F., Escudero, M.A., Gortazar, C., 2014. Ecosystem effects of variant rabbit hemorrhagic disease virus, Iberian Peninsula. *Emerging Infectious Diseases* 20, 2166-2168.
- Droillard, C., Lemaitre, E., Chatel, M., Guitton, J-S., Marchandeu, S., Eterradosi, N., Le Gall-Reculé, G., 2018. First complete genome sequence of a hare calicivirus strain isolated from *Lepus europaeus*. *Microbiol. Resour. Announc.* 7, 22, e01221-18
- Duarte, M.D., Carvalho, C.L., Barros, S.C., Henriques, A.M., Ramos, F., Fagulha, T., Luís, T., Duarte, E.L., Fevereiro, M., 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J Virol Methods* 219, 90-95.
- Fitzner, A., Niedbalski, W., 2017. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated in Poland. *Arch Virol*, 162, 3197-3203.
- Forrester, N.L., Moss, S.R., Turner, S.L., Schirrneier, H., and Gould, E.A., 2008. Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: possible impact on evolution and epidemiology. *Virology* 376, 390-396.
- Gall, A., Hoffmann, B., Teifke, J.P., Lange, B., Schirrneier, H., 2007. Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet Microbiol* 120, 17-32.
- Gavier-Widen, D., Morner, T., 1991. Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries: a review. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10: 453-458.
- Gregg, D.A., House, C., Meyer, R., Berninger, M., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev Sci Tech* 10, 435-451.
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 2000. Caliciviridae. In *Virus Taxonomy 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by van Regenmortel M, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten E, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo M, McGeoch D, Pringle CR, Wickner R. Orlando, FL: Academic Press.
- Guittré, C., Baginski, I., Le Gall, G., Prave, M., Trépo, C., Cova, L., 1995. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 58, 128-132.
- Guittré, C., Ruvoen-Clouet, N., Barraud, L., Cherel, Y., Baginski, I., Prave, M., Ganiere, J.P., Trepo, C., Cova, L., 1996. Early stages of rabbit haemorrhagic disease virus infection monitored by polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed B* 43, 109-118.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Lavazza, A., Capucci, L. 2016. Rabbit Haemorrhagic Disease, In: *OIE Terrestrial Manual 2018*, 1389-1406.
- Le Gall, G., Arnauld, C., Boilletot, E., Morisse, J.P., Rasschaert, D., 1998. Molecular

- epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J. Gen. Virol.* 79, 11-16.
- Le Gall, G., Huguet, S., Vende, P., Vautherot, J-F., Rasschaert, D., 1996. European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. *J. Gen. Virol.* 77, 1693–1697
- Le Gall-Recule, G., Zwingelstein, F., Laurent, S., de Boissesson, C., Portejoie, Y., Rasschaert, D., 2003. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol* 148, 65-81.
- Le Gall-Recule, G., Zwingelstein, F., Portejoie, Y., Le Gall, G., 2001. Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic Disease and European Brown Hare Syndrome viruses. *J Virol Methods* 97, 49-57.
- Le Pendu, J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Guitton, J.S., Le Gall-Recule, G., Lopes, A.M., Marchandeu, S., Alda, F., Almeida, T., Celio, A.P., Barcena, J., Burmakina, G., Blanco, E., Calvete, C., Cavadini, P., Cooke, B., Dalton, K., Delibes Mateos, M., Deptula, W., Eden, J.S., Wang, F., Ferreira, C.C., Ferreira, P., Foronda, P., Goncalves, D., Gavier-Widen, D., Hall, R., Hukowska-Szematowicz, B., Kerr, P., Kovaliski, J., Lavazza, A., Mahar, J., Malogolovkin, A., Marques, R.M., Marques, S., Martin-Alonso, A., Monterroso, P., Moreno, S., Mutze, G., Neimanis, A., Niedzwiedzka-Rystwej, P., Peacock, D., Parra, F., Rocchi, M., Rouco, C., Ruvoen-Clouet, N., Silva, E., Silverio, D., Strive, T., Thompson, G., Tokarz-Deptula, B., Esteves, P., 2017. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 98, 1658-1666.
- Lemaitre, E., Zwingelstein, F., Marchandeu, S., Le Gall-Recule, G., 2018. First complete genome sequence of a European non-pathogenic rabbit calicivirus (lagovirus GI.3). *Arch Virol* 163, 2921-2924.
- Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Qian, N.H., 1984. A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine* 16, 253-255.
- Liu, W., Dang, R., Wang, X., 2015. Development of a SYBR-based real-time PCR to detect rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and analyze its tissue distribution in experimentally infected rabbits. *Virol Sin* 30, 228-230.
- Lopes, A.M., Correia, J., Abrantes, J., Melo, P., Ramada, M., Magalhães, M.J., Alves, P.C., and Esteves, P.J. (2015a). Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses* 7, 27-36.
- Lopes, A.M., Gavier-Widén, D., Le Gall-Reculé, G., Esteves, P.J., Abrantes, J., 2013. Complete coding sequences of European brown hare syndrome virus (EBHSV) strains isolated in 1982 in Sweden. *Arch. Virol.* 158, 2193–2196.
- Lopes, A.M., Magalhães, M.J., Alves, P.C., Esteves, P.J., Abrantes, J., 2017. An update on the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) strains circulating in Portugal in the 1990s: earliest detection of G3-G5 and G6. *Arch. Virol.* 162, 1-5.
- Mahar, J.E., Hall, R.N., Peacock, D., Kovaliski, J., Piper, M., Mourant, R., Huang, N., Campbell, S., Gu, X., Read, A., Urakova, N., Cox, T., Holmes, E.C., Strive, T., 2018. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival. *Journal of Virology*, 92, e01374-17
- Marcato, P.S., Benazzi, C., Vecchi, G., Galeotti, M., Della Salda, L., Sarli, G., Lucidi, P., 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 10, 371-392.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus. Evol.* 1, vev003.
- McIntosh, M.T., Behan, S.C., Mohamed, F.M., Lu, Z., Moran, K.E., Burrage, T.G., Neilan, J.G., Ward, G.B., Botti, G., Capucci, L., Metwally, S.A., 2007. A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virol. J.* 4, 96.

- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.-J., 1991. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 184, 677-686.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.J., Thumfart, J.O., 2000. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 276, 349-363.
- Mitro, S., Krauss, H., 1993. Rabbit hemorrhagic disease: A review with special reference to its epizootiology. *European Journal of Epidemiology* 9, 70-78.
- Morisse, J.P., Le Gall, G., Boilletot, E., 1991. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Rev Sci Tech* 10, 269-310.
- Nystrom, K., Le Gall-Recule, G., Grassi, P., Abrantes, J., Ruvoen-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Lopes, A.M., Esteves, P.J., Strive, T., Marchandeu, S., Dell, A., Haslam, S.M., Le Pendu, J., 2011. Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog* 7, e1002188.
- Parra, F., Prieto, M., 1990. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J. Virol.* 64, 4013.
- Plassiart, G., Guelfi, J.F., Ganiere, J.P., Wang, B., Andre-Fontaine, G., Wyers, M., 1992. Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic disease. *Zentralbl Veterinarmed B* 39, 443-453.
- Prieto, J.M., Fernandez, F., Alvarez, V., Espi, J.F., Garcia Marin, J.F., Alvarez, M., Martin, J.M., Parra, F., 2000. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Research in Veterinary Science*, 68, 181-187.
- Rouco, C., Abrantes, J., Serronha, A., Lopes, A.M., Maio, E., Magalhães, M.J., Blanco, E., Bárcena, J., Esteves, P.J., Santos, N., Alves, P.C., and Monterroso, P., 2018. Epidemiology of RHDV2 (*Lagovirus europaeus*/GI.2) in free-living wild European rabbits in Portugal. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, e373-e382.
- Rouco, C., Aguayo-Adan, J. A., Santoro, S., Abrantes, J., Delibes-Mateos, M. 2019. Worldwide rapid spread of the novel rabbit haemorrhagic disease virus (GI.2/RHDV2/b). *Transbound Emerg Dis* 66, 1762-1764.
- Schirrmeyer, H., Reimann, I., Kollner, B., and Granzow, H., 1999. Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch Virol* 144, 719-735.
- Teixeira, L., Marques, R.M., Aguas, A.P., Ferreira, P.G., 2011. A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits. *Res Vet Sci* 91, 164-166.
- Ueda, K., Park, J.H., Ochiai, K., Itakura, C., 1992. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *The Japanese journal of veterinary research* 40, 133-141.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.

**Table 1**

List of primers used to amplify and/or to sequence the GI.1d/00-21 complete coding sequence

Primers	Primer sequence (5'-3')	Position (relative to GenBank accession number MH190418)
1U	GATTAGGCCGTGAAAGTTATG	1-13
1L	CAACGTCAACAACTTGCC	532 - 552
7L	CCACTGCCGTTGTGTCTCAT	3350 - 3369
13L	GCACGAACGACATGTCAGG	6314 - 6332
15L	ATCAAGCACTGGACTCGCC	7362 - 7378
3082Fwd	CATGACATGACTGCAGAGGAG	3092 - 3112
5461Rev	GCCAATCCCTGCCGTTGCAATCG	5450 - 5473

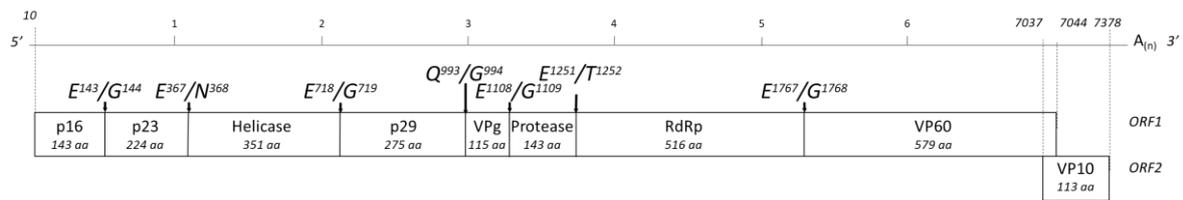
**Table 2.**

Genomic RNA copies of GI.1d/00-21 per uL of RNA calculated from RT-qPCR analyses (log)

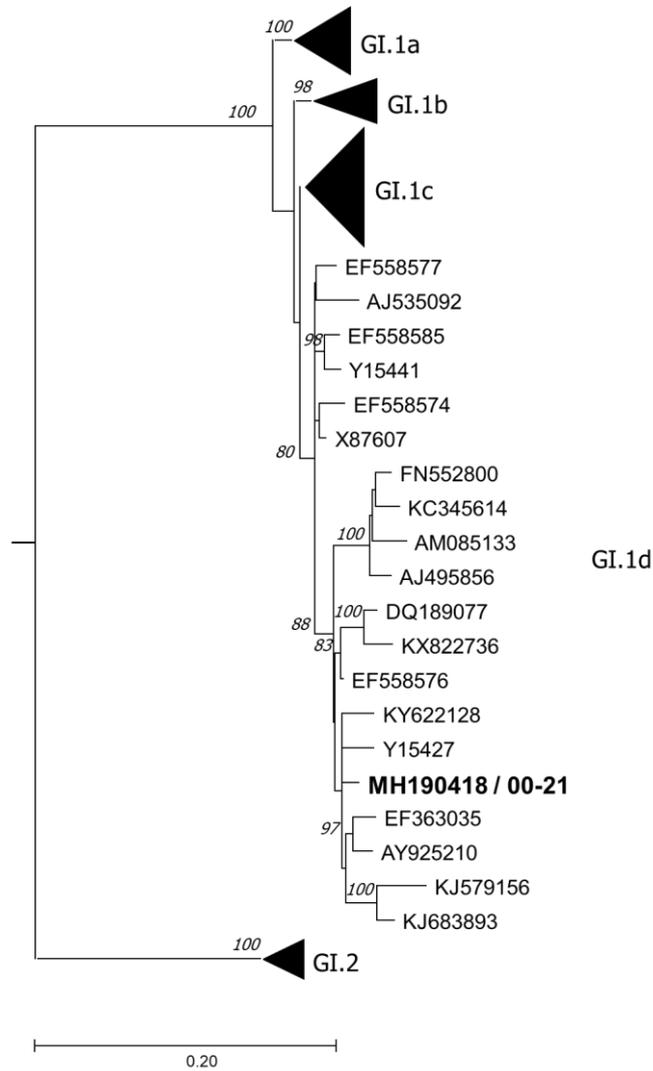
Time (hpi)	Liver	Duodenum	Rectal swab	Thymus	Lungs	Spleen	Kidney	Faeces
Control								
16		4.31E+00						
16	2.50E+00	4.72E+00	2.20E+00					
20	2.75E+00	2.72E+00	2.56E+00					
20								
24	3.77E+00	2.71E+00						
24		2.20E+00						
39	3.65E+00	3.40E+00	3.25E+00					
39	7.32E+00	3.91E+00	3.36E+00	5.38E+00	6.11E+00	2.51E+00	4.95E+00	3.72E+00
45	5.85E+00	3.70E+00	2.91E+00	4.97E+00	4.15E+00	4.11E+00	4.15E+00	2.26E+00
45	7.08E+00	4.15E+00	3.93E+00	5.00E+00	5.59E+00	3.11E+00	5.57E+00	3.18E+00
60	7.92E+00	4.26E+00	4.08E+00	6.28E+00	5.18E+00	3.73E+00	6.18E+00	4.04E+00
60	7.34E+00	4.32E+00	3.95E+00	5.91E+00	6.90E+00	6.63E+00	6.64E+00	3.04E+00

The negative control rabbit was sacrificed at the end of the trial (11 dpi).

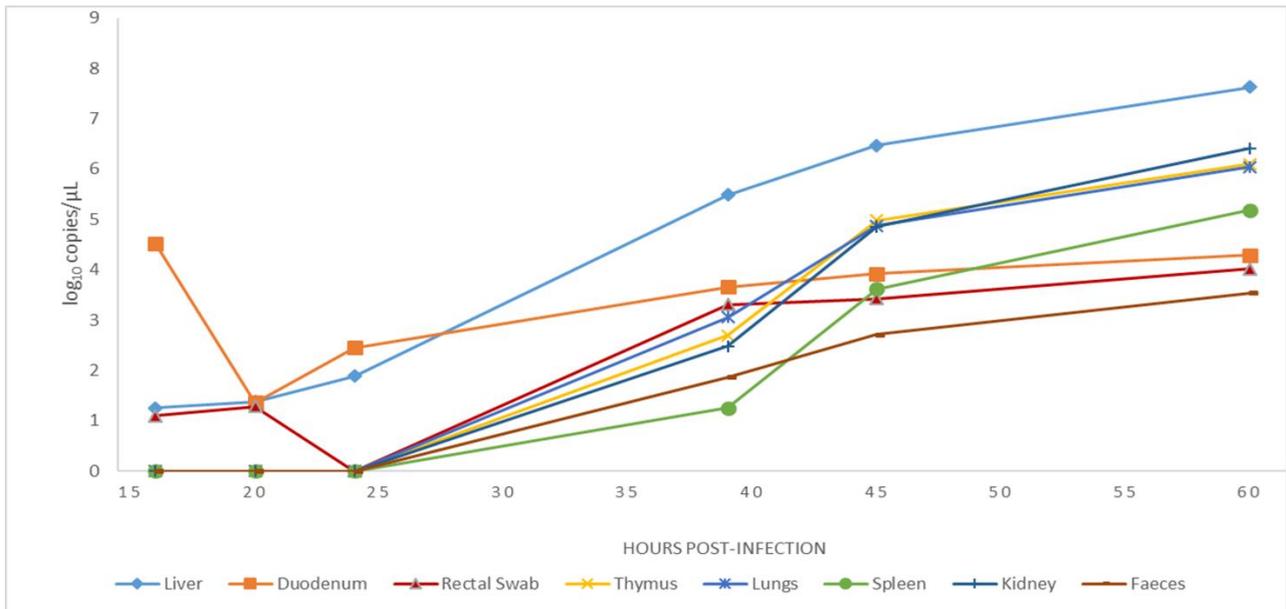
An empty case corresponds to a negative result



**Figure 1.** Genome organization of GI.1d/00-21 strain. The viral genome is 7,433 nucleotides in length, excluding the poly(A) tail. The genomic RNA is organized into two open reading frames (ORFs). ORF1 is 7,044 nt long and encodes a 2,346 amino-acid (aa)-long protein (p16, p23, Helicase, p29, VPg, Protease, RdRp, VP60), and ORF2 is 342 nt long and encodes a 113-aa-long protein (VP10). The expected cleavage sites are illustrated at the top of the genome using black arrows.

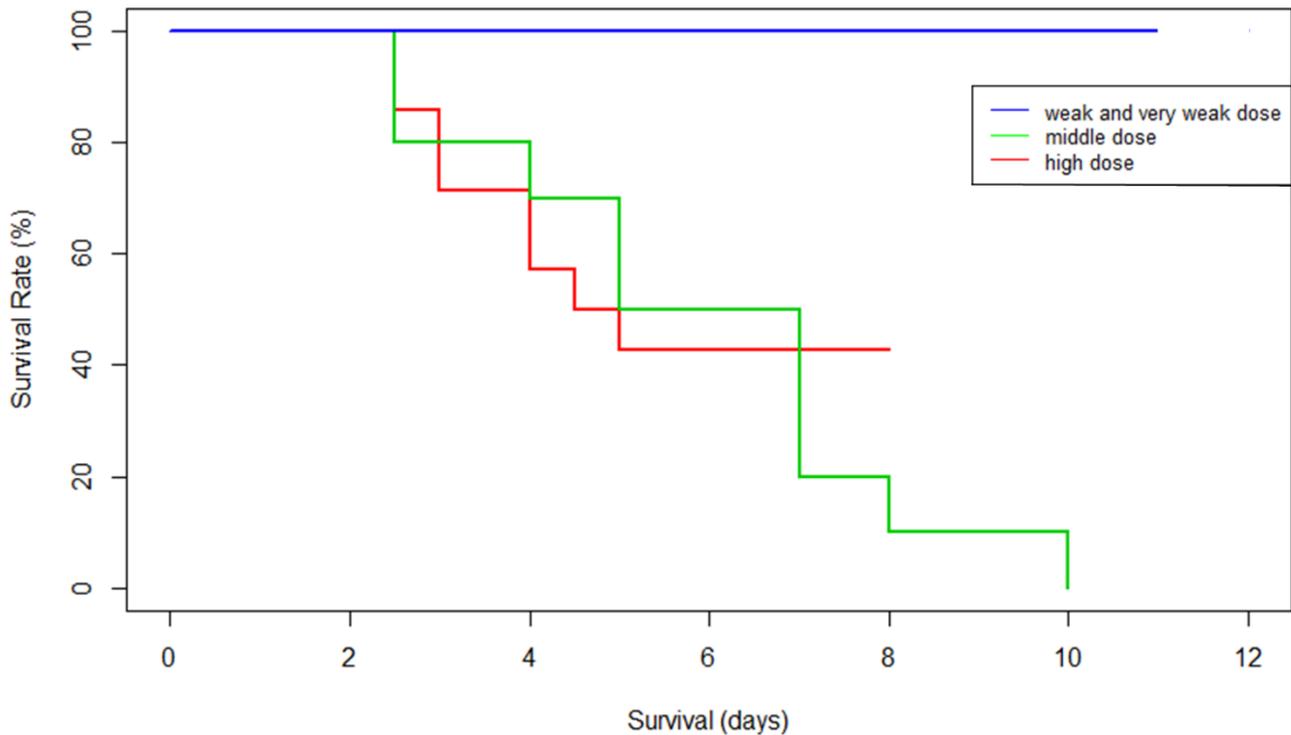


**Figure 2.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of lagovirus GI VP60 gene nucleotide sequences (n=117). The tree was rooted using the European Brown Hare Syndrome Virus EBHSV VP60 sequence (Accession Number AM933650). All known GI genotypes and variants are represented as collapsed in order to reduce the tree size and highlight the newly identified sequence. The sequences were selected with Jalview software (redundancy threshold of 98) from all complete lagovirus GI VP60 gene sequences available in GenBank database. The Maximum-likelihood tree is shown. Sample newly sequenced in this study is shown in bold and significant (greater than 70) bootstrap values for 1,000 replicates are shown in italic after each node.



**Figure 3.** Viral RNA load in tissues of rabbit infected with GI.1d/00-21 strain in early infection stage. RT-qPCR was used to monitor genomic RNA in different organ samples of rabbits sacrificed at 16, 20, 24, 39, 45 hours post-infection (hpi). The two first rabbits that died of RHD at 60 hpi were included in the study.

### Kaplan-Meier Survival Curves



**Figure 4.** Survival analysis of rabbits challenged with GI.1d/00-21 at four doses of genomic RNA copies. The very weak and weak doses were illustrated in blue ( $0.1$  and  $10^4$  genome copies, respectively), the middle dose in green ( $10^7$ ) and the high dose ( $10^{11}$ ) in red. All surviving rabbits were sacrificed at eight days post infection (dpi) for the high dose and at 11 dpi for the other doses. Statistically significant differences between the middle/high dose and the weak/very weak doses were estimated with the log rank test ( $p < 0.05$ ).

## 2. Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour but de tenter de développer un système de génétique inverse pour les lagovirus. Dans un premier temps, le génotype et le phénotype d'une souche GI.1/RHDV de référence ont été caractérisés.

La souche de référence sélectionnée est la souche 00-21. L'obtention du génome complet et l'analyse phylogénétique réalisée à partir de la séquence du gène codant la protéine de capsid VP60 ont confirmé que la souche 00-21 appartenait au variant GI.1d/RHDV. Au niveau génomique, la souche GI.1d/00-21 a une organisation identique à tous les lagovirus et aucune recombinaison avec les lagovirus connus n'a été détectée. Le site potentiel de clivage de la polyprotéine situé entre la protéine p23 et la protéine 2C-like hélicase, le dipeptide E<sup>367</sup>/N<sup>368</sup>, n'a jamais été détecté chez d'autres lagovirus à cette position. Il a toutefois été caractérisé entre les protéines 3C-like protéase et RdRp de certaines souches GII.1/EBHSV et GII.2/HaCV, suggérant que l'efficacité du site de clivage au niveau p23/2C-like hélicase ne soit pas affecté par ce changement de séquence. Une substitution nucléotidique a été par ailleurs identifiée au niveau du 5' UTR, à la position 8 (T->C). Cette substitution n'est pas partagée avec d'autres lagovirus, même si toutes les séquences de 5' UTR ne sont pas disponibles. Cependant, les six premiers nucléotides conservés chez tous les lagovirus le sont aussi pour cette souche. Chez les autres calicivirus, le 5' UTR a été décrit comme interagissant avec des facteurs de l'hôte mais la fonction du 5' UTR des lagovirus est inconnue.

Afin de posséder un stock important de matériel viral pour réaliser les différentes études expérimentales *in vivo* de caractérisation de la souche de référence, un essai de multiplication virale sur des lapins EOPS a dû être effectué. Le séquençage du génome viral post-multiplication a confirmé que la séquence du virus propagé était bien identique à celle de la souche GI.1d/00-21 sauvage.

La cinétique de répllication dans différents organes et le taux de mortalité chez des lapins EOPS de la souche GI.1d/00-21 ont été étudiés en inoculant par voie orale 24 lapins avec un inoculum contenant une dose virale infectieuse estimée à  $10^{11}$  copies de génome viral. Lors de l'étude de la cinétique de répllication de la souche, les premières lésions macroscopiques ont été observées à partir de 60 hpi sur les premiers lapins morts de l'infection virale. L'analyse des prélèvements d'organes en RT-qPCR a révélé que le virus infectait le foie d'un des deux premiers lapins euthanasiés à 16 hpi, et la totalité des organes prélevés à partir de 39 hpi sur l'un des deux lapins euthanasiés ainsi que sur tous les lapins euthanasiés à 45 hpi ou morts spontanément à 60 hpi. Le taux de mortalité dans cet essai a été estimé à 57% confirmant le phénotype pathogène de la souche GI.1d/00-21. Tous les prélèvements de foie des lapins survivants ont été révélés positifs en RT-qPCR.

La dose minimale infectieuse a été estimée entre  $10^4$  et  $10^7$  copies d'ARN génomique viral. En effet, quand les animaux ont été inoculés avec 0,1 ou  $10^4$  copies d'ARN génomique viral, aucune mortalité n'a été observée. Seul un prélèvement de foie sur dix s'est révélé faiblement positif en RT-PCR chez les lapins inoculés avec  $10^4$  copies d'ARN génomique. Quand les animaux ont été inoculés avec  $10^7$  copies d'ARN génomique, le taux de mortalité a été estimé à 80% et la présence d'ARN viral a été confirmée en RT-qPCR dans tous les prélèvements de foie.

Ces caractéristiques génomique et phénotypique de la souche GI.1d/00-21 vont nous permettre de commencer à développer le système de génétique inverse pour les GI.1/RHDV. En effet, les données de séquence génomique vont être utilisées pour cloner la copie ADN du génome viral dans des plasmides devant permettre la régénération de la souche GI.1d/00-21. Les données phénotypiques nous informent sur la cinétique de répllication du virus dans les organes de lapins EOPS ainsi que sur la quantité de particules virales infectieuses nécessaires pour infecter au moins un lapin sur 10, à savoir  $10^4$  copies d'ARN génomique viral, et sur la quantité de particules virales infectieuses nécessaires pour infecter 100% des lapins inoculés et provoquer 80% de mortalité, à savoir  $10^7$  copies d'ARN génomique viral. Afin de valider le système de génétique inverse développé, il faudra qu'il permette de régénérer un virus ayant la même séquence génomique et le même phénotype que la souche de référence GI.1d/00-21.

## II. Travaux préliminaires pour l'élaboration d'un nouveau système de génétique inverse des lagovirus

### 1. Introduction

La structure et l'organisation génomique des lagovirus ont été présentées au paragraphe II. 1. Morphologie et 2. Organisation génomique, de l'introduction du mémoire.

Pour développer notre système de génétique inverse, un plasmide permettant la régénération de métagenomevirus aviaire AMPV de sous-groupe C (Szerman et al. 2019) a été utilisé comme plasmide de référence et modifié pour intégrer une copie complète du génome de la souche GI.1d/00-21. Ce plasmide a été utilisé pour tenter de régénérer une copie recombinante de la souche GI.1d/00-21 ayant les mêmes propriétés génétiques et phénotypiques que le virus sauvage. Dans la première partie de ce travail, des cellules ont été transfectées *in vitro* avec les constructions plasmidiques développées, et la transcription des ARN viraux ainsi que l'expression des protéines virales ont été recherchées. Dans la deuxième partie, trois essais expérimentaux *in vivo* ont été conduits sur lapins EOPS. Dans le premier essai des surnageants et des cellules transfectées ont été inoculés à des lapins.

A la suite de cet essai, les foies des lapins ont été broyés puis ont été inoculés dans le second essai expérimental à de nouveaux lapins. Les autres lapins de ce second essai expérimental ont été inoculés avec des cellules nouvellement transfectées et les surnageants de culture. Dans le dernier essai, les constructions plasmidiques ont été directement inoculées à de nouveaux lapins.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Stratégie adoptée pour le développement du système de génétique inverse

Pour tenter de développer le nouveau système de génétique inverse des lagovirus, l'approche de la transfection d'un seul plasmide dans les cellules sans virus auxiliaire a été sélectionnée car moins lourde à mettre en place et efficace chez la plupart des calicivirus dont les lagovirus (Annexe 3). Parmi les systèmes récents, les plasmides sont composés d'un promoteur recrutant l'ARN pol II ou la polymérase du bactériophage T7, d'un ribozyme HHr, d'une copie du génome viral orienté 5'-3' polyadénylé (entre 20 et 30A quand cela est précisé) (cf. Introduction – C. Génétique inverse – 7. Bilan et évolution des systèmes de génétique inverse des calicivirus). Les plasmides utilisés dans ce nouveau système de génétique inverse comportent deux promoteurs : un pT7 et un pCMV. Le premier promoteur va reproduire les conditions qui ont permis de régénérer le virus RHDV par Liu et al. (2006) avec des ARNs non coiffés traduits dans le cytoplasme des cellules transfectées.

Le second promoteur va quant à lui recruter l'ARN pol II et permettre la production d'ARNs coiffés dans le noyau des cellules transfectées, comme déjà utilisé pour régénérer de nombreux calicivirus (Annexe 3), dont le RHDV (Liu et al. 2008). La séquence du ribozyme HHr a été clonée à l'extrémité 5' du génome viral tandis que celle du ribozyme HDVr a été clonée à l'extrémité 3' du génome viral pour produire des ARNs correspondant à la séquence virale clonée dans le plasmide, selon l'approche utilisée pour augmenter la régénération des MNV (Chaudhry et al. 2007). Enfin, pour tenir compte de la relative incertitude quant à la longueur de la queue polyA à régénérer pour que le génome transcrit à partir de notre plasmide de génétique inverse soit infectieux, nous avons construit un premier plasmide incorporant une queue polyA de 20A suivie de la séquence du HDVr. Le second plasmide a quant à lui été construit dans le but de générer des ARNs polyadénylés avec plus de 20A en clonant à la fin du 3' UTR du génome viral, le signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine (Bovine Growth Hormone) ou BGHpolyA.

## 2.2. Autorisation HCB

La manipulation d'organisme génétiquement modifié (OGM) est autorisée en France par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation qui s'appuie sur les avis du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB). La demande d'agrément d'utilisation d'OGM auprès de ce ministère a donc été effectuée pendant la thèse, le 17/04/2018, pour pouvoir essayer de régénérer des lagovirus. Cette demande a été argumentée sur la base d'un dossier administratif constitué, conformément aux exigences réglementaires :

- D'un dossier technique : décrivant les résultats escomptés, les niveaux de confinement nécessaires d'après les recommandations générales du HCB concernant les organismes utilisés dans le projet ainsi que la gestion des déchets et effluents générés par le projet
- De deux formulaires décrivant les conditions de transfection et les organismes biologiques utilisés dans le projet
- De la cartographie des plasmides utilisés dans le projet
- Du tableau d'association hôte/pathogène décrivant la totalité des constructions plasmidiques du projet (nom de la construction, nom de l'insert, ...), les organismes qui vont permettre de produire l'OGM (cellules, animaux, ...) et enfin les OGM générés (nature de l'OGM, classement de l'OGM)
- D'un dossier de description des installations, plans des locaux et attribution des surfaces, règles de manipulation et mesures en cas d'incident

Le manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés permet de constituer ce dossier. D'après ce manuel, le virus RHDV est classé dans le groupe 3, qui regroupe entre autres les souches de lyssavirus ou de flavivirus collectées chez l'homme, ceci bien que la RHD corresponde à une maladie strictement animale pour laquelle un vaccin commercial est disponible. Cette classification signifie que la manipulation d'outils permettant l'obtention de RHDV génétiquement modifiés ainsi que la manipulation de tout matériel, biologique ou non, contaminé avec le virus OGM doivent être réalisées dans des laboratoires et des animaleries de niveau de confinement 3. Ce classement impose par ailleurs l'inclusion de nouveaux éléments dans le dossier à déposer au Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation :

- Un dossier d'information destiné au public
- Le plan d'urgence des laboratoires L3 et des animaleries A3

Ces compléments ont été déposés le 22/11/2018 et une demande de déclassement pour manipuler le virus issu de génétique inverse dans des installations de confinement 2 a été formulée le 16/01/2019, en s'appuyant sur les éléments énoncés plus haut (maladie strictement animale pour laquelle un vaccin existe).

Nos arguments ont été entendus et la demande de déclassement a finalement été acceptée par le HCB le 06/11/2019 (Annexe 4), cependant trop tardivement pour que cette décision facilitant la mise en œuvre de la génétique inverse puisse être appliquée dans le cadre de cette thèse. De ce fait, l'ensemble des manipulations de génétique inverse *in vitro* et *in vivo* a été effectué en confinement 3.

### 2.3. Souche de référence

La souche pathogène de référence utilisée est la souche GI.1d/00-21 dont la caractérisation génomique et phénotypique est décrite dans la publication 4. Le stock viral de référence a ensuite été préparé comme décrit dans la publication 4. Le RHDV étant stable à -20°C, le stock viral a été conservé à cette température pendant la durée de l'étude.

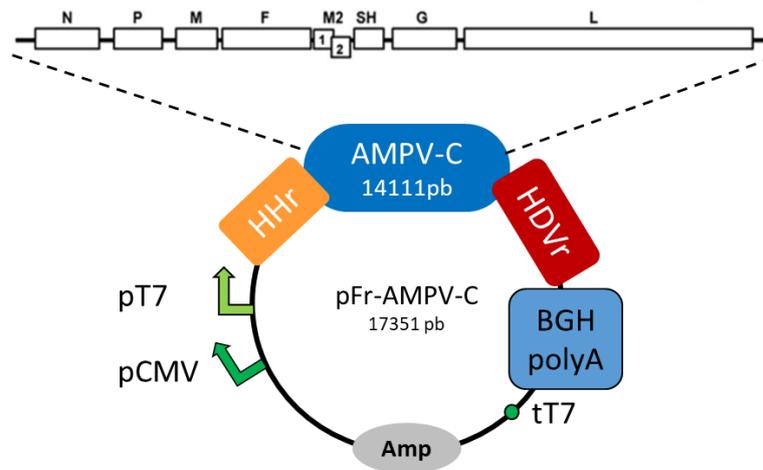
### 2.4. Constructions plasmidiques

Le système de génétique inverse a été basé sur l'utilisation du plasmide pFr-AMPV-C (Szerman et al., 2019), produit au sein du laboratoire d'accueil. Le plasmide est composé d'un pT7 et d'un pCMV, suivi d'une copie ADN du génome d'un AMPV-C orienté 3' -> 5' (virus à ARN négatif) encadré par les séquences des ribozymes HHr et HDVr, du BGHpolyA, de la séquence du terminateur T7 (tT7) et porte le gène de résistance à l'ampicilline (Figure 22). Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pSMART LC Amp (Lucigen) qui présente les avantages d'être de petite taille (2 kb), d'être à faible nombre de copies et permettant la production de protéines toxiques. De plus, ce plasmide ne possède aucun promoteur et de terminateur autour du site multiple de clonage. Cela permet de créer le plasmide que l'on souhaite en ajoutant soi-même les promoteurs, insert et terminateurs.

