



HAL
open science

Étude de la protection virologique induite par la vaccination contre la myxomatose chez le lapin européen

Simon Bonlieu

► To cite this version:

Simon Bonlieu. Étude de la protection virologique induite par la vaccination contre la myxomatose chez le lapin européen. Médecine vétérinaire et santé animale. 2008. <dumas-04557476>

HAL Id: dumas-04557476

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04557476v1>

Submitted on 24 Apr 2024

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.



HAL Authorization

ETUDE DE LA PROTECTION VIROLOGIQUE INDUITE PAR LA VACCINATION CONTRE LA MYXOMATOSE CHEZ LE LAPIN EUROPEEN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2008
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Simon Marie Jacques BONLIEU
Né, le 14 décembre 1981 à Pamiers (Ariège)

Directeur de thèse : Monsieur. le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Stéphane BERTAGNOLI
M. Gilles MEYER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M. M.	G. VAN HAVERBEKE P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M. M. M. M. M. M. Mme M. M. M. M.	L. FALIU C. LABIE C. PAVAU F. LESCURE A. RICO A. CAZIEUX V. BURGAT J. CHANTAL J.-F. GUELF M. EECKHOUTTE D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2[°] CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DUCOS de LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle. **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores domestiques*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mme **BENNIS-BRET, Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCLAINVILLE –CAMUS, Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE)** *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologie, Histologie*
Mme **LETRON –RAYMOND, Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER –MEYNADIER, Annabelle**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
Mlle **GOSSOT Pauline**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **NOUVEL Laurent-Xavier**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **RATTEZ Elise**, *Médecine*
M. **REYNOLDS Brice**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VOLMER Romain**, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **BIBBAL Delphine**, *H.I.D.A.O.A Sciences de l'Alimentation*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
M. **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommages respectueux

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Qui nous a proposé ce sujet de thèse et a permis par ses conseils l'élaboration de ce travail

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance

Monsieur le Docteur Gilles MEYER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Qui nous a fait l'honneur de juger ce travail et de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements

A toute l'équipe du laboratoire de microbiologie pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

A **Brigitte** pour son immense talent dans la réalisation des ELISA mais surtout et avant tout pour sa complicité et sa gentillesse.

Aux jeunes travailleurs du labo **Béa, Soph, Mag** et **Bertrand**, pour l'ambiance "studieuse" et de nombreuses pauses cafés.

A **Véronique** et **Eric**, mes parents pour leur bienveillance tout au long de ces années.

A mon petit frère, **Benjamin**, en mémoire de nos jeux de gosses et de nos bagarres.

A mes amis de l'ENVT dont la compagnie m'a permis de vivre cinq années d'école extraordinaires.

A **Ange, Fanny, Pierrou, Vince** et **Jeff**, mes partenaires de TP.

A mes collègues de T1pro : **Arnaud, Guillaume, Matthieu** et **Michael** mon partenaire de galère de thèse.

A **Milouze** et **Nico** pour leur dynamisme qui nous a permis d'organiser et de réaliser de grandes choses.

A **Alex** et **Jérem** pour de nombreuses soirées ludiques mémorables.

A **Julien** pour son amitié et son immense générosité.

A **Aumérine, Aurélie, Juliette, Anne-So, Julie, Nom** et **Ludo, VB, Alien, Mickey, Nabou, Lolita, Ingrid, Eve, Gaelle, Gaston, Aude** et **Bruce, Jarek, Dumé, Jean-Yves, Myriam, Marie, Manon, Mel, Guigouille, Mel, Marie** et **Quentin, Seb, Jérôme, Xavier, Gégé, Romain, Caro Guizmo, Condor, Bibi, Ludovic** et **Jésus**.

A tous les vétérinaires qui m'ont fait confiance jusqu'ici et m'ont permis de faire mes premiers pas dans la vie active : **Sophie** et **Philippe** d'Oradour, **Jean-Guy** et **Marc** d'Argentat, **Hervé Aymeric** et **Pierre** de Naucelle ; ils ont toute ma reconnaissance.

A **Jacqueline, Jean-Claude, Pascal** et **Philippe** qui m'ont fait découvrir la Guadeloupe.

Aux randonneurs pyrénéens et aux globe-trotters de tous les horizons.

A **Florence**, ma cerise sur le gâteau du bonheur...

Sommaire

Table des illustrations p12

Introduction p15

Première partie : synthèse bibliographique p17

I. Caractères généraux des Poxvirus et du virus myxomateux p19

A. Classification p19

B. Structure p20

C. Cycle réplcatif p22

1. L'entrée du virus dans la cellule p22

2. L'expression des gènes viraux et sa régulation p23

a. Expression des gènes précoces p23

b. Réplication du génome p24

c. Expression des gènes intermédiaires et tardifs p24

3. L'assemblage et la maturation des virions p25

II. Etude systématique de la myxomatose p26

A. Généralités p26

B. Symptomatologie de la myxomatose chez le lapin européen p27

1. Forme aiguë p28

2. Forme subaiguë intermédiaire p30

3. Forme atténuée p31

4. Myxomateuse amyxomateuse p32

C. Lésions macroscopiques de myxomatose p33

D. Pathogénie du virus myxomateux chez le lapin européen p34

E. Réponse immune suite à une infection par le virus myxomateux p36

1. Mise en place de la réponse immune p36

2. Cinétique des anticorps p37

3. Immunité maternelle passive p38

F. Epidémiologie de la myxomatose p39

1. Les sources de virus p39

a. Les victimes p39

b. Les réservoirs de virus p40

- 2. Les modes de contagion p42
 - a. La contagion directe p42
 - b. La transmission indirecte vectorielle par les arthropodes p43
 - * Les culicidés p43
 - * Les siphonaptères p46
 - * Les simulidés p48
 - * Les poux et les tiques p49
- 3. Réceptivité intrinsèque de l'hôte p50
- 4. Cycle épidémiologique et saisonnalité de la myxomatose p50
- G. Prophylaxie de la myxomatose p51
 - 1. Prophylaxie sanitaire p51
 - 2. Prophylaxie médicale p52
 - a. Vaccination hétérologue par fibromatisation p52
 - b. Vaccination homologue par le virus modifié SG33 p53
 - 3. Lâchers de lapins non sensibles p55

III. Conséquences de la myxomatose sur la biocénose p57

- A. Conséquences historiques de la myxomatose p57
- B. Co-évolution du virus myxomateux et de son hôte p58
- C. Démographie des populations de lapins de garenne en France : impacts actuels de la myxomatose p60
 - 1. Ecologie et dynamique des populations du lapin de garenne p61
 - a. L'endo-limitation p61
 - b. L'exo-limitation p62
 - * Les prédateurs p62
 - * La chasse p63
 - * L'évolution des milieux naturels p63
 - * Les maladies p64
 - 2. Impacts actuels de la myxomatose en France p65

Deuxième partie : Etude expérimentale p71

Introduction p73

I. Matériels et méthodes p75

A. Principe p75

B. Animaux utilisés p75

C. Souches virales utilisées p75

D. Protocoles p76

1. Expérience n°1 p76

2. Expérience n°2 p78

E. Surveillance clinique p79

F. Réalisation des prélèvements sanguins p80

G. Analyse sérologique et titrage des anticorps par la méthode ELISA p81

1. Principe p81

2. Réalisation (Gelfi et *al.*, 1999) p82

3. Intérêts de la méthode ELISA p82

H. Analyse virologique et recherche d'ADN viral par PCR p83

1. Extraction et purification de l'ADN p83

a. Principe p83

b. Réalisation pratique p83

2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) p84

a. Principe p84

b. Réalisation pratique p85

c. Intérêts de la PCR p86

3. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose p87

II. Résultats p88

A. Manipulations préliminaires p88

1. Détermination du titre en anticorps des lapins vaccinés p88

a. Expérience n°1 p88

b. Expérience n°2 p88

2. Vérification du statut sérologique des lapins sentinelles et témoins p89

B. Protection clinique et virologique de la vaccination vis-à-vis des lapins inoculés p89

1. Expérience n°1 p89

a. Protection clinique p89

b. Protection virologique p89

- 2. Expérience n°2 p91
 - a. Protection clinique des animaux inoculés p91
 - b. Protection virologique p92

C. Etude de la transmission du virus d'épreuve aux lapins sentinelles p94

- 1. Observation clinique des animaux sentinelles p94
- 2. Analyses virologiques et sérologiques p94
 - a. Expérience n°1 p94
 - b. Expérience n°2 p96

III. Discussion générale p99

Conclusion p105

Références bibliographiques p107

Annexes p117

Table des Illustrations

Table des figures

- Figure 1** : Représentation schématique d'un orthopoxvirus p20
- Figure 2** : Représentation schématique du génome viral des *Poxviridae* p22
- Figure 3** : Schéma théorique de l'évolution de la myxomatose dans une forte population p66
- Figure 4** : Schéma théorique de l'évolution de la myxomatose dans une faible population p67
- Figure 5** : Impact de la myxomatose en fonction du taux de transmission p69
- Figure 6** : Dosage d'un anticorps avec la technique ELISA p81
- Figure 7** : Principe de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) p85
- Figure 8** : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins vaccinés de l'expérience n°1 p90
- Figure 9** : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins vaccinés de l'expérience n°2 p93
- Figure 10** : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins sentinelles de l'expérience n°1 p95
- Figure 11** : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins sentinelles de l'expérience n°2 pour J3 et J7 p96
- Figure 12** : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins sentinelles de l'expérience n°2 pour J10, J13, J17 et J20 p97

Table des tableaux

- Tableau 1** : Classification des *Chordopoxvirinae* p19
- Tableau 2** : Les membres du genre *Leporipoxvirus* et leur spectre d'hôte p20
- Tableau 3** : Critères de gradation de la virulence des souches de virus myxomateux p27
- Tableau 4** : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les lapins inoculés p77
- Tableau 5** : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les lapins sentinelles p78
- Tableau 6** : Protocole vaccinal p78
- Tableau 7** : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les lapins inoculés p79
- Tableau 8** : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les animaux sentinelles p79
- Tableau 9** : Titre en anticorps des lapins vaccinés (J0) p88
- Tableau 10** : Titre en anticorps des lapins vaccinés (J0-28) p88
- Tableau 11** : Résultats des PCR des lapins vaccinés p90
- Tableau 12** : Résultats des PCR des lapins vaccinés p93

Tableau 13 : Synthèse des résultats des lapins inoculés de l'expérience n°2 p94

Tableau 14 : Résultats des PCR des lapins sentinelles p95

Tableau 15 : Résultats des PCR des lapins sentinelles p96

Tableau 16 : Résultats des sérologies des lapins sentinelles p97

Table des photographies

Photo 1 : Scarification locale de l'oreille gauche du lapin n°11 à J8 p91

Photo 2 : Lapin n°12 à J11 p92

Table des annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des évolutions cliniques des lapins inoculés de l'expérience n°2 p117

Annexe 2 : Synthèse des manipulations et des résultats de l'expérience n°2 p118

Introduction

La myxomatose est une maladie infectieuse, virulente, inoculable, à transmission essentiellement vectorielle, qui touche avant tout le lapin européen *Oryctolagus cuniculus*. Elle est due au virus myxomateux, poxvirus du genre *Leporipoxvirus*, apparenté au plan immunologique au virus du Fibrome de Shope. Elle a été décrite pour la première fois en 1986, par Saranelli, comme une maladie mortelle caractérisée par l'apparition de nodules, appelés « myxomes », au niveau de la tête, de la région anogénitale et dorsolombaire, généralement associée à des troubles respiratoires et à une blépharoconjunctivite, et aboutissant à la mort de l'individu en une dizaine de jours dans les cas les plus graves.

Dans les années cinquante, face aux nuisances causées par une surpopulation massive de lapins de garenne, l'Australie décida d'utiliser le virus myxomateux comme moyen de lutte biologique. En France, l'introduction du virus par le professeur Armand-Delille dans sa propriété de Maillebois en Eure-et-Loire en 1952, fut à l'origine de l'apparition et de l'extension de la maladie dans toute l'Europe y compris la Grande Bretagne. Bien loin de causer les désastres des premières épidémies, la myxomatose évolue actuellement de manière endémique avec des micro-épizooties régionales et saisonnières. Elle reste néanmoins une des principales causes de mortalité du lapin sauvage, et participe à la régression des populations de lapins de garenne observée en France depuis une trentaine d'années.

L'épidémiosurveillance de la myxomatose, à l'initiative de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS), est réalisée par les observations cliniques sur le terrain, relayées par les fédérations de chasse, ainsi que par l'évaluation du statut sérologique de lapins sauvages capturés.

Les lapins ayant réchappés à une infection sauvage de myxomatose restent séropositifs pendant au moins 12 mois (Kerr, 1997) et on considère que lors de multiples réinfections, les lapins restent séropositifs à vie (Marchandeu et Boucraut-Baralon, 1999). Cependant, on connaît peu le rôle épidémiologique des lapins séropositifs. Peuvent-ils déclarer une forme atténuée de myxomatose et excréter du virus, lors de réinfection ? A partir de quel titre en anticorps ? Nous avons donc étudié le comportement clinique, sérologique et virologique de lapins séropositifs après vaccination vis-à-vis d'une épreuve virulente sévère, et leur éventuelle contagiosité en plaçant des lapins séronégatifs en contact étroit avec les premiers.

Après une synthèse bibliographique rappelant notamment les aspects cliniques et épidémiologiques de la myxomatose, nous exposerons les résultats de notre travail réalisé au sein de l'UMR 1225 à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Caractères généraux des poxvirus et du virus myxomateux

A. Classification

La famille des *Poxviridae* est divisée en deux sous-familles dont les membres infectent les vertébrés pour l'une (*Chordopoxvirinae*) et les invertébrés pour l'autre (*Entomopoxvirinae*).

La sous-famille des *Chordopoxvirinae* est elle-même subdivisée en 8 genres (tableau 1) (Van Regenmortel et al., 2000). Le virus prototype est le virus de la vaccine (VACV), chef de file du genre *Orthopoxvirus*. Le virus myxomateux (MYXV) appartient au genre *Leporipoxvirus*, comme le virus du fibrome de Shope (SFV), agent d'une hyperplasie fibromateuse chez le lapin américain du genre *Sylvilagus*. Les membres du genre *Leporipoxvirus* et leurs hôtes respectifs sont décrits dans le tableau 2.