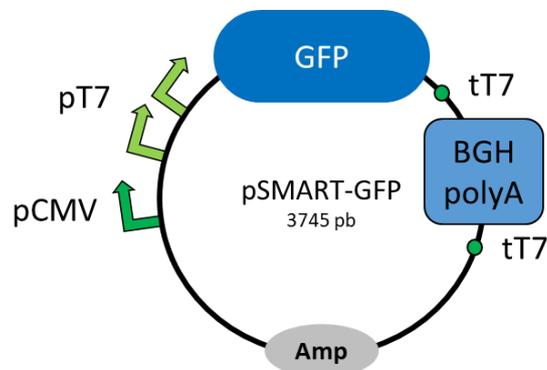
Un autre plasmide produit au laboratoire a également été utilisé, le plasmide pSMART-GFP. Ce plasmide partage le même squelette que le plasmide pFr-AMPV-C. Cependant, le pSMART-GFP possède un pCMV, deux pT7, le gène codant la protéine fluorescente verte (GFP), le tT7, le BGHpolyA et le gène de résistance à l'ampicilline (Figure 23). Pour faciliter le clonage, le plasmide a été construit en insérant un pT7, le gène codant la GFP et un tT7 dans le plasmide pSMART. Cela explique la présence de deux pT7 et deux tT7 dans ce plasmide.

Le plasmide pFr-AMPV-C a servi de matrice pour construire deux plasmides. La polyadénylation des ARNs des lagovirus étant peu décrite dans la littérature, un premier plasmide a été construit pour générer des ARNs flanqués de 20A à l'extrémité 3', et un second plasmide a été construit pour générer

des ARNs flanqués de plus de 20A. Le plasmide pSMART-GFP a quant à lui servi à tester les conditions de transfections des plasmides dans les cellules.



**Figure 22.** Représentation schématique du plasmide pFr-AMPV-C (17351 pb) (Szerman et al. 2019). Le plasmide possède deux promoteurs : le promoteur de la polymérase du bactériophage T7 (pT7) et le promoteur de l'ARN polymérase II du cytomégalovirus humain (pCMV). Les virus AMPV étant des virus à ARN négatif, la copie ADN a été clonée dans le sens 3' -> 5', on retrouve donc après le pCMV la séquence du ribozyme Hammerhead directement suivie de la séquence du gène N, P, M, F, M2, SH, G et L du génome AMPV et de la séquence ribozyme du virus de l'hépatite Delta (HDVr). Le plasmide inclut également la séquence du signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine (Bovine Growth Hormone ou BGHpolyA), la séquence du terminateur T7 (tT7) et un gène de résistance à l'ampicilline (Amp).

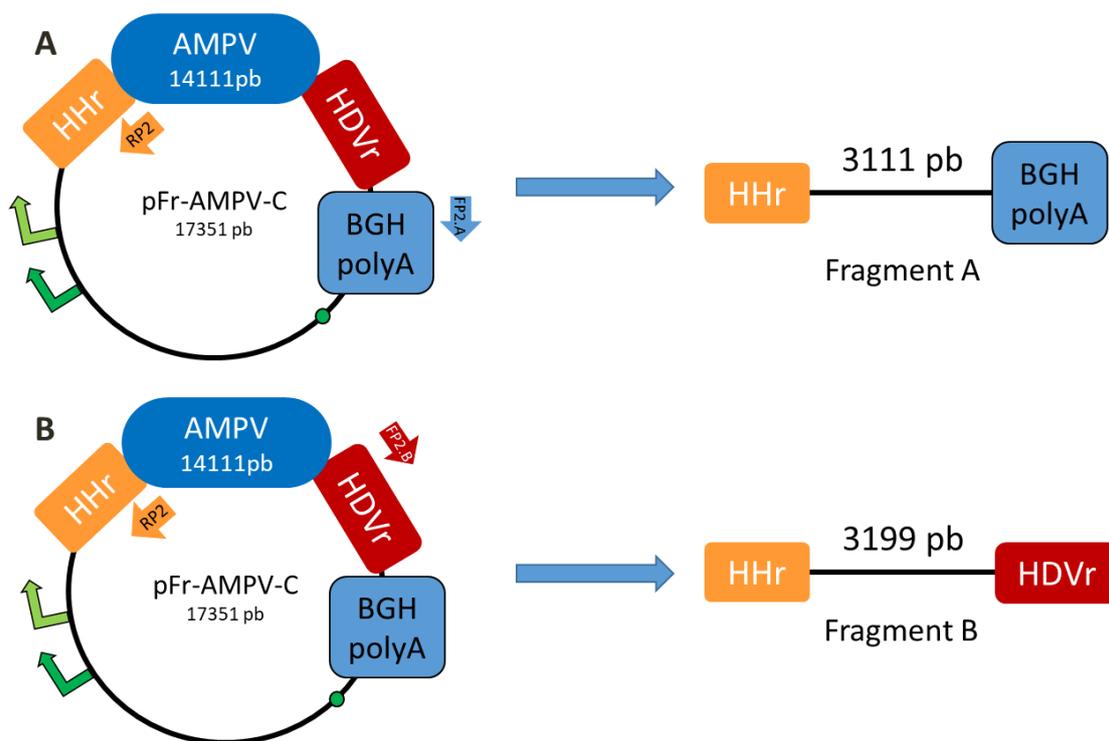


**Figure 23.** Représentation schématique du plasmide pSMART-GFP (3745 pb). Le plasmide possède trois promoteurs : le promoteur de l'ARN polymérase II du cytomégalovirus humain (pCMV) et deux promoteurs de la polymérase du bactériophage T7 (pT7). Le gène codant la protéine fluorescente verte (GFP) est suivi par la séquence du terminateur T7 (tT7) et par la séquence de signal de polyadénylation Bovine Growth Hormone (BGHpolyA). Le plasmide possède aussi un gène de résistance à l'ampicilline (Amp).

### 2.4.1. Cartes plasmidiques

Les deux plasmides destinés à régénérer la production d'ARNs viraux, avec une queue poly A de plus de 20A ou de 20A, ont été appelés pSMART A et pSMART B, respectivement.

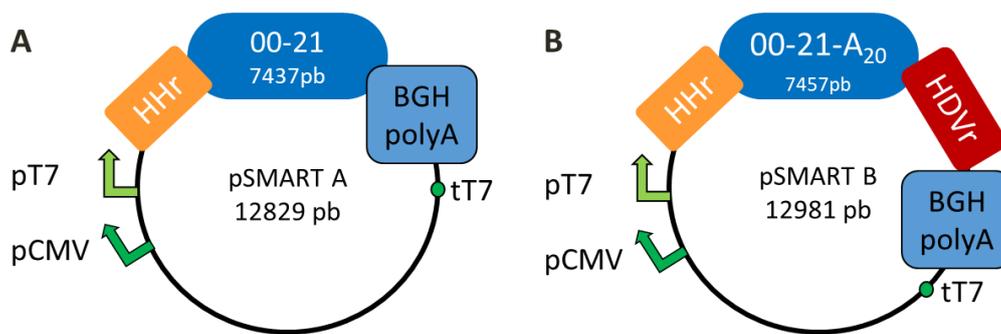
Le plasmide pSMART A est constitué des promoteurs pT7 et pCMV, de la séquence du HHr suivi de la copie ADN du génome de la souche GI.1d/00-21, orienté 5' -> 3', et du BGHpolyA (Figure 24A). Le plasmide pSMART B est très proche du plasmide pSMART A, mais en diffère par l'extrémité 3' de la copie ADN du génome viral, qui est suivie dans pSMART B d'une queue polyA de 20A et de la séquence du ribozyme HDVr (Figure 24B).



**Figure 24.** Représentation schématique des plasmides pSMART A (A) et pSMART B (B). Les plasmides possèdent deux promoteurs : un promoteur de la polymérase du bactériophage T7 (pT7) et le promoteur de l'ARN polymérase II du cytomégalovirus humain (pCMV). (A) Pour le plasmide pSMART A (12829 pb), la copie ADN du génome viral de la souche GI.1d/00-21 (7437 pb), orienté 5' -> 3', est directement suivie par la séquence du signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine (BGHpolyA) et par la séquence du terminateur T7 (tT7). (B) Pour le plasmide pSMART B (12981 pb), l'ADNc du génome viral de la souche GI.1d/00-21 orienté 5' -> 3' est flanqué en son extrémité 3' d'une queue polyA de 20A (7457 pb). Les 20A sont directement suivis par le ribozyme du virus de l'hépatite delta (HDVr), de la séquence du BGHpolyA et de la séquence du tT7. Ces deux derniers éléments n'ont pas d'effet sur les séquences des ARNs produits car le HDVr est situé en amont sur le plasmide.

### 2.4.2. Exérèse de l'insert AMPV

Toutes les PCRs ont été réalisées avec l'enzyme Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Pour la construction du plasmide pSMART A, le plasmide pFr-AMPV-C a été amplifié en PCR avec les amorces FP2.A/RP2 (Annexe 5). Cette PCR permet d'éliminer la copie ADN du génome viral AMPV-C et le HDVr de façon à obtenir le fragment A, composé du squelette du plasmide sans insert, avec en 5' le HHr et en 3' le BGHpolyA (Figure 25A). Pour construire le plasmide pSMART B, le plasmide pFr-AMPV-C a été amplifié en PCR avec les amorces FP2.B/RP2 afin d'éliminer l'ADNc du génome viral AMPV-C (Annexe 5). Cette PCR a généré le fragment B, constitué du squelette du plasmide sans insert, avec en 5' le HHr et en 3' le HDVr (Figure 25B). Les produits PCR ont été purifiés en électrophorèse sur gel d'agarose, révélés sous ultraviolet (UV) et les bandes à la taille 3111 pb et 3199 pb, représentant les fragments A et B respectivement, ont été visualisés. Les fragments A et B ont ensuite été prélevés puis purifiés à l'aide du kit Min Elute (Qiagen) puis dosés en fluorimétrie avec le kit Qubit HS DNA (Thermofisher).



**Figure 25.** Représentation schématique des amplifications réalisées à partir du plasmide pFr-AMPV-C. (A) Pour pSMART A, l'amorce FP2.A (flèche bleue) va s'hybrider à l'extrémité 5' de la séquence du BGHpolyA et l'amorce RP2 (flèche orange) va s'hybrider sur l'extrémité 3' de la séquence du HHr. La PCR va permettre l'amplification du fragment A de 3111 pb contenant la séquence du HHr, les promoteurs pT7 et pCMV, et la séquence du BGHpolyA. (B) Pour pSMART B, l'amorce FP2.B (flèche rouge) va s'hybrider à l'extrémité 5' de la séquence du HDVr. La PCR va permettre l'amplification du fragment B de 3199 pb contenant la séquence du HHr, les promoteurs pT7 et pCMV, le HDVr et la séquence du BGHpolyA.

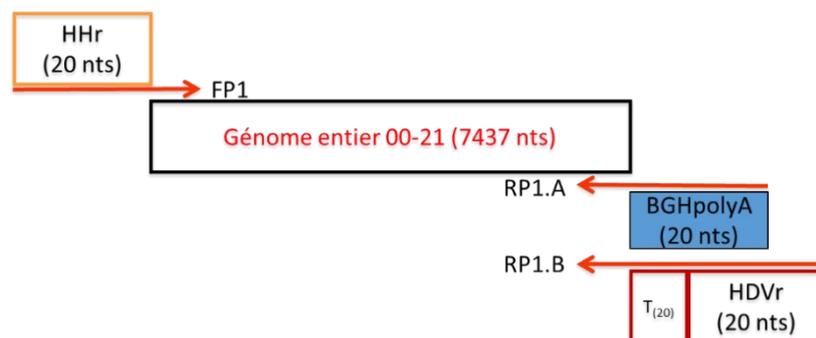
### 2.4.3. Amplification du génome de la souche GI.1d/00-21

Pour cloner la copie du génome viral de la souche GI.1d/00-21, les ARNs totaux ont été extraits à partir d'un exsudat de foie de lapin infecté par la souche GI.1d/00-21 avec le kit Nucleospin II RNA (Macherey Nagel) en suivant les instructions du fabricant. Les ADNc ont ensuite été générés par transcription inverse (RT) avec un oligo(dT) comme amorce avec le kit Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific).

L'ADNc a ensuite été amplifié en une seule fois en PCR avec deux couples d'amorces conçus afin de réaliser l'assemblage de Gibson (Figure 26) :

- Le couple FP1/RP1.A (Annexe 5) : ces amorces possèdent des queues flottantes permettant l'ajout des régions homologues (20 nts) avec le HHr (FP1) et le BGHpolyA (RP1.A). Le produit PCR A va servir à assembler le plasmide pSMART A.
- Le couple FP1/RP1.B (Annexe 5) : ces amorces possèdent des queues flottantes permettant l'ajout des régions homologues (20 nts) avec le HHr (FP1) et le HDVr (RP1.B). L'amorce RP1.B va aussi permettre l'ajout d'une queue polyA de 20A à l'extrémité 3' du génome viral. Le produit PCR B va servir à assembler le plasmide pSMART B

Les produits PCRs A et B ont été purifiés et dosés comme décrit précédemment pour être clonés en assemblage Gibson avec les fragments A et B.



**Figure 26.** Stratégie d'amplification du génome viral pour générer les extensions nécessaires aux assemblages Gibson destinés à construire les plasmides pSMART A et B.

Les plasmides pSMART A et B ont ensuite été assemblés à l'aide de deux techniques de clonage :

- L'assemblage Gibson (recombinaison homologue) (Gibson and Smith et al. 2009)
- Le Restriction Free cloning (RF cloning) (Van den Ent et al. 2006)

#### 2.4.4. Clonage par assemblage de Gibson

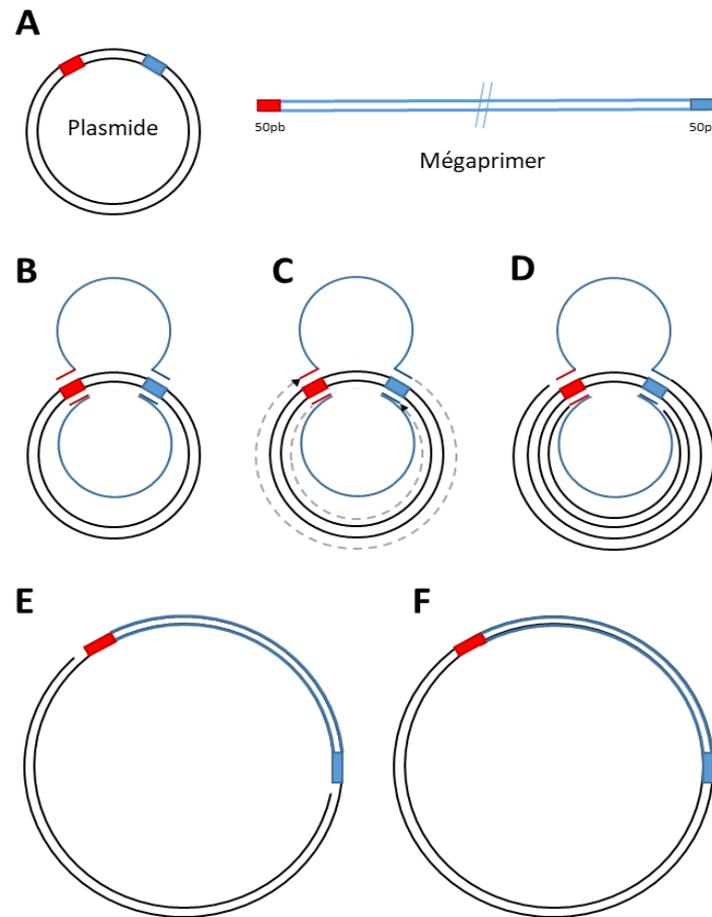
L'assemblage de Gibson correspond au clonage de deux fragments d'ADN linéaires double brin, un plasmide linéarisé et un insert à cloner, ayant des extrémités homologues sur 20 – 40 pb avec les extrémités du plasmide linéarisé. Cet assemblage est réalisé avec un kit composé d'un mélange de trois enzymes : une exonucléase, une ADN polymérase et une ligase à ADN. Ces enzymes vont permettre la recombinaison homologue entre les extrémités du plasmide linéarisé et celles de l'insert.

L'assemblage de Gibson a été entrepris entre le fragment A/produit PCR A et le fragment B/produit PCR B avec le kit Gibson assembly cloning kit (New England Biolabs). Chaque produit des réactions d'assemblage Gibson a ensuite été transformé dans des bactéries *Escherichia coli* compétentes DH5α NEB Express Competent *E. coli* (New England Biolabs), cultivées sur une boîte de pétri LB-Agar + Ampicilline, à 37°C pendant 16h. Cent colonies bactériennes ont ensuite été repiquées sur une nouvelle boîte de pétri LB-Agar + Ampicilline et cultivées à 37°C pendant 16 h. Les colonies repiquées ont été criblées par PCR avec les amorces VHD-21Fwd/VHD-7410rev (Annexe 2). Cette PCR permet d'amplifier le génome viral de la souche GI.1d/00-21. Après migration des produits PCRs sur gel d'agarose, cette PCR permet d'identifier les plasmides ayant la plus grande partie de génome viral clonée *via* l'observation de la taille des bandes.

La PCR VHD-21Fwd/VHD-7410rev a indiqué que l'assemblage de Gibson n'avait pas permis de cloner entièrement les produits PCR A ou B. D'après la taille des bandes obtenues sur gel, le plasmide pSMART A ayant intégré la plus grande partie du fragment A n'a intégré que 2200 pb. Le plasmide B ayant intégré la plus grande partie du fragment B n'a intégré que 1300 pb. Le séquençage de ces plasmides incomplets a révélé que seul le début du génome fusionné à la fin du génome avait été intégré, suggérant une recombinaison aléatoire à l'intérieur du génome viral. Ces plasmides incomplets ont donc été corrigés par Restriction Free cloning (RF cloning).

#### 2.4.5. Clonage par Restriction Free (RF) cloning

Le RF cloning consiste à utiliser un produit PCR, appelé mégaprimé, comme amorce pour insérer une région d'intérêt dans un plasmide parent (Figure 27A). Les extrémités 3' des brins sens et anti-sens du mégaprimé, complémentaires à la séquence du plasmide, vont servir d'amorces anti-sens et sens respectivement. L'hybridation de ces extrémités sur le plasmide va créer une boucle contenant la région à cloner (Figure 27B). Le plasmide va ensuite servir de matrice pour une amplification en PCR (Figure 27C). Une fois amplifié (Figure 27D), le plasmide matrice méthylé est digéré avec l'enzyme *Dpn* I pour générer un plasmide pas totalement circulaire, qui contient l'insert (Figure 27E). Ce plasmide est ensuite transformé dans des bactéries compétentes pour circulariser le plasmide et le multiplier (Figure 27F) (van den Ent and Lowe, 2006).



**Figure 27.** Principe du Restriction Free cloning d'après van den Ent and Lowe (2006). (A) Représentation schématique du plasmide en noir et du mégaprimé en bleu. Les régions qui vont s'hybrider pendant la PCR sont illustrées par un rectangle rouge et un rectangle bleu. (B) Hybridation du mégaprimé au plasmide. (C et D) Amplification du plasmide. (E) Représentation schématique du plasmide pas totalement circularisé qui résulte de la digestion *Dpn* I. (F) Représentation schématique du résultat de RF cloning après transformation des bactéries.

Le plasmide pSMART A ayant intégré le plus grand fragment a ensuite été complété par RF cloning. Le plasmide pSMART A incomplet va donc servir de plasmide parent. Pour générer le mégaprimé permettant de compléter le plasmide parent, le génome complet de la souche GI.1d/00-21 a été amplifié avec les amorces VHD-21Fwd/VHD-7410rev (Annexe 2) à l'aide de la polymérase Phusion Green Hot Start qui ne produit pas de nucléotide supplémentaire aux extrémités du produit PCR. Le mégaprimé a été purifié et dosé comme décrit précédemment. La réaction PCR de RF cloning a été effectuée en présence de 50 ng de mégaprimé et de 7 ng de plasmide parent pSMART A incomplet. Les produits d'amplification ont été digérés avec l'enzyme *Dpn*I Fast Digest (Thermo Scientific) pendant 30 min à 37°C pour éliminer le plasmide incomplet. Les produits digérés ont été transformés dans des bactéries DH5α NEB Express Competent *E. coli*. Après 24h de culture à 37°C sur milieu LB-Agar + ampicilline, 70 colonies ont été repiquées sur une autre boîte de pétri LB-Agar +

ampicilline et cultivées à 37°C pendant 16 h. Les colonies positives ont été cultivées dans 5 mL de milieu liquide LB + ampicilline à 37°C, à 270 rpm pendant 16h. Le plasmide issu de la réaction de RF cloning a été purifié avec le kit Nucleospin plasmid (Macherey Nagel) en suivant les instructions du fabricant et le plasmide pSMART A complet a ensuite été criblé en PCR avec les amorces VHD-21Fwd/VHD-7410rev.

Le plasmide pSMART A qui semblait avoir intégré la copie du génome viral dans sa totalité, après visualisation d'une bande de 7430 pb sur gel d'agarose, a été séquencé dans les deux sens par la méthode de Sanger (amorces décrites Annexe 2) avec le kit Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies) en suivant les instructions du fabricant, et analysé avec l'appareil "3500 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems) afin de rechercher d'éventuelles mutations. La séquence obtenue a été analysée avec le logiciel Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen).

#### 2.4.6. Corrections des mutations et construction de pSMART B par RF cloning

Seules trois mutations ont été détectées en séquençage Sanger. Ces trois mutations étant proches les unes des autres, elles ont été corrigées en RF cloning comme décrit précédemment. Les mégaprimers ont été amplifiés à partir de l'ADNc issu de la RT des ARNs de la souche GI.1d/00-21 sauvage. Deux couples d'amorces (Annexe 5) ont été utilisés pour générer deux mégaprimers permettant la correction des mutations :

- U939/CZe2rev : permet d'amplifier la région 919-1242 du génome viral (323 pb)
- U336SB/7255rev : permet d'amplifier la région 5641-7269 du génome viral (1628 pb)

Le plasmide pSMART A complet et corrigé a été séquencé entièrement en séquençage Sanger pour s'assurer de la validité de la séquence plasmidique (Annexe 2). Il a ensuite servi de matrice pour construire le plasmide pSMART B complet là aussi en RF cloning. Le mégaprimier a été généré avec le couple d'amorce VHD-7258Fwd/BGHpolyA rev (Annexe 5), à partir du plasmide parent pSMART B incomplet issu de la réaction d'assemblage Gibson. Ce couple d'amorce permet d'amplifier l'extrémité 3' du génome viral, la queue poly A de 20A et le HDVr (525 pb) clonés lors de l'assemblage Gibson. Après RF cloning, le plasmide pSMART B a été séquencé entièrement en séquençage Sanger comme décrit précédemment pour s'assurer de la validité de la séquence plasmidique.

Une fois leurs séquences vérifiées, les plasmides pSMART A et B ont été amplifiés en culture bactérienne comme décrit précédemment puis de grandes quantités de chaque plasmide ont été purifiées avec le kit Nucleobond PC 10000 Endotoxin Free (Macherey Nagel). Les plasmides purifiés ont ensuite été séquencés en séquençage Sanger, comme décrit précédemment, pour s'assurer de la validité des séquences plasmidiques. Les positions de toutes les amorces de séquençage sur le plasmide pSMART B sont présentées en Annexe 2. Les plasmides pSMART A et B ont été repris dans

250 µL d'eau Endotoxine free, et ont été dosés à 710 ng/µL et 575 ng/µL respectivement. Ces stocks plasmidiques ont ensuite été aliquotés et surgelés à -20°C pour la fin de l'étude. Les aliquots ont servi pour les transfections *in vitro* et l'inoculation *in vivo*.

## 2.5. Essais de régénération du virus *in vitro*

### 2.5.1. Types cellulaires transfectés

Deux types cellulaires ont été testés pour tenter de régénérer des particules virales infectieuses :

Les cellules RK13 : cellules rénales de lapin *O. cuniculus*. Ces cellules ont l'intérêt majeur de provenir de lapin et, si des co-facteurs cellulaires indispensables au virus sont présents chez l'espèce cible, on peut espérer qu'ils seront exprimés chez cette lignée. Par ailleurs, ce type cellulaire est celui qui a déjà été utilisé pour régénérer le virus RHDV (Liu et al. 2006, Liu et al. 2008, Zhu et al. 2017). Dans ces cellules, des deux promoteurs présents dans les plasmides pSMART A et pSMART B, seul le pCMV a été utilisé. Le milieu de culture était composé de DMEM (Gibco) + 10% de sérum de veau fœtal (SFV) décomplémenté, 200 u/mL de mélange antibiotique (Pénicilline/Streptomycine) et 2 µg/mL de fungizone. Les cellules ont été cultivées en étuve réglée à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les cellules BSR-T7 : cellules rénales de bébé hamster exprimant la polymérase du bactériophage T7. Ces cellules ont permis d'utiliser les deux promoteurs car elles expriment la polymérase du bactériophage T7 et l'ARN pol II. Le milieu de culture était composé de MEM (Gibco) + 10% de SF décomplémenté, 200 u/mL de mélange antibiotique (Pénicilline/Streptomycine) et 2 µg/mL de fungizone. L'agent de sélection G418 a été ajouté dans le milieu de culture (200 µg/mL final) des cellules BSR-T7 pour sélectionner les cellules contenant le plasmide exprimant la polymérase du bactériophage T7. Comme pour les cellules RK13, les cellules ont été cultivées en étuve réglée à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 2.5.2. Agents de transfection

Plusieurs agents de transfections ont été testés à différentes concentrations. Le plasmide pSMART-GFP (Figure 23, plasmide GFP) a été transfecté dans les cellules RK13 et BSR-T7. Ce plasmide, bien que plus petit que les plasmides pSMART A et B, a l'avantage d'avoir une séquence très proche de ceux-ci et exprime la protéine GFP, permettant de détecter facilement les cellules transfectées. Pour transfecter le plasmide pSMART-GFP, les cellules BSR-T7 et RK13 ont été comptées (Tableau 9) et mises en plaque p48, un jour avant la transfection (J-1).

**Tableau 9.** Conditions de transfection testées avec le plasmide pSMART-GFP.

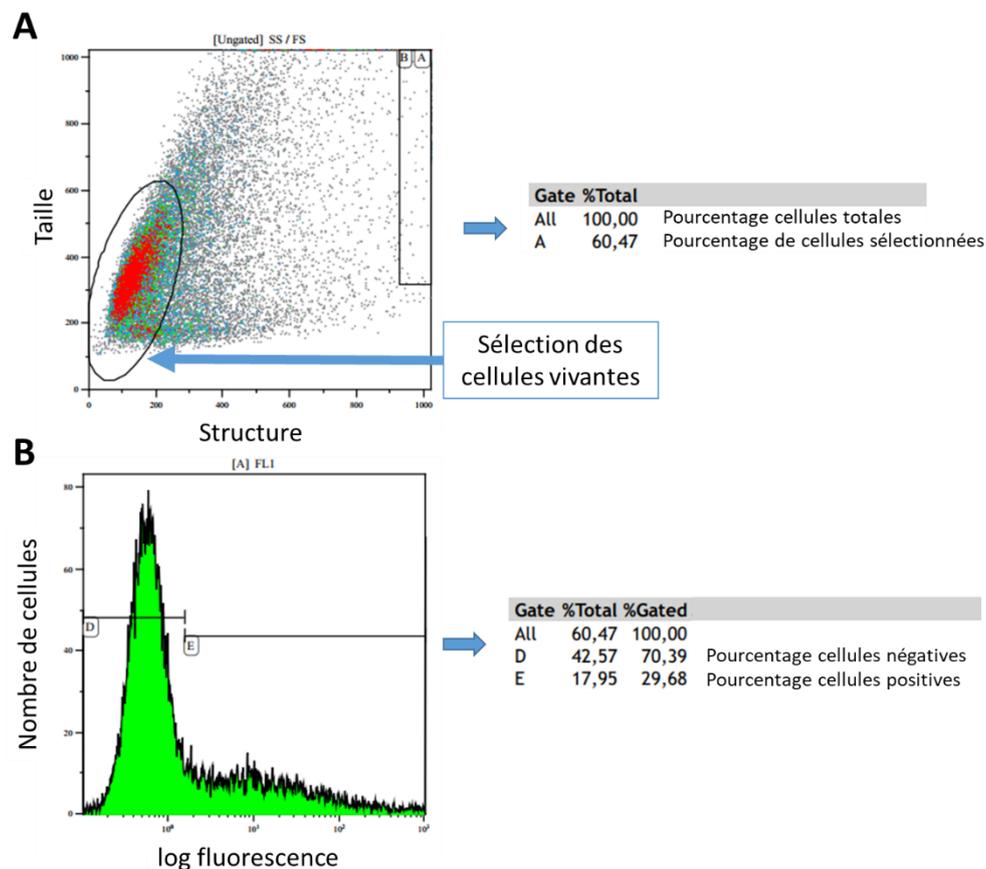
Agent de transfection	Volume d'agent de transfection utilisé par puits	Quantité de plasmide transfecté	Nombre de cellules transfectées
<b>Lipofectamine 2000</b>	5 µL	2 µg	BSR-T7 : $1,4 \times 10^6$ cellules/puits RK13 : $1 \times 10^6$ cellules/puits
<b>Mirus Trans IT-293</b>	6 µL	1 µg	BSR-T7 : $0,6 \times 10^6$ cellules/puits RK13 : $0,4 \times 10^6$ cellules/puits
	3 µL		
<b>Mirus Trans IT-LT1</b>	6 µL		
	3 µL		
<b>Mirus Trans IT-Virus GEN</b>	6 µL		
	3 µL		

Les cellules ont été mises en étuve pendant une nuit jusqu'à observation d'une confluence cellulaire de 80-90%. A J0, le milieu de culture des cellules a été éliminé puis remplacé par 250 µL d'OptiMEM Reduced Serum Media (RSM) (Gibco) préalablement chauffé à 37°C. Les mélanges de transfection représentant les différentes conditions de transfection ont ensuite été préparés dans 200 µL d'OptiMEM RSM comme décrit dans le Tableau 9. Au total, sept mélanges de transfection ont été préparés. Chaque mélange a reposé 20 min à température ambiante puis 800 µL d'OptiMEM RSM ont été ajoutés. Cinq cents µL de mélange de transfection/puits ont été déposés en prenant soin de déposer le mélange goutte à goutte sur les cellules. Les plaques de culture cellulaire ont ensuite été incubées à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> pendant cinq heures. Une fois l'incubation terminée, le milieu de culture a de nouveau été remplacé, cette fois par 250 µL d'OptiMEM contenant 5 % de SVF. Les cellules ont ensuite été incubées pendant deux jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

À J+2 post-transfection, l'expression de la GFP a été quantifiée. Pour cela, le milieu de culture des cellules a été éliminé et les tapis cellulaires ont été lavés avec 1 mL de PBS. Après avoir éliminé le PBS, 400 µL/puits de trypsine (154 u/mL) préalablement chauffée à 37°C ont été ajoutés sur les tapis cellulaires, qui ont ensuite été incubés 5 min à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> afin de décoller les cellules. Les cellules dissociées ont ensuite été reprises dans 3 mL/puits de milieu de culture + 10% de SVF puis transférées

dans un tube pour être centrifugées 10 min à 1500 g. Après la centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot a été repris avec 1 mL de PBS pour recentrifuger les cellules 8 min à 1500 g. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules ont été reprises dans 3 mL de PBS puis ont été passées en cytométrie en flux sur le cytomètre Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter). Le laser du cytomètre a été réglé à 488 nm.

La cytométrie a permis d'estimer la viabilité cellulaire post-transfection à partir de la taille et de la forme de chaque cellule, mais aussi le nombre de cellules vivantes fluorescentes (Figure 28), qui permet d'estimer l'efficacité du protocole utilisé pour transfecter le plasmide pSMART-GFP.



**Figure 28.** Exemple d'analyse de résultats de cytométrie en flux de cellules transfectées avec le plasmide pSMART - GFP. (A) Graphique de la taille des cellules en fonction de la structure des cellules. Avant de sélectionner les cellules à analyser, le logiciel a été paramétré avec les données de cellules vivantes témoins qui ont un aspect (taille/structure) proche des cellules étudiées. Ces paramètres ont permis de regrouper en amas sur le graphique les cellules de l'échantillon qui ont la même taille et la même structure que les cellules vivantes témoins. Ce nuage de point a été sélectionné manuellement afin d'estimer le nombre de cellules vivantes de l'échantillon et d'analyser le pourcentage de cellules fluorescentes dans cette population de cellules. A partir de cette sélection, le logiciel indique le pourcentage de cellules totales et le pourcentage de cellules sélectionnées qui représente les cellules vivantes. (B) Graphique du nombre de cellules précédemment sélectionnées en fonction du log de fluorescence. Ce graphique permet d'estimer le nombre de cellules fluorescentes à l'aide du logiciel d'interprétation des résultats. Les fenêtres D et E illustrées sur ce graphique ont été sélectionnées

manuellement. La fenêtre D représente les cellules vivantes non fluorescentes, soit 70,39 % des cellules sélectionnées et 42,57 % des cellules totales. La fenêtre E représente les cellules vivantes fluorescentes, soit 29,68 % de cellules sélectionnées et 17,95 % des cellules totales. Dans cet exemple, seules les cellules vivantes et fluorescentes ont été analysées pour estimer l'efficacité de transfection du pSMART-GFP dans les cellules.

L'agent de transfection qui a permis la meilleure viabilité cellulaire post-transfection et ayant le meilleur taux de cellules transfectées a été sélectionné pour la transfection des plasmides pSMART-A et B dans les cellules RK13 et BSR-T7. La lipofectamine 2000 s'est révélée être le meilleur agent de transfection pour les cellules RK13, en permettant la transfection d'environ 30% des cellules avec le plasmide pSMART-GFP. Pour les cellules BSR-T7, c'est l'agent de transfection Trans IT-LT1 (Mirus) qui s'est avéré être le plus efficace, en permettant la transfection d'environ 50% des cellules avec le plasmide pSMART-GFP.

### 2.5.3. Transfection *in vitro* des plasmides A, B et GFP

Les plasmides pSMART A et B ont été transfectés dans les cellules RK13 et BSR-T7 cultivées dans des plaques 6 puits (avec ou sans lamelles de verre de 8 mm de diamètre posées au fond des puits) et des plaques 48 puits. Afin d'appliquer les conditions optimales de transfection décrites précédemment, les cellules RK13 ont été transfectées avec de la lipofectamine 2000 tandis que les cellules BSR-T7 ont été transfectées avec l'agent de transfection Trans IT-LT1 (Mirus). Pour les deux lignées cellulaires, les cellules ont été transfectées à 80-90% de confluence cellulaire avec 500 ng de plasmide dans des plaques 48 puits, et avec 4 µg de plasmide dans des plaques 6 puits. Les conditions de transfection sont résumées dans le Tableau 10.

**Tableau 10.** Conditions optimales de transfection des cellules RK13 et BSR-T7.

Type cellulaire	Support de culture	Agent de transfection	Quantité de plasmide	Confluence des cellules
BSR-T7	p48	Trans IT-LT1	500 ng	80 - 90%
	Lamelle de verre		4 µg	
	p6			
RK13	p48	Lipofectamine 2000	500 ng	
	Lamelle de verre		4 µg	
	p6			

#### 2.5.4. Détection de l'ARN viral produit dans les cellules transfectées

L'ARN viral a été détecté et quantifié à partir des cellules transfectées et de leurs surnageants. Pour cela, les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 µL de cellules + surnageants avec le kit Nucleospin II RNA (Macherey Nagel) en suivant les instructions du fabricant.

Les ARN totaux extraits ont ensuite subi une double digestion à la DNase I avec le kit TURBO DNA-free™ Kit (ThermoFisher) afin d'éliminer toute trace des plasmides transfectés. La transcription inverse a ensuite été effectuée avec un oligo(dT) comme décrit précédemment sur une partie des ARNs totaux non-digérés et sur une partie des ARNs traités à la DNase. Au final, quatre conditions ont été obtenues et sont résumées dans le Tableau 11. Les acides nucléiques des quatre conditions ont été amplifiés en PCR avec les amorces U38/L337ts (Annexe 5) avec l'enzyme Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) après transfection inverse. Cette PCR amplifie une région de 326 pb du gène codant la VP60 (Annexe 5). Les produits PCR ont ensuite été révélés sur gel d'agarose comme décrit précédemment.

**Tableau 11.** Description des différentes conditions nécessaires à la démonstration de la production d'ARN viral post-transfection

Conditions	Acides nucléiques	ARN traité à la DNase I	RT	Détection
1	ARN totaux	Non	non	Plasmide
2	ARN totaux digérés à la DNase I	Oui	non	/
3	ADNc totaux	Non	oui	ARN totaux + plasmide
4	ADNc provenant des ARNs traités à la DNase I	Oui	oui	ARN viraux

#### 2.5.5. Détection en PCR de la présence de génomes viraux complets dans les inoculums de cellules transfectées

Afin de vérifier la synthèse de génomes viraux complets dans les cellules transfectées, deux approches ont été suivies :

- L'amplification des génomes viraux à l'aide d'une seule PCR
- L'amplification des génomes viraux à l'aide de plusieurs PCRs chevauchantes

Les PCRs présentées ci-après ont été réalisées à l'aide du kit Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Les produits PCRs ont été purifiés et dosés comme décrit précédemment.

Dans un premier temps, la PCR VHD-21Fwd/VHD-7410rev a été utilisée pour amplifier les génomes viraux complets en une seule étape, même si sa sensibilité n'a pas été étudiée. Cette stratégie n'ayant pas donné de résultats satisfaisants (cf. 3.3.2), des essais d'amplifications des génomes viraux à l'aide de PCR chevauchantes ont alors été réalisés. Cette méthode a pu être utilisée pour rechercher la synthèse de génomes viraux complets de la condition « cellules BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A » uniquement. L'ensemble des amorces utilisées est résumé dans le Tableau 12.

**Tableau 12.** Amorces utilisées pour amplifier le génome viral avec des PCR chevauchantes.

Couple d'amorce	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce 5' ->3'	Région du génome viral amplifiée
1U/1L	1U	GATTAGGCCGTGAAAGTTATG	1-550
	1L	CAACGTCAACAACTTGTC	
2U/6L	2U	CAAGTTATTCCTGTGCTTA	400-2860
	6L	GGTCGGTGAACACRTCAAC	
VHD-2475F/12Lbis	VHD-2475F	GAGGGTATCACTGTCCACAACGG	2500-5300
	12Lbis	CAGGTACTACCGAGACGAC	
4860F/7255rev	4860F	CATGACTCCGATGATGGTNAG	4860-7255
	7255rev	CTACTAGCATCATTATGCAT	
15U/VHD-7410rev	15U	GTAACAATTGGACTTTCGCTC	6800-7410
	VHD-7410rev	ATAGCTTGCTTTAACTATAAACCCAATT	

#### 2.5.6. Séquençage en NGS des amplicons issus des PCRs chevauchantes

Les produits d'amplification obtenus à l'aide des PCRs chevauchantes réalisées sur les cellules transfectées ont été séquencés afin de vérifier la synthèse des ARNs viraux générés post-transfection et de confirmer que leurs séquences étaient identiques à celle du génome de la souche de référence. Les produits PCRs ont été séquencés en NGS à cause de leurs faibles concentrations qui empêchaient de les séquencer en séquençage Sanger. Le séquençage NGS a été effectué à la plateforme NGS de l'unité Génétique Virale et Biosécurité de l'Anses. Pour cela, une librairie a été préparée avec le kit Ion Xpress Plus fragment library kit fragmentation (Life Technologie). Les fragments obtenus ont été sélectionnés en fonction de leurs tailles puis purifiés avec le kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Une PCR en émulsion a ensuite été effectuée sur l'appareil Ion OneTouch 2 system, puis un enrichissement a été effectué avec l'appareil Ion OneTouch ES en utilisant le kit Ion PI template OT2 200 kit v3 (Life Technologies). Les échantillons ont ensuite été chargés sur une puce P1 puis séquencés avec le séquenceur Ion Torrent Proton (Life Technologies). Après nettoyage des séquences générées, les séquences ont été assemblées à partir de la séquence du génome viral de la souche GI.1d/00-21. Cet assemblage a permis de générer une séquence consensus.

### 2.5.7. Détection de protéines virales post-transfection

Les protéines virales exprimées post-transfection ont été détectées en immunofluorescence (IF). Au début de l'étude les cellules RK13 et BSR-T7 ont été analysées en IF. Les premiers résultats n'ont pas été satisfaisants pour les cellules RK13. Faute de temps pour améliorer les conditions d'IF pour les cellules RK13, nous avons donc décidé de nous concentrer sur les cellules BSR-T7. Seules les cellules BSR-T7 seront donc traitées en IF dans la suite du document.

Les cellules ont été fixées trois jours post-transfection suite aux essais de transfection des plasmides pSMART A et B. En effet, au-delà de 72 h post-transfection, de nombreuses cellules mortes, décollées du support de culture, ont été observées. Afin d'obtenir des tapis cellulaires en bon état pour l'IF et de laisser un maximum de temps aux cellules pour produire de potentielles protéines virales, les cellules ont été fixées juste avant d'observer la mortalité cellulaire. Après la fixation des cellules, le milieu de culture a été éliminé puis le tapis cellulaire a été lavé au PBS. Un mélange éthanol/acétone (v/v) à -20°C a ensuite été déposé sur le tapis cellulaire. La plaque a ensuite été déposée dans une boîte hermétique et a été incubée 25 min à -20°C. Après avoir éliminé le mélange éthanol/acétone, la plaque a été laissée à température ambiante pour faire sécher le tapis cellulaire fixé.

Deux protocoles de marquage ont été utilisés dans cette étude en fonction du support sur lequel les cellules étaient fixées.

#### 2.5.7.1. Coloration en immunofluorescence de cellules fixées sur plaques

Quand les cellules ont été fixées sur plaques, les cellules ont été lavées au PBS avant d'être incubées avec l'anticorps primaire. Sur ce support, trois anticorps primaires ont été utilisés :

- Un sérum polyclonal de lapin (SLa/VHD/8) : anticorps dirigé contre la VP60 des RHDV, produit au laboratoire en inoculant des lapins EOPS avec un virus RHDV récolté en France au début des années 90 et inactivé. Il est utilisé au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS en IF.
- Un mélange d'anticorps monoclonaux de souris : l'anticorps monoclonal 1H3 dirigé contre un épitope exposé à la surface de la protéine VP60 des RHDV et l'anticorps monoclonal 6G2 dirigé contre un épitope sur une partie interne de la protéine VP60 des lagovirus ont été utilisés en mélange. Ces anticorps ont été produit par le laboratoire IZSLER en Italie (Capucci et al. 1995). Le mélange d'anticorps monoclonaux à 2 mg/mL (1 mg/mL de chaque AcM) a été utilisé au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS en IF.
- Un sérum négatif de lapin (SLa/T/6) contre le RHDV : témoin négatif d'IF, produit au laboratoire à partir de lapins EOPS. Il est utilisé au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS en IF.

Un anticorps primaire/puits a été déposé sur les tapis cellulaires puis les cellules ont été placées dans une boîte humide incubée à 37°C pendant une heure. L'incubation de l'anticorps primaire a été suivie de trois lavages au PBS. L'anticorps secondaire a ensuite été déposé sur les tapis cellulaires. Deux anticorps secondaires ont été utilisés en fonction de l'anticorps primaire :

- Goat anti-rabbit IgG (H+L) – FITC (Invitrogen) : utilisé au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS sans contre-coloration sur les cellules incubées avec les anticorps primaires correspondant au sérum négatif et au sérum polyclonal.
- Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen) : utilisé au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS sur les cellules incubées avec le pool d'anticorps monoclonaux.

Comme pour l'anticorps primaire, les anticorps secondaires décrits ci-dessus ont été déposés sur les tapis cellulaires puis les cellules ont été incubées à 37°C pendant une heure. Là aussi, l'incubation a été suivie de trois lavages au PBS pour la visualisation des cellules marquées au microscope inversé Olympus IX 71, couplé à un système de fluorescence (unité d'alimentation, boîtier pour lampe 100 W, illuminateur, cube fluorescence à miroir). Ce microscope était équipé d'un oculaire X10, et les cellules ont été observées avec l'objectif X20, exposées 5 s à 480/30 nm.

#### 2.5.7.2. Coloration en immunofluorescence de cellules fixées sur lamelles de verre

Quand les cellules ont été fixées sur lamelles de verre, les cellules ont été incubées 10 min à température ambiante en présence de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) 50 mM afin d'éliminer le maximum de bruit de fond à fort grossissement. Après trois lavages au PBS, les lamelles ont été incubées dans du PBS + 5 % SVF, 30 min à température ambiante. Le PBS + 5 % SVF a ensuite été éliminé et les lamelles ont été incubées avec l'anticorps primaire. Les anticorps primaires et secondaires ainsi que les conditions d'incubation déjà décrits au paragraphe précédent ont été utilisés, avec cette fois-ci des dilutions en PBS + 5 % de SVF. Les lamelles ont ensuite été montées avec du Fluoromount G™ avec DAPI (Invitrogen) sur des lames de verre (3 lamelles/lame de verre). Après une heure de séchage à température ambiante, les lamelles ont été observées avec le microscope droit Olympus BX41. Ce microscope était équipé d'un oculaire X10, et les cellules ont été observées avec l'objectif à immersion X60, exposées 5 s à 480/30 nm pour l'observation des protéines virales et exposées 1 s à 350 nm pour l'observation des noyaux cellulaires.

## 2.6. Tentatives de régénération du virus *in vivo*

### 2.6.1. Ethique

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec la réglementation nationale et européenne sur le bien-être des animaux, après approbation des protocoles par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (n° APAFIS 13443-2018020900265030) et après approbation des protocoles par le comité d'éthique de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Cometh Anses / UPEC / ENVA, saisines C227451).

### 2.6.2. Animaux

Dans chaque essai, des lapins Néo-Zélandais blancs EOPS âgés de dix semaines ont été utilisés. Les animaux ont été commandés chez deux fournisseurs, Charles Rivers ou Hypharm, pour des questions de disponibilité des animaux selon les dates des expérimentations animales. Tous les lapins ont eu accès *ad libitum* à de l'eau et à une alimentation sous forme de granulés stérilisés pendant toute la durée des essais.

### 2.6.3. Suivi clinique

Suite aux recommandations du comité d'éthique, qui imposent en cas de maladie d'évolution rapide plusieurs passages en animalerie par jour afin d'être sûr de détecter les animaux malades atteignant le point limite justifiant une euthanasie compassionnelle, les animaux ont été contrôlés trois fois par jour. Les signes cliniques recherchés incluaient l'isolement des animaux, la léthargie et l'anorexie, et correspondaient aux points limites déterminés dans le protocole approuvé par le comité d'éthique.

### 2.6.4. Inoculations de cellules transfectées

Deux essais expérimentaux ont été réalisés dans les animaleries de confinement A3 du laboratoire

Dans l'essai 1, 10 lapins EOPS ont été hébergés dans la même cage. Trois jours avant l'inoculation (J-3), une prise de sang sur tube sec a été faite sur chaque animal, pour déterminer en ELISA leur statut sérologique vis-à-vis du RHDV (cf. 2.6.8.). Un écouvillon rectal a par ailleurs été effectué pour vérifier, après une extraction d'ARN et une RT-PCR U38-L337ts (Annexe 5) réalisée sur l'éluat de reprise de chaque écouvillon, que les animaux n'étaient pas excréteurs de lagovirus échappant au dépistage sérologique. Le jour de l'inoculation (J0), cinq inoculum ont été préparés, ils sont décrits dans le Tableau 13. Pour cela, les cellules ont été transfectées trois jours avant le début de l'essai afin qu'elles soient récoltées à J+3 post-transfection.

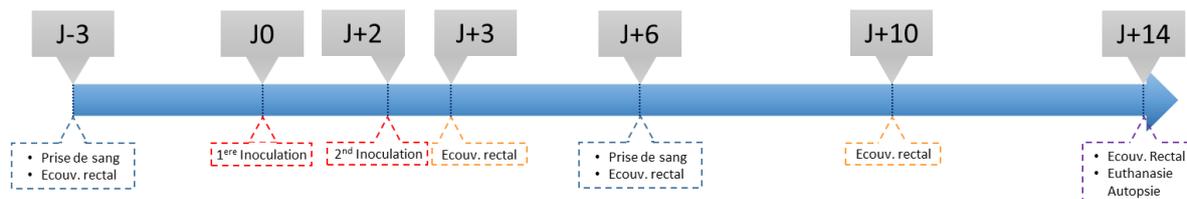
**Tableau 13.** Description des inoculums du premier essai de d'inoculation de cellules transfectées *in vivo*.

Inoculum	Description de l'inoculum	Abréviation
1	10 mL de cellules et surnageant BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A en p6	BSR-T7 A
2	10 mL de cellules et surnageant BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B en p6	BSR-T7 B
3	10 mL de cellules et surnageant RK13 transfectées avec le plasmide pSMART A en p6	RK13 A
4	10 mL de cellules et surnageant RK13 transfectées avec le plasmide pSMART B en p6	RK13 B
5	10 mL de cellules et surnageant RK13 transfectées avec le plasmide A ayant subi quatre subcultures en p6	RK13 4sub A
1 bis	Cellules et surnageant BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A en p48 pour 2 <sup>nd</sup> inoculation	/
2 bis	Cellules et surnageant BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B en p48 pour 2 <sup>nd</sup> inoculation	/

Le matin de l'inoculation, les tapis cellulaires ont été grattés et les cellules et surnageants de chaque condition ont été récoltés et mélangés.

Deux lapins par condition ont été inoculés par voie orale (2,5 mL) et par voie nasale (0,5 mL), ce qui correspond aux voies d'entrée naturelle du virus sauvage, ainsi que par la voie intramusculaire (deux injections de 0,5 mL). Une partie de chaque inoculum est retournée au laboratoire pour être analysée en PCR (cf. paragraphe 2.5.4.) et en RT-qPCR (cf. paragraphe 2.6.6.). Les analyses des inoculums en PCR ont été effectuées le jour de l'inoculation afin de vérifier la présence d'ARN viral. Ces analyses ont révélé que les inoculums n'étaient que très faiblement positifs. Au vu de ces résultats, nous avons décidé de ré-inoculer une partie des animaux. Pour cela, les lapins inoculés avec des cellules BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A ou B ont été ré-inoculés à J+2 avec les surnageants + cellules de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A ou B qui avaient été stockés à -80°C. Ces inoculums ont donc subi un cycle de congélation/décongélation. De l'ARN viral a été détecté dans ces deux inoculums avant l'inoculation des animaux. La seconde inoculation a été pratiquée de la même façon que la première. Les lapins ont été suivis pendant 14 jours, période à l'issue de laquelle les lapins survivants ont été sacrifiés. Pendant les 14 jours d'essai, des prises de sang sur tubes secs ont été réalisées à l'oreille de chaque animal à J+6 et J+14 et des écouvillons rectaux ont été prélevés à J+3, J+6, J+10 et J+14 (Figure 29). Après la mise à mort des animaux, tous les lapins ont été autopsiés. Sur chaque animal, un prélèvement a été effectué sur le thymus, les poumons, le foie, la rate, les reins, le duodénum, et les fèces. Une partie de chaque prélèvement a été stockée dans du RNA Later (Qiagen) pour prévenir la dégradation de l'ARN avant analyse en RT-PCR. Ces prélèvements ont été tout d'abord stockés une nuit à 4°C, puis à -20°C selon les recommandations du fabricant.

Aucune condition témoin n'a été réalisée dans cet essai préliminaire. Un autre essai expérimental était en effet prévu avec une condition témoin en cas de régénération du virus.



**Figure 29.** Organisation du premier essai d'inoculation de cellules transfectées à des lapins EOPS.

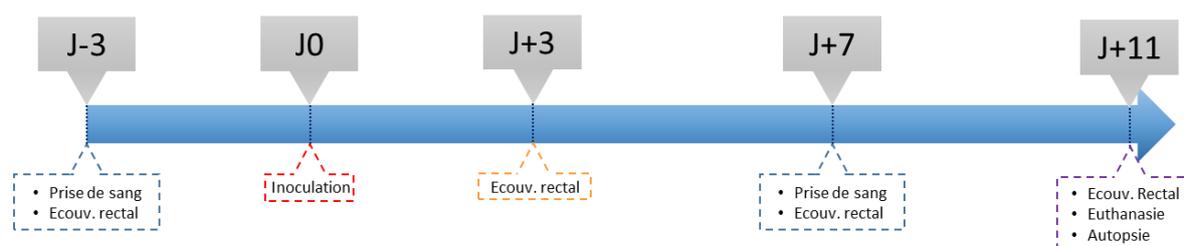
L'essai 2 a immédiatement suivi l'essai 1. Ce second essai avait pour objectif de retenter une régénération du virus *in vivo* via l'injection de cellules transfectées, mais aussi de réaliser un second passage à partir des foies prélevés dans l'essai 1. Pour cela, 10 nouveaux lapins EOPS ont été hébergés dans la même cage et dans la même animalerie que l'essai précédent, nettoyées mais non désinfectées. Pendant la mise en place des lapins dans la cage, soit trois jours avant l'inoculation (J-3), une prise de sang sur tube sec et un écouvillon rectal ont été réalisés sur chaque animal. Le jour de l'inoculation (J0), huit inoculum ont été préparés et administrés selon le Tableau 14.

**Tableau 14.** Conditions d'inoculation de l'essai 2

Inoculum	Description de l'inoculum	Abréviation	Nombre de lapins inoculés
6	Pool des foies des lapins précédemment inoculés avec les cellules + surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A	Foie BSR-T7 A	2
7	Pool des foies des lapins précédemment inoculés avec les cellules + surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B	Foie BSR-T7 B	2
8	Pool des foies des lapins précédemment inoculés avec les cellules + surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART A	Foie RK13 A	1
9	Pool des foies des lapins précédemment inoculés avec les cellules + surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART B	Foie RK13 B	1
10	Cellules et surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A en p48	BSR-T7 A	1
11	Cellules et surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B en p48	BSR-T7 B	1
12	Cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART A en p48	RK13 A	1
13	Cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART B en p48	RK13 B	1

Tous les inoculum ont été administrés comme décrit précédemment et une partie de chaque inoculum est retournée au laboratoire pour être analysée en PCR (cf. paragraphe 2.5.4.) et RT-qPCR (cf. paragraphe 2.6.6.). Les pools de foie destinés à être inoculés par voie intramusculaire ont été filtrés en cascade à 0,80  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  et 0,22  $\mu\text{m}$  puis traités avec 200 u/mL de Penicilline/Streptomycine, 2  $\mu\text{g/mL}$  de Fungizone, et 0.625% de Gentamicine pendant 1h15 dans la glace avant d'être administrés. Les lapins ont été suivis pendant 11 jours, période à l'issue de laquelle les lapins survivants ont été sacrifiés. Pendant les 11 jours d'essai (cette durée correspondant à la disponibilité de l'animalerie A3), des prises de sang sur tubes secs sur chaque animal ont été réalisées à J+7 et J+11 et des écouvillons rectaux ont été prélevés à J+3, J+7 et J+11 (Figure 30). Comme pour le premier essai, tous les lapins ont été autopsiés après la mise à mort. Les prélèvements et les conditions de stockages de ceux-ci sont identiques au premier essai.

Là aussi, aucune condition témoin n'a été réalisée dans cet essai préliminaire. Un autre essai était prévu avec une condition témoin en cas de régénération du virus.



**Figure 30.** Organisation du second essai d'inoculation de cellules transfectées et de broyat de foie à des lapins EOPS.

### 2.6.5. Inoculations de plasmides *in vivo*

L'essai 3 de régénération du virus issu de génétique inverse directement chez l'animal a été réalisé en inoculant les plasmides pSMART A ou pSMART B à des lapins EOPS *via* la voie intramusculaire. Faute de temps pour rechercher et tester des agents de transfections *in vivo*, aucun agent de transfection n'a été utilisé dans cette approche. Pour cela, deux cages ont été aménagées dans une même animalerie de niveau de confinement A3. Deux lapins ont été hébergés dans chacune des cages. Une prise de sang sur tube sec a été réalisée avant l'inoculation à J0, puis les deux lapins de la cage 1 ont chacun reçu 350  $\mu\text{g}$  de plasmide pSMART A. Les deux autres lapins hébergés dans la cage 2 ont tous les deux reçu 350  $\mu\text{g}$  de plasmide pSMART B. Une seconde prise de sang sur tube sec a été réalisée sur chaque lapin 10 minutes après l'inoculation pour s'assurer de la présence du plasmide dans le sang des animaux en PCR (Allemandou et al. 2011). Les animaux ont été sacrifiés et autopsiés à J+4, l'animalerie A3 n'étant plus disponibles au delà. Seuls le sang et le foie des animaux ont été

prélevés lors de l'autopsie pour vérifier la présence éventuelle d'ARN viral avec une séquence correspondant à celle du virus en RT-PCR (Figure 31).



**Figure 31.** Organisation de l'essai d'inoculation de plasmide *in vivo* à des lapins EOPS.

#### 2.6.6. Détection et quantification des ARNs viraux dans les inoculum

Les ARNs provenant des inoculum constitués de cellules transfectées et de surnageants ont été extraits comme décrit précédemment. Les ARNs viraux ont ensuite été détectés par amplification du gène codant la protéine de capsid avec le couple d'amorces U38/L337ts comme décrit dans la partie 2.5.4.

Seuls les ARNs issus des inoculum mis en œuvre pour les essais de multiplication ont été quantifiés en RT-qPCR SYBR green au retour d'animalerie. Pour rappel, ces inoculum correspondaient à des cellules BSR-T7 ou RK13 transfectées avec les plasmides pSMART A ou B, et à des broyats de foie. Pour quantifier les ARNs viraux produits en génétique inverse post-transfection, les ARNs totaux ont été extraits et digérés deux fois à la DNase I comme décrit précédemment. La quantification du génome viral a été effectuée avec la RT-qPCR 1342Fwd/1444rev (publication 4). Les amorces 1342Fwd/1444rev (1342Fwd : 5' ATACAGCAAAGGTTATGACAG 3', 1444rev : 5' AGGTGTTGGTTGATGATGG 3') permettent l'amplification de 102 pb du gène codant l'hélicase virale dans la région non-structurale du génome viral. L'amplification de cette région permet de quantifier uniquement le génome viral et évite l'amplification de la partie subgénomique qui pourrait biaiser la quantification. La limite de détection et la limite de quantification sont de 100 copies (publication 4). Les RT-qPCR ont été réalisées avec le kit Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Thermofisher).

### 2.6.7. Détection des ARNs viraux dans les prélèvements

Pour traiter les écouvillons rectaux, l'écouvillon a été vortexé dans 1 mL de PBS, et 100 µL ont été prélevés pour l'extraction d'ARN totaux. Les ARNs provenant d'organes ont été extraits à partir de 100 µL d'un broyat d'organe. L'ensemble des extractions d'ARN totaux a été réalisé avec le kit Nucleospin II RNA (Macherey Nagel) en suivant les instructions du fabricant.

Les prélèvements de sang sur tubes secs collectés 10 minutes post-inoculation lors de l'essai de transfection *in vivo* ont été centrifugés pendant 10 minutes à 2500 g. Après la centrifugation, chaque sérum a été collecté puis les plasmides ont été extraits à partir de 200 µL de chaque sérum à l'aide du kit Nucleospin virus (Macherey Nagel) en suivant les instructions du fabricant.

Les ARNs totaux issus des broyats d'organe et des écouvillons rectaux ont directement été analysés en RT-PCR en une étape avec le kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen) avec les amorces U38/L337ts. Aucune digestion à la DNase I n'a été effectuée sur les ARNs pour gagner du temps sur les analyses. En cas d'échantillons positifs, une double digestion à la DNase I était prévue pour confirmer la présence d'ARN viral. Les produits PCR ont ensuite été purifiés et révélés comme décrit précédemment. Chaque écouvillon rectal a été analysé sans délai après le prélèvement pour suivre l'excrétion digestive du virus. Faute de temps, seuls le foie et le duodénum de chaque animal, organes cibles des virus pathogènes et non-pathogènes sauvages, ont été analysés.

Les plasmides provenant des prélèvements de sang ont été analysés en qPCR avec le kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad) avec les amorces U38/L337ts précédemment décrites.

### 2.6.8. Etude du statut sérologique

Des échantillons de sang ont été prélevés sur tubes secs au cours des expérimentations animales afin de rechercher la présence d'anticorps anti-VP60 en ELISA et de déterminer ainsi une possible séroconversion des animaux post-inoculation. Les prélèvements sanguins coagulés ont été centrifugés à 3000 rpm, 15 min à 4°C pour récupérer le sérum. Le kit commercial ELISA Ingezim RHDV 17.RHD.K1 (Eurofins-Ingenasa) permet la détection des anticorps induits par le virus RHDV (Gil et al., 2006) et plus particulièrement des anticorps induits par la souche GI.1d/00-21 (Publication 4). Ce kit a donc été utilisé pour étudier la séroconversion des animaux en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons ayant une DO supérieure à 0,300 à 405 nm ont été interprétés comme positifs tandis que les échantillons ayant une DO inférieure ont été interprétés comme négatifs. Les échantillons possédant une DO proche du seuil de positivité ont été analysés une seconde fois pour confirmation

du résultat. La moyenne des deux valeurs a ensuite été utilisée pour l'interprétation finale des résultats.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Vérifications de la séquence des plasmides

Le séquençage des plasmides pSMART A et B a révélé que les plasmides avaient une séquence nucléotidique 100% identique aux séquences attendues pour les plasmides considérés.

#### 3.2. Transfection *in vitro*

##### 3.2.1. Détection et quantification d'ARN viral à partir de cellules et surnageants

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie concerne le traitement des inoculums constitués de cellules transfectées des essais 1 et 2. Ils sont résumés dans le Tableau 15.

Directement après l'extraction d'ARN et avant tout traitement à la DNase I, tous les échantillons provenant de cellules transfectées se sont révélés positifs en PCR, suggérant la présence de plasmides utilisés lors de la transfection des cellules dans les échantillons. Afin de les éliminer, une double digestion des ARNs par la DNase I a été nécessaire pour chaque échantillon. Les PCRs effectuées en l'absence d'une phase préalable de RT ont permis de confirmer l'efficacité du traitement à la DNase I puisqu'elles se sont révélées toutes négatives.

Les RT-PCRs réalisées sur les inoculums 1 à 4 se sont tout d'abord révélées très faiblement positives. Une seconde analyse en RT-PCR a été réalisée à la fin de l'essai 1 et a confirmé la présence d'ARN viral dans ces inoculums après l'observation de bandes bien plus intenses sur gel d'agarose. Les inoculums 1bis et 2bis de la seconde inoculation réalisée au cours de l'essai 1 se sont révélés positifs dès la première analyse en RT-PCR. L'inoculum 5 a été faiblement positif en RT-PCR, mais ce résultat n'a pas été reproductible quand nous avons voulu le confirmer, et cet échantillon a été considéré comme étant négatif. Il est probable que la RT-PCR U38/L337ts ne soit pas assez sensible pour détecter une très faible quantité d'ARN.

**Tableau 15.** Synthèse des résultats de PCR post-transfections

Essai	Inoculum	Description de l'inoculum	Résultats en PCR après :			Conclusion
			Extraction ARN - PCR	Extraction ARN – Double digestion DNase I - PCR	Extraction ARN – Double digestion à la DNase – RT – PCR	
<b>1</b>	1	Cellules et surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A en p6	PCRs positives	PCRs négatives	1 <sup>ères</sup> PCRs faiblement positives, 2 <sup>ndes</sup> PCRs positives	Présence d'ARN viral dans les inoculums
	2	Cellules et surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B en p6				
	3	Cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART A en p6				
	4	Cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART B en p6				
	5	Cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide A ayant subi quatre subcultures en p6			1 <sup>ères</sup> PCRs faiblement positives, 2 <sup>ndes</sup> PCRs négative	
<b>2</b>	10	Cellules et surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A en p48	PCRs positives	PCRs négatives	PCRs positives	Présence d'ARN viral dans les inoculums
	11	Cellules et surnageants de BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B en p48				
	12	Cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART A en p48			PCRs négatives	Très faible présence d'ARN viral dans les inoculums
	13	Cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART B en p48				

Les inoculums 10 et 11 (BSR-T7 en p48) de l'essai 2 ont été trouvés positifs en RT-PCR alors que les inoculums 12 et 13 (RK13 en p48) ont été trouvés négatifs. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce résultat négatif. La première hypothèse concerne le type cellulaire et le format de la plaque de culture cellulaire. En effet, il est possible que les conditions de transfection des cellules RK13 en plaque p48 soient moins favorables pour produire des ARNs viraux. La seconde hypothèse concerne la sensibilité de la RT-PCR. Il est possible que la RT-PCR U38/L337ts ne soit pas assez sensible pour détecter des ARNs viraux présents en quantité trop faible dans les inoculums 12 et 13. Il est donc possible que ces inoculums contiennent néanmoins de l'ARN viral.

L'ensemble de ces résultats montre toutefois que le système de génétique inverse est capable de générer de l'ARN viral.

Afin de quantifier l'ARN viral présent dans les différents inoculums, une RT-qPCR a été effectuée sur les ARNs digérés à la DNase I. Les inoculums de la seconde inoculation de l'essai 1 (1 bis et 2 bis) n'ont pas été analysés en RT-qPCR. L'ensemble des résultats de RT-qPCR est résumé dans le Tableau 16.

**Tableau 16.** Résultats de RT-qPCR sur les ARNs traités à la DNase I provenant des inoculums des essais d'inoculation de cellules transfectées et de broyats de foie.