Tableau 1 : Classification des *Chordopoxvirinae* (Van Regenmortel et al., 2000)

Genre	Espèce type	Principales autres espèces
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la vaccine (VACV)	Virus de l'ectromélie (ECTV) Cowpoxvirus (CPXV) Virus de la variole du chameau (CMLV) Virus de la variole du singe – rabbitpox Virus de la variole humaine (VARV)
<i>Parapoxvirus</i>	Orf virus (ORFV)	Virus de l'ecthyma contagieux Virus de la stomatite papuleuse Pseudocowpoxvirus
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la clavelée	Virus de la variole caprine (GTPV) Lumpy skin disease virus (LSDV)
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose (MYXV)	Virus du fibrome de Shope (SFV) Virus du fibrome du lièvre Virus du fibrome de l'écureuil
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine (SWPV)	
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus du Molluscum contagiosum (MOCV)	
<i>Yatapoxvirus</i>	Virus tana (TPV)	Virus yaba (YTV)

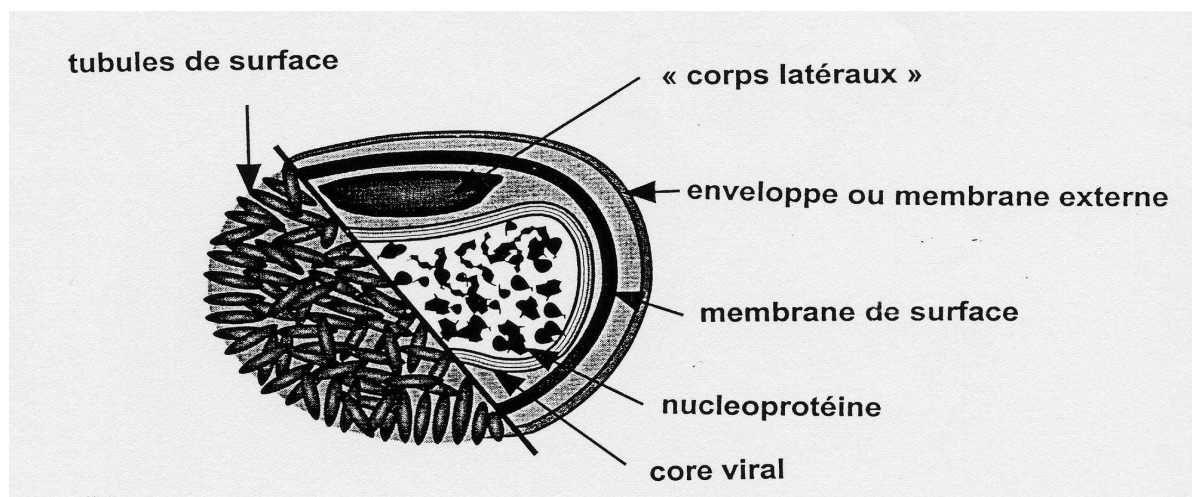
Tableau 2 : Les membres du genre *Leporipoxvirus* et leur spectre d'hôte
(Fenner et Fantini, 1999)

Virus	Pathologie chez l'hôte naturel	Pathologie chez <i>Oryctolagus cuniculus</i> , lapin européen
Virus de la myxomatose (MYXV)	<i>Sylvilagus</i> sp. : myxome bénin localisé	Myxomatose généralisée et immunodépression
Virus du fibrome de Shope (SFV)	<i>Sylvilagus floridanus</i> : fibrome bénin localisé	Fibrome bénin localisé
Virus du fibrome malin du lapin	Non déterminé	Nodules dermiques, immunodépression généralisée
Virus du fibrome de l'écureuil	<i>Sciurus</i> sp. : fibromes multiples	Non sensible
Virus du fibrome du lièvre	<i>Lepus</i> sp. : lésions cutanées localisées	Fibrome bénin localisé

B. Structure

Les *Poxviridae* sont de forme ovoïde, de dimension moyenne 400 x 300 x 200 nm (Van Regenmortel et *al.*, 2000) et sont parmi les plus gros virus animaux connus.

Figure 1 : Représentation schématique d'un orthopoxvirus (IMV à gauche et EEV à droite en coupe) (Van Regenmortel et *al.*, 2000)



Plus d'une centaine de polypeptides entrent dans la composition du virion des *Poxviridae*, représenté figure 1 (Vilagines et Vilagines, 1985). Classiquement, on distinguait au sein du virion des « corps latéraux », se logeant dans les cavités du core (Vilagines et Vilagines, 1985).

Pour certains auteurs, ces corps latéraux ne seraient que des artefacts de microscopie électronique ne correspondant pas à une structure virale en tant que telle (Dubochet et *al.*, 1994) bien que d'autres réfutent cette théorie (Griffiths et *al.*, 2001). Des analyses en cryomicroscopie ont montré qu'ils avaient une réalité physique (Cyrklaff et *al.*, 2005).

La nature et le nombre de membranes permettent de distinguer les poxvirus selon quatre formes distinctes : les IMV (virions intracellulaires matures), les EEV (virions extracellulaires enveloppés), les CEV (virions enveloppés associés à la cellule) et les IEV (virions intracellulaires enveloppés).

Les IMV sont formés dans le cytoplasme. On leur attribue classiquement une seule membrane, ce qui a été confirmé par des observations en microscopie électronique (Carter et *al.*, 2005). Les IMV représentent la très grande majorité de la progénie virale, ils restent séquestrés dans le cytoplasme et sont libérés avec la lyse de la cellule hôte. Cette forme est la plus résistante et serait adaptée au passage du virus d'un hôte à l'autre.

Une petite partie des IMV acquiert une double enveloppe supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi ou des endosomes et constitue les IEV. Ils migrent vers la surface cellulaire grâce aux microtubules du cytosquelette et fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Ils perdent ainsi leur enveloppe la plus externe et produisent la libération d'EEV par exocytose. Une partie des virions, les CEV, est retenue à la surface cellulaire.

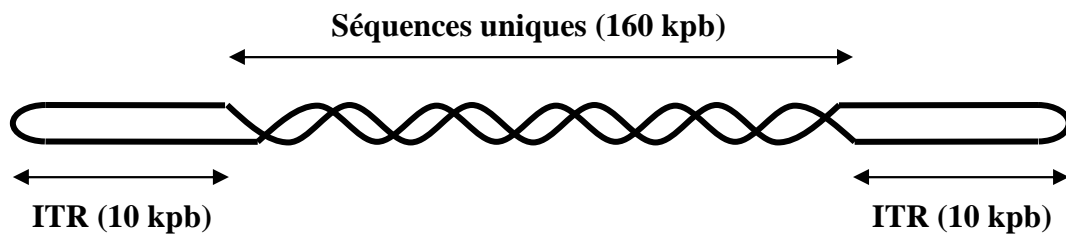
Les formes EEV et CEV, minoritaires au sein de la progénie virale (de 1 à 30 % selon les virus et les lignées cellulaires), sont donc caractérisés structurellement par l'existence d'une membrane supplémentaire, l'enveloppe externe, par rapport aux IMV. Cette enveloppe leur confère des propriétés particulières en terme de reconnaissance des cellules cibles et de protection contre les effecteurs du système immunitaire (Vanderplasschen et *al.*, 1998). Les CEV assurent l'infection des cellules de proche en proche grâce à une queue d'actine qui se forme en dessous d'eux. Les EEV constituent une forme de dissémination virale sur de plus longues distances (Smith et *al.*, 2002).

Les membranes sont constituées de phospholipides et de protéines dont certaines sont la cible d'anticorps produits au cours de l'infection virale.

Le core abrite le génome viral, constitué d'une molécule unique d'ADN linéaire double brin. La taille de l'ADN varie de 130 à 375 kpb dans l'ensemble de la famille (Moss, 2001).

L'organisation générale du génome est commune à tous les *Poxviridae* (figure 2) : on distingue une région centrale très conservée au sein d'un genre, contenant les gènes essentiels pour le cycle viral, et des régions terminales répétées inversées (ITR) de 10 à 15 kbp, codant essentiellement pour des facteurs de pathogénicité (Moss, 2001).

Figure 2 : Représentation schématique du génome viral des *Poxviridae* (modèle : VACV). ITR : Répétitions inversées terminales (Fenner et Fantini, 1999)



Le virus myxomateux mesure 290 x 230 x 75 nm. La taille de son génome est de 161773 pb. Sa structure génomique a été d'abord étudiée par Russell et Robbins, au travers d'une étude des profils de restriction de 3 souches virales (Russell et Robbins, 1989). Un séquençage fragmentaire de certaines zones d'intérêt du génome a ensuite fait place au séquençage complet de la souche Lausanne du virus (Cameron *et al.*, 1999).

C. Cycle répliatif

Le cycle répliatif des poxvirus a été étudié en détail et à l'échelle moléculaire en prenant le virus de la vaccine pour modèle. Ce cycle se déroule intégralement dans le cytoplasme de la cellule hôte et sa durée est variable (12 à 24 heures pour le VACV).

1. L'entrée du virus dans la cellule

Plusieurs mécanismes de la pénétration des poxvirus dans les cellules cibles ont été proposés.

L'hypothèse la plus généralement acceptée est que la pénétration des IMV se fait par fusion membranaire. Des images de microscopie électronique démontrent d'ailleurs la continuité des membranes virale et cellulaire (Carter *et al.*, 2005). Les IMV déclencheraient un signal intracellulaire à l'origine de protrusions membranaires actiniques, essentielles pour la pénétration dans la cellule (Locker *et al.*, 2000).

Les mécanismes d'entrée dans la cellule des EEV sont plus controversés. Selon certains auteurs, les EEV pénétreraient par endocytose et seraient pris en charge par des vésicules intracellulaires. Le pH acide des vésicules induirait la rupture de l'enveloppe externe et le core serait libéré par fusion de la membrane des IMV avec celle des vésicules (Ichihashi, 1996, Vanderplasschen *et al.*, 1998). Un autre mécanisme est proposé, sur les bases d'observations en microscopie électronique. La membrane des EEV se romprait au contact de la membrane cellulaire, et resterait à l'extérieur de la cellule. La particule IMV ainsi libérée pénétrerait par fusion membranaire, comme décrit ci-dessus (Carter *et al.*, 2005).

Concernant l'entrée du MYXV dans la cellule, des images en microscopie électronique (Duteyrat *et al.*, 2006) semble confirmer le mécanisme d'entrée des EEV par rupture préalable de l'enveloppe et entrée des IMV (Carter *et al.*, 2005). Des images d'endocytose et de macropinocytose sont également rapportées (Duteyrat *et al.*, 2006).

2. L'expression des gènes viraux et sa régulation

Le cycle se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule infectée. Les *Poxviridae* sont, avec le virus de la peste porcine africaine, les seuls virus à ADN connus qui synthétisent leur ARNm dans le cytoplasme, et sont donc quasi-autonomes pour les processus de réplication et de transcription qui ont habituellement lieu dans le noyau. Ils codent leurs propres enzymes et facteurs de transcription.

L'expression des gènes est séquentielle ; on distingue ainsi les gènes précoces, transcrits avant la réplication du génome viral, des gènes intermédiaires et tardifs qui sont transcrits après. Une même ARN polymérase à 9 sous-unités est utilisée pour la transcription des trois types de gènes (Broyles, 2003).

a. Expression des gènes précoces

Dans les minutes qui suivent l'entrée du virus dans la cellule, l'activation de la machinerie transcriptionnelle permet la synthèse d'ARNm précoces, coiffés et polyadénylés, représentant environ la moitié du génome (Buller et Palumbo, 1991). La synthèse des premiers transcrits se fait au sein du core, à l'aide d'enzymes virales, présentes dans le virion. Les transcrits s'échappent ensuite par des pores à la surface du core et sont traduits via les ribosomes cellulaires.

Les enzymes impliquées dans cette phase sont une ARN polymérase, un facteur de transcription précoce, une polyA polymérase, ainsi que des enzymes de coiffe et de méthylation. Parmi les gènes exprimés précocement, on trouve ceux codant pour les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, la biosynthèse des nucléotides et la transcription des gènes intermédiaires.

b. Réplication du génome

Après désintégration du core, l'ADN devient accessible aux enzymes. La réplication de l'ADN se déroule de façon autonome dans le cytoplasme de la cellule infectée, à l'aide d'enzymes d'origine virale exclusivement. L'ADN viral ne s'associe aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) qui l'enveloppent pour former un compartiment dans lequel la réplication s'initie (Mallardo *et al.*, 2002).

Au début du cycle, la boucle de chaque télomère de l'ADN viral est coupée par une endonucléase spécifique. Les télomères poxviraux sont, par analogie aux chromosomes eucaryotes, des séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités de la molécule linéaire d'ADN viral. C'est dans les télomères qu'ont lieu, de toute évidence, l'initiation et la terminaison de la réplication (DeLange et McFadden, 1990). Néanmoins, il ne semble pas exister d'origine de réplication spécifique. Pendant la réplication de l'ADN, plusieurs unités génomiques linéaires se juxtaposent au niveau des télomères viraux et forment des concatémères de haut poids moléculaire, considérés comme des intermédiaires de réplication. Les concatémères sont ensuite transformés en molécules d'ADN matures qui seront incorporées dans les particules virales, en fin de processus infectieux.

c. Expression des gènes intermédiaires et tardifs

Une régulation en cascade permet d'assurer d'abord la transcription des gènes précoces, puis la transcription des gènes intermédiaires et la réplication du génome, et enfin l'expression des gènes tardifs.

Les ARNm intermédiaires et tardifs sont en général plus longs que les ARNm précoces. La transcription de ces gènes nécessite la synthèse *de novo* de l'ARN polymérase. Elle requiert également la participation de protéines de la cellule hôte. Les gènes intermédiaires et tardifs codent des protéines participant à la morphogénèse et l'assemblage des virions, ainsi que des protéines nécessaires à la transcription des gènes précoces (Rosel et Moss, 1985).

3. L'assemblage et la maturation des virions

Les virions s'assemblent dans des régions circonscrites du cytoplasme, identifiables en microscopie électronique. Ces sites, appelées virosomes, apparaissent 4 à 5 heures après l'infection. Des membranes virales commencent par s'y accumuler. Ces membranes seraient synthétisées *de novo*, dériveraient des membranes du compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Sodeik et *al.*, 1993) ou résulteraient de la fusion de petites vésicules issues d'organites cellulaires (Traktman et *al.*, 2000).

Après incorporation de la nucléoprotéine et maturation, les IMV sont formés. Certains s'entourent d'une double enveloppe supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi et se dirigent vers la surface cellulaire grâce aux microtubules. Ils fusionnent avec la membrane plasmique et perdent leur enveloppe la plus externe pour libérer des EEV et CEV (Smith et *al.*, 2002). Les CEV restent accolés à la membrane cellulaire puis sont repoussés par une microvillosité actinique qui se développe sous eux (Smith et *al.*, 2002). D'autres extensions cellulaires (ponts cytoplasmiques, filopodiums, grosses villosités) permettent aussi la diffusion des particules virales enveloppées de cellule à cellule (Duteyrat et *al.*, 2006).

II. Etude systématique de la myxomatose

A. Généralités

La myxomatose est une maladie du lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*. Elle est systémique, rapidement létale dans sa forme classique et se caractérise par l'apparition sur l'animal de lésions cutanées mucoïdes, nommés myxomes dont la première description remonte en 1896 à l'Institut d'Hygiène de Montevideo.