Inoculum	Ct	cp/ $\mu$ L d'ARN	cp/lapins (4mL)
1	23.67	3.56E+04	8.54E+07
2	23.3	4.49E+04	1.08E+08
3	25.85	8.90E+03	2.14E+07
4	25.35	1.25E+04	3.01E+07
5			
10	19.59	4.45E+05	1.07E+09
11	19.96	3.55E+05	8.53E+08
12	29.5	9.58E+02	2.30E+06
13	31.51	2.75E+02	6.61E+05

Le fait de détecter de l'ARN viral dans les inoculums 12 et 13 conforte les hypothèses énoncées précédemment. En effet, la quantité d'ARN viral produite par les cellules RK13 cultivées en plaque p48 est bien plus faible que la quantité d'ARN viral produite par les cellules BSR-T7 cultivées sur ce support. De plus, le fait de détecter de l'ARN viral dans les inoculums 12 et 13 uniquement en RT-qPCR conforte l'idée que la RT-PCR utilisée précédemment, moins sensible que la RT-qPCR, n'était pas assez sensible pour détecter la faible quantité d'ARN viral produite dans ces conditions de transfection.

Ces résultats ont montré que le système de génétique inverse est capable de produire de l'ARN viral. Aucune différence n'a cependant été observée entre la quantité d'ARN produite avec le plasmide pSMART A ou avec le plasmide pSMART B. Les quantités d'ARN viral produites ont été plus importantes dans les cellules BSR-T7 que dans les cellules RK13, que ce soit en plaque p6 ou p48. L'utilisation combinée du pT7 et du pCMV permet donc une meilleure production d'ARN viral que le pCMV seul. En plus de quantifier l'ARN viral, cette RT-qPCR ciblant le début du génome viral, a permis de vérifier que le système permet de produire le début du génome viral.

### 3.2.2. Amplification et séquençage de génomes complets

Le génome complet n'a été amplifié dans sa totalité qu'une seule fois à l'aide des amorces VHD-21Fwd/VHD-7410rev (Annexe 5). Ce résultat a été obtenu à partir de la condition « cellules BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B ». Cependant cette PCR a donné une bande de faible intensité et n'a pas été reproductible. Cela peut être expliqué par la faible sensibilité de la PCR VHD-21Fwd/VHD-7410rev et/ou par la rareté des ARNs viraux complets dans les échantillons.

Les PCRs chevauchantes n'ont pas non plus permis d'amplifier du génome viral dans sa totalité. Pour réaliser ces analyses, nous avons sélectionné l'inoculum correspondant à la condition de transfection « BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART B » qui avait permis de générer la plus importante quantité estimée d'ARN viral (inoculum 10, Tableau 16) et qui avait aussi permis d'amplifier le génome entier en une seule RT-PCR. Seule la région 380 – 7437 a pu ainsi être amplifiée. Les bandes obtenues ont été prélevées et purifiées pour que les produits PCR soient séquencés. Il est important de noter que plus la région à amplifier était grande, plus l'intensité du fragment PCR était faible.

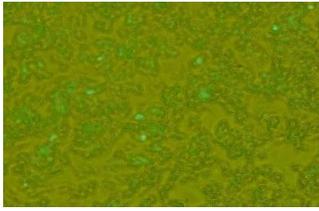
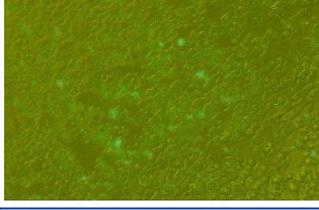
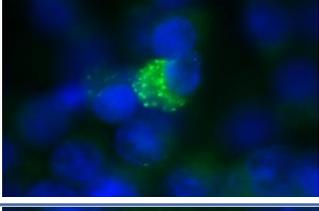
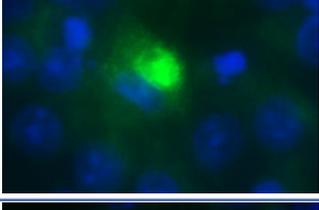
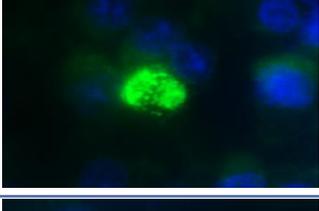
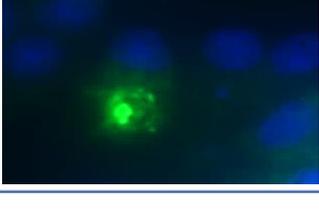
Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce constat. Il est possible que les différentes PCRs utilisées aient des sensibilités différentes et qu'elles ne permettent donc pas d'amplifier le génome viral avec la même efficacité. Une autre hypothèse serait que les régions de grandes tailles sont plus rares que les régions de petites tailles dans les échantillons du fait de la dégradation des ARNs générés dans les cellules. Cette dégradation des ARNs viraux expliquerait aussi les difficultés à amplifier le génome viral à l'aide de la PCR VHD-21Fwd/VHD-7410rev, bien que de grandes quantités d'ARNs viraux soient produites d'après la RT-qPCR utilisée (Tableau 16).

Les résultats de séquençage NGS de la région 380 – 7437 ont indiqué une seule ambiguïté dans le gène codant la VP60 : C5860T (T 55% - C 45%). Cette mutation engendre un changement d'acide aminé L->F. Il est prévu de séquencer cette mutation en séquençage Sanger pour confirmer ce résultat.

### 3.2.3. Détection des protéines virales

Les résultats d'immunofluorescence obtenus sur les cellules BSR-T7 sont résumés dans la Figure 32. Aucune cellule fluorescente n'a été observée dans les conditions de témoins négatifs. Cependant, un important bruit de fond a été observé sur l'ensemble du tapis cellulaire (cf. condition témoin Figure 32). La protéine VP60 a été détectée dans de très rares cellules (environ 1% des cellules) transfectées avec le plasmide pSMART A ou avec le plasmide pSMART B en utilisant l'anticorps polyclonal comme anticorps primaire sur les cellules fixées sur plaque ne permettant qu'une observation au grossissement X200. Par contre, les cellules fixées sur lamelles de verre ont permis l'observation des cellules au grossissement X600. Ces observations ont permis de détecter la protéine VP60 au niveau du cytoplasme des cellules transfectées, que ce soit avec le sérum polyclonal ou le mélange d'anticorps monoclonaux utilisés comme anticorps primaire (Figure 32).

L'ensemble de ces résultats montrent que le système est capable de produire la protéine VP60 dans le cytoplasme des cellules transfectées. Cette protéine étant située à l'extrémité C-terminale de la polyprotéine, il est probable que les autres protéines de l'ORF1 soient aussi produites. Cependant, faute d'anticorps monoclonaux disponibles dirigés contre chaque protéine de l'ORF 1, il nous a été impossible de vérifier cette hypothèse.

Condition	IF
Témoins + agent de transfection Sérum polyclonal Grossissement x200	
pSMART A Sérum polyclonal Grossissement x200	
pSMART B Sérum polyclonal Grossissement x200	
pSMART A Sérum polyclonal Grossissement x600	
pSMART B Sérum polyclonal Grossissement x600	
pSMART A Anticorps monoclonaux Grossissement x600	
pSMART B Anticorps monoclonaux Grossissement x600	

**Figure 32.** Observation au microscope à fluorescence de cellules BSR-T7 à grossissement X200 ou X600. Trois conditions de transfection sont illustrées : sans plasmide, pSMART A, pSMART B et deux conditions de marquage sont présentées : avec un sérum polyclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux. La protéine VP60 est marquée en vert et le noyau des cellules en bleu.

### 3.3. Essais *in vivo*

#### 3.3.1. Essai 1 : inoculations de cellules transfectées

##### 3.3.1.1. Inoculums

L'ensemble des résultats concernant les inoculums de l'essai 1 sont décrits dans les paragraphes 3.2.1 et 3.2.2. Pour rappel, l'inoculum 5 composé de cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide A ayant subi quatre subcultures en p6, est le seul inoculum où aucun ARN viral n'a été détecté. Dans les quatre autres inoculums de la première série d'inoculation, l'ARN viral a été détecté grâce à l'utilisation d'une part, d'une RT-qPCR permettant d'amplifier une région située au début du génome viral et d'autre part, d'une RT-PCR permettant d'amplifier une région située au début du gène codant la VP60. La quantification de cet ARN viral en RT-qPCR a indiqué que les animaux avaient été inoculés avec environ  $10^7$  copies d'ARN viral. Cette dose d'ARN viral est équivalente à la dose de virus sauvage inoculée à des lapins EOPS qui a provoqué 80% de mortalité lors de l'essai d'effet dose (publication 4).

##### 3.3.1.2. Symptômes et lésions macroscopiques

Aucun symptôme ni mortalité liée à la RHD n'ont été observés pendant l'essai 1. Tous les animaux ont été euthanasiés à la fin de l'essai (14 jours post- inoculation). Lors des autopsies des animaux, aucune lésion macroscopique, qu'elle soit liée à la RHD ou non, n'a été observée. Ces résultats, ajoutés à la charge importante d'ARN viral estimée dans les inoculums, suggèrent qu'il n'y a pas ou très peu de particules virales infectieuses de générées post-transfection des cellules, ou que le virus régénéré possède une séquence génomique différente de celle du virus sauvage et donc potentiellement un phénotype différent.

##### 3.3.1.3. Etude de l'excrétion virale

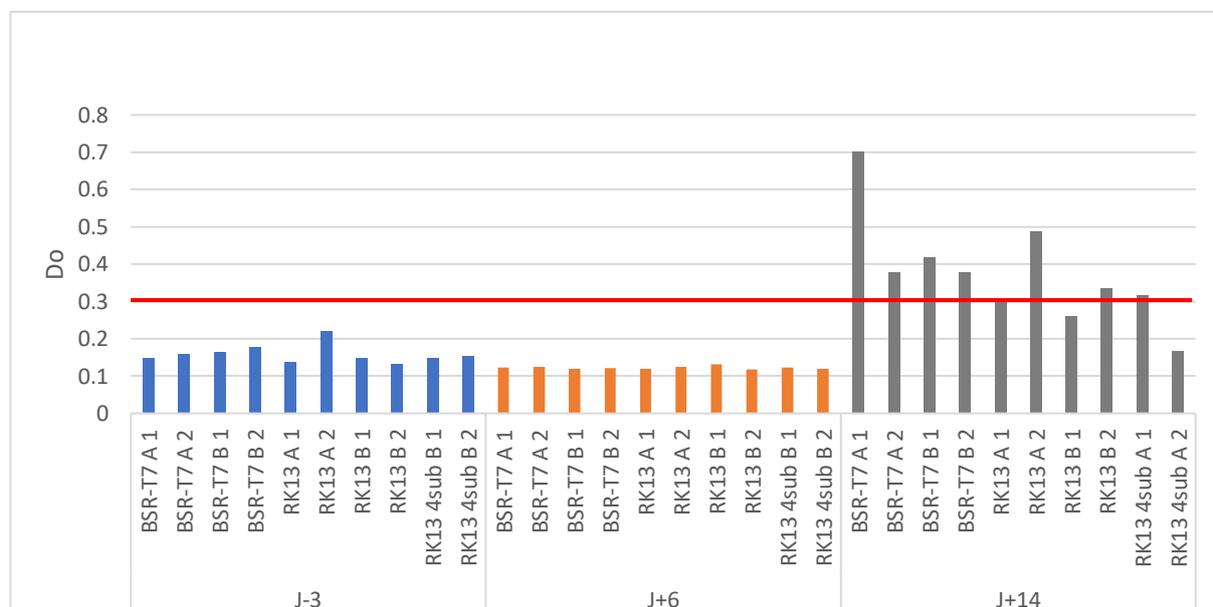
Les écouvillons rectaux prélevés au cours de l'essai se sont tous révélés négatifs en RT-PCR. Ainsi, aucune excrétion virale au niveau rectal n'a été observée quel que soit le jour de prélèvement.

##### 3.3.1.4. Recherche de virus dans les animaux

Pour rappel, seuls les foies et les duodénums, organes cibles respectifs des virus sauvages pathogènes et non-pathogènes, ont été analysés en RT-PCR pour le moment. Aucune trace d'ARN viral n'a été détectée dans ces organes. Les autres organes devront cependant être analysés pour rechercher de l'ARN viral afin de vérifier l'hypothèse d'un virus régénéré potentiellement différent de la souche de référence et possédant un tropisme particulier.

## 3.3.1.5. Etude de la séroconversion

Les échantillons de sang prélevés trois jours avant les inoculations à J0 ont tous été négatifs confirmant le statut EOPS des animaux avant le début des essais expérimentaux. L'ensemble des résultats d'ELISA de l'essai 1 est illustré en Figure 33.



**Figure 33.** Etude de la séroconversion des animaux de l'essai 1 (deux lapins par inoculum). Les échantillons collectés à J-3 sont illustrés en bleu, ceux collectés à J+6 post-inoculation sont illustrés en orange, et ceux collectés à J+14 sont illustrés en gris. Le seuil de positivité est indiqué par une ligne rouge. Tout échantillon ayant une valeur au-dessus de ce seuil est considéré comme positif d'après les instructions du fabricant du kit.

Aucune séroconversion n'a été observée avant J+14. Tous les animaux inoculés avec des cellules BSR-T7 transfectées avec le plasmide pSMART A ou pSMART B ont séroconverti.

Les valeurs de DO obtenues pour les animaux inoculés avec des cellules RK13 transfectées avec les plasmides pSMART A ou B étaient proches du seuil mais trois lapins sur six ont séroconverti. Parmi eux, un des deux lapins avait été inoculé avec l'inoculum 5 (cellules et surnageants de RK13 transfectées avec le plasmide pSMART A ayant subi quatre subcultures en p6) dans lequel l'ARN viral n'a pas pu être détecté. Les différences de valeurs de DO entre les lapins inoculés avec des cellules et surnageants de BSR-T7 et les lapins inoculés avec des cellules et surnageants de RK13 peuvent s'expliquer par la seconde inoculation. En effet, seuls les animaux inoculés avec des cellules et surnageants de BSR-T7 ont été ré-inoculés. Ces animaux ont théoriquement reçu plus de protéines virales que les autres n'ayant pas été ré-inoculés. Ces résultats sont cohérents avec les observations en immunofluorescence et suggèrent que le système de génétique inverse est capable d'induire chez les cellules transfectées la production de protéines virales en quantité suffisante pour induire une

séroconversion d'une partie des animaux. Cette interprétation nécessite cependant d'être confirmée dans la mesure où l'expérimentation n'incluait pas de cellules transfectées avec un plasmide témoin, dont l'inoculation avec rappel aurait permis de vérifier que les réponses détectées sont effectivement spécifiques.

### 3.3.2. Essai 2 : inoculations de broyats de foie et de cellules transfectées

#### 3.3.2.1. Inoculums

Les inoculums constitués de cellules et surnageants sont décrits dans les paragraphes 3.2.1 et 3.2.2. Pour rappel, seuls les inoculums 10 et 11, constitués de cellules BSR-T7, ont été trouvés positifs en RT-PCR ciblant le gène codant la VP60 situé dans le dernier tiers du génome viral. Par contre, la quantification de cet ARN viral à l'aide de la RT-qPCR ciblant une région située au début du génome a indiqué que les inoculums 10 à 13 étaient tous positifs. Les lapins ont été inoculés avec  $10^5$  copies d'ARN viral pour les animaux inoculés avec des cellules RK13, et  $10^9$  copies pour ceux inoculés avec des cellules BSR-T7. Cette dernière dose d'ARN viral est supérieure à la dose de virus sauvage inoculée ( $10^7$  copies) à des lapins EOPS qui a provoquée 80% de mortalité lors de l'essai d'effet dose de la publication 4.

Les inoculums 6 à 9, issus de broyats de foie, ont tous été trouvés négatifs en RT-PCR. Il est possible que la RT-PCR ne soit pas assez sensible pour détecter l'ARN dans ces échantillons. Une autre explication, plus probable, est que le premier essai d'inoculation de cellules transfectées n'ait pas permis d'infecter le foie des animaux inoculés.

#### 3.3.2.2. Symptômes et lésions macroscopiques

Comme dans l'essai 1, aucun symptôme ni mortalité liée à la RHD n'ont été observés pendant l'essai 2. Tous les animaux ont donc été euthanasiés à la fin de l'essai (11 jours post- inoculation). Lors des autopsies des animaux, aucune lésion macroscopique, qu'elle soit liée à la RHD ou non, n'a été observée. Ces résultats suggèrent les mêmes hypothèses que celles décrites précédemment.

#### 3.3.2.3. Etude de l'excrétion virale

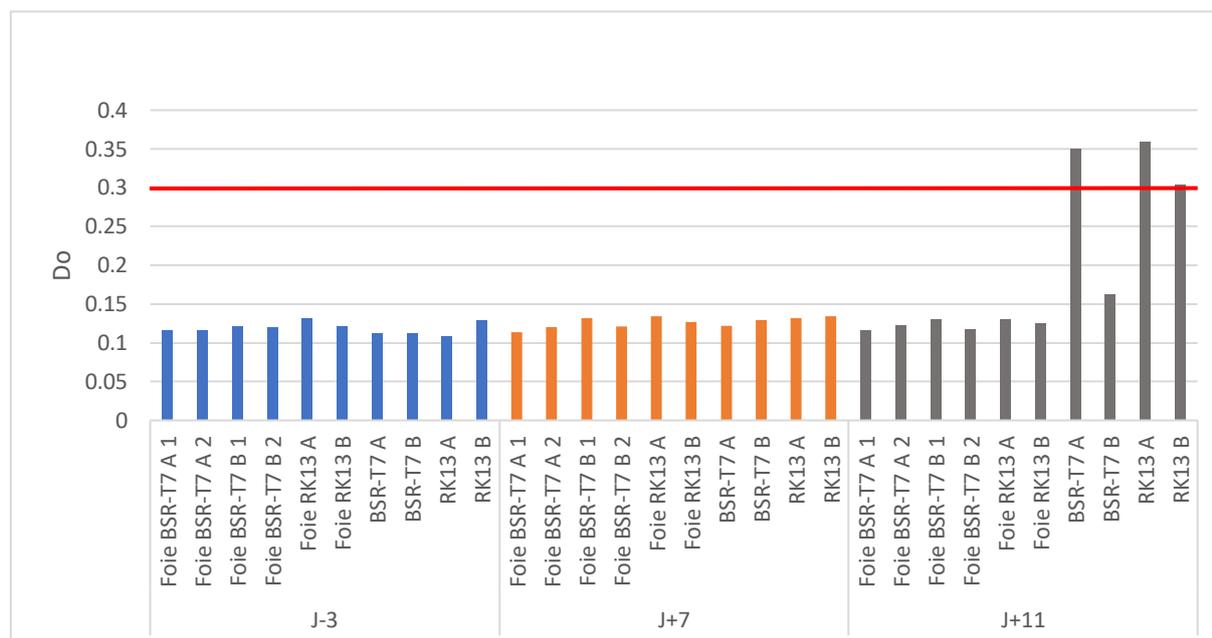
Comme dans l'essai 1, les écouvillons rectaux se sont révélés négatifs en RT-PCR. Aucune excrétion virale au niveau rectal n'a donc été observée aux différents temps où les écouvillonnages ont été effectués.

#### 3.3.2.4. Recherche de virus dans les animaux

Aucune trace d'ARN viral n'a été détectée dans les prélèvements de foie et de duodénum. Les autres organes devront être analysés ultérieurement pour rechercher de l'ARN viral.

### 3.3.2.5. Etude de la séroconversion

Pour les échantillons de l'essai 2, seule une partie des animaux inoculés avec des cellules transfectées ont séroconverti (Figure 34).



**Figure 34.** Etude de la séroconversion des animaux de l'essai 2 (deux animaux par inoculum). Les abréviations de chaque inoculum sont indiquées sous chaque barre. Les échantillons collectés à J-3 sont illustrés en bleu, ceux collectés à J+7 post-inoculation sont illustrés en orange, et ceux collectés à J+11 sont illustrés en gris. Le seuil de positivité est indiqué par une ligne rouge. Tout échantillon ayant une valeur au-dessus de ce seuil est considéré comme positif d'après les instructions du fabricant du kit.

Ce résultat confirme les résultats négatifs de RT-PCR obtenus sur les inoculums constitués d'un mélange de surnageants de broyats de foie. La séroconversion des animaux inoculés avec les cellules transfectées est uniquement visible à J+11 post-inoculation avec des valeurs de DO légèrement au-dessus du seuil. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues lors du précédent essai, ce qui pourrait s'expliquer par la durée du second essai qui a été plus court de 3 jours. Les animaux du second essai ont donc eu moins de temps pour séroconvertir que les animaux du premier essai. Comme dans l'essai 1, certains animaux ayant été inoculés avec des cellules transfectées n'ont pas séroconverti.

### 3.3.3. Essai 3 : inoculations des plasmides *in vivo*

#### 3.3.3.1. Validation de l'inoculation

La RT-PCR réalisée sur les échantillons de sang prélevés 10 minutes post-inoculation a donné des résultats positifs. Ce résultat valide le fait que suite à l'inoculation des plasmides par la voie intramusculaire, ceux-ci sont rapidement retrouvés dans le sang des animaux inoculés.

### 3.3.3.2. Symptômes et lésions macroscopiques

Aucun symptôme ni mortalité liés à la RHD n'ont été observés pendant l'essai 3. Tous les animaux ont donc été euthanasiés à la fin de l'essai (4 jpi). Lors des autopsies des animaux, aucune lésion macroscopique, qu'elle soit liée à la RHD ou non, n'a été observée.

### 3.3.3.3. Recherche de virus dans les animaux

Aucune trace d'ARN viral n'a été détectée dans les prélèvements de foie des animaux inoculés.

## 4. Conclusions

Les premières expérimentations *in vivo* mises en place pour valider le nouveau système de génétique inverse des lagovirus n'ont pour le moment pas permis de montrer que le système était capable de produire du virus, infectieux ou non. Cependant, les résultats obtenus ont permis de conclure que le système de génétique inverse permettait la production d'une grande quantité d'ARN viral après transfection des cellules BSR-T7 ou RK13, que ce soit avec le plasmide pSMART A ou avec le plasmide pSMART B. Il a été aussi observé que les cellules BSR-T7 permettaient une meilleure production d'ARN viral que les cellules RK13. Malgré les grandes quantités d'ARN viral détectées, il n'a pas été possible de séquencer le génome complet issu de génétique inverse et plusieurs explications sont possibles.

La première a été l'obligation de manipuler le matériel biologique issu de génétique inverse en confinement de niveau 3. Ceci nous a empêché de séquencer les ARNs générés en NGS après transfection des cellules car le matériel permettant la génération des bibliothèques et le séquençage n'est disponible qu'en confinement de niveau 2. Aujourd'hui, les OGMs RHDV issus de notre système de génétique inverse ont été reclassés par le HCB, permettant la manipulation de matériel biologique issu de génétique inverse en confinement de niveau 2. Il serait donc possible de séquencer les ARNs générés en NGS afin de déterminer leur séquence. La couverture de séquence permettra d'estimer si chaque région du génome est bien produite par le système de génétique inverse.

La seconde explication est qu'il a été difficile d'amplifier le génome complet en une seule PCR et les PCRs chevauchantes réalisées pour obtenir de meilleurs résultats n'ont pas permis de d'amplifier le début génome. Cette difficulté peut être expliquée par la dégradation des ARNs néo-synthétisés. La coiffe en 5' pourrait éviter cette dégradation. Dans ce système, seuls les ARNs générés avec le pCMV sont normalement coiffés. Ce promoteur a été suffisant pour régénérer le virus RHDV sur cellules RK13 (Liu et al. 2008) et dans les systèmes disposant de cellules permissives à la réplication virale (Katayama et al. 2014, Oka et al. 2014, Sandoval-Jaime et al. 2015).

Afin d'optimiser le rendement d'ARNs coiffés, il serait intéressant de tester la transcription *in vitro*, en présence d'un analogue de la coiffe, des plasmides pSMART A et pSMART B, suivie de la transfection des ARNs coiffés dans les cellules BSR-T7 ou RK13 afin de voir si cette condition permet de générer du virus. Un virus auxiliaire permettant l'ajout d'un analogue de la coiffe (cf. Annexe 3) pourrait aussi être utilisé afin de régénérer le virus.

Le faible nombre de cellules positives en IF peut aussi être expliqué par la dégradation des ARNs néo-synthétisés mais aussi par le faible taux de cellules transfectées. Les conditions de transfusions (nombre de cellules à transfecter, quantité de plasmide à transfecter) et les conditions d'IF (essayer d'autres anticorps primaires et secondaires) doivent donc encore être améliorées afin d'augmenter le nombre de cellules positives en IF. Les résultats obtenus ont aussi permis de conclure que le système de génétique inverse permettait la production de VP60 après transfection des cellules. Bien que le nombre de cellules fluorescentes en IF soit extrêmement faible, la quantité de protéines de capsidite produite est suffisante pour générer une séroconversion chez une majorité des animaux inoculés avec des cellules et surnageants de cellules transfectées avec le plasmide pSMART A ou B.

Il reste donc du travail pour finir le développement de ce nouveau système de génétique inverse. Cependant ce travail préliminaire a permis de mettre en place les bases permettant la régénération de la souche GI.1d/00-21, en développant notamment les plasmides capables de produire des ARNs viraux et en permettant la production de la protéine VP60, éléments indispensables à la régénération du virus.

Discussion générale et perspectives

## I. Etude des lagovirus non-pathogènes du lièvre (HaCV)

Les travaux présentés à l'occasion de cette thèse ont été entrepris afin d'étudier la diversité génétique des lagovirus et de trouver des éléments de réponse à l'origine de la pathogénicité. La diversité génétique des lagovirus du lapin est bien documentée. En effet, deux lagovirus pathogènes ont été identifiés chez les lapins *Oryctolagus cuniculus* : le rabbit hemorrhagic disease virus (GI.1/RHDV) (Liu et al., 1984) et le rabbit hemorrhagic disease virus 2 (GI.2/RHDV2) (Le Gall-Reculé et al., 2011). Par ailleurs, plusieurs lagovirus non-pathogènes ont également été identifiés : le rabbit calicivirus (RCV), le European rabbit calicivirus 1 (GI.3/RCV-E1) (Le Gall-Reculé et al., 2011) et les European rabbit calicivirus 2 et Australian rabbit calicivirus 1 (GI.4/RCV-E2 et GI.4/RCV-A1) (Strive et al., 2009; Le Gall-Reculé et al., 2015; Le Pendu et al., 2017). Ces lagovirus non-pathogènes sont moins étudiés que les lagovirus pathogènes et se sont révélés distants génétiquement de ceux-ci.

### 1. Diversité génétique des HaCV

Chez le lièvre, seule la diversité génétique des lagovirus pathogènes est bien décrite dans la littérature. En effet, les virus European brown hare syndrome virus (GII.1/EBHSV) (Gavier-Widen and Morner, 1991) et les RHDV2 (Puggioni et al., 2013 ; Camarda et al., 2014; Hall et al., 2017; Le Gall-Reculé et al., 2017; Velarde et al., 2017; Neimanis et al., 2018) infectent les *Lepus spp.* Récemment, un lagovirus potentiellement non-pathogène, nommé hare calicivirus (HaCV), a été identifié pour la première fois chez des lièvres sains. Afin d'augmenter nos connaissances sur les HaCV, les séquences de gène codant la protéine de capsid VP60 de plusieurs virus ont été caractérisées pour étudier la diversité génétique des HaCV et si possible identifier de potentiels liens évolutifs avec les lagovirus pathogènes EBHSV. Au début de nos travaux, seule une séquence de gène codant la VP60 était disponible dans les bases de données internationales (Cavadini et al. 2015). Vingt nouvelles souches HaCV ont été détectées pendant notre étude réalisée sur des lièvres tués à la chasse et récoltés par les agents de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS, maintenant Office Français de la Biodiversité, OFB), et 11 nouvelles séquences de gène codant la VP60 ont été obtenues. L'étude de ces virus a aussi permis de caractériser la première séquence de génome complet d'un virus HaCV. Ce génome possède la même organisation génomique que les autres lagovirus (Publication 2) et aucune recombinaison n'a été détectée. Aujourd'hui, deux autres séquences de génomes quasi complets d'HaCV et une séquence partielle correspondant à un peu plus de la moitié du génome d'un troisième HaCV ont été décrites dans la littérature. Ces souches ont été collectées sur des lièvres sauvages en Australie (Mahar et al., 2019).

L'étude de l'ensemble des séquences du gène codant la VP60 des HaCV français et australiens, ainsi que des séquences d'HaCV italiens déposées entre temps dans les bases de données nucléotidiques, a permis d'observer une très grande diversité génétique chez ces virus et de définir deux nouveaux génotypes dans le génogroupe GII ainsi que plusieurs génotypes potentiels (Publication 1). En effet, l'analyse phylogénétique a distingué deux groupes phylogéniques : un premier groupe comprenant une souche HaCV australienne et les souches européennes, dont la souche HaCV française décrite dans la publication 2, et un second groupe constitué des deux autres souches HaCV australiennes et d'une souche française. Une particularité intéressante a par ailleurs été mise en évidence dans ce second groupe puisque les trois souches possèdent une délétion d'un acide aminé non partagée par aucun autre lagovirus. Cette spécificité nous a permis de suggérer une origine commune entre ces HaCV européens et australiens, ces derniers étant probablement arrivés en Australie par l'intermédiaire de lièvres européens infectés. En effet, cette espèce a été introduite régulièrement dès le début de la colonisation européenne de l'Australie (Stott, 2015).

Les analyses phylogéniques ont aussi permis d'estimer le taux d'évolution du gène codant la protéine VP60 du génogroupe GII. Le taux d'évolution estimé pour ce génogroupe est en moyenne de  $2.71 \times 10^{-3}$  subs/site/an ( $1.98-3.43 \times 10^{-3}$  95% HPD). Ce taux d'évolution est similaire à celui des GII.1/EBHSV, des GI.1/RHDV et des GI.4/RCV-A1 (Lopes et al., 2014; Eden et al., 2015; Mahar et al., 2016), et est légèrement supérieur à celui des GI.2/RHDV2 estimé à  $3.93 \times 10^{-4}$  subs/site/an ( $3.32-4.58 \times 10^{-4}$  95% HPD) (Silvério et al., 2018) (Publication 1). Les taux d'évolution du gène codant la protéine de capsid des autres calicivirus sont peu étudiés et seuls ceux de certains génotypes de norovirus ont été estimés. Ces taux restent proches de ceux obtenus pour les lagovirus, comme par exemple celui des norovirus GII.3 estimé à  $5.8 \times 10^{-3}$  subs/site/an ( $4.4-7.4 \times 10^{-3}$  95% HPD) (Boon et al., 2011) ou celui des norovirus GII.4 estimé à  $5.1 \times 10^{-3}$  subs/site/an ( $4.4-6 \times 10^{-3}$  95% HPD) (Bok et al., 2009; Boon et al., 2011). Il est cependant à noter que les taux d'évolution de ce gène estimés pour les calicivirus ont des valeurs plus élevées que les taux d'évolution estimés pour les virus à ARN qui sont généralement entre  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  subs/site/an (Sanjuán et al., 2010). Ces valeurs élevées peuvent expliquer la grande diversité génétique observée chez les calicivirus.

L'obtention de nouvelles séquences du gène codant la VP60 d'HaCV de différentes origines géographiques pourrait permettre de confirmer les génotypes potentiels mis en évidence par notre étude. D'autres génomes complets d'HaCV devront être séquencés pour acquérir de nouvelles données et mieux comprendre l'histoire évolutive de ces virus. De même, peu de génomes complets d'EBHSV ont été caractérisés à ce jour et le séquençage d'un plus grand nombre permettrait d'étudier d'éventuelles recombinaisons avec des virus HaCV, comme cela a été observé chez les virus RHDV2 avec des souches non-pathogènes de lapin (GI.3/RCV-E1 et GI.4/RCV-E2). Ces nouvelles séquences

pourraient peut-être aussi nous donner des éléments de réponse sur l'origine des souches EBHSV comme cela a été mis en évidence pour les RHDV2 dans la publication 3.

## 2. Recherche de potentiels liens évolutifs entre les HaCV et les EBHSV

En collaboration avec l'équipe de Jacques Le Pendu du CRCINA (Université de Nantes, CNRS, Inserm), la première prédiction de structure de la protéine VP60 d'un des HaCV étudié a été modélisée. Cette prédiction de structure s'est avérée être très proche de celle d'un GII.1/EBHSV obtenue dans l'étude de Lopes et al. (2014) et ne peut donc pas à elle seule expliquer la différence de pathogénicité entre les deux souches.

L'obtention de nouvelles séquences a aussi permis de déterminer l'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) du gène codant la VP60 de chaque génotype HaCV nouvellement identifié (Publication 1). Les tMRCA HaCV ont été estimés à des dates antérieures aux tMRCA des EBHSV. Ces résultats suggèrent que les HaCV circulaient bien avant les virus EBHSV. Cette observation est compatible avec l'hypothèse selon laquelle le HaCV a évolué vers la forme pathogène EBHSV au sein de la même espèce. Néanmoins, elle ne peut être vérifiée pour le moment puisque nous n'avons pas réussi à caractériser le virus qui pourrait être l'ancêtre des lagovirus pathogènes du lièvre. Il est possible que ce virus soit aujourd'hui éteint et il serait intéressant de pouvoir caractériser d'autres séquences de gène codant la VP60 de HaCV provenant de prélèvements plus anciens collectés aux alentours de l'émergence des EBHSV en 1980 par exemple. La caractérisation de telles souches permettrait de savoir si les souches HaCV circulant à cette époque étaient génétiquement proches des premières souches EBHSV identifiées, et donc de savoir si l'évolution de souches non-pathogènes vers des souches pathogènes pourrait être à l'origine de l'émergence des EBHSV, comme cela a été observée avec le poliovirus. Ce virus est un picornavirus, famille virale proche des calicivirus, pouvant provoquer une paralysie des membres inférieurs et des arrêts respiratoires chez l'Homme. Dans le but d'éradiquer ce virus, un vaccin contenant trois poliovirus vivants et atténués ne provoquant pas de pathologie (Sabin, 1985) a été distribué partout dans le monde à la fin des années 1980 (Kew et al., 2005). Une récente étude a révélé qu'une des souches de poliovirus de ce vaccin, appelée OPV 2, pouvait évoluer par mutations progressives et recombinaisons pour devenir pathogène et provoquer la polomyélite. Trois mutations dans la région structurale du virus ont été identifiées comme étant responsables du gain de virulence de la souche OPV 2 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Stern et al., 2017). D'après les auteurs, ce gain de virulence participerait à l'augmentation de la population virale dans l'organisme infecté, favorisant ainsi les probabilités de transmission, co-infection et recombinaison avec d'autres virus.

### 3. Phénotype des virus HaCV

Bien que les virus HaCV soient considérés comme des lagovirus non-pathogènes car collectés sur des lièvres sains, une expérimentation animale est nécessaire pour confirmer définitivement ce phénotype. Les premières observations de Cavadini et al. (2015) sur des lièvres d'élevage infectés avec des HaCV indiquent que les animaux n'ont aucun symptôme. Il est cependant difficile de mettre en place une expérimentation animale en condition de laboratoire sur une espèce sauvage telle que le lièvre et ce pour plusieurs raisons. La première est l'obtention des animaux. Contrairement à l'Italie où les élevages de lièvres sont plus nombreux, peu d'élevages de lièvres existent en France et il est plus difficile pour nous de s'en procurer. Une solution serait de capturer des lièvres sauvages dans la nature mais cette option ne permet pas de garantir une homogénéité de statut sanitaire entre les animaux capturés et n'est donc pas adaptée à la constitution de lots en vue d'une expérimentation animale. De plus, la manipulation d'animaux sauvages en expérimentation animale nécessite une dérogation à la directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Cette directive stipule aussi que la détention de lièvres en animalerie nécessite du matériel et du personnel qualifié ayant une expertise sur la manipulation de ces animaux pendant les essais expérimentaux (notion de « certificat de capacité pour la faune sauvage »). Enfin, le bien-être de l'animal va être difficile à respecter car les lièvres n'ont pas l'habitude d'être confinés dans une cage. L'ensemble de ces raisons ne nous a pas permis d'effectuer dans le cadre de cette thèse, les expérimentations animales sur les lièvres nécessaires pour vérifier le phénotype non-pathogène des HaCV que nous avons étudiés.

## II. Etude de l'origine de la pathogénicité des RHDV2

### 1. Diversité génétique et recombinaisons

Toujours pour étudier la diversité génétique des lagovirus, d'autres séquences de génome complet mais aussi de la région codante de plusieurs GI.3/RCV-E1 et GI.2/RHDV2 ont été caractérisées. Ces travaux complètent les précédents travaux du laboratoire qui avaient décrit pour la première fois la séquence du gène codant la VP60 d'un RCV-E1 (Le Gall-Reculé et al. 2011), puis la séquence du génome complet de ce lagovirus (Lemaitre et al. 2018). L'analyse phylogénique de ces génomes complets a permis d'identifier une recombinaison entre la région non-structurale des RCV-E1 et la région structurale des premières souches RHDV2 collectées entre 2010-2012 en France, en Italie, en Espagne et au Portugal. Ces résultats suggèrent que l'émergence des RHDV2 proviendrait de la recombinaison entre la région non-structurale d'un RCV-E1 et la région structurale d'un virus inconnu. Ces souches recombinantes ont aussi été détectées sur des prélèvements plus récents collectés en

2016 en France, aux Pays-Bas et au Canada. Ce dernier résultat montre que les premières souches RHDV2 caractérisées en 2010 continuent de circuler dans la faune sauvage (Publication 3).

Les virus RHDV2 ont déjà été décrits comme pouvant recombiner avec d'autres lagovirus. En effet, la recombinaison entre la région non-structurale de virus RCV-A1 et la région structurale de RHDV2 a été décrite peu après l'émergence en 2010 des RHDV2 (Silvério et al., 2018). Ce type de recombinaison a aussi été décrit entre les RHDV et les RHDV2 (Lopes et al., 2015b; Lopes et al., 2018b). L'origine de ces souches recombinantes est inconnue mais il est probable que, compte tenu de la période de leur découverte, une souche recombinante RCV-E1/RHDV2 initiale ait recombiné avec une souche RCV-A1 ou RHDV pour générer des souches RCV-A1/RHDV2 et des souches RHDV/RHDV2. Toutefois, il est aussi possible que le virus inconnu possédant la région structurale et non-structurale des virus RHDV2 ait recombiné avec des virus RCV-A1 et/ou RHDV, comme cela a potentiellement été le cas avec des RCV-E1 en 2010.

Les lagovirus ne sont pas les seuls calicivirus à utiliser la recombinaison pour évoluer et ainsi créer de la diversité génétique. En effet, la recombinaison entre la région non-structurale et la région structurale du génome a été observée chez de nombreux génotypes de norovirus (Jiang et al., 1999; Oliver et al., 2004; Bull et al., 2007; Symes et al., 2007; Ludwig-Begall et al., 2018), chez les FCV (Coyne et al., 2006; Symes et al., 2015) et chez les sapovirus (Katayama et al., 2004; Hansman et al., 2007). En règle générale, la recombinaison est un moyen d'évolution viral fréquemment utilisé par les virus à ARN, comme par exemple les enterovirus (*Picornaviridae*) (Savolainen-Kopra and Blomqvist, 2010). Le modèle de recombinaison le plus étudié est le « copy choice recombination ». Dans ce modèle, l'ARN polymérase, responsable de la réplication virale et qui correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) dans la plupart des virus à ARN, passe d'une molécule d'ARN (donneur) à une autre (accepteur) tout en restant liée à la chaîne d'acide nucléique en cours de synthèse afin de générer un ARN recombinant. Ce saut de RdRp se fait le plus souvent entre deux régions génomiques homologues (Simon-Lorier and Holmes, 2011). Le fait que l'extrémité 5' des ARNs génomiques et subgénomiques des lagovirus soient homologues à la jonction entre le gène codant la RdRP et le gène codant la VP60 pourrait donc favoriser le saut de RdRp pendant la réplication virale et la génération d'un ARN recombinant.

Cette étude souligne l'importance de la caractérisation génétique des lagovirus qui dans ce cas, nous a permis de suggérer que l'émergence des souches pathogènes RHDV2 ait été causée par l'évolution de souches à l'origine non-pathogènes grâce à un ou plusieurs événements de recombinaison. Ces résultats n'excluent pas l'hypothèse que la pathogénicité de ces virus puisse aussi provenir d'un saut de barrière d'espèce. En effet, l'origine de la région structurale des virus RHDV2

reste encore inconnue et il est possible que le virus parent de cette région structurale provienne d'une autre espèce.

## 2. Recherche d'autres espèces hôtes des lagovirus

Chez les *Caliciviridae*, les norovirus sont capables d'infecter un grand nombre d'espèces différentes, comme les chiens, les chats, les bovins, les porcs et les Hommes. Le saut de la barrière d'espèce est suspecté d'être à l'origine des émergences de norovirus chez l'homme (Villabruna et al., 2019). Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée à ce jour pour rechercher un lien épidémiologique entre une infection chez l'animale et une infection chez l'homme, des études sérologiques ont montré que des hommes en contact avec des animaux infectés par des norovirus avaient séroconverti. Des essais expérimentaux ont aussi montré que le norovirus humain pouvait infecter des veaux et des porcs gnotobiotiques en conditions de laboratoire. Cependant à ce jour, le saut de barrière d'espèce des norovirus vers l'homme n'a toujours pas été confirmé (Villabruna et al., 2019).

Plusieurs pistes sont étudiées au laboratoire afin de détecter des lagovirus chez d'autres espèces animales. La première espèce étudiée est le lapin à queue blanche, *Sylvilagus floridanus*, espèce résistante à l'infection par le RHDV mais qui semble être sensible aux lagovirus non-pathogènes (Lavazza et al. 2015). Pour rappel, cette espèce provenant d'Amérique du nord et résistante à la myxomatose a été introduite en Europe dans les années 70 pour palier la forte baisse du nombre de lapins européens touchés par cette maladie, peu de temps avant la première détection d'EBHSV en 1980 et de RHDV en 1984 (cf. Introduction). Pour étudier cette piste, des prélèvements duodénaux de *S. floridanus* ont été demandés à des écoles vétérinaires du Canada et du Québec et 23 prélèvements collectés en 2017 et 2018 ont été reçus au laboratoire en 2017 et 2019. Parmi ces prélèvements, 16 ont été analysés en RT-PCR et aucun lagovirus n'a été détecté. Par ailleurs, 11 autres prélèvements collectés aux États-Unis en 2017 et 2018 par le Cornell University Museum of Vertebrates ont été analysés au laboratoire. Seul un échantillon s'est révélé faiblement positif en RT-PCR. Après le séquençage du produit PCR et une analyse Blast de la séquence dans la base de données nucléotidiques Genbank, il s'est avéré que cette séquence provenait d'un RHDV2. Le génome de ce virus devra être séquencé dans sa totalité afin de déterminer si ce virus correspond au virus parent de la région structurale des virus recombinants RHDV2, même s'il est plus probable que cette infection ait été causée par une souche contemporaine de RHDV2. En effet, ce virus a été détecté pour la première fois aux États-Unis en 2016. En plus des échantillons stockés au laboratoire qui restent à étudier, un plus grand nombre d'échantillons provenant d'Amérique du nord devront être analysés afin de rechercher d'éventuels lagovirus chez cette espèce. Les collaborations déjà engagées avec les

équipes américaine et canadienne seront à poursuivre et de nouvelles collaborations pourront être envisagées afin d'obtenir des échantillons collectés dans d'autres régions américaines.

Une autre espèce est étudiée au laboratoire, le tamia de Sibérie, *Tamias sibiricus*. Les Tamias et les léporidés sont des espèces sympatriques qui pourraient donc se transmettre des lagovirus. De plus, cette espèce a elle aussi été introduite en Europe à la fin des années 1970 (Chapuis, 2005), peu de temps avant la première détection de lagovirus pathogènes. Des échantillons de duodénum de Tamias ont été collectés en 2018 en France par l'ONCFS à partir d'animaux capturés et tués dans le cadre du plan de lutte contre les espèces exotiques envahissantes. Ces échantillons n'ont pas encore été traités afin de rechercher d'éventuels lagovirus.

### III. Développement d'un système de génétique inverse en vue de l'étude du pouvoir pathogène

L'étude du pouvoir pathogène des lagovirus nous a poussé à développer un système de génétique inverse pour les lagovirus afin de déterminer si la région structurale était responsable à elle seule de la pathogénicité des lagovirus. En effet, la détection de souches pathogènes GI.1d/RHDV et RHDV2 recombinantes possédant une région structurale de souche pathogène et une région non-structurale de souche non-pathogène (Ghislaine Le Gall-Reculé, comm. pers. ; Silvério et al. 2018) semble indiquer que les motifs de pathogénicité pourraient être uniquement portés par la région structurale. Par contre, aucun lagovirus recombinant possédant une région structurale de virus non-pathogène et une région non-structurale de virus pathogène n'a été caractérisé à ce jour, ce qui ne permet pas de confirmer définitivement cette hypothèse. Le développement d'un système de génétique inverse pour le RHDV entrepris au cours de ces travaux de thèse avait pour objectif de générer un virus chimère possédant la région structurale d'un virus pathogène et la région non-structurale d'un virus non-pathogène, puis inversement, afin de vérifier si ces virus chimères régénérés possédaient respectivement un phénotype pathogène et non-pathogène. Nous avons pour ce faire utilisé comme virus de référence un GI.1d/RHDV français.

En effet, les premiers variants GI.1d/RHDV ont été détectés en France en 1990 puis, à partir de 2000, des souches pathogènes GI.1d recombinantes au niveau de leur région non-structurale avec un lagovirus très proche des lagovirus non-pathogènes GI.3/RCV-E1 français ont émergé (lagovirus recombinants GI.3/GI.1d) et remplacé les GI.1d/RHDV d'origine (Ghislaine Le Gall-Reculé, comm. pers.). Par ailleurs, les séquences génomiques complètes de deux de ces trois types de virus sauvages, GI.3/GI.1d et GI.3, avaient été obtenues antérieurement au laboratoire (Ghislaine Le Gall-Reculé, données non publiées ; Lemaitre et al., 2018), et la caractérisation phénotypique d'une souche GI.3 avait déjà été réalisée (souche GI.3/06-11, Le Gall-Reculé et al., 2011).

## 1. Tentative de développement d'un nouveau système de génétique inverse

### 1.1. Caractérisation de la souche de référence

Le développement d'un système de génétique inverse pour le RHDV est tout d'abord passé par la caractérisation génotypique et phénotypique de la souche de référence GI.1d/RHDV qui nous manquait (souche GI.1d/00-21, récoltée en 2000 en France, publication 4). Son organisation génomique est identique aux autres lagovirus. Les extrémités du génome viral ont été obtenues en utilisant une méthode de « rapid amplification of cDNA ends 5' et 3' » (RACE) développée au laboratoire (Lemaitre et al., 2018) et une différence a été observée en position 8 du 5' UTR (T -> C). Bien que les données de séquence des extrémités des génomes des lagovirus soient moins fréquemment disponibles dans les bases de données nucléotidiques, la méthode de RACE étant lourde à mettre en place, cette différence semble spécifique à la souche GI.1d/00-21. La séquence du 5' UTR est conservée chez chaque genre de calicivirus (Alhatlani et al., 2015) et les six premiers nucléotides du 5'UTR sont effectivement conservés chez tous les lagovirus ainsi que pour cette souche.

La cinétique de répllication du virus dans les organes des lapins inoculés par voie orale indique une répllication précoce dans le foie des animaux dès 16 h post-inoculation (hpi). Les prélèvements d'organes collectés à partir 39 hpi ont tous été détectés positifs en RT-qPCR ciblant l'ARN génomique. Ces résultats sont proches de la cinétique de répllication établie précédemment par Guitré et al. (1996). Dans cette étude, les auteurs ont inoculé une souche RHDV récoltée en France avant 1995 (variant non précisé : GI.1b ou GI.1c) à des lapins par voie nasale (dose inoculée non-précisée) et ont sacrifié deux lapins à différents temps. Les organes prélevés étaient le foie, la rate, les poumons, les reins, le thymus, les amygdales et les ganglions lymphatiques. De l'ARN viral a été détecté en RT-PCR dès 18 hpi dans le foie et la rate puis dans tous les organes à partir de 36 hpi. Cependant dans cette étude, aucune expérimentation permettant de connaître l'évolution des doses de génome dans les organes n'a été effectuée. Une autre étude a étudié les stades précoces de l'infection par le RHDV dans les organes en RT-PCR en obtenant les mêmes résultats que Guitré et al. (1995) (Shien et al., 2000). Les deux autres études disponibles ont utilisé les méthodes de Western-blot ou d'immunohistochimie pour détecter la présence de la protéine de capsid VP60 (Alonso et al., 1998 ; Prieto et al., 2000). Ainsi, Prieto et al (2000) ont observé la présence de VP60 dans quelques hépatocytes chez le premier lapin sacrifié à 12 hpi.

Afin d'estimer la dose minimale infectieuse de la souche GI.1d/00-21, nous avons inoculé des lapins avec différentes doses de particules virales purifiées correspondant à  $10^7$ ,  $10^4$  ou  $10^{-1}$  copies d'ARN. Ces doses virales ont été estimées en adaptant le protocole mis en place par Teixeira et al. (2011). Ce protocole consiste à purifier les particules virales sur un gradient de densité Optiprep™ puis

à extraire les ARNs totaux de la fraction contenant les particules virales infectieuses. Nous avons ensuite développé une RT-qPCR ciblant la région non-structurale du génome afin d'estimer le nombre de particules virales contenant le génome viral complet (et pas seulement l'ARN dans chaque dose à inoculer (Publication 4). L'ARN génomique a été ainsi ciblé contrairement aux autres méthodes de quantification en RT-qPCR développées pour les lagovirus qui ciblent le gène VP60 (Duarte et al., 2015; Gall et al., 2007; Liu et al., 2015). Cette particularité permet de moins biaiser la quantification estimée des particules virales infectieuses, le gène VP60 étant à la fois présent sur l'ARN génomique et sur l'ARN subgénomique (Meyers, et al. 1991). De plus, le ratio d'ARN génomique/ARN subgénomique n'est pas documenté chez les lagovirus. La souche GI.1d/00-21 induit 80% de mortalité lorsque les animaux sont inoculés avec une dose de  $10^7$  copies et permet d'infecter 100% des lapins. Aucune mortalité n'a été observée avec la dose inoculée de  $10^4$  copies. Ce dernier résultat nous a surpris car bien qu'il n'y ait pas de donnée accessible pour les RHDV sur la dose minimale infectieuse, celle des norovirus a été estimée entre 10 à 100 particules virales (Yezli and Otter, 2011). La dose de  $10^4$  copies a cependant permis d'infecter un lapin sur 10 pendant l'essai expérimental. Ainsi avec la souche utilisée, une charge virale de  $10^4$  copies permet d'infecter une partie des animaux tandis qu'une charge virale supérieure à  $10^4$  copies ( $10^7$  copies) est nécessaire pour observer de la mortalité. Le premier résultat est toutefois important car il indique la charge virale à atteindre en génétique inverse pour infecter des animaux *in vivo* afin de valider le système à développer.

## 1.2. Constructions plasmidiques et résultats obtenus

Une fois la souche de référence caractérisée, le développement du système de génétique inverse a été entrepris. Deux plasmides ont été construits permettant la production d'ARNs polyadénylés avec 20 A ou plus de 20 A pour régénérer la souche GI.1d/00-21 car la polyadénylation des ARNs génomiques et subgénomiques des calicivirus est peu documentée. Dans les systèmes de génétique inverse des calicivirus, la taille de la queue polyA, quand elle est précisée, varie entre 16 et plus de 20 A. Cependant, Liu et al. (2008) ont rapporté que la queue polyA n'était pas essentielle à l'infectiosité du RHDV *in vivo*. Afin d'augmenter nos chances de régénérer la souche GI.1d/00-21, nous avons décidé de construire deux plasmides permettant de produire des ARNs polyadénylés avec 20 A ou plus. La transfection de ces plasmides dans les cellules RK13 et BSR-T7 a permis la production d'ARN viral et la production de protéine VP60. Ce résultat indique qu'une queue polyA de 20 A est suffisante pour produire de l'ARN viral et de la protéine VP60. Par ailleurs, les cellules BSR-T7 semblent plus efficaces pour produire de grandes quantités d'ARN viral et de protéine VP60 que les cellules RK13 dans nos conditions de transfection. Cette différence d'efficacité entre les BSR-T7 et RK13 peut être expliquée par la différence des taux de transfection qui sont de 50% pour les BSR-T7 et de 30% pour les RK13. Cependant, l'inoculation de cellules transfectées n'a pas permis d'infecter les animaux, mais

une séroconversion a été détectée. L'inoculation des animaux directement avec les plasmides n'a pas non plus permis leur infection.

## 2. Potentielles limites de l'étude

Le système de génétique inverse n'est donc pas encore validé. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats :

- Hypothèse 1 : le système de génétique inverse permet la production de particules virales infectieuses mais en quantité insuffisante pour infecter les animaux en expérimentation animale
- Hypothèse 2 : le système de génétique inverse ne permet pas la production de particules virales infectieuses
- Hypothèse 3 : le système de génétique inverse permet la production d'un virus différent de la souche sauvage

L'hypothèse 1 a été émise suite à la détection des éléments indispensables à la production de particules virales infectieuses, l'ARN viral et la protéine VP60 capable de s'auto-assembler pour former la capsid virale. Le virus régénéré ne pouvant pas se répliquer dans les cellules RK13 ou BSR-T7, il est plus difficile d'obtenir, dans nos conditions de régénération, le nombre de copies infectieuses nécessaire à l'infection des animaux en expérimentation animale (égal ou supérieur à  $10^4$  copies, voire  $10^7$  copies). En effet, une fois que le plasmide a pénétré dans les cellules, il va normalement permettre la production d'ARN viral. L'ARN viral va être traduit pour produire les protéines virales nécessaires à la génération des particules virales dans les cellules. En l'absence de cellules permissives, les particules virales néo synthétisées ne vont pas initier de cycle viral pour se multiplier. Cela a pour conséquence une production de particules virales extrêmement faible et probablement insuffisante pour infecter des animaux. Afin d'augmenter nos chances de régénération du virus chez l'animal, une autre voie d'inoculation pourrait être testée. En effet, dans nos essais *in vivo*, les voies naturelles d'entrée du virus chez le lapin ont été utilisées pour inoculer les animaux, à savoir la voie orale et la voie nasale. La voie intramusculaire a aussi été testée pour permettre aux particules virales potentiellement régénérées d'atteindre rapidement la voie sanguine. Le tropisme du virus RHDV étant principalement hépatique, une inoculation intrahépatique pourrait favoriser l'infection des animaux avec une dose virale extrêmement faible.

La production de particules virales du norovirus humain HuNoV, qui lui non plus ne se multiplie pas en culture cellulaire, a été observée en microscopie électronique après transfection d'un plasmide constitué d'un pEF-1 $\alpha$  recrutant l'ARN pol II (Katayama et al. 2014), comme devrait le faire le pCMV dans le système de génétique inverse que nous avons développé. Il est ainsi envisageable que notre

système permette la production de particules virales et il faudrait essayer d'observer ces particules virales en microscopie électronique après leur concentration en gradient isopycnique, voire en immuno-électromicroscopie pour faciliter leur observation. Cependant, cette méthode nécessite une importante quantité de particules virales par mL pour avoir une chance de les observer. Les probabilités que cette méthode fonctionne dans notre cas sont donc faibles. Il faudrait aussi essayer d'estimer le nombre de particules virales générées par le système de génétique inverse en les purifiant et en les concentrant en gradient de densité OptiPrep™ puis en estimant la quantité d'ARN génomique à l'aide de la RT-qPCR décrite dans l'article 4. Si la quantité de particules générées s'avère effectivement être trop faible, il faudra alors optimiser d'avantage les conditions de transfection pour arriver à augmenter le nombre de particules infectieuses dans les inoculums. Toutefois, la purification sur gradient de densité entraîne souvent une perte de matériel biologique et si la quantité de particules virales à purifier est faible, il est peu probable que l'on détecte l'ARN viral après purification.

La seconde hypothèse, émise après les essais de régénération du virus *in vivo*, serait que le système de génétique inverse ne permette pas la production de particules virales infectieuses. En effet aucune trace de virus n'a été détectée dans les prélèvements effectués en animalerie. Si le système ne permet pas de produire des particules virales, il faut alors revoir la stratégie dans son ensemble. La principale différence du système développé dans cette étude avec les autres systèmes développés pour les calicivirus, outre le fait de ne pas avoir de cellules permissives permettant la multiplication du virus *in vitro*, est l'absence d'apport d'analogue de la coiffe pour mimer la VPg. Dans notre stratégie, nous avons utilisé le pCMV pour générer des ARNs coiffés dans le noyau des cellules transfectées. Dans les systèmes de génétique inverse des calicivirus les plus récents, l'utilisation de promoteurs permettant de recruter l'ARN pol II est en effet suffisante pour régénérer des calicivirus qui disposent de systèmes de culture cellulaire pour les multiplier, comme les FCV (Oka et al., 2014) et les MNV (Strong et al., 2012; Katayama et al., 2014) mais aussi pour régénérer des calicivirus qui n'en disposent pas comme le RHDV (Liu et al., 2008b) et les HuNoV (Katayama et al., 2004) (cf. Introduction – génétique inverse). Cependant dans nos conditions, si l'utilisation du promoteur pCMV n'est pas suffisante pour générer des ARNs coiffés dans les cellules RK13 ou BSR-T7, il y a des chances pour que l'ARN viral néo-synthétisé soit rapidement dégradé dans les cellules transfectées car non protégé en 5'. Cette dégradation des ARNs viraux néo-synthétisés a été supposée après avoir observé que l'amplification en PCR de petites régions génomiques virales était plus efficace que l'amplification de grandes régions génomiques. Si les ARNs ne sont pas ou insuffisamment coiffés, le système de génétique inverse devra être modifié.

Deux options s'offrent à nous pour cela. Nous pouvons repartir des premiers systèmes de génétique inverse des calicivirus (Sosnovtsev and Green, 1995 ; Chang et al., 2005b ; Liu et al., 2006 ; Wei et al., 2008), qui consistaient à produire des ARNs viraux *in vitro* en présence d'analogue de la coiffe. Une autre solution consisterait à utiliser un virus auxiliaire modifié, comme le virus de la variole aviaire dit fowlpox (FPV/T7) ou le virus vaccinia VTF7 pour générer à la fois la polymérase du bactériophage T7 et coiffer les ARNs viraux néo synthétisés. Dans les deux solutions, seul le pT7 serait utilisé pour transcrire le plasmide. Les virus auxiliaires et le pT7 ont été utilisés dans certains systèmes de génétique inverse des calicivirus, notamment pour régénérer des FCV (Thumfart and Meyers, 2002), MNV (Chaudhry et al., 2007 ; Arias et al., 2012), un virus RDHV mutant (Zhu et al., 2017) et des HuNoV (Asanaka et al., 2005).

Enfin, la dernière hypothèse serait que le virus régénéré soit différent du virus sauvage. Deux cas de figure pourraient expliquer cette hypothèse. Le premier serait que la séquence clonée dans le plasmide ne corresponde pas à la séquence génomique du virus sauvage. En effet, une mutation dans le 5' UTR a été détectée, mutation qui semble exclusive à la souche GI.1d/00-21. Bien que cette mutation ait été observée *via* deux manipulations indépendantes, il reste la possibilité qu'elle corresponde à un artéfact de séquençage. Si c'est le cas, il n'est pas impossible que cette mutation perturbe les structures secondaires identifiées au début du génome des RHDV (Simmonds et al., 2008) et empêche la production de particules infectieuses viables. Une nouvelle construction pourrait donc être réalisée en remplaçant ce nucléotide par le nucléotide consensus. Le second cas de figure serait que le génome du virus issu de génétique inverse soit différent de la séquence clonée dans le plasmide. Il se pourrait ainsi que le virus régénéré ne soit pas viable ou que son tropisme change. Il faudra commencer par produire des ARNs viraux en génétique inverse en quantité suffisante pour pouvoir les séquencer en NGS et vérifier leurs séquences. Si des différences sont observées entre les ARNs régénérés et la séquence du génome viral de la souche de référence, il faudra analyser le reste des organes prélevés sur les lapins inoculés en animalerie pour chercher la présence éventuelle de virus ailleurs que dans les organes cibles du virus de référence.

### 3. Perspectives

#### 3.1. Vérifier la production d'un virus identique à la souche de référence

Pour vérifier la production d'un virus identique à la souche de référence, de nouvelles expérimentations animales seront nécessaires pour démontrer que le virus est capable d'infecter les animaux inoculés et les animaux contacts. Il faudra aussi confirmer que le virus issu de génétique inverse a le même tropisme et le même phénotype que la souche sauvage, à savoir la même cinétique de répllication dans les organes *in vivo* et les mêmes taux d'infectiosité et de mortalité, afin de valider

le système de génétique inverse. Ces expérimentations seront facilitées par l'autorisation obtenue du Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation permettant d'effectuer ces expérimentations animales dans des animaleries de confinement de niveau 2.

### 3.2. Production de virus chimères

La validation du système de génétique inverse pour le RHDV permettra par la suite d'étudier les motifs de pathogénicité des lagovirus. La première utilisation de ce système consistera à remplacer la région non-structurale de la souche GI.1d/00-21 avec celle de la souche non pathogène GI.3/06-11. Une fois le plasmide construit, il faudra s'assurer de la viabilité de ce virus. En effet, les séquences génomiques des souches recombinantes GI.3/GI.1d apparues en 2000 en France présentent en moyenne une distance génétique de 5% au niveau de leur région non-structurale avec celle des souches GI.3/RCV-E1 qui ont pu être caractérisées entre 2006 et 2009 en France. Cela représente une différence de 1,3% en moyenne au niveau protéique. Ces différences pourraient être indispensables à la viabilité et l'infectiosité du virus chimère et des expérimentations animales seront nécessaires pour le vérifier. De plus, si le virus est détecté majoritairement dans le foie et s'il provoque de la mortalité chez les animaux infectés, cela validera son phénotype pathogène. Ce dernier résultat démontrera que la région structurale est suffisante pour conférer le phénotype pathogène des lagovirus. Une étude complémentaire pourrait permettre de confirmer ces conclusions.

En effet, si la région structurale du génome semble être responsable de la pathogénicité des lagovirus, alors la construction d'un virus chimère composée de la partie non-structurale de la souche pathogène GI.1d/00-21 et de la partie structurale de la souche non-pathogène GI.3/06-11 devrait conduire à une perte du phénotype pathogène et un changement de tropisme du virus. Cependant, un tel virus recombinant n'a jamais été décrit dans la littérature, ce qui pourrait laisser supposer qu'il ne soit pas viable. Pour s'assurer de la viabilité de ce virus, l'expérimentation animale sera là aussi nécessaire. Le virus sera qualifié de viable si une séroconversion est détectée chez les animaux inoculés et contacts. Si le virus est bien non-pathogène, il sera détecté en grande majorité dans le duodénum des lapins et aucune mortalité ne sera détectée chez les animaux post-inoculation. Ce résultat confirmera que la région structurale du génome est bien responsable de la pathogénicité des lagovirus. L'étude pourra ensuite être affinée au niveau du gène codant la VP60 uniquement, puis à des régions plus petites de ce gène, notamment les régions hypervariables qui sont impliquées dans l'antigénicité des lagovirus.

Dans le cas où les échanges de régions structurales ou les modifications apportées au niveau du gène VP60 ne seraient pas suffisants pour modifier le phénotype initial, d'autres régions pourront être échangées ou mutées entre les virus pathogènes et non-pathogènes afin d'étudier d'autres pistes.

La première serait de reproduire dans la construction chimère constituée de la partie non-structurale de la GI.3/06-11 et de la partie structurale de la GI.1d/00-21, les différences d'acides aminés observées entre la région non-structurale des virus recombinants GI.Id/RHDV et celle des virus GI.3/RCV-E1. La seconde piste serait d'étudier l'échange du gène codant la protéine non structurale p16 dont le rôle est inconnu, mais pour laquelle un lien entre les mutations observées au niveau de cette protéine et la plus forte virulence de souches GI.1c/RHDV australiennes a été suggéré (Elsworth et al., 2014). Par ailleurs, un évènement de recombinaison a été décrit au niveau de cette protéine entre une souche non-pathogène GI.4/RCV-A1 et une souche GI.2/RHDV2 (Silvério et al. 2018). La dernière piste viserait à étudier l'échange du gène codant la RdRp. Ce gène a été décrit chez d'autres virus, comme le poliovirus ou le virus de la fièvre aphteuse, comme pouvant être impliqué dans la virulence (Korboukh et al., 2014; Zeng et al., 2014).

### 3.3. Autres applications du système de génétique inverse

L'acquisition d'un système de génétique inverse appliqué aux lagovirus sera un nouvel outil pour le laboratoire afin d'étudier plus finement ces virus. Il pourrait par exemple servir à étudier les structures secondaires des extrémités non-codantes et de la jonction entre la région non-structurale/région structurale du génome viral identifiées à l'aide d'outils bio-informatiques (Simmonds et al., 2008; Alhatlani et al., 2015) en les modifiant afin d'étudier leurs fonctions. Des études similaires ont déjà été réalisées chez les MNV. En effet, le système de génétique inverse développé par Chaudhry et al. (2007) a permis de régénérer, entre autres, un MNV avec une structure secondaire en 5' du génome viral modifiée. Les mutations introduites ont permis de casser cette structure secondaire, ce qui a eu pour conséquence de diminuer l'infectiosité du virus *in vitro* (Simmonds et al., 2008).

## Conclusion générale

Nos travaux ont contribué à l'étude des lagovirus. Dans un premier temps, nous avons étudié la diversité génétique des lagovirus non-pathogènes afin de compléter nos connaissances sur ces virus jusqu'alors très peu étudiés et si possible identifier des liens évolutifs entre les lagovirus non-pathogènes et pathogènes. Ces travaux ont tout d'abord permis l'obtention de 11 nouvelles séquences de gène codant la protéine de capsid (VP60) de virus HaCV et la caractérisation du premier génome complet d'HaCV. L'analyse phylogénique réalisée avec l'ensemble des séquences de gène VP60 des HaCV a montré une importante diversité génétique chez ces lagovirus et a permis de définir deux nouveaux génotypes au sein du génogroupe GII, GII.2 et GII.3, ainsi que plusieurs autres génotypes potentiels. L'obtention de ces séquences a aussi permis de modéliser la première prédiction de structure de la protéine VP60 d'un lagovirus HaCV. Cette prédiction de structure s'est révélée très proche de celle des EBHSV, à l'exception des boucles flexibles du domaine P2 de la VP60 qui semblent avoir une orientation différente. L'analyse de l'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) de ces séquences semble indiquer que les virus HaCV circulaient bien avant les EBHSV. La caractérisation du génome complet d'un HaCV a quant à elle révélé une même structure génomique que celle des autres lagovirus. Aucune recombinaison avec des lagovirus connus n'a été identifiée sur le génome viral étudié.