Les hôtes naturels du virus myxomateux sont les lapins américains du genre *Sylvilagus*. Chez ces animaux, la maladie est bénigne (fibrome cutané uniquement) et il n'est relevé aucune immunodépression générale. Il semble ainsi que le virus myxomateux ait « sauté » une barrière d'espèce pour provoquer chez le lapin européen cette maladie fulgurante, accompagnée d'un tableau clinique très caractéristique d'immunodépression généralisée avant la mort de l'animal (Fenner et Ratcliffe, 1965). Le virus myxomateux est devenu un exemple de virus ayant réussi une adaptation totale à un nouvel hôte, le lapin européen, et peut désormais être transmis entre *Oryctolagus cuniculus* en l'absence totale de son hôte naturel. La transmission du virus se fait essentiellement de manière vectorielle par l'intermédiaire d'arthropodes piqueurs, vecteurs passifs.

Ce virus reste la seule arme biologique utilisée un jour officiellement pour détruire une population de vertébrés à l'échelle d'un continent. En effet, le virus a été introduit volontairement en Australie en 1950 pour éliminer les lapins, responsables de dommages agronomiques, écologiques et économiques considérables dans le pays. Il a été introduit, volontairement en France en 1952 et a rapidement colonisé l'Europe. Au cours des premières années, le virus s'est propagé très rapidement en provoquant des épizooties catastrophiques, décimant 99% des individus et mettant en péril les populations de lapins de garennes.

Par la suite, la maladie a fait place, progressivement, à une forme enzootique, ponctuée de micro-épizooties régionales et saisonnières. Ainsi, sur le plan clinique, aux formes aiguës, rapidement mortelles, se sont surajoutées des formes subaiguës et atténuées, non systématiquement mortelles et génératrices d'immunité (Ross, 1972).

Lorsque ce phénomène est observé pour la première fois en Australie, Fenner et Marshall (1957) proposent de grader la virulence des souches de virus, selon un système arbitraire dépendant du taux de mortalité mais aussi du temps moyen de survie des animaux (tableau 3).

Tableau 3 : Critères de gradation de la virulence des souches de virus myxomateux
(Fenner et Fantini, 1999)

Grade de virulence	Taux de mortalité (%)	Temps moyen de survie (jours)
I	> 99	< 13
II	95-99	14-16
III	70-95	17-28
IIIa	90-95	17-22
IIIb	70-90	23-28
IV	50-70	29-50
V	< 50	-

Ainsi, les souches de grades I sont des souches hypervirulentes (souche type Lausanne) tandis que les souches de grade V sont des souches très atténuées, les autres étant intermédiaires.

B. Symptomatologie de la myxomatose chez le lapin européen

Les caractères cliniques généraux de l'infection myxomateuse sont définis par l'apparition de proliférations dermiques abondantes et exsudatives, appelées « pseudotumeurs » ou « myxomes ».

Les formes cliniques se diversifient, à mesure de l'ancienneté du processus dans une région ou un pays, selon une forme aiguë, une forme subaiguë et une forme atténuée. Après quelques années d'épizooties aiguës en Australie et en Europe dans les années 50, l'apparition progressive des formes cliniques subaiguës et atténuées découle à la fois, de l'apparition de souches virales moins virulentes (Fenner et Fantini, 1999) et de la sélection de lignées de lapins plus ou moins résistantes (Marshall et Douglas, 1961 ; Ross et Sanders, 1977 ; 1984).

Les formes cliniques classiques coexistent depuis le début des années 80 en Europe, avec des formes cliniques atypiques caractérisées par l'absence de pseudotumeurs cutanées et par un hyperpneumotropisme apparent, on parle de « myxomatose amyxomateuse » ou de « myxomatose respiratoire » (Marlier et Vindevogel, 1996 ; Marlier et *al.*, 1997).

L'incubation s'étend en moyenne sur 5 à 8 jours mais peut exceptionnellement se raccourcir à 2 jours ou se prolonger jusqu'à 18 jours en fonction du mode de contamination et de la virulence de la souche concernée (Joubert et *al.*, 1972).

1. Forme aiguë

Cette forme est généralisée, exsudative, grave et mortelle, épizootique. Elle correspond aux formes cliniques observées sur les populations fraîchement infectées, comme en Australie et en Europe au début des années 50, en raison de la pleine réceptivité de l'hôte et de la haute virulence du virus. Elle est associée aux souches virales de degrés I et II de virulence maximale (exemple : souche Lausanne).

Les prodromes de l'infection, éphémères et peu significatifs passent généralement inaperçus : les mouvements sont plus lents, les réflexes de fuite émoussés, le pelage marque une horripilation généralisée, annonciatrice de l'apparition des tuméfactions cutanées.

Les phases évolutives de la maladie découlent des localisations initiales infligées par la piqûre contaminante, suivies de la généralisation nodulaire pseudo-tumorale.

La phase de début, oculaire et céphalique, se caractérise par une blépharo-conjonctivite intense, bilatérale, contemporaine d'une lésion cutanée érythémateuse au site d'inoculation progressant en une lésion oedémateuse, le « myxome primaire », qui peut atteindre plusieurs centimètres de diamètre.

Le larmolement discret au début, s'intensifie progressivement et mouille abondamment les joues de l'animal. Les paupières sont congestionnées et œdématisées, la muqueuse conjonctivale s'injecte et se parsème de phycèmes. La palpation de la région orbitaire décèle une grande sensibilité et déclenche des mouvements de défense contre la douleur. En un ou deux jours, la région zygomatique et nasale se recouvre d'une sérosité limpide, qui devient franchement purulente et agglutine les poils de la face en plaques feutrées ou cartonnées. Les paupières sont rapprochées, tuméfiées, épaissies, surtout la paupière supérieure dont l'infiltration diffuse peut atteindre la taille d'une noisette. Les paupières se soudent ensuite par le muco-pus. Dès cette période les animaux sauvages devenus aveugles errent misérablement en plein jour hors de leur terrier sans demeurer au gîte. Leur odorat, fortement diminué par l'œdème des narines et le jetage mucopurulent, leur permettrait cependant d'emprunter les coulées habituelles menant à leur terrier.

La phase d'état est marquée par les localisations ano-génitales sur l'anūs et la vulve chez la femelle, sur l'anūs, le scrotum et le fourreau chez le mātē. Un œdēme inflammatoire nettement circonscrit apparaīt, la rēgion devient rosēe, puis rougeātē et turgescente, enfin vineuse, liliacēe et noirātē.

Chez le mātē surtout, les lēsions sont trēs rēvélatrices. Le scrotum, ēpaissi, offre une saillie bien dēlimitēe sur les parties voisines et l'orchite-vaginalite s'installe rapidement. La soudure des deux feuillets de la sēreuse vaginale s'oppose ā l'action du puissant crēmaste qui, chez cette espēce, permet normalement la dissimulation intra-abdominale des testicules ā la moindre alerte. L'organe demeure donc extērieur de palpation aisēe et douloureuse. Le prēpuce est œdēmatiē, la balanite notable, le gland nēcrosē, le paraphimosis important et trēs douloureux.

La phase terminale correspond aux pseudotumeurs cutanēes qui apparaissent 3 ā 5 jours aprēs le dēbut de la clinique. Elles signalent avec la blēpharo-conjonctivite et les lēsions ano-génitales la gēnēralisation du processus. En divers points du corps, se rēvèlent des nodules hémisphériques, rēguliērement bombés, dont le nombre est variable, de 3 ā plusieurs dizaines. La dimension de ces pseudotumeurs myxomateuses oscille de la taille d'un pois ā celle d'une amande ; grossiērement hémisphériques ou plus ou moins aplaties, elles sont d'autant plus volumineuses que la maladie se prolonge : elles peuvent alors devenir cohērentes et/ou confluentes. Leur consistance est ā la fois ferme et ēlastique ; elles ne paraissent ni chaudes, ni douloureuses et demeurent adhērentes au revētement cutanē.

La rēpartition des myxomes est irrēguliēre : quelquefois gēnēralisēes, les lēsions se situent le plus souvent sur la tēte, le dos, les lombes et ā l'extrēmitē des membres.

Ā la tēte, les pseudotumeurs siēgent surtout sur les oreilles, ā la base de la conque auriculaire et au bord antērieur du pavillon, mais aussi sur la face, le museau, le nez, le menton. La confluence des lēsions dēforme alors complētement les rēgions labiale, jugale, palpēbrale, mentonniēre, auriculaire, qui deviennent irrēguliērement bosselēes, conférant ā l'animal une allure monstrueuse et repoussante. Le faciēs de l'animal devient « lēonin » en raison de la boursouffure des joues et de l'aplatissement apparent du cōne nasal. La dyspnēe est intense, en raison de l'obstruction plus ou moins complēte des narines, et se traduit par un cornage rēvélateur.

Le long de l'ēpine dorsale, les myxomes peuvent figurer, de part et d'autre de l'ēchine amaigrie et saillante, deux cordons irrēguliērs, bosselés, polycycliques dēformant la silhouette de l'animal.

A l'extrémité des membres, les myxomes peuvent se développer en grand nombre et engainer littéralement le métacarpe et le métatarse, en remodeler les contours, sans dépasser la limite supérieure des articulations du grasset et du coude.

Enfin, la palpation des nœuds lymphatiques explorables révèlent une polyadénite symétrique et généralisée.

A cette période, l'animal demeure tapi dans un coin de sa cage ou traîne lamentablement dans la campagne surtout sur les routes et les parties découvertes, il perd l'instinct de la prudence et de la conservation, ne fuit pas à l'approche de l'homme ou du chien et se laisse aisément rattraper à la course. L'état général est profondément altéré, souvent fébrile en raison des surinfections bactériennes. L'appétit a disparu, l'amaigrissement rapide se transforme en cachexie avec une véritable fonte musculaire, exprimée par la saillie de l'échine et des régions osseuses.

La phase terminale se déroule alors très rapidement : la mort survient assez vite après une prostration complète. La cause précise de la mort n'est pas totalement éclaircie et diffère selon les auteurs. Les surinfections bactériennes de la sphère respiratoire, dues le plus souvent à des Pasteurelles profitant de l'immunodépression, sont souvent invoquées (Marlier *et al.*, 2000b). Cependant, dans les cas où les lapins sont atteints de manière aiguë, ils semblent que les lésions pulmonaires soient superficielles (Kerr et McFadden, 2002). D'autres auteurs évoquent l'asphyxie causée par l'obstruction complète des narines (Joubert *et al.*, 1972), mais là encore, ceci ne peut expliquer complètement la mort des lapins infectés de manière aiguë.

L'évolution de la forme aiguë est mortelle en 6 à 8 jours après le début des symptômes soit une douzaine de jours après la contamination, cette période peut être raccourcie notamment chez les lapereaux, très sensibles.

2. Forme subaiguë intermédiaire

Les lésions encore nombreuses, essentiellement céphaliques, apparaissent moins exsudatives. Souvent les oreilles, alourdies par nombre élevé de myxomes, s'inclinent puis restent tombantes et immobiles.

Même si la mort est encore fréquente, la survie est prolongée (15 jours à 3 semaines), et la guérison spontanée peut même intervenir dans certains cas. Cette forme demeure fréquemment enzootique et correspond au degré III de virulence.

3. Forme atténuée

Cette forme d'évolution prolongée est localisée, peu exsudative, bénigne et autocurable. Elle autorise à la fois la survie des lapins, le développement d'une immunité post-infectieuse solide et durable et la reconstitution des populations des garennes. Ces souches correspondent aux degrés de virulence IV et V mais peuvent aussi concerner des souches de degré III chez des lapins immunisés ou porteurs d'un certain degré de résistance innée.

Coïncidant avec un excellent état général et le maintien de tous les réflexes instinctifs, des pseudotumeurs limitées apparaissent avec des caractères très différents de ceux des lésions aiguës. Leur nombre est faible et n'excède pas une dizaine. La dimension des myxomes est toujours restreinte, ne dépassant pas, le plus souvent, la taille d'un pois, et leur consistance, d'abord molle, devient très ferme lorsque la cicatrisation se développe. Les lésions se sclérosent et leur périphérie se garnit de croûtes très adhérentes. Leur répartition est essentiellement céphalique et métatarsienne, les nodules s'observant rarement dans la région dorsale.

Le caractère morphologique des pseudotumeurs est très variable et offre une gamme très nuancée, selon le stade évolutif et la virulence résiduelle du virus en cause.

Au stade initial de formation nodulaire, les pseudotumeurs peuvent de façon très irrégulière, revêtir un aspect légèrement exsudatif, mais ne montrent aucune tendance à l'extension locale et régionale. Quelquefois, seules des lésions urticariennes, noueuses, circonscrites et nettement délimitées sont visibles. Elles peuvent être protubérantes et bien délimitées ou, au contraire, beaucoup plus réduites, plates et ombiliquées.

Au stade ultérieur d'encroûtement, puis de décrustation, elles se densifient, prennent une coloration noirâtre, perdent entièrement leur caractère exsudatif, et se recouvrent d'une carapace épaisse et foncée au centre, pelliculaire et translucide à la périphérie. Peu à peu, la lésion régresse, les croûtes se fragmentent et se détachent pour laisser subsister un nodule très restreint et très densifié.

Au stade terminal de cicatrisation, ne subsistent plus que des dépilations en regard de chaque lésion initiale, persistant pendant plusieurs mois. Le pelage est ainsi tacheté d'alopécies, qui disparaissent ensuite, comblées par la fourrure de régénération.

L'évolution réclame deux à huit semaines, parfois davantage, pour s'accomplir en totalité.

Certaines formes cliniques atténuées atypiques ont été notées.

La forme *mono-nodulaire abortive* ne révèle qu'un seul nodule autocurable, d'évolution relativement rapide et n'entraînant qu'un stade de dépilation éphémère.

La forme *nodulaire cratériforme*, sans doute liée à une réaction d'hypersensibilité, se caractérise par une lésion nécrotique d'évolution plus ou moins rapide selon l'importance des surinfections bactériennes locales. Elle pourrait être due à une réinfection ou à une surinfection spécifique (Joubert et *al.*, 1972).

4. Myxomateuse « amyxomateuse »

Ces nouvelles formes de myxomatose, présentées dans un premier temps en tant qu'accidents vaccinaux dus à l'utilisation de la souche SG33 en élevages intensifs (Brun et *al.*, 1981), ont été constatées par la suite en élevages traditionnels et chez les lapins de garenne en France (Joubert et *al.*, 1982 ; Arthur et Louzis, 1988), puis dans des élevages en Belgique (Marlier et Vindevogel, 1996). Les souches dites « amyxomateuses » présentent des variations instables de virulence similaires à celles des souches classiques. Elles se caractérisent par un réel hypo-ectodermotropisme allant, aussi bien dans les formes aiguës qu'atténuées, jusqu'à l'absence de myxomes, et par l'apparence relative d'un hyperpneumotropisme (myxomatose « respiratoire ») surtout dans les formes atténuées, très souvent compliquées de bactérioses pulmonaires (Joubert et *al.*, 1982).

La présence du myxome primaire désignant le point d'inoculation est constante. Il apparaît sous la forme d'une macule congestive trois jours après inoculation, puis d'une large papule rougeâtre (Marlier et *al.* 1997). Les premiers signes cliniques généraux apparaissent 8 jours après inoculation pour la souche amyxomateuse MYX 555/94 étudiée par Marlier et *al.* (1997) et se traduisent par des conjonctives rougeâtres et œdématisées avec de la photophobie et du jetage séreux.

Les animaux présentent ensuite une forte dyspnée inspiratoire associée à un abondant jetage séromuqueux, des conjonctives rouges fortement œdématisées, un épiphora séreux et un gonflement des paupières pouvant aller jusqu'à la fermeture de l'œil. Ces lésions évoluent ensuite vers un épiphora et un jetage mucopurulents. Une tuméfaction du scrotum et de l'anus est présente mais d'apparition plus tardive que pour les souches classiques. Elle apparaît ainsi au quatorzième jour après l'inoculation.

La difficulté du diagnostic liée à l'absence de lésions pathognomoniques fait que la présence de la maladie peut passer inaperçue dans certains élevages. Ainsi, une étude effectuée dans 16 élevages intensifs considérés indemnes de myxomatose sur la base de l'absence de signes cliniques nodulaires typiques, montre que la séroprévalence moyenne est de 55 et 38 % respectivement chez les lapines et les lapereaux de chair. De plus, la séroprévalence en anticorps myxomateux est plus élevée dans les élevages confrontés à des pathologies respiratoires récurrentes ou à des troubles digestifs par rapport aux élevages sans problème (Marlier et *al.*, 2001).

C. Lésions macroscopiques de myxomatose

Les lésions principales sont constituées par les pseudotumeurs myxomateuses, soit aiguës très exsudatives, soit atténuées, peu exsudatives, rapidement densifiées, croûteuses, génératrices, après décrustation, d'une dépilation prolongée. Les « myxomes » sont hémisphériques, mal délimités, enchâssés dans l'épaisseur de la peau et non énucléables. Leur consistance molle et élastique ne constitue qu'un épaissement dermique imprécis et mal délimité. Leur bilatéralité est constante.

A la coupe, le tissu du « myxome » aigu est uniforme, homogène et translucide, brillant, de coloration rose-grisâtre ou franchement rougeâtre selon le degré de vascularisation de la lésion. Après quelques instants, la section devient succulente, miroitante et laisse sourdre un léger exsudat limpide, jaune ou rose. Le myxome subaigu présente un tissu plus dense, à centre dur, peu ou pas exsudatif, surmonté en général d'une croûte noirâtre (Joubert et *al.* 1972).

Les lésions accessoires viscérales confirment la généralisation de la multiplication virale au sein de la plupart des organes internes. Les poumons sont souvent congestionnés avec des hémorragies ponctuées du parenchyme pulmonaire et quelquefois de la trachée, des grosses bronches et des bronchioles. Le foie peut recéler des zones congestives ou dégénérées. La rate est hypertrophiée, de couleur foncée et boueuse à la coupe.

Les noeuds lymphatiques, réactionnels, congestionnés et succulents, montrent des lésions superposables aux lésions spléniques et suggèrent une virulence préférentielle du virus myxomateux vis-à-vis des cellules réticulées ; il en est de même du thymus.

Les testicules sont congestionnés et hypertrophiés. Leurs lésions s'associent à celles des organes génitaux externes (balanite, paraphimosis, épaissement scrotal, nécrose du gland).

Lors de guérison, les séquelles d'orchite mais aussi de métrite et de salpingite, sont responsables d'une baisse considérable de fécondité chez les sujets des deux sexes et d'un retard à la régénération des populations à partir des animaux rescapés des épizooties antérieures (Joubert *et al.* 1972).

Le mécanisme de la mort demeure obscur car les examens au niveau des organes prioritaires ne révèlent ni des lésions incompatibles avec la survie, ni de fortes résorptions toxiques dues aux altérations tissulaires et macrophagiques, sauf pour les souches californiennes qui causent une atteinte considérable du système nerveux central (Joubert *et al.*, 1972).

Pour les formes amygomateuses, les complications respiratoires bactériennes semblent plus fréquentes notamment lorsque l'évolution se prolonge (souches atténuées) ou dans de mauvaises conditions d'hygiène (élevages intensifs). Ainsi, les examens bactériologique et anatomopathologique confirment des lésions de conjonctivite et de rhinite aiguës séreuses évoluant vers une blépharoconjonctivite et une rhinite aiguës mucopurulentes par complications bactériennes. De même, les poumons présentent des lésions de congestion passive et d'hépatisation rouge des lobes apicaux, correspondant à une pneumonie interstitielle aiguë évoluant vers une bronchopneumonie alvéolaire aiguë par complication bactérienne (Marlier *et al.*, 1997).

D. Pathogénie du virus myxomateux chez le lapin européen

Le devenir de l'infection d'un sujet réceptif, est déterminée par trois facteurs : la sensibilité de l'hôte (espèce, lignée, âge, individu), l'infectiosité et la dose virales et enfin les modalités de contagion et de pénétration du virus. La sensibilité de l'hôte tient, tout d'abord, à l'espèce puisque *qu'Oryctolagus* est incomparablement plus sensible que les autres espèces. Elle tient aussi de la lignée car certaines lignées s'avèrent spontanément plus résistantes que d'autres et aussi à l'âge car les lapereaux sont naturellement plus sensibles que les adultes.

Bien que le virus suive la même évolution chez l'hôte quelque soit le degré de virulence de la souche, celui-ci détermine la durée incubatoire. Elle est de 3 à 7 jours pour une souche pleinement active, de 4 à 9 jours pour une même dose de virus atténué. D'autre part, la dose infectante doit être suffisante et dépasser le seuil de multiplication locale initiale.

Dans la nature le mode de contagion ultra-majoritaire est la voie vectorielle par l'intermédiaire de la piqûre d'un arthropode infecté. La voie de pénétration principale est donc l'injection intradermique.

Après un repas sanguin, l'arthropode piqueur permet au virus myxomateux d'infecter directement les cellules du derme, majoritairement les cellules dendritiques, exprimant le CMH-II. Il est clairement établi que ces cellules représentent le site primaire de réplication du virus myxomateux (Best *et al.*, 2000). Le point d'inoculation correspond donc au site de multiplication primaire du virus.

Vingt-quatre heures après inoculation, le virus est détectable au niveau des nœuds lymphatiques drainant le site d'inoculation. A ce niveau, le virus myxomateux infecte majoritairement les lymphocytes T du paracortex du nœud lymphatique entraînant une réduction massive du nombre de lymphocytes T à ce niveau (Best *et al.*, 2000).

Une virémie initiale est détectable à partir du 2^e jour et devient responsable de l'invasion de l'organisme tout entier, principalement le poumon, la rate, les testicules et la peau (site majeur de dissémination, comme la paupière et autres sites cutanéomuqueux), et de la bilatéralité des lésions. Ainsi, alors que l'infection demeure encore totalement silencieuse, le virus est présent dans le sang, les tissus et les organes, les sécrétions ou les excréments et le sujet devient contaminant pour ses congénères et pour les vecteurs.

Le virus n'est pas retrouvé dans le sérum mais dans la fraction des globules blancs (Fenner et Fantini, 1999), ce qui est certainement à mettre en relation avec la prise en charge des virions par les macrophages tissulaires (cellules impliquées dans la dissémination systémique). Le virus myxomateux se réplique donc dans les lymphocytes et les macrophages, cellules exprimant le CMH-II, et le dysfonctionnement de ces cellules-clés du système immunitaire explique le tableau général d'immunodépression caractéristique de la maladie.

Le mécanisme d'apparition du myxome primaire dans les 2 à 3 premiers jours semble mettre en jeu, comme le suggèrent les lésions vasculo-nerveuses du derme, des phénomènes d'allergie non spécifique, peut-être responsables par l'intermédiaire des fibroblastes, du volumineux œdème myxoïde. La lésion est toujours infectante pour le moustique vecteur.

Le 5^e jour suivant l'inoculation, la multiplication du virus s'accroît dans l'organisme et apparaît alors la conjonctivite contemporaine de l'apparition du virus dans les liquides de lavage de la muqueuse oculaire.

Le 6^e jour environ, les manifestations précoces de la généralisation secondaire de la myxomatose se traduisent par l'éruption de résurgence des lésions, constituant la triade classique de la blépharo-conjonctivite, de l'œdème ano-génital et des « myxomes » secondaires » répartis sur le corps.

Tous les tissus et organes internes sont dès le 3^e jour le siège d'une augmentation croissante du titre viral aux sites de multiplication mésoenchymateux internes : noeuds lymphatiques, rate, foie, poumons, surrénales, également cœur et reins où coexistent des lésions spécifiques et des altérations non spécifiques de stase et d'œdème.

Au cours des derniers stades, les symptômes s'aggravent, la multiplication virale s'accroît pour atteindre des titres maximaux le 8^e ou le 9^e jour et baisser ensuite peu avant la mort qui survient donc en 10 jours environ avec 3-4 jours d'incubation et 7-8 jours d'expression clinique, pour les formes aiguës.

Dans les formes subaiguës et atténuées, la séquence des événements et le calendrier du processus demeurent grossièrement identiques, mis à part la période d'incubation et la phase terminale qui sont allongées. Pour les souches atténuées, la virémie est très transitoire, la multiplication virale et la généralisation sont moins intenses, l'atteinte organique est plus lente et étagée.

La guérison définitive ne paraît pas entraîner de portage latent ni d'excrétion virale tardive. Ce qui signifierait que les sujets guéris ne doivent pas être considérés comme un réservoir de virus. Cependant certains auteurs décrivent une recrudescence de signes cliniques suite à une immunodépression et la possibilité de transmettre expérimentalement le virus à partir des paupières (Williams et *al.*, 1972). Lors d'infection par une souche amyxomateuse, le virus actif peut être retrouvé dans les testicules jusqu'à cent jours après infection (Marlier et *al.*, 2000a).

E. Réponse immune suite à une infection par le virus myxomateux

1. Mise en place de la réponse immune

La mise en place de la réponse immune contre le virus myxomateux commence avec l'infection par le virus des cellules dendritiques, dans le derme, et des lymphocytes T au niveau des nœuds lymphatiques drainant.

Les lapins développent des IgM et IgG contre le virus. Si ces anticorps peuvent neutraliser le virus, il apparaît qu'ils ne protègent pas les lapins de la mort, comme en témoignent des expériences d'immunisation passive avec une mortalité observée de 17 lapins sur 20 après transfert d'un sérum contre le virus myxomateux, puis épreuve virale (Fenner et Marshall, 1954). De plus, les vaccins à virus inactivés n'ont pas permis de protéger les lapins contre la myxomatose, alors même que des anticorps étaient produits (Fenner et Ratcliffe, 1965), ceci au contraire des vaccins à virus atténués, qui eux, sont bien protecteurs.

Ces données suggèrent que si des anticorps préexistants peuvent conférer une relative protection, en tout état de cause, les anticorps développés au cours de la maladie ne sont pas une donnée-clé dans la survie des lapins. La réponse à médiation cellulaire est donc plus importante que la réponse humorale dans le contrôle de l'infection par le virus myxomateux.

En effet, la virulence du virus dépend essentiellement de l'infection des cellules initiatrices de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, les cellules dendritiques et les lymphocytes T. L'inflammation est également un phénomène important dans le contrôle de l'infection. Le virus myxomateux possède plusieurs protéines aux propriétés anti-inflammatoires, qui empêchent la mise en place d'une réponse immune à médiation cellulaire efficace (Collin et *al.*, 2005). Ainsi, la résistance génétique constatée chez certaines lignées de lapins serait due à une forte réponse immunitaire innée, autorisant une réponse immunitaire cellulaire efficace (Best et Kerr, 2000).

2. Cinétique des anticorps

Dans les formes atténuées, les diverses réactions sérologiques se positivent dès le 3^e jour (agglutination) et surtout vers le 7^e ou 10^e jour (FC, ELISA) (Joubert et *al.*, 1972).

La persistance des anticorps chez les lapins sauvages guéris de myxomatose varie en fonction du type d'anticorps recherchés et donc de la méthode utilisée. La fixation du complément permet de mettre en évidence une chute des anticorps dans les 6 mois suivants l'infection, tandis que la séroneutralisation montre une persistance des anticorps pendant au moins 20 mois (Fenner et *al.*, 1953). A l'inverse certaines études réalisées avec double immunodiffusion montrent une fluctuation du titre en anticorps avec une décroissance du titre précédant une éventuelle remontée ultérieure (Williams et *al.*, 1973). Enfin, l'ELISA démontre que des animaux sauvages infectés naturellement conservent un titre en anticorps élevé pendant au moins 12 mois et restent séropositifs pendant 2 ans sans fluctuer de positif à négatif (Best, 1997).

Des infections successives, dans une population dont la structure permet un entretien permanent de la circulation virale, permettent le développement d'une réponse immunitaire durable, persistant probablement à vie (Marchandeau et Boucraut-Baralon, 1999).

Pour faire la différence entre une infection récente et une infection plus ancienne, la cinétique des IgM est utile. Le niveau en IgM est haut à partir du 9^e jour après l'infection, soit à peu près au moment où les signes cliniques apparaissent, puis décline et passe en dessous du seuil de détection environ 30 à 37 jours après l'infection. A l'inverse les IgG atteignent leur pic 30 jours post-infection et se maintiennent à un niveau élevé pendant plusieurs mois. Le rapport IgM/IgG constitue ainsi une valeur prédictive du stade d'infection. Un rapport élevé caractérise une infection récente tandis qu'un rapport bas indique que l'on se trouve plutôt en phase de rémission (Best, 1997).

Une étude portant sur cinq années de mesures de titres en anticorps myxomateux de plusieurs populations de lapins en Australie par double immunodiffusion, montre que chez une grande proportion de lapins immuns, les anticorps chutent en dessous du seuil de détection puis remontent plus tard sans l'avènement d'une épizootie de myxomatose observable (Williams *et al.*, 1973). Cette remontée du titre en anticorps suggère une nouvelle stimulation immunitaire pouvant être liée à une réexposition à une souche sauvage très atténuée n'entraînant pas d'épisode clinique observable dans la population. Néanmoins, l'hypothèse d'une infection latente est envisagée. Pour les auteurs, la chute de la réponse immune sous un certain seuil, permettrait une réactivation du virus conservé à l'état latent dans certains tissus, sa multiplication et ainsi une nouvelle stimulation immunitaire expliquant cette remontée du taux d'anticorps (Williams *et al.*, 1972).

La faible sensibilité de l'immunodiffusion pourrait expliquer en partie la fluctuation des titres en anticorps observés. En effet, les statuts sérologiques mesurés par ELISA de lapins sauvages naturellement infectés, restent positifs pendant au moins 2 ans sans fluctuer de positif à négatif (Best, 1997). Les observations épidémiocliniques et sérologiques ne sont donc pas en faveur de l'hypothèse de l'existence de porteurs latents asymptomatiques.

3. Immunité maternelle passive

Les titres en anticorps maternels mesurés par ELISA sont similaires chez tous les lapins d'une même portée mais aussi d'une portée à l'autre chez une lapine donnée (Best, 1997).

L'immunité maternelle transmise est détectable par ELISA chez tous les lapereaux jusqu'à 6 semaines après la naissance (Best, 1997), et peut chez quelques exceptions s'étendre jusqu'à 10 semaines (Bertagnoli, 2007, données non publiées). La séroneutralisation et la fixation du complément donnent des valeurs similaires de 7 semaines (Fenner et *al.*, 1953).