L'ensemble de ces données de séquences a permis d'augmenter significativement les connaissances sur les lagovirus du lièvre. Ces données n'ont toutefois pas été suffisantes pour établir un potentiel lien évolutif entre les souches HaCV et EBHSV. D'autres séquences de génomes et de gène codant la VP60 de virus HaCV seront nécessaires pour étudier cette hypothèse sur l'origine des formes pathogènes et pour confirmer l'existence des nouveaux autres génotypes entrevus. Par ailleurs, le phénotype des virus HaCV devra être vérifié en expérimentation animale pour confirmer que ces souches possèdent bien un phénotype non-pathogène chez les lièvres.

Nous avons aussi étudié les lagovirus du lapin afin de compléter nos connaissances sur ces virus, et notamment sur les lagovirus non-pathogènes GI.3/RCV-E1, en obtenant d'autres séquences de génomes complets ainsi que des séquences de la région codante de plusieurs GI.3/RCV-E1 et GI.2/RHDV2. Les analyses phylogéniques et les analyses de recombinaisons de ces séquences ont permis d'établir que l'émergence des virus GI.2/RHDV2 a été causée par au moins un événement de recombinaison entre la région non-structurale d'une souches GI.3/RCV-E1 et la région structurale d'un virus inconnu. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse que les virus pathogènes GI.2/RHDV2 ont émergé suite à l'évolution d'un lagovirus non-pathogène. Cependant ces résultats sont aussi compatibles avec l'hypothèse du saut de la barrière d'espèce car le virus inconnu, donneur de la partie structurale des RHDV2 dans l'évènement de recombinaison, n'a jamais été détecté chez le lapin *Oryctolagus cuniculus* et les lièvres *Lepus sp.* Il est donc possible que ce virus inconnu provienne d'une

autre espèce vraisemblablement sympatrique. Aujourd'hui, deux pistes sont explorées au laboratoire pour rechercher une possible espèce réservoir des lagovirus pathogènes pour les léporidés, les *Sylvilagus floridanus* et les *Tamias sibericus*.

Dans la seconde partie de la thèse, nous avons voulu étudier les bases moléculaires du pouvoir pathogène des lagovirus à l'aide d'un nouveau système de génétique inverse. Pour commencer à développer ce nouveau système de génétique inverse pour le RHDV, le génotype et le phénotype de la souche de référence GI.1d/RHDV 00-21 ont été caractérisés. Par la suite, deux plasmides ont été construits pour régénérer la souche GI.1d/RHDV 00-21 avec 20 A ou plus de 20 A à l'extrémité 3' du génome viral. La transfection de ces plasmides dans les cellules RK13 et BSR-T7 a permis la production d'ARNs viraux et de protéines VP60. Les expérimentations de régénération du virus *in vivo* n'ont pas permis de conclure que le système de génétique inverse était capable de produire des particules virales infectieuses malgré les signes d'une séroconversion chez la majorité des lapins inoculés. Par ailleurs, l'absence d'animaux contacts pendant les essais de régénération du virus *in vivo* n'a pas permis de vérifier le caractère infectieux du phénomène à l'origine de la séroconversion. Il sera donc nécessaire de poursuivre ces travaux pour améliorer le système et de le valider afin d'étudier les motifs de pathogénicité des lagovirus.

A l'issue de ce travail de thèse, la diversité génétique des lagovirus est mieux caractérisée. Les travaux préliminaires réalisés sur le développement d'un nouveau système de génétique inverse devraient permettre au laboratoire de disposer prochainement d'un nouvel outil pour étudier plus finement les lagovirus. Ainsi, en plus d'étudier les bases moléculaires du pouvoir pathogène des lagovirus, cet outil pourrait permettre d'entreprendre par exemple la caractérisation du rôle de certaines protéines virales ou de comprendre les fonctions des structures secondaires du génome viral.

## Références bibliographiques

- Abrantes, J., Lopes, A.M., Dalton, K.P., Melo, P., Correia, J.J., Ramada, M., et al. (2013). New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg Infect Dis* 19(11), 1900-1902. doi: 10.3201/eid1911.130908.
- Abrantes, J., Lopes, A.M., Dalton, K.P., Parra, F., and Esteves, P.J. (2014). Detection of RHDVa on the Iberian Peninsula: isolation of an RHDVa strain from a Spanish rabbitry. *Arch Virol* 159(2), 321-326. doi: 10.1007/s00705-013-1808-2.
- Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., and Esteves, P.J. (2012). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* 43, 12. doi: 10.1186/1297-9716-43-12.
- Ahlquist, P., French, R., Janda, M., and Loesch-Fries, L.S. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22), 7066-7070. doi: 10.1073/pnas.81.22.7066.
- Alhatlani, B., Vashist, S., and Goodfellow, I. (2015). Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Res* 206, 134-143. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.002.
- Allemandou, A., Grasland, B., Hernandez-Nignol, A.C., Keranflec'h, A., Cariolet, R., and Jestin, A. (2011). Modification of PCV-2 virulence by substitution of the genogroup motif of the capsid protein. *Vet Res* 42, 54. doi: 10.1186/1297-9716-42-54.
- Alonso, C., Oviedo, J.M., Martin-Alonso, J.M., Diaz, E., Boga, J.A., and Parra, F. (1998). Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 143(2), 321-332. doi: 10.1007/s007050050289.
- An, S., Kim, B., Lee, J., Song, J., Park, B., Kwon, Y., et al. (1988). Studies on picornavirus haemorrhagic fever (tentative name) in rabbit, 1; physico-chemical properties of the causative virus. *Research Reports of the Rural Development Administration-Veterinary (Korea R.)*.
- Arias, A., Bailey, D., Chaudhry, Y., and Goodfellow, I. (2012). Development of a reverse-genetics system for murine norovirus 3: long-term persistence occurs in the caecum and colon. *J Gen Virol* 93(Pt 7), 1432-1441. doi: 10.1099/vir.0.042176-0.
- Asanaka, M., Atmar, R.L., Ruvolo, V., Crawford, S.E., Neill, F.H., and Estes, M.K. (2005). Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(29), 10327-10332. doi: 10.1073/pnas.0408529102.
- Asgari, S., Hardy, J.R., Sinclair, R.G., and Cooke, B.D. (1998). Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera:Calliphoridae) among wild rabbits in Australia. *Virus Res* 54(2), 123-132. doi: 10.1016/s0168-1702(98)00017-3.

- Bárcena, J., Guerra, B., Angulo, I., González, J., Valcárcel, F., Mata, C.P., et al. (2015). Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Veterinary research* 46(1), 106.
- Bergin, I.L., Wise, A.G., Bolin, S.R., Mullaney, T.P., Kiupel, M., and Maes, R.K. (2009). Novel Calicivirus Identified in Rabbits, Michigan, USA. *Emerg Infect Dis* 15(12), 1955-1962. doi: 10.3201/eid1512.090839.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S.E., Hutson, A.M., and Estes, M.K. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77(21), 11603-11615. doi: 10.1128/jvi.77.21.11603-11615.2003.
- Billinis, C., Psychas, V., Tontis, D.K., Spyrou, V., Birtsas, P.K., Sofia, M., et al. (2005). European brown hare syndrome in wild European brown hares from Greece. *J Wildl Dis* 41(4), 783-786. doi: 10.7589/0090-3558-41.4.783.
- Boga, J., Marín, M.S., Casais, R., Prieto, M., and Parra, F. (1992). In vitro translation of a subgenomic mRNA from purified virions of the Spanish field isolate AST/89 of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Virus Research* 26(1), 33-40. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(92\)90144-X](https://doi.org/10.1016/0168-1702(92)90144-X).
- Bok, K., Abente, E.J., Realpe-Quintero, M., Mitra, T., Sosnovtsev, S.V., Kapikian, A.Z., et al. (2009). Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol* 83(22), 11890-11901. doi: 10.1128/JVI.00864-09.
- Boniotti, B., Wirblich, C., Sibilía, M., Meyers, G., Thiel, H.J., and Rossi, C. (1994). Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* 68(10), 6487-6495.
- Boon, D., Mahar, J.E., Abente, E.J., Kirkwood, C.D., Purcell, R.H., Kapikian, A.Z., et al. (2011). Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol* 85(17), 8656-8666. doi: 10.1128/JVI.00472-11.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2), 521-530. doi: 10.1016/s0092-8674(85)80025-8.
- Boucher, S., G., L.G.-R., Le Normand, B., Bertagnoli, S., Guérin, J.-L., Decors, A., et al. (2012a). Mesures de prévention et de protection contre le virus VHD variant 2010. *Le point Vétérinaire* 327.
- Boucher, S., Le Gall-Recule, G., Le Normand, B., Bertagnoli, S., Guérin, J.-L., Decors, A., et al. (2012b). Aspect clinique de la maladie hémorragique virale due au virus variant 2010. *Le Point Vétérinaire* (327), 35-38.

- Boucher, S., and Nouaille, L. (1996). *Maladies des lapins*. France Agricole.
- Britton, P., Green, P., Kottier, S., Mawditt, K.L., Penzes, Z., Cavanagh, D., et al. (1996). Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus. *J Gen Virol* 77 ( Pt 5), 963-967. doi: 10.1099/0022-1317-77-5-963.
- Buchholz, U.J., Finke, S., and Conzelmann, K.K. (1999). Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73(1), 251-259.
- Bull, R.A., Tanaka, M.M., and White, P.A. (2007). Norovirus recombination. *J Gen Virol* 88(Pt 12), 3347-3359. doi: 10.1099/vir.0.83321-0.
- Burki, F. (1965). Picornaviruses of cats. *Arch Gesamte Virusforsch* 15(5), 690-696. doi: 10.1007/bf01245215.
- Burn, G.L., Svensson, L., Sanchez-Blanco, C., Saini, M., and Cope, A.P. (2011). Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett* 585(23), 3689-3698. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.032.
- Butler, E.T., and Chamberlin, M.J. (1982). Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 257(10), 5772-5778.
- Camarda, A., Pugliese, N., Cavadini, P., Circella, E., Capucci, L., Caroli, A., et al. (2014). Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Res Vet Sci* 97(3), 642-645. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.10.008.
- Capucci, L., Cavadini, P., Schiavitto, M., Lombardi, G., and Lavazza, A. (2017). Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2). *Vet Rec* 180(17), 426. doi: 10.1136/vr.104132.
- Capucci, L., Fallacara, F., Grazioli, S., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., and Brocchi, E. (1998). A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res* 58(1-2), 115-126. doi: 10.1016/s0168-1702(98)00106-3.
- Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., and Rossi, C. (1996). Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol* 70(12), 8614-8623.
- Capucci, L., Nardin, A., and Lavazza, A. (1997). Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet Rec* 140(25), 647-650. doi: 10.1136/vr.140.25.647.

- Capucci, L., Scicluna, M.T., and Lavazza, A. (1991). Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 10(2), 347-370.
- Carvalho, C.L., Silva, S., Gouveia, P., Costa, M., Duarte, E.L., Henriques, A.M., et al. (2017). Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in the archipelago of Madeira, Portugal (2016-2017). *Virus Genes* 53(6), 922-926. doi: 10.1007/s11262-017-1483-6.
- Cavadini, P., Molinari, S., Pezzoni, G., Chiari, M., and Brocchi, E. (2015a). Identification of a new non-pathogenic lagovirus in brown hares (*Lepus europeus*). In: Kelly P, Phillips S, Smith A and Browning C (editors). *5th World Lagomorph Conference*. Turlock, CA: California, State University Stanislaus.
- Cavadini, P., Molinari, S., Pezzoni, G., Chiari, M., Brocchi, E., Lavazza, A., et al. (Year). "Identification of a new non-pathogenic lagovirus in *Lepus europeus*", in: *Proceeding of the Xth International Congress for Veterinary Virology*, 76-77.
- Chan, C.M., Chu, H., Zhang, A.J., Leung, L.H., Sze, K.H., Kao, R.Y., et al. (2016). Hemagglutinin of influenza A virus binds specifically to cell surface nucleolin and plays a role in virus internalization. *Virology* 494, 78-88. doi: 10.1016/j.virol.2016.04.008.
- Chang, K.-O., Sosnovtsev, S.S., Belliot, G., Wang, Q., Saif, L.J., and Green, K.Y. (2005). Reverse Genetics System for Porcine Enteric Calicivirus, a Prototype Sapovirus in the Caliciviridae. *Journal of Virology* 79(3), 1409-1416. doi: 10.1128/jvi.79.3.1409-1416.2005.
- Chapman, J.A., and Flux, J.E. (1990). *Rabbits, hares and pikas: status survey and conservation action plan*. IUCN.
- Chapuis, J.-L. (2005). Répartition en France d'un animal de compagnie naturalisé, le Tamia de Sibérie (*Tamias sibiricus*). *Revue d'Ecologie* 60, 239-253.
- Chasey, D. (1994). Possible origin of rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom. *Vet Rec* 135(21), 496-499. doi: 10.1136/vr.135.21.496.
- Chasey, D., and Duff, P. (1990). European brown hare syndrome and associated virus particles in the UK. *Vet Rec* 126(25), 623-624.
- Chastel, C. (1997). La naissance de la virologie. *Virologie* 1(2), 103-110.
- Chaudhry, Y., Skinner, M.A., and Goodfellow, I.G. (2007). Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* 88(Pt 8), 2091-2100. doi: 10.1099/vir.0.82940-0.
- Chen, L., Liu, G., Ni, Z., Yu, B., Yun, T., Song, Y., et al. (2009). Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60. *J Gen Virol* 90(Pt 12), 2952-2955. doi: 10.1099/vir.0.015081-0.

- Chen, M., Liu, X., Hu, B., Fan, Z., Song, Y., Wei, H., et al. (2019). Rabbit hemorrhagic disease virus non-structural protein 6 induces apoptosis in rabbit kidney cells. *Frontiers in Microbiology* 10(JAN), 3308. doi: 10.3389/fmicb.2018.03308.
- Chiari, M., Molinari, S., Cavadini, P., Bertasi, B., Zanoni, M., Capucci, L., et al. (2016). Red foxes (*Vulpes vulpes*) feeding brown hares (*Lepus europaeus*) infected by European brown hare syndrome virus (EBHSV) might be involved in the spread of the virus. *European Journal of Wildlife Research* 62(6), 761-765. doi: 10.1007/s10344-016-1055-4.
- Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11(24), 3319-3326. doi: 10.1101/gad.11.24.3319.
- Cho, H.S., Ha, N.C., Kang, L.W., Chung, K.M., Back, S.H., Jang, S.K., et al. (1998). Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *J Biol Chem* 273(24), 15045-15052. doi: 10.1074/jbc.273.24.15045.
- Chrobocińska, M. (2001). Restriction enzyme analysis of the capsid protein gene of different strains of European brown hare syndrome virus. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 45, 141-152.
- Conley, M.J., McElwee, M., Azmi, L., Gabrielsen, M., Byron, O., Goodfellow, I.G., et al. (2019). Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature* 565(7739), 377-381. doi: 10.1038/s41586-018-0852-1.
- Contreras, R., Cheroutre, H., Degrave, W., and Fiers, W. (1982). Simple, efficient in vitro synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes. *Nucleic Acids Res* 10(20), 6353-6362. doi: 10.1093/nar/10.20.6353.
- Cooke, B.D., and Fenner, F. (2002). Rabbit haemorrhagic disease and the biological control of wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Australia and New Zealand. *Wildlife Research* 29(6), 689-706.
- Cooke, B.D., Robinson, A.J., Merchant, J.C., Nardin, A., and Capucci, L. (2000). Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol Infect* 124(3), 563-576. doi: 10.1017/s0950268899003994.
- Coyne, K.P., Reed, F.C., Porter, C.J., Dawson, S., Gaskell, R.M., and Radford, A.D. (2006). Recombination of Feline calicivirus within an endemically infected cat colony. *J Gen Virol* 87(Pt 4), 921-926. doi: 10.1099/vir.0.81537-0.
- Cyrklaff, M., Risco, C., Fernandez, J.J., Jimenez, M.V., Esteban, M., Baumeister, W., et al. (2005). Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8), 2772-2777. doi: 10.1073/pnas.0409825102.

- D' Angelo, A., Cerri, J., Cavadini, P., Lavazza, A., Capucci, L., and Ferretti, M. (2019). The Eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) in Tuscany (Central Italy): weak evidence for its role as a host of EBHSV and RHDV. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 30(1), 8-11. doi: 10.4404/hystrix-00146-2018.
- Dalton, K.P., Balseiro, A., Juste, R.A., Podadera, A., Nicieza, I., del Llano, D., et al. (2018). Clinical course and pathogenicity of variant rabbit haemorrhagic disease virus in experimentally infected adult and kit rabbits: Significance towards control and spread. *Veterinary Microbiology* 220, 24-32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.033>.
- Dalton, K.P., Nicieza, I., Abrantes, J., Esteves, P.J., and Parra, F. (2014). Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet Microbiol* 169(1-2), 67-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.015.
- Dalton, K.P., Nicieza, I., Balseiro, A., Muguerza, M.A., Rosell, J.M., Casais, R., et al. (2012). Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg Infect Dis* 18(12), 2009-2012. doi: 10.3201/eid1812.120341.
- de Graaf, M., van Beek, J., and Koopmans, M.P. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol* 14(7), 421-433. doi: 10.1038/nrmicro.2016.48.
- Delibes-Mateos, M., Ferreira, C., Carro, F., Escudero, M.A., and Gortazar, C. (2014). Ecosystem effects of variant rabbit hemorrhagic disease virus, Iberian Peninsula. *Emerg Infect Dis* 20(12), 2166-2168. doi: 10.3201/eid2012.140517.
- Desselberger, U. (2019). Caliciviridae Other Than Noroviruses. *Viruses* 11(3). doi: 10.3390/v11030286.
- Di Profio, F., Melegari, I., Sarchese, V., Robetto, S., Bermudez Sanchez, S., Carella, E., et al. (2018). Potential role of wolf (*Canis lupus*) as passive carrier of European brown hare syndrome virus (EBHSV). *Research in Veterinary Science* 117, 81-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.11.016>.
- Domingo, E. (2010). Mechanisms of viral emergence. *Vet Res* 41(6), 38. doi: 10.1051/vetres/2010010.
- Drews, B., Szentiks, C.A., Roellig, K., Fickel, J., Schroeder, K., Duff, J.P., et al. (2011). Epidemiology, control and management of an EBHS outbreak in captive hares. *Vet Microbiol* 154(1-2), 37-48. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.021.
- Droillard, C., Lemaitre, E., Chatel, M., Guitton, J.S., Marchandeu, S., Eterradosi, N., et al. (2018). First Complete Genome Sequence of a Hare Calicivirus Strain Isolated from *Lepus europaeus*. *Microbiol. Resour. Announc.* 7(22), e01224-01218. doi: 10.1128/mra.01224-18.
- Duarte, M., Carvalho, C., Bernardo, S., Barros, S.V., Benevides, S., Flor, L., et al. (2015a). Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: disclosure of common genetic

- markers and phylogenetic segregation within the European strains. *Infect Genet Evol* 35, 163-171. doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.005.
- Duarte, M.D., Carvalho, C.L., Barros, S.C., Henriques, A.M., Ramos, F., Fagulha, T., et al. (2015b). A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J Virol Methods* 219, 90-95. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.03.017.
- Duarte, M.D., Henriques, A.M., Barros, S., Luís, T., Fagulha, T., Ramos, F., et al. (2014). New insight into the epidemiology of rabbit hemorrhagic disease viruses in Portugal: retrospective study reveals the circulation of genogroup 5 (G5) in Azores and discloses the circulation of G1 and G6 strains in mainland until 2008. *Infect Genet Evol* 27, 149-155. doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.017.
- Duff, J., Whitwell, K., and Chasey, D. (Year). "The emergence and epidemiology of European brown hare syndrome in the UK", in: *Proceedings of the First International Symposium on Caliciviruses, United Kingdom*, 176-181.
- Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J Mol Biol* 166(4), 477-535. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80282-4.
- Eden, J.S., Read, A.J., Duckworth, J.A., Strive, T., and Holmes, E.C. (2015). Resolving the Origin of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Insights from an Investigation of the Viral Stocks Released in Australia. *J Virol* 89(23), 12217-12220. doi: 10.1128/jvi.01937-15.
- Elsworth, P., Cooke, B.D., Kovaliski, J., Sinclair, R., Holmes, E.C., and Strive, T. (2014). Increased virulence of rabbit haemorrhagic disease virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Virology* 464-465, 415-423. doi: 10.1016/j.virol.2014.06.037.
- Esteves, P.J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Cavadini, P., Gavier-Widen, D., Guitton, J.S., et al. (2015). Emergence of Pathogenicity in Lagoviruses: Evolution from Pre-existing Nonpathogenic Strains or through a Species Jump? *PLoS Pathog* 11(11), e1005087. doi: 10.1371/journal.ppat.1005087.
- Farkas, T., Cross, R.W., Hargitt, E., 3rd, Lerche, N.W., Morrow, A.L., and Sestak, K. (2010). Genetic diversity and histo-blood group antigen interactions of rhesus enteric caliciviruses. *J Virol* 84(17), 8617-8625. doi: 10.1128/JVI.00630-10.
- Farkas, T., Sestak, K., Wei, C., and Jiang, X. (2008). Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* 82(11), 5408-5416. doi: 10.1128/JVI.00070-08.

- Farnos, O., Rodriguez, D., Valdes, O., Chiong, M., Parra, F., Toledo, J.R., et al. (2007). Molecular and antigenic characterization of rabbit hemorrhagic disease virus isolated in Cuba indicates a distinct antigenic subtype. *Arch Virol* 152(6), 1215-1221. doi: 10.1007/s00705-006-0926-5.
- Ferreira, P.G., Costa, E.S.A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., and Aguas, A.P. (2005). Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Immunol Immunopathol* 103(3-4), 217-221. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.09.028.
- Fitzner, A., and Niedbalski, W. (2017). Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated in Poland. *Arch Virol* 162(10), 3197-3203. doi: 10.1007/s00705-017-3476-0.
- Flynn, W.T., and Saif, L.J. (1988). Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. *J Clin Microbiol* 26(2), 206-212.
- Fraser, D., Mahler, H.R., Shug, A.L., and Thomas, C.A. (1957). THE INFECTION OF SUB-CELLULAR ESCHERICHIA COLI, STRAIN B, WITH A DNA PREPARATION FROM T2 BACTERIOPHAGE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 43(11), 939-947. doi: 10.1073/pnas.43.11.939.
- Frolich, K., Haerer, G., Bacciarini, L., Janovsky, M., Rudolph, M., and Giacometti, M. (2001). European brown hare syndrome in free-ranging European brown and mountain hares from Switzerland. *J Wildl Dis* 37(4), 803-807. doi: 10.7589/0090-3558-37.4.803.
- Frolich, K., Klima, F., and Dedek, J. (1998). Antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus in free-ranging red foxes from Germany. *J Wildl Dis* 34(3), 436-442. doi: 10.7589/0090-3558-34.3.436.
- Frolich, K., Kujawski, O.E., Rudolph, M., Ronsholt, L., and Speck, S. (2003). European brown hare syndrome virus in free-ranging European brown hares from Argentina. *J Wildl Dis* 39(1), 121-124. doi: 10.7589/0090-3558-39.1.121.
- Frölich, K., and Lavazza, A. (2008). "European Brown Hare Syndrome," in *Lagomorph Biology*, eds. P.C. Alves, N. Ferrand & K. Hackländer. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 253-261.
- Fuerst, T.R., and Moss, B. (1989). Structure and stability of mRNA synthesized by vaccinia virus-encoded bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. Importance of the 5' untranslated leader. *J Mol Biol* 206(2), 333-348. doi: 10.1016/0022-2836(89)90483-x.
- Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W., and Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(21), 8122-8126. doi: 10.1073/pnas.83.21.8122.

- Gall, A., Hoffmann, B., Teifke, J.P., Lange, B., and Schirrmeyer, H. (2007). Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet Microbiol* 120(1-2), 17-32. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.10.006.
- Gavier-Widen, D. (1994). Morphologic and immunohistochemical characterization of the hepatic lesions associated with European brown hare syndrome. *Vet Pathol* 31(3), 327-334. doi: 10.1177/030098589403100305.
- Gavier-Widen, D., and Morner, T. (1991). Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries: a review. *Rev Sci Tech* 10(2), 453-458. doi: 10.20506/rst.10.2.555.
- Gil, F., Titarenko, E., Terrada, E., Arcalis, E., and Escribano, J.M. (2006). Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. *Plant Biotechnol J* 4(1), 135-143. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00172.x.
- Goodfellow, I. (2011). The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein. *Curr Opin Virol* 1(5), 355-362. doi: 10.1016/j.coviro.2011.09.003.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., et al. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO reports* 6(10), 968-972. doi: 10.1038/sj.embor.7400510.
- Goodfellow, I., and Taube, S. (2016). "Calicivirus Replication and Reverse Genetics," in *Viral Gastroenteritis*, eds. L. Svensson, U. Desselberger, H.B. Greenberg & M.K. Estes. (Boston: Academic Press), 355-378.
- Gould, A.R., Kattenbelt, J.A., Lenghaus, C., Morrissy, C., Chamberlain, T., Collins, B.J., et al. (1997). The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res* 47(1), 7-17. doi: 10.1016/s0168-1702(96)01399-8.
- Granzow, H., Weiland, F., Strebelow, H.G., Liu, C.M., and Schirrmeyer, H. (1996). Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res* 41(2), 163-172. doi: 10.1016/0168-1702(96)01285-3.
- Grazioli, S., Agnoletti, F., Scicluna, M., Masoero, N., Guercio, A., Fallacara, F., et al. (Year). "Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) subtype "A" (RHDVa) is replacing the original strain in some Italian regions", in: *Fifth International Congress of the European Society for Veterinary Virology*, (Brescia, Italy), pp 202–203.
- Green, K.Y. (2007). Caliciviridae. *The Noroviruses in Fields Virology*, 950-979.

- Gregg, D.A., House, C., Meyer, R., and Berninger, M. (1991). Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev Sci Tech* 10(2), 435-451.
- Guittré, C., Baginski, I., Le Gall, G., Prave, M., Trépo, C., and Cova, L. (1995). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 58(2), 128-132. doi: [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90065-9](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90065-9).
- Guo, M., Hayes, J., Cho, K.O., Parwani, A.V., Lucas, L.M., and Saif, L.J. (2001). Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *J Virol* 75(19), 9239-9251. doi: 10.1128/JVI.75.19.9239-9251.2001.
- Guo, Z.S., Wang, L.H., Eisensmith, R.C., and Woo, S.L. (1996). Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 3(9), 802-810.
- Haga, K., Fujimoto, A., Takai-Todaka, R., Miki, M., Doan, Y.H., Murakami, K., et al. (2016). Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(41), E6248-E6255. doi: 10.1073/pnas.1605575113.
- Hall, R.N., Huang, N., Roberts, J., and Strive, T. (2019). Carrion flies as sentinels for monitoring lagovirus activity in Australia. *Transbound Emerg Dis* 66(5), 2025-2032. doi: 10.1111/tbed.13250.
- Hall, R.N., Mahar, J.E., Read, A.J., Mourant, R., Piper, M., Huang, N., et al. (2018). A strain-specific multiplex RT-PCR for Australian rabbit haemorrhagic disease viruses uncovers a new recombinant virus variant in rabbits and hares. *Transbound Emerg Dis* 65(2), e444-e456. doi: 10.1111/tbed.12779.
- Hall, R.N., Peacock, D.E., Kovaliski, J., Mahar, J.E., Mourant, R., Piper, M., et al. (2017). Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. *Vet Rec* 180(5), 121. doi: 10.1136/vr.104034.
- Haller, O., and Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3(10), 710-717.
- Han, K.R., Lee, J.H., Kotiguda, G.G., Jung, K.H., Chung, M.S., Kang, S., et al. (2018). Nucleotide triphosphatase and RNA chaperone activities of murine norovirus NS3. *J Gen Virol* 99(11), 1482-1493. doi: 10.1099/jgv.0.001151.
- Hansman, G.S., Oka, T., Katayama, K., and Takeda, N. (2007). Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17(2), 133-141. doi: 10.1002/rmv.533.

- Harkness, J.E., V., T.P., S., V., and C.L., W. (2010). "Clinical Signs and Differential Diagnoses," ed. Wiley-Blackwell.), 195-347.
- Henning, J., Meers, J., Davies, P.R., and Morris, R.S. (2005). Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiol Infect* 133(4), 719-730. doi: 10.1017/s0950268805003766.
- Henriksen, P., Gavier, D., and Elling, F. (1989). Acute necrotising hepatitis in Danish farmed hares. *Vet Rec* 125(19), 486-487. doi: 10.1136/vr.125.19.486.
- Holland, J.J., Mc, L.L., and Syverton, J.T. (1959). The mammalian cell-virus relationship. IV. Infection of naturally insusceptible cells with enterovirus ribonucleic acid. *J Exp Med* 110(1), 65-80. doi: 10.1084/jem.110.1.65.
- Hu, Z., Tian, X., Zhai, Y., Xu, W., Zheng, D., and Sun, F. (2010). Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. *Protein Cell* 1(1), 48-58. doi: 10.1007/s13238-010-0007-0.
- Jahnke, M., Holmes, E.C., Kerr, P.J., Wright, J.D., and Strive, T. (2010). Evolution and phylogeography of the nonpathogenic calicivirus RCV-A1 in wild rabbits in Australia. *J Virol* 84(23), 12397-12404. doi: 10.1128/JVI.00777-10.
- Ji, C.Y., Du, N.X., and Xu, W.Y. (1991). Adaptation of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits to the DJRK cell strain. *Rev Sci Tech* 10(2), 337-345.
- Jiang, X., Espul, C., Zhong, W.M., Cuello, H., and Matson, D.O. (1999). Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol* 144(12), 2377-2387. doi: 10.1007/s007050050651.
- Jung, J.Y., Lee, B.J., Tai, J.H., Park, J.H., and Lee, Y.S. (2000). Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *J Comp Pathol* 123(2-3), 135-140. doi: 10.1053/jcpa.2000.0403.
- Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., and Virgin, H.W.t. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299(5612), 1575-1578. doi: 10.1126/science.1077905.
- Katayama, K., Hansman, G.S., Oka, T., Ogawa, S., and Takeda, N. (2006). Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 151(7), 1291-1308. doi: 10.1007/s00705-005-0720-9.
- Katayama, K., Miyoshi, T., Uchino, K., Oka, T., Tanaka, T., Takeda, N., et al. (2004). Novel recombinant sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10(10), 1874-1876. doi: 10.3201/eid1010.040395.
- Katayama, K., Murakami, K., Sharp, T.M., Guix, S., Oka, T., Takai-Todaka, R., et al. (2014). Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(38), E4043-4052. doi: 10.1073/pnas.1415096111.

- Kausche, G.A., Pfankuch, E., and Ruska, H. (1939). Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im bermikroskop. *Die Naturwissenschaften* 27(18), 292-299. doi: 10.1007/bf01493353.
- Kerr, P.J., and Donnelly, T.M. (2013). Viral infections of rabbits. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 16(2), 437-468. doi: 10.1016/j.cvex.2013.02.002.
- Kerr, P.J., Kitchen, A., and Holmes, E.C. (2009). Origin and Phylodynamics of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *Journal of Virology* 83(23), 12129. doi: 10.1128/JVI.01523-09.
- Kew, O.M., Sutter, R.W., de Gourville, E.M., Dowdle, W.R., and Pallansch, M.A. (2005). Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* 59(1), 587-635. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123625.
- Kim, D.W., Uetsuki, T., Kaziro, Y., Yamaguchi, N., and Sugano, S. (1990). Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene* 91(2), 217-223. doi: 10.1016/0378-1119(90)90091-5.
- Kocher, J.F., Lindesmith, L.C., Debbink, K., Beall, A., Mallory, M.L., Yount, B.L., et al. (2018). Bat Caliciviruses and Human Noroviruses Are Antigenically Similar and Have Overlapping Histo-Blood Group Antigen Binding Profiles. *mBio* 9(3), e00869-00818. doi: 10.1128/mBio.00869-18.
- Komolafe, O.O., and Jarrett, O. (1986). A possible maturation pathway of calicivirus particles. *Microbios* 46(187), 103-111.
- Konig, M., Thiel, H.J., and Meyers, G. (1998). Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 72(5), 4492-4497.
- Korboukh, V.K., Lee, C.A., Acevedo, A., Vignuzzi, M., Xiao, Y., Arnold, J.J., et al. (2014). RNA virus population diversity, an optimum for maximal fitness and virulence. *J Biol Chem* 289(43), 29531-29544. doi: 10.1074/jbc.M114.592303.
- Kovaliski, J., Sinclair, R., Mutze, G., Peacock, D., Strive, T., Abrantes, J., et al. (2014). Molecular epidemiology of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in Australia: when one became many. *Molecular Ecology* 23(2), 408-420. doi: doi:10.1111/mec.12596.
- Kumar, D., Broor, S., and Rajala, M.S. (2016). Interaction of Host Nucleolin with Influenza A Virus Nucleoprotein in the Early Phase of Infection Limits the Late Viral Gene Expression. *PLoS One* 11(10), e0164146. doi: 10.1371/journal.pone.0164146.
- Laurent, S., Vautherot, J.F., Madelaine, M.F., Le Gall, G., and Rasschaert, D. (1994). Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol* 68(10), 6794-6798.
- Lavazza, A., and Capucci, L. (2008). "How Many Caliciviruses are there in Rabbits? A Review on RHDV and Correlated Viruses," in *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation*, eds.

- P.C. Alves, N. Ferrand & K. Hackländer. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 263-278.
- Lavazza, A., and Capucci, L. (2016). "Rabbit Haemorrhagic Disease," in *OIE Terrestrial Manual 2018.*), 1389-1406.
- Lavazza, A., Cavadini, P., Barbieri, I., Tizzani, P., Pinheiro, A., Abrantes, J., et al. (2015a). Field and experimental data indicate that the eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) is susceptible to infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus and not with rabbit haemorrhagic disease (RHD) virus. *Vet Res* 46, 13. doi: 10.1186/s13567-015-0149-4.
- Lavazza, A., Scicluna, M.T., and Capucci, L. (1996). Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *Zentralbl Veterinarmed B* 43(7), 401-410.
- Lavazza, A., Tittarelli, C., and Cerioli, M. (2015b). The use of convalescent sera in immune-electron microscopy to detect non-suspected/new viral agents. *Viruses* 7(5), 2683-2703. doi: 10.3390/v7052683.
- Le Gall-Reculé, G., and Boucher, S. (Year). "Connaissances et actualité sur la Maladie hémorragique virale du lapin", in: *17èmes Journées de la Recherche Cunicole - 2017*), 97-110.
- Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., Marchandeau, S., Bertagnoli, S., Zwingelstein, F., Cavadini, P., et al. (2013). Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vet Res* 44, 81. doi: 10.1186/1297-9716-44-81.
- 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. doi: 10.1186/s13567-017-0473-y.
- Le Gall-Reculé, G., Lemaitre, E., Briand, F.X., and Marchandeau, S. (Year). "Characterization in France of non-pathogenic lagoviruses closely related to the Australian Rabbit calicivirus RCV-A1 : confirmation of the European origin of RCV-A1", in: *Proceedings of the Xth International Congress for Veterinary Virology, 2015*), 183-185.
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., et al. (2011). Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* 168(5), 137-138. doi: 10.1136/vr.d697.
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Fages, M.P., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Aubineau, J., et al. (2011). Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* 410(2), 395-402. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.001.
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Laurent, S., de Boisseson, C., Portejoie, Y., and Rasschaert, D. (2003). Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993

- and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol* 148(1), 65-81. doi: 10.1007/s00705-002-0908-1.
- Le Gall-Recule, G., Zwingelstein, F., Laurent, S., Portejoie, Y., and Rasschaert, D. (2006). Molecular epidemiology of European brown hare syndrome virus in France between 1989 and 2003. *Arch Virol* 151(9), 1713-1721. doi: 10.1007/s00705-006-0754-7.
- Le Gall-Recule, G., Zwingelstein, F., Portejoie, Y., and Le Gall, G. (2001). Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic Disease and European Brown Hare Syndrome viruses. *J Virol Methods* 97(1-2), 49-57. doi: 10.1016/s0166-0934(01)00336-6.
- Le Gall, O., Christian, P., Fauquet, C.M., King, A.M., Knowles, N.J., Nakashima, N., et al. (2008). Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Arch Virol* 153(4), 715-727. doi: 10.1007/s00705-008-0041-x.
- Le Minor, O., Boucher, S., Joudou, L., Mellet, R., Sourice, M., Le Moullec, T., et al. (2019). Rabbit haemorrhagic disease: experimental study of a recent highly pathogenic GI.2/RHDV2/b strain and evaluation of vaccine efficacy. *World Rabbit Science* 27(3), 143-156. doi: 10.4995/wrs.2019.11082.
- Le Pendu, J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Guitton, J.S., Le Gall-Recule, G., Lopes, A.M., et al. (2017). Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 98(7), 1658-1666. doi: 10.1099/jgv.0.000840.
- Lemaitre, E., Zwingelstein, F., Marchandeu, S., and Le Gall-Recule, G. (2018). First complete genome sequence of a European non-pathogenic rabbit calicivirus (lagovirus GI.3). *Arch Virol* 163(10), 2921-2924. doi: 10.1007/s00705-018-3901-z.
- Li, T.F., Hosmillo, M., Schwanke, H., Shu, T., Wang, Z., Yin, L., et al. (2018). Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities. *J Virol* 92(5). doi: 10.1128/jvi.01606-17.
- Liebermann, H., Bergmann, H., Lange, E., Schirmer, H., and Solisch, P. (1992). Some physicochemical properties of the virus of rabbit haemorrhagic disease. *Zentralbl Veterinarmed B* 39(5), 317-326. doi: 10.1111/j.1439-0450.1992.tb01176.x.
- Liu, G., Ni, Z., Yun, T., Yu, B., Chen, L., Zhao, W., et al. (2008a). A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity. *J Gen Virol* 89(Pt 12), 3080-3085. doi: 10.1099/vir.0.2008/003525-0.
- Liu, G., Ni, Z., Yun, T., Zhang, Y., Du, Q., Sheng, Z., et al. (2006a). Rescued virus from infectious cDNA clone of rabbit hemorrhagic disease virus is adapted to RK13 cells line. *Chinese Science Bulletin* 51(14), 1698-1702. doi: 10.1007/s11434-006-2044-x.

- Liu, G., Zhang, Y., Ni, Z., Yun, T., Sheng, Z., Liang, H., et al. (2006b). Recovery of infectious rabbit hemorrhagic disease virus from rabbits after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. *J Virol* 80(13), 6597-6602. doi: 10.1128/jvi.02078-05.
- Liu, G.Q., Ni, Z., Yun, T., Yu, B., Zhu, J.M., Hua, J.G., et al. (2008b). Rabbit hemorrhagic disease virus poly(A) tail is not essential for the infectivity of the virus and can be restored in vivo. *Arch Virol* 153(5), 939-944. doi: 10.1007/s00705-008-0079-9.
- Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., and Qian, N.H. (1984). A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine* 16(6), 253-255.
- Liu, W., Dang, R., and Wang, X. (2015). Development of a SYBR-based real-time PCR to detect rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and analyze its tissue distribution in experimentally infected rabbits. *Virol Sin* 30(3), 228-230. doi: 10.1007/s12250-015-3560-0.
- Lopes, A.M., Breiman, A., Lora, M., Le Moullac-Vaidye, B., Galanina, O., Nyström, K., et al. (2018a). Host-Specific Glycans Are Correlated with Susceptibility to Infection by Lagoviruses, but Not with Their Virulence. *Journal of Virology* 92(4), e01759-01717. doi: 10.1128/jvi.01759-17.
- Lopes, A.M., Capucci, L., Gavier-Widen, D., Le Gall-Recule, G., Brocchi, E., Barbieri, I., et al. (2014). Molecular evolution and antigenic variation of European brown hare syndrome virus (EBHSV). *Virology* 468-470, 104-112. doi: 10.1016/j.virol.2014.08.002.
- Lopes, A.M., Correia, J., Abrantes, J., Melo, P., Ramada, M., Magalhães, M.J., et al. (2015a). Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses* 7(1), 27-36. doi: 10.3390/v7010027.
- Lopes, A.M., Dalton, K.P., Magalhaes, M.J., Parra, F., Esteves, P.J., Holmes, E.C., et al. (2015b). Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. *J Gen Virol* 96(Pt 6), 1309-1319. doi: 10.1099/vir.0.000070.
- Lopes, A.M., Magalhães, M.J., Alves, P.C., Esteves, P.J., and Abrantes, J. (2017). An update on the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) strains circulating in Portugal in the 1990s: earliest detection of G3-G5 and G6. *Archives of Virology* 162(7), 1-5. doi: 10.1007/s00705-017-3318-0.
- Lopes, A.M., Rouco, C., Esteves, P.J., and Abrantes, J. (2018b). GI.1b/GI.1b/GI.2 recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2 (Lagovirus europaeus/GI.2) in Morocco, Africa. *Archives of Virology* 164(1), 279-283. doi: 10.1007/s00705-018-4052-y.
- Lopman, B.A., Steele, D., Kirkwood, C.D., and Parashar, U.D. (2016). The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Med* 13(4), e1001999. doi: 10.1371/journal.pmed.1001999.
- Love, D.N. (1973). The effect of DEAE-dextran on the infectivity of a feline calicivirus and its RNA. *Arch Gesamte Virusforsch* 41(1), 52-58. doi: 10.1007/bf01249928.

- Ludwig-Begall, L.F., Mauroy, A., and Thiry, E. (2018). Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab - a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J Gen Virol* 99(8), 970-988. doi: 10.1099/jgv.0.001103.
- Lwoff, A. (1957). The concept of virus. *J Gen Microbiol* 17(2), 239-253. doi: 10.1099/00221287-17-2-239.
- Machin, A., Martin Alonso, J.M., Dalton, K.P., and Parra, F. (2009). Functional differences between precursor and mature forms of the RNA-dependent RNA polymerase from rabbit hemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* 90(Pt 9), 2114-2118. doi: 10.1099/vir.0.011296-0.
- Machin, A., Martin Alonso, J.M., and Parra, F. (2001). Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J Biol Chem* 276(30), 27787-27792. doi: 10.1074/jbc.M100707200.
- Mahar, J.E., Hall, R.N., Peacock, D., Kovaliski, J., Piper, M., Mourant, R., et al. (2018). Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 (RHDV2; GI.2) Is Replacing Endemic Strains of RHDV in the Australian Landscape within 18 Months of Its Arrival. *J Virol* 92(2). doi: 10.1128/JVI.01374-17.
- Mahar, J.E., Hall, R.N., Shi, M., Mourant, R., Huang, N., Strive, T., et al. (2019). The discovery of three new hare lagoviruses reveals unexplored viral diversity in this genus. *Virus Evol.* 5(1), vez005. doi: 10.1093/ve/vez005.
- Mahar, J.E., Nicholson, L., Eden, J.S., Duchene, S., Kerr, P.J., Duckworth, J., et al. (2016). Benign Rabbit Caliciviruses Exhibit Evolutionary Dynamics Similar to Those of Their Virulent Relatives. *J Virol* 90(20), 9317-9329. doi: 10.1128/jvi.01212-16.
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., and Akashi, H. (2006). Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol* 80(9), 4482-4490. doi: 10.1128/jvi.80.9.4482-4490.2006.
- Marcato, P.S., Benazzi, C., Vecchi, G., Galeotti, M., Della Salda, L., Sarli, G., et al. (1991). Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 10(2), 371-392. doi: 10.20506/rst.10.2.560.
- Marchandeau, S., Bertagnoli, S., Peralta, B., Boucraut-Baralon, C., Letty, J., and Reitz, F. (2004). Possible interaction between myxomatosis and calicivirosis related to rabbit haemorrhagic disease affecting the European rabbit. *Vet Rec* 155(19), 589-592. doi: 10.1136/vr.155.19.589.
- Marchandeau, S., Chantal, J., Portejoie, Y., Barraud, S., and Chaval, Y. (1998). Impact of viral hemorrhagic disease on a wild population of European rabbits in France. *J Wildl Dis* 34(3), 429-435. doi: 10.7589/0090-3558-34.3.429.
- Marin, M.S., Casais, R., Alonso, J.M., and Parra, F. (2000). ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J Virol* 74(22), 10846-10851. doi: 10.1128/jvi.74.22.10846-10851.2000.

- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoen, N., Clement, M., et al. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83(7), 565-573. doi: 10.1016/s0300-9084(01)01321-9.
- Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., et al. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122(7), 1967-1977. doi: 10.1053/gast.2002.33661.
- Marques, R.M., Costa, E.S.A., Aguas, A.P., Teixeira, L., and Ferreira, P.G. (2010). Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. *Vet Res Commun* 34(8), 659-668. doi: 10.1007/s11259-010-9437-7.
- Marques, R.M., Costa, E.S.A., Aguas, A.P., Teixeira, L., and Ferreira, P.G. (2012). Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection. *Vet Immunol Immunopathol* 150(3-4), 181-188. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.038.
- Marques, R.M., Teixeira, L., Aguas, A.P., Ribeiro, J.C., Costa-e-Silva, A., and Ferreira, P.G. (2014). Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). *Vet Res* 45(1), 14. doi: 10.1186/1297-9716-45-14.
- Martin Alonso, J.M., Casais, R., Boga, J.A., and Parra, F. (1996). Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J Virol* 70(2), 1261-1265.
- Matthaei, M., Kerr, P.J., Read, A.J., Hick, P., Haboury, S., Wright, J.D., et al. (2014). Comparative quantitative monitoring of rabbit haemorrhagic disease viruses in rabbit kittens. *Virology* 11, 109. doi: 10.1186/1743-422x-11-109.
- McIntosh, M.T., Behan, S.C., Mohamed, F.M., Lu, Z., Moran, K.E., Burrage, T.G., et al. (2007). A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virology Journal* 4(1), 96. doi: 10.1186/1743-422x-4-96.
- McSweeney, A., Davies, C., and Ward, V.K. (2019). Cell Cycle Arrest is a Conserved Function of Norovirus VPg Proteins. *Viruses* 11(3). doi: 10.3390/v11030217.
- Meis, J.E., and Meis, R. (2007). The New mScript™ mRNA Production System—Efficient mRNA Transcription, Capping and Tailing for the Highest Yields of Active Protein.
- Melen, K., Tynell, J., Fagerlund, R., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., and Julkunen, I. (2012). Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Virology* 9(1), 167. doi: 10.1186/1743-422X-9-167.

- Meyers, G., Wirblich, C., and Thiel, H.-J. (1991a). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 184(2), 677-686. doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90437-G](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90437-G).
- Meyers, G., Wirblich, C., and Thiel, H.J. (1991b). Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 184(2), 664-676. doi: 10.1016/0042-6822(91)90436-f.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.J., and Thumfart, J.O. (2000). Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 276(2), 349-363. doi: 10.1006/viro.2000.0545.
- Miao, Q., Qi, R., Veldkamp, L., Ijzer, J., Kik, M.L., Zhu, J., et al. (2019). Immunogenicity in Rabbits of Virus-Like Particles from a Contemporary Rabbit Haemorrhagic Disease Virus Type 2 (GI.2/RHDV2/b) Isolated in The Netherlands. *Viruses* 11(6). doi: 10.3390/v11060553.
- Mikami, O., Park, J.H., Kimura, T., Ochiai, K., and Itakura, C. (1999). Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 66(3), 237-242. doi: 10.1053/rvsc.1998.0266.
- Mitra, T., Sosnovtsev, S.V., and Green, K.Y. (2004). Mutagenesis of tyrosine 24 in the VPg protein is lethal for feline calicivirus. *Journal of virology* 78(9), 4931-4935. doi: 10.1128/jvi.78.9.4931-4935.2004.
- Mitro, S., and Krauss, H. (1993). Rabbit hemorrhagic disease: A review with special reference to its epizootiology. *European Journal of Epidemiology* 9(1), 70-78. doi: 10.1007/bf00463093.
- Moinet, M. (2011). Avez-vous pensé à la Toxoplasmose chez le lièvre ? *Lettre SAGIR* (169), 4.
- Morisse, J.P., Le Gall, G., and Boilletot, E. (1991). Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Rev Sci Tech* 10(2), 269-310.
- Moss, S.R., Turner, S.L., Trout, R.C., White, P.J., Hudson, P.J., Desai, A., et al. (2002). Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* 83(Pt 10), 2461-2467. doi: 10.1099/0022-1317-83-10-2461.
- Muller, A., Freitas, J., Silva, E., Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Abrantes, J., et al. (2009). Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*) from the Iberian peninsula. *Vet Microbiol* 135(3-4), 368-373. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.057.
- Murayama, R., Harada, Y., Shibata, T., Kuroda, K., Hayakawa, S., Shimizu, K., et al. (2007). Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun* 362(4), 880-885. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.091.

- Nagesha, H.S., Wang, L.F., Hyatt, A.D., Morrissy, C.J., Lenghaus, C., and Westbury, H.A. (1995). Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. *Archives of Virology* 140(6), 1095-1108. doi: 10.1007/bf01315418.
- Nauwynck, H., Callebaut, P., Peeters, J., Ducatelle, R., and Uyttebroek, E. (1993). Susceptibility of hares and rabbits to a Belgian isolate of European brown hare syndrome virus. *J Wildl Dis* 29(2), 203-208. doi: 10.7589/0090-3558-29.2.203.
- Neave, M., Hall, R., Huang, N., McColl, K., Kerr, P., Hoehn, M., et al. (2018). Robust Innate Immunity of Young Rabbits Mediates Resistance to Rabbit Hemorrhagic Disease Caused by Lagovirus Europaeus GI.1 But Not GI.2. *Viruses* 10(9), 512.
- Neill, J.D. (2002). The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Research* 87(1), 89-93. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00086-2).
- Neimanis, A., Larsson Pettersson, U., Huang, N., Gavier-Widén, D., and Strive, T. (2018a). 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*). *Veterinary Research* 49(1), 46. doi: 10.1186/s13567-018-0540-z.
- Neimanis, A.S., Ahola, H., Larsson Pettersson, U., Lopes, A.M., Abrantes, J., Zohari, S., et al. (2018b). Overcoming species barriers: an outbreak of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 in an isolated population of mountain hares (*Lepus timidus*). *BMC Vet. Res.* 14(1), 367. doi: 10.1186/s12917-018-1694-7.
- Neimanis, A.S., Ahola, H., Zohari, S., Larsson Pettersson, U., Brojer, C., Capucci, L., et al. (2018c). Arrival of rabbit haemorrhagic disease virus 2 to northern Europe: Emergence and outbreaks in wild and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Sweden. *Transbound Emerg Dis* 65(1), 213-220. doi: 10.1111/tbed.12650.
- Nims, R., and Plavsic, M. (2013). Inactivation of Caliciviruses. *Pharmaceuticals* 6(3), 358-392. doi: 10.3390/ph6030358.
- Nowotny, N., Bascuñana, C.R., Ballagi-Pordány, A., Gavier-Widén, D., Uhlén, M., and Belák, S. (1997). Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch Virol* 142(4), 657-673. doi: 10.1007/s007050050109.
- Nowotny, N., Steineck, T., Tatarush, F., Schilcher, F., and Weissenböck, H. (1991). European Brown Hare Syndrome (EBHS) - Experimentelle Untersuchungen. *Wien. Tierärztl. Mschr.* (78), 370 - 378.
- Nystrom, K., Le Gall-Recule, G., Grassi, P., Abrantes, J., Ruvoen-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., et al. (2011). Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic

- disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog* 7(8), e1002188. doi: 10.1371/journal.ppat.1002188.
- O'Keefe, J.S., Tempero, J.E., Motha, M.X., Hansen, M.F., and Atkinson, P.H. (1999). Serology of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits before and after release of the virus in New Zealand. *Vet. Microbiol.* 66(1), 29-40. doi: 10.1016/s0378-1135(98)00307-1.
- Ohlinger, V.F., Haas, B., Meyers, G., Weiland, F., and Thiel, H.J. (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *Journal of virology* 64(7), 3331-3336.
- Ohlinger, V.F., Haas, B., and Thiel, H.J. (1993). Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Veterinary research* 24(2), 103-116.
- Oka, T., Takagi, H., and Tohya, Y. (2014). Development of a novel single step reverse genetics system for feline calicivirus. *J Virol Methods* 207, 178-181. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.07.004.
- Oliveira, L.M., Blawid, R., Orilio, A.F., Andrade, B.Y.G., Souza, A.C.A., and Nagata, T. (2018). Development of an infectious clone and replicon system of norovirus GII.4. *J Virol Methods* 258, 49-53. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.05.011.
- Oliver, S.L., Brown, D.W., Green, J., and Bridger, J.C. (2004). A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* 326(2), 231-239. doi: 10.1016/j.virol.2004.06.010.
- Ossiboff, R.J., Zhou, Y., Lightfoot, P.J., Prasad, B.V.V., and Parker, J.S.L. (2010). Conformational Changes in the Capsid of a Calicivirus upon Interaction with Its Functional Receptor. *Journal of Virology* 84(11), 5550-5564. doi: 10.1128/jvi.02371-09.
- Park, J.H., and Itakura, C. (1992). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in tissues by immunohistochemistry. *Res Vet Sci* 52(3), 299-306. doi: 10.1016/0034-5288(92)90028-z.
- Park, J.H., Lee, Y.S., and Itakura, C. (1995). Pathogenesis of acute necrotic hepatitis in rabbit hemorrhagic disease. *Lab Anim Sci* 45(4), 445-449.
- Parra, F., and Prieto, M. (1990). Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *Journal of Virology* 64(8), 4013.
- Perrotta, A.T., and Been, M.D. (1991). A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature* 350(6317), 434-436. doi: 10.1038/350434a0.
- Pfister, T., and Wimmer, E. (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem* 274(11), 6992-7001. doi: 10.1074/jbc.274.11.6992.
- Plassiart, G., Guelfi, J.F., Ganiere, J.P., Wang, B., Andre-Fontaine, G., and Wyers, M. (1992). Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic disease. *Zentralbl Veterinarmed B* 39(6), 443-453.

- Poli, A., Nigro, M., Gallazzi, D., Sironi, G., Lavazza, A., and Gelmetti, D. (1991). Acute hepatitis in the European brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *J Wildl Dis* 27(4), 621-629. doi: 10.7589/0090-3558-27.4.621.
- Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R., and Bruening, G. (1986). Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA. *Science* 231(4745), 1577. doi: 10.1126/science.231.4745.1577.
- Puggioni, G., Cavadini, P., Maestrone, C., Scivoli, R., Botti, G., Ligios, C., et al. (2013). The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian cape hare (*Lepus Capensis Mediterraneus*). *Vet Res* 44, 96. doi: 10.1186/1297-9716-44-96.
- Racaniello, V.R., and Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214(4523), 916-919. doi: 10.1126/science.6272391.
- Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dötsch, C., et al. (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *The EMBO journal* 14(23), 5773-5784.
- Ramiro-Ibanez, F., Martin-Alonso, J.M., Garcia Palencia, P., Parra, F., and Alonso, C. (1999). Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res* 60(1), 21-28. doi: 10.1016/s0168-1702(98)00144-0.
- Robinson, A.J., Kirkland, P.D., Forrester, R.I., Capucci, L., Cooke, B.D., and Philbey, A.W. (2002). Serological evidence for the presence of a calicivirus in Australian wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, before the introduction of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): its potential influence on the specificity of a competitive ELISA for RHDV. *Wildlife Research* 29(6), 655-662. doi: 10.1071/wr00096.
- Rodak, L., Smid, B., and Valicek, L. (1991). Application of control measures against viral haemorrhagic disease of rabbits in the Czech and Slovak Federal Republic. *Rev Sci Tech* 10(2), 513-524.
- Rodak, L., Smid, B., Valicek, L., Vesely, T., Stepanek, J., Hampl, J., et al. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J Gen Virol* 71 ( Pt 5), 1075-1080. doi: 10.1099/0022-1317-71-5-1075.
- Rosin, A.V., Gilio, N., and Meriggi, A. (2008). "Introduced Lagomorphs as a Threat to "Native" Lagomorphs: The Case of the Eastern Cottontail (*Sylvilagus floridanus*) in Northern Italy," in *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation*, eds. P.C. Alves, N. Ferrand & K. Hackländer. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 153-164.
- Rouco, C., Aguayo-Adán, J.A., Santoro, S., Abrantes, J., and Delibes-Mateos, M. (2019). Worldwide rapid spread of the novel rabbit haemorrhagic disease virus (GI.2/RHDV2/b). *Transboundary and Emerging Diseases* 66(4), 1762-1764. doi: 10.1111/tbed.13189.

- Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238(4826), 491-497. doi: 10.1126/science.2821619.
- Ruvoen-Clouet, N., Blanchard, D., André-Fontaine, G., and Ganière, J.P. (1995). Partial characterization of the human erythrocyte receptor for rabbit haemorrhagic disease virus. *Research in Virology* 146(1), 33-41. doi: [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(96\)80587-5](https://doi.org/10.1016/0923-2516(96)80587-5).
- Ruvoen-Clouet, N., Ganiere, J.P., Andre-Fontaine, G., Blanchard, D., and Le Pendu, J. (2000). Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* 74(24), 11950-11954. doi: 10.1128/jvi.74.24.11950-11954.2000.
- Sabin, A.B. (1985). Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis* 151(3), 420-436. doi: 10.1093/infdis/151.3.420.
- Saif, L.J., Bohl, E.H., Theil, K.W., Cross, R.F., and House, J.A. (1980). Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol* 12(1), 105-111.
- Salmela, P., Belak, K., and Gavier-Widen, D. (1993). The occurrence of European brown hare syndrome in Finland. *Acta Vet Scand* 34(2), 215-217.
- Sandoval-Jaime, C., Green, K.Y., and Sosnovtsev, S.V. (2015). Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *J Virol Methods* 217, 1-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.02.003.
- Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., and Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology* 84(19), 9733. doi: 10.1128/JVI.00694-10.
- Savolainen-Kopra, C., and Blomqvist, S. (2010). Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev Med Virol* 20(6), 358-371. doi: 10.1002/rmv.663.
- Schirrmeier, H., Reimann, I., Kollner, B., and Granzow, H. (1999). Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch Virol* 144(4), 719-735. doi: 10.1007/s007050050538.
- Shien, J.H., Shieh, H.K., and Lee, L.H. (2000). Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 68(3), 255-259. doi: 10.1053/rvsc.1999.0372.
- Silvério, D., Lopes, A.M., Melo-Ferreira, J., Magalhães, M.J., Monterroso, P., Serronha, A., et al. (2018). Insights into the evolution of the new variant rabbit haemorrhagic disease virus (GI.2) and the identification of novel recombinant strains. *Transboundary and Emerging Diseases* 65(4), 983-992. doi: 10.1111/tbed.12830.

- Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudhry, Y., Evans, D.J., and Goodfellow, I.G. (2008). Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res* 36(8), 2530-2546. doi: 10.1093/nar/gkn096.
- Simon-Loriere, E., and Holmes, E.C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol* 9(8), 617-626. doi: 10.1038/nrmicro2614.
- Smid, B., Valicek, L., Stepanek, J., Jurak, E., and Rodak, L. (1989). Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. *Zentralbl Veterinarmed B* 36(3), 237-240. doi: 10.1111/j.1439-0450.1989.tb00597.x.
- Sosnovtsev, S., and Green, K.Y. (1995). RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology* 210(2), 383-390. doi: 10.1006/viro.1995.1354.
- Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.O., Onwudiwe, O., and Green, K.Y. (2005). Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* 79(7), 4012-4024. doi: 10.1128/jvi.79.7.4012-4024.2005.
- Spibey, N., McCabe, V.J., Greenwood, N.M., Jack, S.C., Sutton, D., and van der Waart, L. (2012). Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vet Rec* 170(12), 309. doi: 10.1136/vr.100366.
- Stern, A., Yeh, M.T., Zinger, T., Smith, M., Wright, C., Ling, G., et al. (2017). The Evolutionary Pathway to Virulence of an RNA Virus. *Cell* 169(1), 35-46 e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.013.
- Stott, P. (2015). Factors influencing the importation and establishment in Australia of the European hare (*Lepus europaeus*). *Australian Journal of Zoology* 63(1), 46-75. doi: 10.1071/zo14037.
- Strive, T., Wright, J., Kovaliski, J., Botti, G., and Capucci, L. (2010). The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. *Virology* 398(1), 125-134. doi: 10.1016/j.virol.2009.11.045.
- Strive, T., Wright, J.D., and Robinson, A.J. (2009). Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 384(1), 97-105. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.004.
- Strong, D.W., Thackray, L.B., Smith, T.J., and Virgin, H.W. (2012). Protruding domain of capsid protein is necessary and sufficient to determine murine norovirus replication and pathogenesis in vivo. *J Virol* 86(6), 2950-2958. doi: 10.1128/JVI.07038-11.
- Stuart, A.D., and Brown, T.D. (2006). Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J Virol* 80(15), 7500-7509. doi: 10.1128/JVI.02452-05.

- Su, P.Y., Wang, Y.F., Huang, S.W., Lo, Y.C., Wang, Y.H., Wu, S.R., et al. (2015). Cell surface nucleolin facilitates enterovirus 71 binding and infection. *J Virol* 89(8), 4527-4538. doi: 10.1128/JVI.03498-14.
- Sutter, G., Ohlmann, M., and Erfle, V. (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* 371(1), 9-12. doi: 10.1016/0014-5793(95)00843-x.
- Symes, S.J., Gunesekere, I.C., Marshall, J.A., and Wright, P.J. (2007). Norovirus mixed infection in an oyster-associated outbreak: an opportunity for recombination. *Arch Virol* 152(6), 1075-1086. doi: 10.1007/s00705-007-0938-9.
- Symes, S.J., Job, N., Ficorilli, N., Hartley, C.A., Browning, G.F., and Gilkerson, J.R. (2015). Novel assay to quantify recombination in a calicivirus. *Vet Microbiol* 177(1-2), 25-31. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.017.
- Szerman, N., Allee, C., Lemaitre, E., Courtillon, C., Amelot, M., Courtois, D., et al. (2019). The small hydrophobic (SH) gene of North American turkey AMPV-C does not attenuate nor modify host tropism in recombinant European duck AMPV-C. *Virology* 526, 138-145. doi: 10.1016/j.virol.2018.10.020.
- Tan, M., Wei, C., Huang, P., Fan, Q., Quigley, C., Xia, M., et al. (2015). Tulane virus recognizes sialic acids as cellular receptors. *Sci Rep* 5(1), 11784. doi: 10.1038/srep11784.
- Taniguchi, T., Palmieri, M., and Weissmann, C. (1978). QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* 274(5668), 223-228. doi: 10.1038/274223a0.
- Taube, S., and Wobus, C.E. (2014). A novel reverse genetics system for human norovirus. *Trends Microbiol* 22(11), 604-606. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.001.
- Thomsen, D.R., Stenberg, R.M., Goins, W.F., and Stinski, M.F. (1984). Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(3), 659-663. doi: 10.1073/pnas.81.3.659.
- Thouvenin, E., Laurent, S., Madelaine, M.F., Rasschaert, D., Vautherot, J.F., and Hewat, E.A. (1997). Bivalent binding of a neutralising antibody to a calicivirus involves the torsional flexibility of the antibody hinge. *J Mol Biol* 270(2), 238-246. doi: 10.1006/jmbi.1997.1095.
- Thumfart, J.O., and Meyers, G. (2002). Feline calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. *J Virol* 76(12), 6398-6407. doi: 10.1128/jvi.76.12.6398-6407.2002.
- Tian, L., Liao, J., Li, J.W., Zhou, W.R., Zhang, X.L., and Wang, H.N. (2007). Isolation and identification of a non-haemagglutinating strain of rabbit hemorrhagic disease virus from China and

- sequence analysis for the VP60 Gene. *Virus Genes* 35(3), 745-752. doi: 10.1007/s11262-007-0155-3.
- Ueda, K., Park, J.H., Ochiai, K., and Itakura, C. (1992). Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn J Vet Res* 40(4), 133-141.
- Uetsuki, T., Naito, A., Nagata, S., and Kaziro, Y. (1989). Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha. *J Biol Chem* 264(10), 5791-5798.
- Urakova, N., Strive, T., and Frese, M. (2017). RNA-Dependent RNA Polymerases of Both Virulent and Benign Rabbit Caliciviruses Induce Striking Rearrangement of Golgi Membranes. *PLOS ONE* 12(1), e0169913. doi: 10.1371/journal.pone.0169913.
- Valicek, L., Smid, B., Rodak, L., and Kudrna, J. (1990). Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch Virol* 112(3-4), 271-275. doi: 10.1007/bf01323171.
- Valíček, L., Šmíd, B., Rodák, L., and Kudrna, J. (1990). Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Archives of Virology* 112(3), 271-275. doi: 10.1007/bf01323171.
- van den Ent, F., and Lowe, J. (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J Biochem Biophys Methods* 67(1), 67-74. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.12.008.
- Vazquez, A.L., Martin Alonso, J.M., Casais, R., Boga, J.A., and Parra, F. (1998). Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Virol* 72(4), 2999-3004.
- Velarde, R., Cavadini, P., Neimanis, A., Cabezon, O., Chiari, M., Gaffuri, A., et al. (2017). Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain. *Transbound Emerg Dis* 64(6), 1750-1761. doi: 10.1111/tbed.12562.
- Villabruna, N., Koopmans, M.P.G., and de Graaf, M. (2019). Animals as Reservoir for Human Norovirus. *Viruses* 11(5). doi: 10.3390/v11050478.
- Vinje, J., Estes, M.K., Esteves, P., Green, K.Y., Katayama, K., Knowles, N.J., et al. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *J Gen Virol* 100(11), 1469-1470. doi: 10.1099/jgv.0.001332.
- Wang, X., Hao, H., Qiu, L., Dang, R., Du, E., Zhang, S., et al. (2012). Phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in China and the antigenic variation of new strains. *Arch Virol* 157(8), 1523-1530. doi: 10.1007/s00705-012-1340-9.
- Wang, X., Xu, F., Liu, J., Gao, B., Liu, Y., Zhai, Y., et al. (2013). Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathog* 9(1), e1003132. doi: 10.1371/journal.ppat.1003132.