Ces anticorps d'origine maternelle confèrent une protection clinique vis-à-vis de la myxomatose jusqu'à leur disparition. Néanmoins, il semble que dans un milieu à fort risque infectieux, les anticorps maternels n'apportent que peu d'avantages. Une étude portant sur des lapins porteurs d'anticorps maternels élevés depuis la naissance dans des enclos contenant des puces infectées, montre que les premiers symptômes apparaissent en moyenne à 38 jours d'âge avec une souche hypervirulente (Lausanne) et à 36 jours d'âge pour une souche atténuée de terrain (FS/98). L'immunité maternelle transmise ne permet pas d'éviter l'infection mais seulement de la retarder, sans permettre un allongement du temps de survie (Sobey et Conolly, 1975).

F. Epidémiologie de la myxomatose

1. Les sources de virus

a. Les victimes

Les animaux *malades* excrètent des quantités considérables de virus par la peau, souillée d'exsudats en regard des pseudotumeurs, en particulier pour les formes aiguës. Les particules desséchées de squames, d'exsudats ou de croûtes peuvent être contagieuses. L'importance des exsudats est capitale pour la propagation vectorielle, car les moustiques absorbent ces produits virulents tout autant qu'ils piquent pour se nourrir de sang. Le myxome primaire reste toujours contaminant pour l'arthropode vecteur tandis que seulement 15% des myxomes de généralisation sont infectants. Les pseudotumeurs des formes atténuées autocurables, peu exsudatives, rapidement crustacées, représentent une source virulente minime par rapport aux lésions multiples et très virulentes des formes aiguës (Joubert et *al.*, 1972).

Les excréments, urines et excréments, sont porteurs de virus en phase virémique et peuvent polluer le milieu extérieur. Elles peuvent aussi se charger en virus au contact des myxomes de la zone ano-génitale.

En outre, la virémie constitue un aspect de la contagiosité puisqu'elle conditionne, dans une certaine mesure, l'infection des arthropodes vecteurs piqueurs hématophages. Toutefois, l'importance du sang est moindre que celle des exsudats pseudotumoraux, en matière de source d'infection des vecteurs.

Les animaux *porteurs* précoces en phase de virémie antéclinique peuvent être contagieux même si cette phase est réduite du fait de l'apparition rapide des symptômes. Les animaux convalescents constituent également une source de contagion puisqu'ils restent potentiellement porteurs de virus jusqu'à la disparition complète des lésions.

Les *cadavres* de lapins morts de myxomatose, ou abattus suite à la maladie, sont une source abondante de virus. Les myxomes restent adhérents à la peau et laissent une carcasse apparemment saine. La peau demeure porteuse du virus plusieurs mois. Dans la nature, les cadavres peuvent souiller des épines ou des terriers qui contamineront par la suite les garennes.

b. Les réservoirs de virus

Trois entités peuvent être soupçonnées d'être des réservoirs du virus myxomateux : le lapin, le vecteur et le terrier.

Les seuls *lapins* réservoirs correspondent, en Amérique, aux *Sylvilagus*, de sensibilité très affaiblie (Regnery et Miller, 1972). En revanche, *Oryctolagus cuniculus* ne paraît pas, en Australie et en Europe, tenir le rôle de réservoir, car s'y oppose la pleine sensibilité de l'espèce.

Pourtant, les souches de virulence intermédiaire, devenues prédominantes, autorisent une évolution prolongée de la maladie et ainsi un portage prolongé des animaux malades et convalescents. Le lapin *Oryctolagus cuniculus*, est donc considéré comme un réservoir temporaire.

Cependant, s'il est admis généralement qu'il n'y a pas de *porteurs sains* pour l'espèce *Oryctolagus cuniculus*, peu d'études le confirment. L'hypothèse de l'existence de lapins porteurs, guéris de myxomatose, mais conservant le virus latent dans une forme asymptomatique pouvant, sous certaines conditions, se réactiver, se multiplier et devenir transmissible, a été étudié (Williams et al., 1972). D'après les auteurs, des conditions de stress hormonaux, thermiques ou sociaux (surpeuplement) sont capables d'entraîner une réactivation

du virus. L'exposition de vingt lapins rescapés, séropositifs, à des chocs thermiques et hormonaux (injections d'ACTH) n'a permis le développement d'une myxomatose clinique, transmissible à des lapins naïfs, que chez un seul lapin.

De même, les auteurs suggèrent que des fluctuations de titre en anticorps observées sur des lapins sauvages ayant survécu à la myxomatose, pouvaient être expliquées par ce phénomène d'infection latente, autorisant une résurgence virale lorsque les anticorps déclinent (Williams et *al.*, 1973). Ce phénomène de fluctuation de titre d'anticorps a été partiellement démenti avec l'avènement de l'Elisa (Best, 1997).

Ainsi, l'hypothèse que le lapin pourrait simuler un réservoir permanent, grâce à l'infection latente d'un virus myxomateux de basse virulence, avec une excrétion virale régulière ou à éclipses (Joubert et *al.*, 1982), n'a pas été complètement élucidée.

Les *vecteurs* arthropodes piqueurs (moustiques et puces) peuvent jouer le rôle de réservoirs, soit temporaires estivo-automnaux en raison de la brièveté relative de leur infectiosité, soit prolongés hiverno-vernaux lorsque le moustique conserve une infectiosité pendant l'hibernation ou lorsque la puce quiescente hiverne dans le terrier vidé de ses occupants par la maladie.

En période hivernale certaines espèces de moustiques peuvent conserver le virus si elles répondent à certains critères biologiques. Le moustique doit avoir une grande affinité pour le lapin et l'hibernation doit être totale. De plus, un repas sanguin doit être pris juste avant l'entrée en hibernation, lorsqu'une épizootie de myxomatose automnale sévit.

D'autre part, il est nécessaire que les conditions thermiques soient favorables à la conservation du virus.

En France trois moustiques répondent à ces critères (Marbach, 1986) :

- *Anopheles atroparvus* garde une infectiosité en semi-hibernation pendant 220 jours.
- *Anopheles maculipennis* est lui aussi susceptible de prendre un repas sanguin avant son entrée en hibernation. Son comportement endophile lui permettrait de déclencher une enzootie vernale.
- *Culiseta annulata* est semi-hibernant. Il est susceptible de prendre un repas sanguin avant l'entrée en hibernation. Lors d'hivers cléments, l'hibernation peut se rompre, le moustique peut alors se déplacer et prendre un repas sanguin si la température dépasse 6°C. Cette espèce est souvent retrouvée dans les clapiers mais la contamination peut se réaliser dans le milieu extérieur lorsque les lapins de garennes nichent dans les fentes des rochers.

Le couple biologique *terrier-puce* associe un réservoir biologique, la puce spécifique du lapin, et un dépositaire thermo-régulé, le terrier. En effet, un terrier dévasté par la myxomatose reste peuplé de puces infectées quiescentes et la terre elle-même favorise la conservation du virus myxomateux dans un milieu à température constante, à l'abri de la lumière, avec une texture grossière de la terre. Les puces peuvent rester contaminantes pendant environ dix semaines et le virus myxomateux se conserve dans la terre des terriers infectés, pendant 26 mois au moins (Joubert et *al.*, 1974). Le caractère contaminant de terriers infectés, dépourvus d'arthropodes, par fouissement, est démontré (Joubert et *al.*, 1974).

Le terrier du lapin de garenne constitue donc le principal réservoir endogé de virus myxomateux, soit inanimé, par conservation virale prolongée dans la terre elle-même, soit animé, par persistance du virus chez les puces quiescentes (Joubert et *al.*, 1969 ; 1974).

2. Les modes de contagion

Le virus myxomateux ne peut se développer en dehors des cellules de l'animal hôte. La contagion myxomateuse peut se faire de façon directe par effraction du revêtement cutanéomuqueux, par dépôt virulent sur un tégument initialement lésé, ou par la piqûre inoculatrice d'un agent animé ou inerte.

a. La contagion directe

Le *contact immédiat*, d'efficacité générale très réduite, consiste dans le dépôt d'un produit pathologique pollué sur la peau ou les muqueuses saines ou érodées. Il est soumis avant tout à la richesse en virus de la lésion, dont les formes très exsudatives aiguës, mortelles priment de très loin sur les formes peu exsudatives ou coûteuses de la myxomatose spontanément atténuée.

La simple cohabitation d'un lapin malade avec un lapin indemne à peau et muqueuses saines conduit le plus souvent à l'échec. Cependant, le contact des muqueuses avec les exsudats très riches en virus d'un lapin malade suffit à la transmission du virus.

La voie anale par contact avec une litière infectée est peu ou pas efficace de même que la voie orale naturelle.

La voie oculaire ou nasale s'observe lors du fouissement d'un lapin de garenne dans un terrier infecté ou lors de microtraumatismes oculaires au moment du toilettage, avec des griffes infectées par de la terre contaminée (Joubert et *al.*, 1974).

La voie respiratoire est relativement efficace. Au laboratoire, un lapin sain soumis à une atmosphère riche en virus contracte la myxomatose, en l'absence de tout vecteur. Ceci s'observe dans les élevages industriels bien protégés, où la concentration animale est importante dans des locaux mal ventilés, l'ammoniacque fragilisant les voies respiratoires, ou pour le lapin de garenne en terrier avec un aérosol riche en virus.

La voie génitale est un moyen possible de contamination. Le risque est élevé, en raison de la haute activité sexuelle du lapin et aussi de sa forte prolificité, qui multiplie les contacts entre mâles et femelles, entre lapine et portée à l'allaitement. Les mâles transmettent la maladie dans les élevages et les terriers dans la mesure où la douleur n'empêche pas le coït, les lésions génitales étant riches en virus. Dans les garennes, l'activité sexuelle s'accompagne de combats entre mâles qui provoquent des lésions cutanées et favorisent la transmission du virus.

L'inoculation *médiate et différée* s'opère par vecteurs inanimés. Dans la nature, un lapin myxomateux peut déposer du virus sur des végétaux épineux qui contamineront par la suite d'autres lapins. Le commerce de peaux contaminées, les fourrages ramassés en zone atteinte, les griffes des prédateurs, sont autant de moyens de contamination et de dissémination virale dont le rôle est difficile à mesurer (Joubert et *al.*, 1972).

b. La transmission indirecte vectorielle par les arthropodes

La transmission de la myxomatose par piqûre d'arthropode se révèle le fondement même de la transmission et de l'entretien du virus, tant chez les garennes qu'en élevage traditionnel. En élevage industriel, la prédominance de la contagion est la contamination directe, la protection contre les vecteurs étant importante.

Les Culicidés, les Siphonaptères et les Simulidés sont les principaux vecteurs, les poux, les tiques et les acariens ne jouent qu'un rôle accessoire.

*** Les culicidés**

Les moustiques sont généralement les principaux vecteurs de la myxomatose, notamment en Australie et en France. Ils sont responsables d'une transmission exclusivement mécanique et horizontale de la myxomatose. Il n'y a pas de multiplication virale chez le vecteur ni de transmission verticale à la descendance.

Chez les culicidés, le comportement de piqûre est lié au cycle ovarien et par conséquent est spécifique des femelles.

Les modalités de l'infection du moustique diffèrent selon le lieu de la piqûre et le stade évolutif de la maladie de l'hôte. Le vecteur peut, en effet, théoriquement s'infecter soit à la suite d'un repas sanguin pris en phase virémique, soit par piqûre sur des « myxomes » exsudatifs, à un degré moindre sur des « myxomes » autoturables. En réalité, la part de responsabilité du sang virémique dans l'infection du moustique est minime par rapport à celle des exsudats cutanés virulents.

Le titre viral au niveau des myxomes céphaliques sur lesquels le moustique pique préférentiellement, doit être suffisant pour rendre le moustique infectant. Les « myxomes » très exsudatifs des formes cliniques aiguës sont très riches en virus et demeurent infectants pendant la semaine de survie du sujet, tandis que les pseudotumeurs des formes subaiguës sont moins exsudatives, moins riches en virus mais peuvent rester infectantes pour le moustique pendant 2 à 3 semaines (Joubert et *al.*, 1972). La quantité virale ingérée dépend aussi de la forme et de la taille des stylets buccaux, ce qui explique que certains moustiques sont des vecteurs plus efficaces que d'autres. En effet, des pièces buccales de grande taille et un nombre de dents des maxilles important favorisent une forte absorption de virions. La quantité de virus absorbée lors d'un repas sur les lésions cutanées d'un lapin infecté varie entre 10 et 2000 unités infectieuses, la charge moyenne étant de 100 unités infectieuses (Fenner et Ratcliffe, 1965).

La fréquence des repas sanguins peut également jouer sur l'infection du moustique même si, en théorie, un seul repas, même interrompu, suffit à rendre le moustique infectant.

L'infection du moustique est également dépendante de la rencontre avec un lapin infecté. Chez les garennes, l'activité maximale se situant au crépuscule et à l'aube et d'avril à octobre, les moustiques ayant les mêmes heures de sortie nyctémérales seront plus aptes à se contaminer. De même, une faible hauteur de vol est un facteur favorisant. Enfin, le comportement endophile ou exophile du moustique détermine le type de lapin piqué.

A la suite du repas infectant, le moustique est immédiatement mais transitoirement infectant et se comporte comme une « aiguille ailée ». Une partie du virus transite dans l'intestin sans se multiplier et est éliminée avec le sang digéré dans les excréments. Une partie importante du virus reste sur les pièces buccales où il est conservé et protégé par des protéines provenant des exsudats myxomateux. La mort de l'insecte entraîne une destruction rapide du virus en quelques jours (Joubert et *al.*, 1972).

La possibilité de transmettre l'infection décroît à chaque piqûre. Environ 2 % des particules virales sont inoculées à chaque piqûre (Marbach, 1986). Le délai d'infectiosité en dehors de la diapause est de l'ordre d'un mois (Joubert et *al.*, 1972).

La contamination d'un nouvel hôte par le vecteur dépend du taux de survie du vecteur, de la possibilité de rencontre avec le lapin sain et de la quantité de virus inoculé.

Le moustique est insensible au virus, il transmet indifféremment les diverses souches virales. Cependant, il a été démontré que les moustiques jouent un rôle majeur dans la sélection de souches de virulence intermédiaire. En effet, on sait qu'un fort titre viral est requis au niveau de la peau du lapin infecté pour rendre le moustique infectant. Or les lapins infectés par une souche hypervirulente (grade I et II) sont ceux qui ont le temps de survie le plus court et meurent quelques jours seulement après que les titres viraux aient atteints le seuil nécessaire. A l'inverse, les lapins touchés par des souches fortement atténuées (grade V) survivent longtemps mais le titre viral cutané n'atteint des valeurs élevées que très brièvement avant de redescendre. Finalement, les lapins infectés par les souches modérément atténuées (grade III et IV) présentent une combinaison d'un temps de survie prolongé avec un haut titre viral cutané. Ces lapins constituent donc la plus grande source d'infection pour les moustiques et les souches de virulence intermédiaire sont plus facilement transmises sur le terrain et deviennent dominantes (Fenner et *al.*, 1956 ; Mead-Briggs et Vaughan, 1975).

Ainsi, plusieurs types de moustiques jouent des rôles épidémiologiques différents.

Les vecteurs « estivaux épizootiques à distance » sont de bons voiliers, avec une population maximale l'été et un nombre de cycles gonotrophiques importants. Ils assurent la contagion de la myxomatose à longue distance lors des épizooties estivo-automnales. Il leur faut beaucoup d'humidité pour se développer. Ce sont les moustiques du genre *Aedes* tels que *Aedes caspius* et *Aedes detritus* en Camargue (Joubert et *al.*, 1967) mais aussi *Aedes vexans*, *Aedes sticticus* et *Aedes cinereus*. Normalement exophiles, ils peuvent éventuellement pratiquer l'endophilie.

Les vecteurs « densificateurs sur place » sont de mauvais voiliers, à comportement endophile. Ils assurent la propagation de la myxomatose entre les garennes et entre les lapins domestiques au sein du clapier, en relayant les vecteurs estivaux épizootiques (Joubert et *al.*, 1967). Il s'agit principalement d'*Anopheles maculipennis*, *Culex pipiens* et de *Culiseta annulata*. Ce dernier a des mœurs pholéophiles qui lui confèrent la possibilité de piquer les garennes nichant dans les failles des rochers (Marbach, 1986).

Les précurseurs d'une épizootie hiverno-vernale, *Culiseta annulata* et *Anopheles maculipennis* conservent, lors de la diapause hivernale, le virus sur leurs pièces buccales. Lors d'hivers cléments, ou de printemps précoces, il y a reprise d'activité de l'insecte avec existence d'un cycle gonotrophique qui entraîne un repas sanguin. Ils participent alors aux oligozooties hivernales et à la conservation hiverno-vernale du virus dans certaines régions.

*** Les siphonaptères**

Deux puces sont susceptibles de parasiter le lapin : *Spilopsyllus cuniculi* et *Ctenocephalides felis*. Le virus est prélevé au cours d'un repas sur les exsudats cutanés, plutôt que dans le sang, et persiste localement sur les pièces buccales. Comme pour les moustiques la puce transmet mécaniquement et horizontalement le virus par inoculation lors de piqûres ultérieures.

En Grande Bretagne la puce du lapin européen *Spilopsyllus cuniculi* est considérée comme le principal vecteur de myxomatose (Lockley, 1954) même si les moustiques peuvent jouer un rôle dans certains cas. L'étude de la transmission de souches de virus myxomateux de différents grades de virulence par la puce (Mead-Briggs et Vaughan, 1975), a montré que les lapins atteints de souche hypervirulente (grade I), ainsi que ceux atteints de souches atténuées (grade V), ne sont porteurs que de peu de puces infectées (respectivement 12% et 8%). A contrario, les lapins infectés par une souche modérément atténuée (IIIA et IIIB) sont porteurs de la plus grosse proportion de puces infectées (42%). Ainsi, comme en Australie et en France, les souches de moyenne virulence sont devenues prédominantes en Grande Bretagne.

Spilopsyllus cuniculi a été introduite en Australie en 1966 en vue de favoriser la transmission de souches virulentes de myxomatose au sein des populations de garennes. En effet, les moustiques se sont rapidement révélés comme n'étant pas les vecteurs de myxomatose idéaux pour contrôler efficacement les populations de lapins de garennes. Ils sélectionnent les souches de moyenne virulence et sont de médiocres réservoirs pour la conservation hivernale du virus, ce qui est préjudiciable pour maintenir des épizooties majeures et fréquentes. Les scientifiques australiens ont donc introduit la puce car c'est un vecteur moins soumis aux variations saisonnières et géographiques que les moustiques.

La puce s'est rapidement établie dans les populations de lapins sauvages et la transmission effective de la myxomatose par les puces a été démontrée (Sobey et Conolly, 1971). La puce permet notamment de favoriser la transmission et la persistance de la souche virulente Lausanne pendant au moins seize semaines (Rosamond et *al.*, 1977), et de maintenir des populations de lapins à des niveaux assez bas, malgré des saisons de mises bas normales.

D'autre part, l'introduction de la puce coïncide avec l'apparition d'épizooties hiverno-vernales en Australie. La sévérité de ces épizooties est variable et peut aller jusqu'à l'effacement total de l'augmentation de la population de lapins classiquement observée au printemps, ou à l'inverse passer totalement inaperçue lorsque la saison de reproduction se prolonge (Rosamond et *al.*, 1978). Les premiers résultats observés étant favorables, des méthodes d'élevage de puces à grande échelle sont mises au point (Sobey et *al.*, 1974).

En France, la puce joue un rôle important dans l'entretien hiverno-vernal de la myxomatose oligozootique en microfoyers invétérés permanents. En effet, le broyat de puces quiescentes retrouvés en hiver dans les terriers « morts » se révèle riche en virus myxomateux (Joubert et *al.*, 1969). Les puces restent donc quiescentes plusieurs mois dans les terriers dévastés tout en conservant le virus actif sur les pièces buccales. La recolonisation des garennes entraîne la reprise d'activité des puces et la transmission du virus lors de piqûres ultérieures et ce de manière décroissante (*myxomatose d'inoculation*).

De surcroît, le virus myxomateux sans support, est directement retrouvé dans la terre des terriers dévastés par la myxomatose. La présence du virus dans les déjections de puces et la dégradation des puces elles-mêmes autorisent la contamination de la terre. La structure de ce refuge endogé permet une conservation du virus au cours de l'hiver. Lors de la recolonisation du terrier, le nouvel hôte se contamine directement en creusant les nouvelles galeries et lors de la toilette avec ses griffes souillées (*myxomatose de fouissement*).

La puce participe donc à la pérennité de la myxomatose pendant l'hiver par l'intermédiaire de l'amorçage d'une maladie vernale tant par une myxomatose d'inoculation par la puce, que par une myxomatose de fouissement due à la contamination directe par la terre polluée (Joubert et *al.*, 1969 ; Joubert et *al.*, 1974).

En outre, au cours des épizooties estivo-automnales elles diffusent la maladie au sein des terriers ou des élevages mais leur importance est moindre car bien que présente toute l'année *Spilopsyllus cuniculi* est surtout abondante les mois d'hiver.

La puce participe peu à la propagation de la maladie dans l'espace car elle est relativement fidèle à son hôte et ne le quitte le plus souvent que quelques jours après sa mort.

De plus, le cycle reproducteur de la puce dépend directement de celui de l'hôte, notamment des hormones produites par la lapine gravide (Sobey et *al.*, 1974), l'extension de la population de puces reste donc limitée à la garenne, voire au terrier d'origine. Ce sont donc des « densificateurs sur place ». Néanmoins, certains auteurs évoquent la possibilité du rôle de la puce dans l'extension de la myxomatose sur de longues distances par l'intermédiaire d'oiseaux migrateurs (Lockley, 1954) ou d'autres hôtes transitoires, mais cela semble rester exceptionnel.

*** Les Simulidés**

Deux espèces interviennent en France : *Tetisimulium bezzii* et *Odagnia* groupe *ornatum*.

Une étude a prouvé le rôle des simulies dans la propagation du virus myxomateux au cours d'enzooties régionales en Haute-Provence lors d'hivers doux et cléments (Joubert et Prave, 1972). Les broyats de simulies adultes, capturés en janvier et en février (1969 et 1972), révèlent la présence du virus, après inoculation à des lapins neufs.

Lors d'une deuxième étude menée en laboratoire, des lapins inoculés sont mis en contact étroit avec des lapins neufs deux à deux, en présence de simulies (Joubert et Monnet, 1975). Les lapins neufs ont présenté, en moyenne, les premiers myxomes céphaliques après six jours d'incubation et sont morts douze jours après le lâcher des insectes. Les simulies jouent donc le rôle de vecteurs mécaniques par souillure des pièces buccales, sans transmission ovarienne.

Les femelles hématophages, fortement attirées par les lapins, piquent préférentiellement sur les téguments fins et richement vascularisés : pourtour des yeux, des oreilles, des organes génitaux, c'est-à-dire aux endroits où les premiers « myxomes » se manifestent chez le lapin. Les larves puis les nymphes issues de l'éclosion des oeufs pondus en eaux vives, restent sédentaires dans les torrents, puis donnent l'adulte en cinq à six semaines durant la belle saison. Les pontes d'automne fournissent des larves qui vont hiberner et ce n'est que cinq à six mois plus tard que naissent les premiers imagos, dès que les conditions thermiques sont satisfaisantes.

Aussi, les hivers doux et les printemps prématurés sont-ils peuplés d'une génération précoce d'adultes aptes à amorcer, dès janvier ou février, une enzootie hiverno-vernale de myxomatose à partir de quelques cas initiaux déclenchés en terrier par fouissement ou par piquûre de puces quiescentes (Joubert et Monnet, 1975).

De plus, dans les régions pauvres en moustiques et aux conditions météorologiques favorables à leur développement, les simulies semblent aptes non seulement à amorcer des enzooties hivernales par temps doux et humide ou à réamorcer l'épizootie de myxomatose vernale, mais encore à supplanter en grande partie les moustiques dans leur rôle vectoriel majeur (Joubert et Monnet., 1975).

Enfin, le rôle des simulies précoces de fin d'hiver rend plus intelligible celui d'entretien hivernal du virus par les puces. En effet, seules les jeunes puces adultes n'ayant pris encore aucun repas après l'éclosion peuvent demeurer longtemps vivantes, alors que les puces déjà infectées sur lapin myxomateux ne sauraient survivre pendant tout l'hiver, jusqu'au retour des moustiques. Les simulies serviraient donc d'amorçage vernal de la myxomatose oligozootique, avec ou non relais ultérieur par les moustiques, et rendraient efficace le rôle des puces (Joubert et Monnet, 1975).

*** Les poux et les tiques**

Haemodipsus ventricosus, le pou parasite du lapin, est un vecteur très peu fiable car peu mobile et nécessitant un contact étroit entre les lapins pour changer d'hôte (Marbach, 1986).

Les tiques *Ixodes festai* et *Rhipicephalus sanguineus* ne jouent qu'un rôle accessoire dans la transmission du virus myxomateux. La contamination des tiques se fait uniquement lors de la phase virémique, la tique ne piquant pas sur les myxomes.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse du rôle de la tique *Rhipicephalus sanguineus* dans la transmission et la conservation du virus de la myxomatose au Maroc (Blanc et Ascione, 1961). Les Rhipicéphales pris sur des lapins atteints de myxomatose, broyés et inoculés à des lapins neufs se sont révélés infectants à tous les stades (larve, nymphe et adulte).

D'autre part, les Rhipicéphales nourris à l'état de larves sur les lapins atteints de myxomatose s'infectent, et l'infection persiste à l'état nymphal et à l'état adulte. En effet, l'inoculation à des lapins neufs de broyat de chaque stade de tique, engendre une myxomatose clinique. Cependant, tous les essais de transmission par des tiques infectées à l'état larvaire et placés ensuite, à tous les stades, sur des lapins neufs se sont révélés infructueux.

Le rôle des tiques dans la transmission et la conservation du virus semble donc minime, voire nul, en raison de l'impossibilité pour le virus ingéré de réinfecter les pièces buccales après la mue (Joubert et al., 1969) : l'infectiosité ne dure que jusqu'à la mue.

3. Réceptivité et sensibilité intrinsèque de l'hôte

L'aptitude de l'hôte à laisser l'agent infectieux se multiplier à une dose infectante donnée dépend de facteurs d'espèce et de lignée. Seuls sont réceptifs les Lagomorphes domestiques et sauvages, mais avec des variations entre espèces puisque la réceptivité et la sensibilité d'*Oryctolagus* sont très supérieures à celles de *Lepus* et surtout de *Sylvilagus* qui ne présente qu'une maladie bénigne autocurable. La lignée semble occuper chez les lapins de garennes, une place importante dans l'acquisition d'une résistance spontanée, probablement d'ordre génétique, nécessaire au développement d'une myxomatose nodulaire guérissable (Ross et Sanders 1877 ; 1984).

L'âge entre en jeu également. Les lapereaux issus de mères vaccinées ou guéries de myxomatose bénéficient d'une immunité maternelle spécifique pendant au moins 6 semaines (Best, 1997). Par contre, le lapereau de moins de trois semaines, qui n'a aucune immunité, est plus sensible qu'un adulte à dose virale identique, même atténuée.

La race et le sexe ne jouent pas de rôle significatif dans la réceptivité et la sensibilité de l'hôte. Les femelles gravides paraissent nettement moins sensibles et développent des pseudotumeurs et des lésions viscérales moins graves ; toutefois elles avortent fréquemment et l'évolution mortelle demeure inchangée (Joubert et *al.*, 1972).

4. Cycle épidémiologique et saisonnalité de la myxomatose

Les épidémies dévastatrices des années 50 ont laissé place actuellement à une maladie qui évolue plutôt de manière enzootique dont l'expression clinique se traduit par des micro-épizooties régionales et saisonnières. Les variations saisonnières et annuelles constatées sur le terrain sont la résultante de l'interaction de 3 éléments : l'abondance des lapins, leur état immunologique et l'abondance et la diversité des vecteurs du virus (Arthur et Louzis, 1988).

Dans les régions tempérées de l'hémisphère nord la saison de reproduction des lapins de garenne s'étale généralement de janvier à juin voire jusqu'en septembre les années fastes. La naissance des lapereaux entraîne une augmentation considérable du nombre de lapins sensibles à la myxomatose en fin de période de mises bas. Ceci explique que les mois de la fin de l'été et du début de l'automne sont très favorables à l'apparition de flambées épizootiques de myxomatose. En effet, outre la pullulation importante de moustiques à cette saison, les populations sont constituées majoritairement de jeunes n'ayant jamais été exposés au virus et

les densités y sont les plus fortes, ce qui offre au virus les meilleures conditions de contagion (Marchandeau et al., 1999).

Les variations annuelles des taux de morbidité et mortalité sont aussi sous la dépendance de facteurs climatiques, les années humides favorisant la pullulation des moustiques et la diffusion de la maladie tandis que les années chaudes favorisent la guérison rapide des lapins (Fenner et Ratcliffe, 1965) et limitent le développement des vecteurs.

Les épizooties estivo-automnales se propagent donc par l'intermédiaire des moustiques exophiles et bons voiliers. Les simulies interviennent surtout lors d'épizooties printanières qui surviennent souvent après une année sans myxomatose. Elles touchent essentiellement de jeunes adultes qui ne se sont pas immunisés au stade juvénile l'été précédent et se révèlent alors dangereuses pour la population car elles peuvent compromettre la saison de reproduction (Joubert et Monnet, 1975). A la fin de l'automne, en hiver et en tout début de printemps, la myxomatose est véhiculée essentiellement par la puce du lapin (*Spilopsyllus cuniculi*) qui peut provoquer ponctuellement des enzooties hivernales. Les puces quiescentes et les terriers dévastés constituent le principal réservoir de virus permettant ainsi sa conservation au cours de l'hiver (Joubert et al., 1969 ; 1974).