- Ward, V.K., McCormick, C.J., Clarke, I.N., Salim, O., Wobus, C.E., Thackray, L.B., et al. (2007). Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26), 11050-11055. doi: 10.1073/pnas.0700336104.
- Wei, C., Farkas, T., Sestak, K., and Jiang, X. (2008). Recovery of infectious virus by transfection of in vitro-generated RNA from tulane calicivirus cDNA. *J Virol* 82(22), 11429-11436. doi: 10.1128/JVI.00696-08.
- Wenez, R., Luttermann, C., Kreher, F., and Meyers, G. (2019). Structure–function relationship in the ‘termination upstream ribosomal binding site’ of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *Nucleic Acids Research* 47(4), 1920-1934. doi: 10.1093/nar/gkz021.
- Westcott, D.G., and Choudhury, B. (2015). Rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant in Great Britain. *Vet Rec* 176(3), 74. doi: 10.1136/vr.102830.
- Wirblich, C., Sibilio, M., Boniotti, M.B., Rossi, C., Thiel, H.J., and Meyers, G. (1995). 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J Virol* 69(11), 7159-7168.
- Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., et al. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* 2(12), e432. doi: 10.1371/journal.pbio.0020432.
- Xu, Z.J., and Chen, W.X. (1989). Viral haemorrhagic disease in rabbits: A review. *Veterinary Research Communications* 13(3), 205-212. doi: 10.1007/bf00142046.
- Yan, Y., Du, Y., Wang, G., and Li, K. (2017). Non-structural protein 1 of H3N2 influenza A virus induces nucleolar stress via interaction with nucleolin. *Sci Rep* 7(1), 17761. doi: 10.1038/s41598-017-18087-2.
- Yang, L., Wang, F., Hu, B., Xue, J., Hu, Y., Zhou, B., et al. (2008). Development of an RT-PCR for rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and the epidemiology of RHDV in three eastern provinces of China. *J Virol Methods* 151(1), 24-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.04.003.
- Yezli, S., and Otter, J.A. (2011). Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. *Food and Environmental Virology* 3(1), 1-30. doi: 10.1007/s12560-011-9056-7.
- Yunus, M.A., Chung, L.M., Chaudhry, Y., Bailey, D., and Goodfellow, I. (2010). Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *J Virol Methods* 169(1), 112-118. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.006.
- Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., et al. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol* 98(10), 2421-2422. doi: 10.1099/jgv.0.000911.

- Zeng, J., Wang, H., Xie, X., Li, C., Zhou, G., Yang, D., et al. (2014). Ribavirin-resistant variants of foot-and-mouth disease virus: the effect of restricted quasispecies diversity on viral virulence. *J Virol* 88(8), 4008-4020. doi: 10.1128/JVI.03594-13.
- Zhu, J., Miao, Q., Tan, Y., Guo, H., Liu, T., Wang, B., et al. (2017). Inclusion of an Arg-Gly-Asp receptor-recognition motif into the capsid protein of rabbit hemorrhagic disease virus enables culture of the virus in vitro. *J Biol Chem* 292(21), 8605-8615. doi: 10.1074/jbc.M117.780924.
- Zhu, J., Miao, Q., Tang, J., Wang, X., Dong, D., Liu, T., et al. (2018). Nucleolin mediates the internalization of rabbit hemorrhagic disease virus through clathrin-dependent endocytosis. *PLoS pathogens* 14(10), e1007383. doi: 10.1371/journal.ppat.1007383.
- Zhu, J., Wang, B., Miao, Q., Tan, Y., Li, C., Chen, Z., et al. (2015). Viral Genome-Linked Protein (VPg) Is Essential for Translation Initiation of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *PLoS One* 10(11), e0143467. doi: 10.1371/journal.pone.0143467.

## Annexe 1 : Attestation de management qualité de thèse

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Service Management Qualité

Thèse préparée par Clément DROILLARD

« Origine de la pathogénicité des lagovirus : avancées sur la diversité génétique virale et le développement d'un système de génétique inverse »

**Attestation de management qualité de la thèse**  
**Par Eric CHORIN, chef du Service de Management Qualité**

Les travaux de thèse conduits par Clément DROILLARD se sont déroulés sous management de la qualité, dans l'unité « Virologie, Immunologie et Parasitologie Aviaires et Cunicoles » (U VIPAC) à compter de Janvier 2017. Cela s'est concrétisé par la rédaction, dès le début des travaux et par le doctorant, d'un Plan de Management Qualité (PMQ) signé par lui-même, le Directeur de thèse, la Co-Directrice de thèse et le Responsable qualité du Laboratoire.

Véritable engagement pour le management de la thèse, ce PMQ a deux normes pour référence :

- la norme NF EN ISO/CEI 17025 (Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) appliquée dans ce projet, pour la gestion des ressources au sein de l'unité VIPAC ;
- la norme ISO 10006 (Systèmes de management de la qualité – lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets) mise en œuvre pour la conduite du projet de thèse.

Le PMQ fait systématiquement le lien entre le sujet de la thèse, sa mise en œuvre et la formalisation de son déroulement. Avec ce document, ce sont des éléments d'organisation et de gestion des travaux de thèse qui ont été réfléchis, décidés et formalisés. Ce plan comprend notamment l'identification des « points critiques » dans le projet de thèse, les données de sortie attendues à chaque étape identifiée et des « revues de projet » conformément à la norme ISO 10006.

#### La mise en œuvre du PMQ

Comme pour toute démarche de management qualité, la conduite de la thèse s'est traduite par un suivi régulier de l'encadrement avec validation des travaux du doctorant. De nombreuses données ont été enregistrées conformément aux engagements en termes de traçabilité.

Le management de projet a donné lieu à des vérifications de l'application des dispositions d'organisation formalisées dans le PMQ. Cela s'est notamment traduit par deux audits internes de management de projet conduit par le Chef du Service Management Qualité les 24 Aout 2018 et 24 Octobre 2019. Les documents examinés lors de ces audits sont listés en annexe de cette attestation. Au cours de ces audits, aucune fiche de non-conformité n'a été notifiée : les dispositions du PMQ ont donc été parfaitement suivies par la doctorante.

Les exercices de traçabilité faits par l'auditeur se sont révélés conformes aux engagements de l'équipe de thèse. Plusieurs cahiers de laboratoires normalisés ont été utilisés, y compris pour les réunions de l'équipe de thèse. Les cahiers examinés sont extrêmement bien tenus et visés régulièrement par

l'encadrement. Le doctorant a aussi stocké ses nombreuses données dans un dossier électronique très bien structuré permettant de retrouver aisément l'ensemble des données brutes et des données analysées.

Les réunions prévues d'avancement du projet et de suivi du doctorant ont effectivement été réalisées, les comptes rendus sont disponibles et permettent d'identifier le but de la réunion, les données d'entrée et de sortie, la validation des différentes étapes du projet, les éventuels besoins de réorientation des recherches...

Les audits ont permis d'identifier :

- le gros travail réalisé par l'équipe et en particulier par le doctorant avec 4 publications (1 parue, 1 soumise et 2 en cours de rédaction) ;
- la qualité de la traçabilité des travaux conduits ;
- la rigueur du cheminement intellectuel du doctorant dans la conduite de son projet.

#### Bilan du management qualité de la thèse

Le déroulement de la thèse sous management qualité, a d'abord permis à Clément DROILLARD de découvrir deux référentiels qualité qui, dans l'esprit au moins, lui seront nécessaires pour sa carrière professionnelle et directement bénéfiques pour des fonctions éventuelles au sein d'un laboratoire ou dans le management d'un projet.

En second lieu, ce management qualité a dû lui être utile sur plusieurs points :

- la formalisation la plus complète possible du projet scientifique, en particulier au démarrage ;
- l'importance de clarifier les rôles respectifs des différents acteurs du projet mais aussi de s'intégrer dans leur agenda respectif ;
- l'intérêt de réfléchir, au moins au début du projet, aux éventuels points critiques et les actions préventives nécessaires pour les maîtriser. Dans le cas présent, cet aspect « point critique » a été parfaitement géré ;
- la nécessité de mettre en œuvre la traçabilité des ressources (équipements principaux suivis et vérifiés) afin de pouvoir analyser dans les meilleures conditions tout résultat inattendu ;
- l'importance de formaliser tous les résultats et les cheminements intellectuels.

Au final, je suis convaincu que Clément DROILLARD a su mener avec une grande rigueur son projet scientifique en ayant partagé dès le début de sa thèse avec son encadrement la démarche de management qualité.

Fait à Ploufragan le 20 Avril 2020



Eric CHORIN  
Chef du Service Management Qualité

-----

Annexe :

**Principaux documents examinés lors de l'audit du 24 Aout 2018 :**

Les documents préparatoires au premier comité de suivi de thèse du 06/11/2017 sont clairs et correctement archivés. Le compte rendu est disponible. En accord avec l'école doctorale, diverses formations ont été suivies par le doctorant : les attestations sont disponibles. De nombreux travaux ont été menés depuis début 2017. Une traçabilité a été réalisée concernant le séquençage des gènes codant la protéine VP60 de lagovirus non pathogène. Les travaux ont été réalisés sur 3 souches non pathogènes. Examen de la PCR VP60 réalisée le 18/01/2017 (Cf. page 84 du cahier de laboratoire X040121). La traçabilité est très satisfaisante, le cahier est régulièrement signé actant la validation et l'avancée des travaux menés. Les sauvegardes informatiques sont judicieuses.

Au jour de l'audit, le doctorant n'a pas eu à enregistrer de non-conformité lors de la réalisation des travaux. Les travaux avancent selon le rythme défini dans le plan de management de qualité de la thèse. Il n'a pas été notifié de non-conformité au cours de cet audit.

**Principaux documents examinés lors de l'audit du 24 Octobre 2019 :**

Examen de la révision 2 du PMQ intégrant le SPPAE puisque les expérimentations y ont été réalisées en A3. Le PMQ est à jour.

Un seul RHDV a été sélectionné (00-21) qui est un RHDV classique et non circulant sur le territoire et non recombinant. Le phénotype a été caractérisé en A2 au SELEAC in vivo sur lapins. Vu dossier Cometh : dossier déposé sur Apafis (RAS), vu avis favorable du Cometh en date du 13 mars 2018, vu notification de décision du ministère autorisant le projet. Vu protocole de l'essai VIPAC 28-18 et amendement au protocole. Examen de la manipulation d'établissement de la cinétique de réplication : vu fichier 2018 – Essais animalerie, traçabilité sur échantillon 19P006093 (lapin 6261), code manip code titrage PQo : vu cahier de manip X093871 et RT-PCR titrage organes 28618 page 50, RT-PCR validée par la présence de témoins positifs (pour construction de la gamme) et d'un témoin négatif (eau) : RAS bonne traçabilité. Vu le suivi des réunions d'équipes et des réunions de thèse. Chaque réunion de thèse fait l'objet d'une présentation et d'un compte-rendu. La présentation est révisée à chaque réunion afin d'être à jour concernant l'ensemble des travaux menés depuis l'origine de la thèse. Il n'a pas été notifié de non-conformité au cours de cet audit.

**Eléments de sortie de la thèse :**

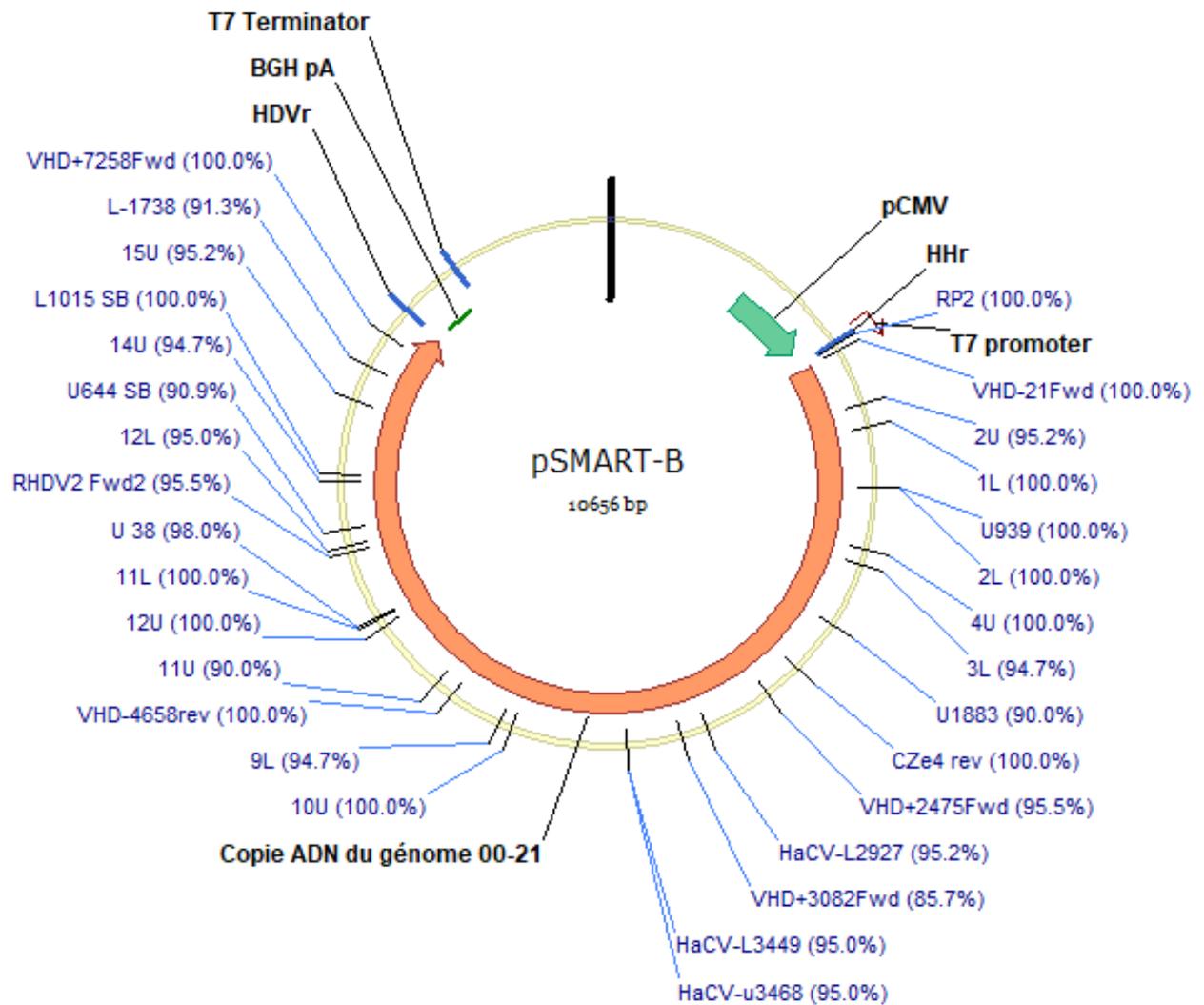
Rapport de thèse en cours de rédaction.

Publications :

- First Complete Genome Sequence of a Hare Calicivirus Strain Isolated from *Lepus europaeus* publiée dans Microbiology Ressource Announcements.
- Genetic diversity and evolution of Hare Calicivirus (HaCV), a recently identified Lagovirus from *Lepus europaeus* publiée dans Infection, Genetics and Evolution
- Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus *Lagovirus europaeus/GI.2* acceptée dans Scientific Reports
- 4eme article en cours de rédaction : caractérisation phénotypique et génomique de la souche 00-21

Une communication orale à Vienne.

Annexe 2 : Illustration des amorces de séquençage Sanger sur la carte plasmidique de pSMART B



Annexe 3 : Tableau bilan des systèmes de génétique inverse des  
calicivirus

Genre	Virus (souche)	Système	Virus support	Cellules	Références	Principaux résultats obtenus	Conclusion des auteurs	Limites de l'étude
Vesivirus	FCV (Urbana)	Transcription <i>in vitro</i> (T7) ARN coiffé	Non	CRFK*	Sosnovtsev and Green (1995)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ECP après transfection</li> <li>● Protéines virales en IF (Ac polyclonal)</li> <li>● Amplification et séquençage du tag génétique après transfection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i></li> <li>● vRG provient bien du système de GI</li> <li>● Production d'ECP : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas plusieurs passages sur cellules</li> <li>● Pas de séquençage du génome de vRG</li> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> </ul>
	FCV (2024)				Plasmide (T7)	Virus vaccinia (MVA/T7)	CRFK* et BHK-21	Thumfart and Meyers (2002)
		<ul style="list-style-type: none"> <li>● ECP après un passage</li> <li>● Protéines virales en IF (Ac polyclonal)</li> <li>● Cinétique de réplication <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> <li>● Expression et détection d'un gène rapporteur</li> </ul>						
FCV (F4)	Plasmide (EF-1 $\alpha$ )	Non	CRFK*	Oka et al., (2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ECP après transfection</li> <li>● Cinétique de réplication <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> <li>● Séroneutralisation : vWT = vRG (Ac monoclonaux)</li> <li>● Présence d'un tag génétique sur le virus GI</li> <li>● Séquence génome viral : vWT = vRG à l'exception du tag génétique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i></li> <li>● Phénotype <i>in vitro</i> : vRG = vWT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas plusieurs passages sur cellules</li> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> </ul>	

<i>Sapovirus</i>	PEC (Cowden)	Transcription in vitro (T7) ARN coiffé	Non	LLC-PK*	Chang et al. (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Système dépendant de la présence de contenu intestinal de porc</li> <li>● ECP après transfection</li> <li>● Titrage de vRG en plage de lyse</li> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF et RIPA (Ac polyclonaux et monoclonaux)</li> <li>● Cinétique de réplication <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> <li>● vRG en EM</li> <li>● Phénotype vRG <i>in vivo</i> : atténué</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i> qui a la même propriété de réplication <i>in vitro</i> et le même phénotype que le vWT adapté</li> <li>● vRG a un phénotype atténué <i>in vivo</i> par rapport au vWT non adapté</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de séquençage du génome viral de vRG</li> </ul>
<i>Norovirus</i>	MNV (MNV-1)	Plasmide (CMV)	Non	293T → RAW 264.7*	Strong et al. (2012)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ↗ titre viral <i>in vitro</i> après plusieurs passages</li> <li>● Phénotype <i>in vivo</i> : vRG = vWT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></li> <li>● Phénotype <i>in vivo</i> : vRG = vWT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de séquençage du génome de vRG</li> </ul>
	MNV (CR6 et CW3)			293T	Ward et al. (2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ECP après un passage</li> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF et WB (Ac monoclonaux et polyclonaux)</li> <li>● Séquence génome viral : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Production de vRG infectieux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> <li>● Phénotype <i>in vitro</i> : pas de comparaison vRG/vWT</li> </ul>
	MNV (MNV-1)	Plasmide (T7)	Baculovirus (Bac-T7)	293T, BHK, COS7, HepG2 → RAW 264.7*	Ward et al. (2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en WB (Ac polyclonaux) après transfection et après un passage</li> <li>● ARN viral encapsidé <i>in vitro</i> en RT-PCR après transfection et après un passage</li> <li>● ECP après un passage</li> <li>● Cinétique de réplication <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> <li>● Séquence génome viral : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i></li> <li>● Phénotype <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> </ul>
	MNV (MNV-1)	Plasmide (T7)	Virus Fowlpox, (FWPV-T7)	BHK → RAW 264.7*	Chaudhry et al. (2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en WB (Ac polyclonaux) après transfection et après un passage</li> <li>● ARN viral encapsidé <i>in vitro</i> en RT-PCR après transfection et après un passage</li> <li>● ECP après un passage</li> <li>● Cinétique de réplication <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> <li>● Séquence génome viral : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i></li> <li>● Phénotype <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> </ul>

Norovirus	MNV (MNV-3)	Plasmide (T7)	Virus Fowlpox, (FWPV-T7)	BSR-T7 -> RAW 264.7*	Arias et al. (2012)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Production de plusieurs virus issus de génétique inverse après plusieurs passages sur cellules</li> <li>● ECP après plusieurs passages</li> <li>● Séquence génome viral : vWT ≠ vRG</li> <li>● Les virus issus des différents passages permettent une infection persistante pendant 56 jours chez la souris</li> <li>● vRG isolé sur cellules à partir de fécès (28j) après passage sur souris</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></li> <li>● Génome vRG ≠ vWT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de comparaison entre le vWT et vRG</li> </ul>
	MNV (MNV-1)	Transcription <i>in vitro</i> (T7) ARN coiffé	Non	293T/ BSR-T7/ RAW 264.7*	Yunus et al. (2010)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ECP après transfection</li> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> WB (Ac non précisés)</li> <li>● ↗ quantité d'ARN viral de vRG entre 6 et 72h post-transfection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Production d'un nombre important de particules infectieuses vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de séquençage du génome viral de vRG</li> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> <li>● Pas de passage sur cellules</li> </ul>
	MNV (S7)	Plasmide (EF-1 $\alpha$ )	Non	293T/ COS-7 → RAW 264.7*	Katayama et al. (2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ECP après transfection</li> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en WB et en IF (Ac polyclonaux)</li> <li>● ARN génomique, subgénomique, et ARN négatif en NB</li> <li>● Production d'ARN coiffés par la VPg</li> <li>● Expression et détection de plusieurs gènes rapporteurs</li> <li>● Densité sur gradient CsCl : vRG = vWT</li> <li>● vRG en EM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Production de vRG de MNV infectieux</li> <li>● Production de vRG de HuNoV dont l'ARN est infectieux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> <li>● Pas de séquençage du génome de vRG</li> </ul>
	HuNoV (U201)			293T/ COS-7				

Norovirus	MNV (MNV-1), FCV (Urbana)	Plasmide (T7-IRES-T7)	Non	293T/ BHK-21 → RAW 264.7*	Sandoval-Jaime et al. (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en autoradiographie</li> <li>● Plages de lyse après transfection</li> <li>● Expression et détection d'un gène rapporteur</li> <li>● Séquençage extrémité 5' et 3' vRG=vWT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i></li> <li>● Phénotype <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> <li>● Pas de séquençage du génome de vRG</li> </ul>
Recovirus	ReV (TV)	Transcription <i>in vitro</i> (T7) ARN coiffé	Non	LLC-MK2 *	Wei et al. (2008)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Séquence génome cloné ≠ vWT</li> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF (Ac polyclonaux)</li> <li>● ECP après transfection et après passages</li> <li>● Cinétique de répllication <i>in vitro</i> : vRG = vWT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i></li> <li>● Phénotype <i>in vitro</i> : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> <li>● Pas de séquençage du génome complet de vRG</li> </ul>
Norovirus	HuNoV	Plasmides (T7)	Virus vaccinia (VTF7)	HEK293T	Asanaka et al. (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF et en RIPA (Ac polyclonaux)</li> <li>● ARN viral <i>in vitro</i> en NB</li> <li>● Densité sur gradient CsCl : vRG = vWT</li> <li>● vRG en EM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Production de vRG <i>in vitro</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de séquençage du génome de vRG</li> </ul>
	HuNoV + GFP	Plasmide (CMV)	Non	Caco-2	Oliviera et al. (2018)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF (Ac polyclonaux)</li> <li>● Expression d'un gène rapporteur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Synthèse de protéines virales <i>in vitro</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de détection ni de séquençage d'ARN de vRG</li> <li>● Pas de démonstration que le système produit des particules virales <i>in vitro</i></li> </ul>
Lagovirus	RHDV (JX/CHA/97)	Transcription <i>in vitro</i> (T7)	Non	RK13	Liu et al. (2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF (Ac non précisé)</li> <li>● vRG en EM</li> <li>● Phénotype vRG <i>in vivo</i> : pathogène</li> <li>● Séquençage génome vRG = 6 mutations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Le système permet la synthèse d'ARN viraux</li> <li>● Production de vRG infectieux et stable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de comparaison entre le phénotype du vWT et vRG</li> <li>● Les observations en microscopies sont issues d'un autre article</li> </ul>

Lagovirus	RHDV (JX/CHA/97)	Plasmide (CMV)	Non	RK13	Liu et al. (2008)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ECP après transfection</li> <li>● ECP après plusieurs passages</li> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF et WB (Ac monoclonaux)</li> <li>● ARN viral en RT-qPCR</li> <li>● ↗ titre viral <i>in vitro</i></li> </ul>	● Production de vRG infectieux	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas d'expérimentation animale pour vérifier le phénotype de vRG</li> <li>● Pas de séquençage du génome de vRG</li> <li>● Pas de digestion à la DNaseI pour ne pas détecter le plasmide dans les cellules en RT-qPCR</li> </ul>
	RHDV (JX/CHA/97 + RGD)	Plasmide (T7)	Virus Poxvirus-T7	RK13* Hépatocyte primaire de lapin	Zhu et al. (2017)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protéines virales <i>in vitro</i> en IF et en WB (Ac non précisé)</li> <li>● ARN viral en RT-qPCR</li> <li>● vRG en EM</li> <li>● ↗ titre viral <i>in vitro</i></li> <li>● Phénotype <i>in vivo</i> : vRG=vWT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● vRG infectieux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></li> <li>● Phénotype <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> : vWT = vRG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de séquençage du génome de vRG</li> </ul>

Symbole	
*	cellules permissives
Abréviation	
Ac	anticorps
ECP	effets cytopathogènes
vRG	virus issu de génétique inverse
vWT	virus sauvage
IF	immunofluorescence
RIPA	radioimmunoprécipitation assay
WB	Western Blot
EM	microscopie électronique
NB	Northern Blot

Annexe 4 : Agrément d'utilisation confinée d'organismes  
génétiquement modifiés à des fins de recherche, de développement  
et d'enseignement



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,  
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

**Direction générale de la recherche et de l'innovation**

Madame Ghislaine LE GALL - RECULE  
ANSES Laboratoire de Ploufragan-  
Plouzané  
Unité VIPAC  
BP 53  
22440 PLOUFRAGAN

Fait à Paris, le 06 novembre 2019

**Arrêté valant agrément d'utilisation confinée d'organismes génétiquement  
modifiés à des fins de recherche, de développement et d'enseignement**

**La ministre de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation,**

**Vu** le code de l'environnement, notamment son chapitre II du titre III du livre V ;

**Vu** le dossier de demande d'agrément déposé par l'ANSES, exploitant représenté par Monsieur Nicolas ETERRADOSSI, Directeur du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané et la directrice des travaux de recherche, Madame Ghislaine LE GALL - RECULE, et enregistré sous le n° 4912 ;

**Vu** l'avis du Haut Conseil des biotechnologies en date du 18 septembre 2019 ;

**Arrête :**

Article 1

L'agrément de classe de **confinement 2** est accordé à l'utilisation comprenant le projet suivant pour une durée qui ne peut excéder **cinq ans** à compter de la présente décision.

L'agrément ne vaut que pour l'utilisation confinée agréée.



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,  
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

L'utilisation d'OGM mentionnée dans le dossier de demande d'agrément susmentionné fait l'objet du classement suivant :

**Projet 1 : Détermination des motifs de pathogénicité des lagovirus du lapin**

C2 pour l'obtention par génétique inverse et propagation sur lignées cellulaires ou cellules primaires de lapin des RHDV sauvages ou mutants décrits pour études in vitro

C2 pour la réalisation d'infections expérimentales in vivo sur le lapin à l'aide de ces mêmes souches.

C1 pour les constructions des différents clones infectieux plasmidiques pour les RHDV sauvages ou mutant.

**Note :**

Les classes de confinement 1, 2, 3 ou 4 correspondent aux niveaux de confinement 1, 2, 3 et 4 définis à l'annexe IV de la **directive 2009/41/CE** du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés.

Pour la ministre et par délégation  
Le chef du département des pratiques  
de recherche réglementées

Laurent PINON

Vous avez la possibilité de contester la décision par deux voies distinctes :

- Un recours administratif exercé dans un délai de deux mois à compter de la réception de cette décision auprès de la ministre de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation.
- Un recours contentieux exercé dans le délai de deux mois de cette décision ou à compter du rejet de votre recours administratif, auprès du tribunal administratif.

Annexe 5 : Amorces utilisés en PCR pour construire, corriger et cribler les plasmides pSMART A et B.

Annexe 5. Les amorces sens sont illustrées en noir, et les amorces anti-sens sont illustrées en rouge.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce 5' -> 3'	Position sur le plasmide	Rôle de l'amorce
FP2.A	GGGTCGGCATGGCATCTCCAC	9207 - 9227	Enlever l'insert AMPV du plasmide pFr-AMPV-C
RP2	GACTATAGGAATTCCTTTTCTATAGTTTCGTCTCACGG	1711 - 1749	
FP2.B	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC	9298 - 9322	
RP1.A	CTGGCAACTAGAAGGCACAGATAGCTTGCTTTAAACTATAAACCCAATT	9158 - 9206	Ajout de queue flottante à la copie ADN du génome viral pour l'assemblage de Gibson
FP1	GAAAGGAATTCCTATAGTCGTGAAAGCTATGGCGGTTATG	1731 - 1770	
RP1.B	TGGAGATGCCTAGCCGACCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATAGCTTGCTTTAAACTATAAAC	9164 - 9226	
VHD-21Fwd	GTGAAAGCTATGGCGGTTATG	1750 - 1770	Amplification de la copie ADN du génome viral + criblage des plasmides
VHD-7410rev	ATAGCTTGCTTTAAACTATAAACCCAATT	9158 - 9186	
U939	GCGATCCTTATGGACTGGAC	2668 - 2687	Génération de mégaprimers pour corriger les mutations en RF cloning
CZe 2 rev	GTTGTGAGCTTGCCAGCACCCCTTCATG	2964 - 2990	
U336 SB	TGGGCTGGTGGCATGCAGTTT	7390 - 7410	
Calici7255rev	CTACACTAGCATCATTATGCAT	8996 - 9017	
VHD+7258Fwd	GCATAATGATGCTAGTGTAG	8898 - 9017	Génération de mégaprimers pour produire le plasmide pSMART B en RF cloning
BGHPolyArev	CCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGC	9498 - 9522	
U38	CAGCGGGCACTGCTACCACAGCATC	7091 - 7115	Détection de l'ARN viral produit dans les cellules transfectées
L337ts	GAAGCGAAACTGCATGCCACCRGCCCA	7390 - 7416	

**Titre :** Origine de la pathogénicité des lagovirus : avancées sur la diversité génétique virale et le développement d'un système de génétique inverse

**Mots clés :** Lagovirus, diversité génétique, évolution virale, génétique inverse

**Résumé :** Les lagovirus infectent les léporidés (lapins et lièvres). Les lagovirus pathogènes tels que le Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) et l'European Brown Hare Syndrome virus (EBHSV) provoquent des hépatites virales souvent mortelles ayant de graves conséquences économiques et écologiques. Les lagovirus non-pathogènes tels que les European Rabbit Calicivirus 1 et 2 (RCV-E1 et RCV-E2) et les Hare Calicivirus (HaCV) ne provoquent aucune maladie chez les lapins et les lièvres, respectivement. L'émergence d'un nouveau lagovirus pathogène en 2010, nommé RHDV2, capable d'infecter à la fois les lapins et les lièvres, nous a poussé à nous interroger sur l'origine de la pathogénicité chez les lagovirus. L'hypothèse étudiée est l'évolution de souches non-pathogènes vers des souches pathogènes. Pour cela, la diversité génétique des lagovirus non-pathogènes, peu connue chez le lièvre, a été étudiée chez cette espèce. Onze nouvelles séquences de gène codant la protéine de capsid et la première séquence du génome complet d'un virus HaCV ont été obtenues. Ces données ont montré la grande diversité génétique des HaCV et leur circulation bien avant la première détection des EBHSV en 1980.

Toutefois, aucun lien évolutif n'a été trouvé avec les EBHSV. De nouvelles séquences de génomes complets ou de régions codantes de RCV-E1 et de RHDV2 ont aussi été caractérisées. Les analyses génétiques ont suggéré qu'un événement de recombinaison entre un virus RCV-E1 et un virus inconnu était à l'origine de l'émergence des RHDV2. Dans la seconde partie de la thèse, nous avons tenté de développer un nouveau système de génétique inverse (GI) pour le RHDV afin d'étudier les bases moléculaires du pouvoir pathogène. Le génotype et le phénotype *in vivo* d'une souche RHDV de référence ont été caractérisés, puis des essais de régénération de cette souche en GI ont été effectués *in vitro* et *in vivo* pour valider le système en cours de développement. Les résultats obtenus ont montré que le système était capable de produire de l'ARN viral et la protéine de capsid *in vitro*. Les essais *in vivo* visant à régénérer le virus n'ont pas permis l'infection de lapins. Cependant, la majorité des animaux ont séroconverti. Ces résultats n'ont pas permis de conclure que le système de GI était capable de produire des particules virales infectieuses et des points d'amélioration sont proposés.

**Title:** Origin of lagovirus pathogenicity: advances in viral genetic diversity and the development of a reverse genetics system

**Keywords:** Lagovirus, genetic diversity, viral evolution, reverse genetic

**Abstract:** Lagoviruses infect leporidae (rabbits and hares). Pathogenic lagoviruses such as Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) and European Brown Hare Syndrome virus (EBHSV) often cause fatal viral hepatitis with serious economic and ecological consequences. Non-pathogenic lagoviruses such as European Rabbit Caliciviruses 1 and 2 (RCV-E1 and RCV-E2) and Hare Caliciviruses (HaCV) cause no disease in rabbits and hares, respectively. The emergence of a new pathogenic lagovirus in 2010, named RHDV2, infecting both rabbits and hares, led us to question the origin of lagoviruses pathogenicity. The studied hypothesis is the evolution from non-pathogenic to pathogenic strains. For this purpose, the genetic diversity of non-pathogenic lagoviruses, little known in hares, was studied in this species. Eleven new gene sequences encoding the capsid protein and the first complete genome sequence of a HaCV virus have been obtained. These data showed the high genetic diversity of HaCVs and revealed their circulation long before the first detection of EBHSV in 1980. However, no evolutionary link was found between

HaCV and EBHSV. New sequences of complete genomes or coding regions of RCV-E1 and RHDV2 were also characterized. Genetic analyses suggested that a recombination event between an RCV-E1 virus and an unknown virus was at the origin of the emergence of RHDV2. In the second part of the thesis, we attempted to develop a new reverse genetics (RG) system for the RHDV in order to study the molecular basis of the pathogenicity of lagoviruses. The *in vivo* genotype and phenotype of a reference RHDV strain were characterized and then *in vitro* and *in vivo* regeneration assays of this strain in RG were performed to validate the system under development. The results showed that the system was able to produce viral RNA and capsid protein *in vitro*. *In vivo* assay to regenerate the virus did not result in the infection of rabbits. However, the majority of the animals seroconverted. These results did not lead to the conclusion that the RG system was able to produce infectious viral particles and points for improvement are proposed.