G. Prophylaxie de la myxomatose

1. Prophylaxie sanitaire

La lutte contre le réservoir du virus est centrée sur la destruction des terriers infectés, dépositaires inertes de virus et support d'arthropodes infectés, des puces quiescentes et parfois des moustiques semi hibernants en diapause (Joubert et al., 1972).

En secteur de myxomatose invétérée, l'explosion des terriers par mines agricoles, supprime l'infection, aère les ronciers et les fourrés, gîtes de vecteurs, et complète le débroussaillage des haies en réduisant les végétaux épineux le long des coulées et ainsi les risques de contamination par piqûres de végétaux vulnérants souillés. L'opération doit s'assurer de la vacuité de la garenne (furetage) et se terminer avant la période de reproduction. Les lapins autochtones ou lâchés reconstituent rapidement d'autres garennes vierges.

La destruction des lapins malades, directement contaminants et surtout relais amplificateurs pour les vecteurs, constitue une mesure importante mais en épargnant les sujets atteints de formes croûteuses atténuées, qui formeront le noyau de régénération des garennes en raison de l'immunité spécifique ainsi conférée. En outre, l'excrétion virale par les porteurs convalescents sert aussi la cause de la régénération des garennes car elle enrichit le milieu en souches de faible virulence et favorise ainsi l'acquisition d'une immunité spécifique.

La lutte contre les lapins malades se réduit donc à la capture des lapins atteints d'une forme aiguë de myxomatose, à leur sacrifice et à la destruction de leurs cadavres par incinération ou enfouissement profond entre deux couches de chaux, à l'abri de toute exhumation.

La lutte contre les vecteurs (puces, moustiques, simulies) consiste dans la nature à renforcer et à étendre la démoustication régionale opérée dans un dessein de lutte contre les nuisances humaines. Le résultat obtenu par la démoustication dans certaines régions françaises a été très favorable notamment en Camargue et dans le Languedoc (Joubert *et al.*, 1982). En élevage, les protections mécaniques (moustiquaires) et chimiques (épuçage, désinsectisation) s'inscrivent, au premier chef, dans la liste des exigences hygiéniques de l'élevage du lapin.

Toutefois, en aucun cas la lutte contre les sources de virus et les vecteurs n'autorise l'espoir d'une éradication de la myxomatose sauvage. Elle vise seulement la limitation d'explosions épizootiques ultérieures et l'infléchissement vers un équilibre biologique favorable, impliquant le développement d'une myxomatose à virus atténués, sélectionnés par les moustiques, et la progressive émergence de lapins plus résistants, ainsi que l'accroissement du taux d'immunité post-infectieuse acquise spontanément (Joubert *et al.*, 1982).

2. Prophylaxie médicale

a. Vaccination hétérologue par fibromatation

Le virus du fibrome de Shope, ou virus fibromateux, *Leporipoxvirus* très proche du virus myxomateux par ses propriétés viro-immunologiques, a été utilisé le premier et pendant des dizaines d'années.

Ce vaccin vivant hétérologue peut être utilisé à partir de 28 jours d'âge, par voie sous-cutanée à la dose de 0,5 ml par lapin (Lyomyxovax[®]), ou par injection intradermique au dermojet à la dose de 0,1 mL par lapin (Dermyxovax[®]). Ces deux spécialités commerciales sont dosées à plus de 2,7 log₁₀ DICCC50 par dose. L'injection intradermique confère une meilleure réponse immunitaire et donc une meilleure protection clinique que l'injection sous-cutanée. Les rappels sont effectués bisemestriellement ou semestriellement selon le risque.

L'immunité paraspécifique post-vaccinale commence dès le 5^e jour, pour atteindre son taux maximal le 8^e jour et persister pendant au moins 6 mois (Arthur et Louzis, 1988). La précocité de l'installation immunitaire paraît relever plus d'une interférence virale paraspécifique, par occupation de certains sites cellulaires réceptifs, que par l'apparition d'anticorps spécifiques sériques (Joubert et *al.*, 1972).

L'avantage de ce vaccin réside dans son innocuité, notamment il ne provoque qu'une immunodépression minime et peut être utilisé dans les élevages à pathologies respiratoires. Toutefois, il ne doit pas être utilisé sur des sujets trop jeunes qui sont hyperréceptifs au virus fibromateux et qui pourraient déclarer une fibromatose généralisée et en mourir. Le taux élevé en corticoïdes lors de la gestation peut stimuler la lésion fibromateuse provoquée (Joubert et *al.*, 1972).

Par contre, ce vaccin ne confère qu'une protection vaccinale partielle qui est due à la paraspécificité, toujours inférieure à la spécificité homologe. Une étude récente testant ce vaccin seul en mono-injection, sur deux souches hypervirulentes, l'une amyxomateuse (MYX 254/95) et l'autre nodulaire (T1), montre une efficacité très réduite. Les auteurs ne mettent pas en évidence de différences significatives entre les animaux témoins et les animaux vaccinés en ce qui concerne le taux de survie, le temps moyen de survie et le temps moyen d'apparition des signes cliniques (Marlier et *al.*, 2000a). Bien que très fréquemment utilisé en élevage, ce vaccin n'apporte qu'une protection très relative, insuffisante face à des souches de forte virulence, même si les souches sauvages susceptibles d'être rencontrées sur le terrain sont de virulence intermédiaire.

b. Vaccination homologe par le virus modifié SG33

En vue de pallier l'activité antimyxomateuse contestable du virus du fibrome de Shope, il était tentant de reproduire artificiellement l'immunité spontanée découlant d'une atteinte de myxomatose atténuée, tout en supprimant ses répercussions sur la fonction reproductrice.

Le virus modifié SG33 mis au point à l'ENVT en 1978 est un mutant thermosensible atténué par passage en séries sur cultures cellulaires et adaptation à la température de 33°C (Saurat et *al.*, 1978). Sous sa forme commerciale actuelle (Dervaximyxo®SG33), ce vaccin est utilisé par injection intradermique à l'oreille au dermojet d'une dose de 0,1 ml (>2,7 log₁₀ DICCC50 par dose) par lapin. La primovaccination se fait en injection unique, ou six semaines après une première injection du vaccin hétérologue par voie intradermique. Il est conseillé de réaliser les rappels tous les quatre mois.

L'immunité conférée par ce vaccin est d'apparition précoce (3 jours) et durable pendant 6 mois à 1 an. Lors de mono-injection, la protection est très satisfaisante pendant 6 mois et la résistance devient insuffisante devant une épreuve expérimentale sévère à partir du 8^e mois. Avec deux injections à 6 semaines d'intervalle, la protection est prolongée jusqu'à un an avec une efficacité optimale jusqu'à 8 mois (Saurat et *al.*, 1978). D'autre part, le suivi clinique et sérologique de lapereaux immunisés en injection unique à l'âge de 4 à 6 semaines, montre que les anticorps apparaissent à partir du 7^e jour et persistent pendant au moins 9 semaines tandis que la protection clinique est efficace à partir du 7^e jour et pendant au moins 6 semaines après la vaccination (Picavet et *al.*, 1989).

L'innocuité de ce vaccin, contrairement au virus fibromateux, n'est pas fiable à 100 %. Des signes bénins de myxomatose avec quelques lésions de petite taille au niveau des yeux, des oreilles ou des organes génitaux, éventuellement associées à une conjonctivite et un œdème des paupières, sont possibles (Picavet et *al.*, 1992).

En outre, le choc vaccinal immuno-dépressif, consécutif à toute administration de virus modifié à pouvoir pathogène notable, a pu, dans les élevages concentrés avec de mauvaises conditions hygiéniques, rompre l'équilibre précaire entre l'hôte et des bactérioses respiratoires de portage ou d'évolution à bas bruit (Arthur et Louzis, 1988). Ces bactérioses révélées et stimulées par la vaccination ont provoqué de fâcheux pseudo-accidents rappelant les formes cliniques dues aux virus myxomateux sauvages amyxomateux et pneumotropes (Brun et *al.*, 1981).

Ainsi, en élevage, le protocole vaccinal recommandé consiste à réaliser une première injection fibromateuse, fondant ainsi une protection relative initiale, en elle-même insuffisante mais inoffensive, puis un rappel six semaines après avec le vaccin SG33. La fibromatose vaccinale initiale permet d'empêcher une mobilisation exagérée des défenses par le SG33 (Joubert et *al.*, 1982). Cette deuxième injection peut être réalisée trois semaines seulement après la fibromatisation pour les élevages à risque élevé d'infection (Marlier et *al.*, 2000a).

Les rappels ultérieurs sont réalisés avec le vaccin SG33 tous les 6 mois.

Ce dernier protocole, testé face à deux souches hypervirulentes démontre une efficacité très satisfaisante vis-à-vis d'une souche nodulaire (T1) ou d'une souche amygomateuse (MYX 254/95). Toutefois, même si le taux et le temps moyen de survie sont corrects, ce protocole n'empêche pas l'apparition de formes cliniques atténuées sur plusieurs lapins et même de la mortalité (2/10) avec le virus T1.

Il permet également de réduire significativement les lésions pulmonaires et les infections bactériennes secondaires chez les lapins survivants. De plus le nombre de prélèvements de paupières et de testicules porteurs du virus est également diminué ainsi que le titre viral des exsudats naso-conjonctivaux (Marlier et *al.*, 2000b).

3. Lâchers de lapins non sensibles

Le lâcher, au printemps, de sujets d'élevage vaccinés, ne permet pas de protéger une population suffisamment nombreuse de garennes. Ces lapins ne restent immunisés que quatre à six mois et sont moins aptes à se défendre que les garennes sauvages (Marbach, 1986). En outre, il semble que cette méthode soit même préjudiciable dans la mesure où ces lapins, impropres à la repopulation des garennes, enrichissent le taux des prédateurs au détriment de la chasse, et surtout risquent d'entraîner une pollution génétique du noyau autochtone par hybridation (Joubert et *al.*, 1982).

La capture de lapins sauvages en vue de leur vaccination avant de les relâcher engendre des effets néfastes à court terme liés au stress de la capture et de la manipulation qui se surajoutent aux effets nuisibles de la vaccination. On constate une surmortalité des jeunes et des sub-adultes dans la première semaine suivant le lâcher (Calvete et *al.*, 2004a). Par contre, à long terme, la vaccination apporte un bénéfice évident des lapins vaccinés par rapport aux lapins non vaccinés, notamment en matière de taux de mortalité. Cependant, l'effet intrinsèque de la vaccination est difficilement quantifiable, étant donné les interactions de la myxomatose avec les autres causes de mortalité des lapins, notamment la prédation (Calvete et *al.*, 2004b). De même, les effets collectifs à très long terme de la vaccination de quelques individus sur une population n'ont pour l'instant pas été analysés.

D'autre part, malgré l'existence d'un vaccin recombinant apportant une protection efficace et durable à la fois contre la myxomatose et la VHD, celui-ci n'est pas utilisable sur le terrain.

Enfin, une large introduction de *Sylvilagus*, comme cela a été essayé en Italie, pourrait compromettre la régénération des garennes car l'espèce se révèle très compétitive d'*Oryctolagus* en l'absence de pression myxomateuse.

III. Conséquences de la myxomatose sur la biocénose

A. Conséquences historiques de la myxomatose

En Australie, au cours de l'épidémie initiale de l'été 1950-1951, la myxomatose a tué environ 99,8 % des animaux infectés et la plupart des populations ont été réduites de plus de 90%. De même, en France, l'épizootie de la myxomatose en 1952 et 1953 a provoqué de façon générale une très forte mortalité dans les populations de lapins de garenne où elle a sévi. Dans la plupart des cas, cette mortalité a atteint, et le plus souvent dépassé, le chiffre de 95 %. Ce n'est guère que dans les biotopes très peu favorables au lapin, où la densité de population était très faible et où les colonies étaient très isolées les unes des autres que l'on a pu observer des mortalités moins importantes.

Après l'irruption de la maladie, il est apparu rapidement qu'elle était capable de persister à l'état enzootique et que d'autre part, une faible, mais nette remontée des populations après la dévastation s'est enclenchée (Giban, 1956).

La réduction importante de la population de lapins au début des années 50 a eu des conséquences écologiques remarquables sur la faune et la flore.

Au niveau de la faune, elle s'est accompagnée d'une modification des chaînes alimentaires dans les biocénoses où ces lagomorphes constituaient un élément important du régime des vertébrés prédateurs (mammifères et oiseaux). Dans les régions où ils se nourrissaient surtout de lapins, les renards ont adapté leur régime alimentaire aux dépens des oiseaux, des poissons, des mulots, des campagnols, des volailles, des agneaux voire des faons de chevreuils. Parallèlement une baisse de la fécondité du renard a été notée. En Europe, une réduction nette de la fécondité de la buse (*Buteo buteo*) a également été observée (Bourlière, 1956 ; Lockley, 1956). Globalement, la grande diminution du nombre des lapins a entraîné une réduction, par les prédateurs, des populations de tous les autres petits mammifères restants (Bourlière, 1956).

L'amélioration immédiate, quantitative et qualitative de la végétation herbacée, résultant de la suppression du lapin, cause de surpâturage et d'érosion, a été bénéfique pour certaines espèces, notamment les cerfs et les lièvres. Toutefois ce sont plutôt les ruminants sauvages et domestiques qui ont été le plus favorisés par la repousse d'herbe (Lockley, 1956).

Les modifications de la végétation consécutive à la disparition des lapins dans les années 50 en Australie et en Europe ont été rapides et spectaculaires.

Avant l'épidémie, les régions où la densité de lapins était très forte, voyaient leur paysage végétal profondément altéré. Dans les forêts françaises, le lapin pratiquait un véritable pâturage sélectif, rongant les jeunes semis, pousses et rejets de chêne, de hêtre, de charme et même de résineux, en épargnant relativement le châtaignier, le bouleau, le tremble et le tilleul. Lors de surpopulation prolongée, la régénération devenant impossible, seuls les vieux arbres persistaient, les graminées broutées prenaient l'aspect d'une pelouse, le sol se dégradait lentement et la lande à callune ou à molinie, parsemée de bouleaux et de trembles, s'installait peu à peu.

Après l'introduction de la myxomatose, un départ surprenant de la végétation herbacée a été observé dans les forêts avec l'apparition massive de semis naturels de chênes et de hêtres. Le reboisement s'est amélioré, la régénération des taillis sous futaie et des forêts de manière générale s'est accélérée (Bourlière, 1956). De même dans les prairies, une plus grande variété de plantes a été observée, surtout parmi les légumineuses et les herbes succulentes (Thomas, 1956).

En Australie, l'herbe a repoussé dans les régions qui étaient auparavant virtuellement désertiques. L'augmentation de la productivité des prairies a été considérable. Il a été estimé que durant la saison 1952-53, dans l'économie ovine, la myxomatose a permis une augmentation de production d'une valeur de 30 millions de livres sterling (Ratcliffe, 1956).

Ainsi, suite aux premières épizooties des années 50, le bilan écologique et économique des principaux pays concernés est globalement positif, notamment pour l'Australie dans le cadre de la campagne d'éradication mise en place vis-à-vis du lapin de garenne, espèce non autochtone et fortement nuisible, mais aussi pour la France.

B. Co-évolution du virus myxomateux et de son hôte

Très tôt après l'introduction de la myxomatose en Australie puis en Europe, une atténuation des souches est constatée. En Grande Bretagne, dès 1955, sont isolées quatre souches provoquant chez des lapins de laboratoire des formes cliniques nodulaires et croûteuses, n'entraînant qu'une faible mortalité (Hudson et Mansi, 1955). Ces formes autocurables permettent l'acquisition d'une immunité spécifique et prolongée chez les sujets guérissant.

Progressivement, ces souches de virulence intermédiaire deviennent prédominantes en raison des mécanismes de transmission vectorielle de la myxomatose, en Australie avec les moustiques (Fenner et *al.*, 1956) comme en Grande Bretagne avec les puces (Mead-Briggs et Vaughan, 1975).

La prédominance de ces souches, génératrices d'immunité, participe au développement précoce d'une résistance d'origine génétique dans les populations de lapins de garenne (Kerr et Best, 1998).

En Australie, le développement d'une résistance d'origine génétique vis-à-vis de la myxomatose, est mis en évidence dès 1958, soit seulement huit ans après l'introduction de la maladie. Marshall et Douglas (1961), rapportent que le taux de mortalité de lapins d'une zone donnée, capturés puis inoculés avec une souche de grade IIIa est passé de 90% à 26% après sept années d'épidémies.

En Grande Bretagne, le développement d'une résistance innée et héréditaire des populations de lapins sauvages est détecté tout d'abord sur un site au début des années 70 (Ross et Sanders, 1977) puis plus tard sur plusieurs autres sites dont un en Ecosse (Ross et Sanders, 1984). Le taux de mortalité de groupes de lapins sauvages, capturés sur une zone donnée et élevés en captivité jusqu'à l'âge de trois mois, puis soumis à une épreuve virulente, diminue significativement au cours des années. Cette résistance d'origine génétique semble être valable essentiellement sur les souches de virulence intermédiaire (grade IIIa). Toutefois, les souches de forte virulence se heurtent également à une résistance, appréciable moins par la diminution du taux de mortalité que par l'augmentation du temps moyen de survie. Ce dernier paramètre constitue d'ailleurs un critère précoce dans la détection de lignées résistantes (Ross et Sanders, 1984).

L'expression de cette résistance d'ordre génétique est fortement liée à l'âge d'exposition des lapereaux à la myxomatose. La réponse à une inoculation par une souche virulente de virus myxomateux de lapins sauvages et domestiques porteurs d'un certain degré de résistance génétique, est fortement affectée par l'âge auquel ils sont inoculés. Le pourcentage de survie et le temps moyen de survie de ces lapins âgés de 10 à 30 semaines chutent lorsque l'âge auquel ils sont inoculés augmente (Sobey et *al.*, 1970).

Toutefois, il semble qu'à cette résistance d'origine génétique, se surajoute une forme de résistance acquise, non génétique, d'origine parentale mais non associée aux anticorps maternels.

Cette résistance améliore la survie des lapereaux issus de lapines accouplées avec des mâles ayant survécu de la myxomatose. En effet, le taux de mortalité des lapereaux après épreuve virulente est réduit de 20 à 25 % lorsqu'ils naissent dans les sept mois suivant l'infection du mâle reproducteur, et est encore amélioré lorsque la souche utilisée pour l'épreuve est la même que celle qui a touché le mâle. Le plus surprenant est qu'il apparaît que les lapereaux issus d'accouplements ultérieurs des mêmes lapines avec des mâles non exposés au virus, bénéficient également de cette protection (Kerr et Best, 1998). Aucune démonstration expérimentale de ce phénomène n'a été effectuée à ce jour.

L'apparition de ces lignées résistantes entraîne par la suite une recrudescence des souches de virulence élevée, notamment de grade II, en Australie (Edmonds et *al.*, 1975) puis en Grande Bretagne (Ross et Sanders, 1987). En effet, ce phénomène favorise la transmission vectorielle de souches virulentes qui entraînent, chez les lapins résistants, des formes cliniques subaiguës avec un titre viral cutané et un temps moyen de survie suffisants pour contaminer les vecteurs.

Toutes ces adaptations des souches virales et des populations de lapins conduisent à un équilibre virus/hôte permettant à la maladie d'évoluer sous une forme enzootique avec des micro-épizooties régionales et saisonnières.

Toutefois, malgré l'atténuation de la virulence des souches et l'apparition de lignées moins sensibles de lapins, la myxomatose reste un facteur de régulation majeur pour les populations de lapins (Flowerdew et *al.*, 1992). En Grande Bretagne, une diminution expérimentale de la prévalence de la maladie, reproduite à deux reprises par réduction du vecteur principal (*Spilopsyllus cuniculi*), conduit à une augmentation significative (x 2-3) du nombre de lapins adultes survivant à l'hiver (Trout et *al.*, 1993).

C. Démographie des populations de lapins de garenne en France : impacts actuels de la myxomatose

En France, les enquêtes auprès des sociétés de chasse montrent une baisse importante des prélèvements cynégétiques au cours du dernier quart du vingtième siècle. En effet, entre les deux enquêtes nationales de 1983-1984 et 1998-1999, le prélèvement a baissé d'environ 50% (Marchandea, 2000).

Cependant, cette baisse générale apparente des populations de garenne cache des situations très contrastées géographiquement. Ainsi, le lapin de garenne reste encore l'espèce la plus prélevée dans de nombreux départements français, notamment dans l'Ouest de la France (Marchandeu et *al.*, 1999). Qu'en est-il de la part de responsabilité de la myxomatose dans le déclin des populations de lapin de garenne en France ?

1. Ecologie et dynamique des populations du lapin de garenne

La dynamique des populations est déterminée par deux facteurs essentiels, d'une part la limitation endogène spontanée de la population, ou *endo-limitation*, caractérisée par la fécondité des lapines et qui détermine l'accroissement potentiel des garennes en fonction de la nourriture locale disponible, et d'autre part l'*exo-limitation*, caractérisée par les divers aspects de la prédation sur le lapin, soit permanente (prédateurs), soit périodique (chasse, maladies), soit exceptionnelle (catastrophes naturelles : inondation et sécheresse).

a. L'endo-limitation

Le lapin fréquente les milieux ouverts et évite les grands ensembles uniformes (grandes cultures, bois) et les zones humides (marais) ou froides (montagne > 1400 m). Le site d'implantation d'une population de lapins de garenne nécessite des sols profonds, meubles et filtrants, ou à défaut des aménagements (garennes), pour y creuser les rabouillères (petits terriers de mise-bas et d'allaitement) à l'intérieur de la garenne ou en plein champ, des couverts arbustifs, herbeux et ensoleillés servant de refuges et des zones de gagnage rases pour s'alimenter. La taille du domaine vital est très restreinte (< 500 m²) dans un milieu idéal, mais sans doute beaucoup plus étendue dans un milieu moins favorable (jusqu'à 5 ou 10 ha).

Le lapin est une espèce socialement organisée. Un groupe social regroupe 2 à 10 individus (généralement 5-7) qui occupent une ou plusieurs garennes. Les différents groupes sociaux occupent l'espace de manière hétérogène et sont plus ou moins interconnectés entre eux en fonction de la densité de population et de l'aménagement des milieux. En effet, la capacité de dispersion du lapin vers un autre noyau de population ou d'expansion (colonisation) vers un espace vierge semble assez limitée.

Les facteurs sociaux inhérents à l'espèce limitent la taille et le devenir de la collectivité, l'ensemble étant lié à la reproduction et à l'état hormonal des lapines.

La fécondité est forte puisqu'une femelle produit de 10 à 25 lapereaux par an de janvier à juin ou septembre selon les conditions climatiques. Toutefois, la mortalité juvénile peut atteindre 80 % (prédation, travaux agricoles, noyades des rabouillères, maladies) et la survie est généralement de 2 à 5 jeunes par femelle et par an.

L'âge des reproducteurs est relativement faible, un à deux ans, alors que l'espérance de vie pour cette espèce peut aller jusqu'à 6 ou 7 années. Notamment en secteurs soumis à la pression de chasse, 80 % des lapins sont âgés de moins d'un an.

L'organisation de cette société matriarcale entraîne d'une part des combats entre les mâles, avec émergence du mâle dominant et éviction des autres grâce au marquage territorial et d'autre part une compétition entre les femelles en vue de la possession des lieux les plus favorables des terriers. Ce n'est qu'à l'issue de la période de reproduction que les mâles exclus, errants et solitaires, se rattachent en surnombre à une communauté existante.

Le développement excédentaire d'une colonie axé sur la fécondité des reproducteurs, reste étroitement soumis aux conditions nutritionnelles et à la densité initiale du noyau communautaire. De même, l'allongement de plusieurs semaines de la saison de reproduction, lors d'années où les conditions nutritionnelles et climatiques le permettent, favorise le renouvellement des reproducteurs, stimule la fécondité et augmente donc la densité jusqu'à l'amorce d'émigrations éventuelles, tout en accroissant le taux des lapereaux de naissance précoce, hiverno-vernale, les plus résistants, notamment vis-à-vis de la myxomatose (Joubert *et al.*, 1982).

b. L'exo-limitation

*** Les prédateurs**

Les prédateurs carnassiers (renard, fouine, belette et rapaces crépusculaires) pèsent de manière permanente sur les colonies. Le nombre de ces prédateurs est variable et dépend d'interventions humaines directes et indirectes. La régulation volontaire par le piégeage et la chasse des prédateurs est souvent minime en raison de la méconnaissance de leur rôle néfaste. Le nombre de prédateurs a également été stimulé dans le dessein sanitaire de lutte écologique contre la rage vulpine, en respectant les compétiteurs alimentaires du renard. Enfin, le lâcher intempestif de gibier de tir et de lapins de repeuplement stimule également leur nombre de manière indirecte (Joubert *et al.*, 1982).

Dans certaines régions la prédation constitue la principale cause de mortalité devant la myxomatose (Calvete et *al.*, 2002).

La prédation peut jouer un rôle important dans des situations de populations fragilisées. En effet, la rupture d'un équilibre démographique d'une population par une épidémie (myxomatose ou VHD) peut rendre la pression de prédation sur les individus survivants, démesurée et délétère pour la régénération de la population.

*** La chasse**

La chasse pèse à titre périodique sur les garennes et constitue un des principaux moyens d'étude de l'état des garennes. L'impact de la chasse sur les populations de garenne est mesuré par la densité apparente de la population c'est-à-dire la visibilité du gibier, d'autant moins tiré que sa répartition est diluée. En période de chasse, le lapin développe spontanément des moyens de défense en restant plus longtemps au terrier et en acquérant rapidement des mœurs davantage nocturnes, de dissimulation. Quatre heures de gagnage sont perdues du fait de la perturbation cynégétique : les sorties normales ont lieu de une heure avant le crépuscule à une heure après l'aube, tandis que les sorties perturbées se font de une heure après le crépuscule à une heure avant l'aube.

Le nombre de prélèvement dépend aussi des conditions aléatoires de la chasse et de l'efficacité des chiens, dont l'odorat peut être amoindri par les excès d'humidité ou de sécheresse. Il faut donc tenir compte de tous ces facteurs dans l'estimation de l'impact cynégétique sur les populations.

La pression cynégétique est pernicieuse en contribuant sans discernement, à limiter le noyau de régénération en sujets juvéniles, les plus diurnes et les plus erratiques, surtout en fin de chasse, car le nombre de lapereaux de naissance précoce, les plus résistants à la myxomatose, est ainsi réduit (Joubert et *al.*, 1982).

*** L'évolution des milieux naturels**

L'évolution des milieux naturels constitue une cause majeure de la réduction des effectifs de lapins de garenne en France. Elle se fait selon deux voies opposées mais tout aussi néfastes pour le lapin. L'intensification de l'agriculture a conduit notamment à supprimer les zones de refuges (haies, bosquets...), à augmenter les risques de dégâts par l'implantation de cultures sensibles, le tout dans un contexte économique où la concurrence du lapin est perçue

comme un fléau. A l'inverse, dans d'autres régions où l'agriculture tend à disparaître, les milieux se ferment et deviennent inhospitaliers pour le lapin.

De cette dégradation des milieux, résulte une fragmentation de l'habitat. Les zones favorables au lapin sont plus distantes les unes des autres et les connections entre noyaux de population sont plus difficiles voire impossibles. Or la probabilité d'extinction d'un noyau de population augmente avec son isolement et est inversement proportionnelle à sa taille. Les noyaux isolés sont rendus très fragiles car très sensibles à des accidents démographiques tel qu'une épidémie de myxomatose ou de VHD (Marchandeau et *al.*, 1999).

*** Les maladies**

Une enquête effectuée dans la région cynégétique Ouest entre 1996 et 1998 a permis d'étudier la fréquence et l'impact des différentes pathologies du lapin de garenne. Les mortalités sont recensées et les cadavres frais pouvant être récupérés sont autopsiés et analysés (Marchandeau et *al.*, 1999). La pathologie la plus fréquente est la coccidiose, détectée dans environ 70% des cas, avec des atteintes fortes, c'est-à-dire susceptibles d'être à l'origine de la mort de l'animal, dans environ 30% des cas. La myxomatose a été mise en évidence chez presque 50 % des cadavres, mais la proportion de lapins porteurs de myxomatose est très variable d'un département à l'autre. En revanche, la VHD semble moins fréquente (17% des cas). Les autres pathologies, parasitaires et bactériennes, sont moins fréquemment rencontrées. Celles-ci ne se révèlent d'une gravité alarmante que lors de dysnutrition, en années humides et froides.

Bien que la coccidiose soit la pathologie la plus fréquente, c'est donc bien la myxomatose qui a le plus d'impact. La myxomatose est souvent associée à d'autres pathologies, notamment la coccidiose qui bénéficierait du caractère immunodépresseur du virus myxomateux.

De la même manière, l'immunodépression résultant de l'infection myxomateuse favorise les infestations parasitaires par les nématodes et les cestodes (Boag, 1988). Des analyses sérologiques effectuées sur des populations sauvages en France, montrent que les lapins séropositifs en VHD ont significativement plus de chances d'être séropositif également en myxomatose que séronégatif. Ceci suggère des modalités de contamination similaires pour les deux virus ou bien on peut penser que le caractère immunosuppresseur du virus myxomateux favorise également l'infection par la VHD (Marchandeau et *al.*, 2004).

Ainsi, l'association fréquente de la myxomatose avec une autre pathologie (coccidiose, VHD), mais aussi avec des traumatismes divers (signes de prédation, chocs,...) suggère que la myxomatose peut, dans la plupart des cas, être indirectement responsable des mortalités en renforçant la sensibilité des animaux à d'autres causes de mortalité (Marchandeau et *al.*, 1999).

Cette interaction entre les différentes pathologies pose les bases de la notion de pathocénose. La pathocénose est un système qui a des propriétés structurales particulières et qui implique que la distribution de chaque maladie ne peut pas être considérée indépendamment des autres maladies présentes au même moment dans cette population. Dans une situation écologique stable, elle tend vers un équilibre caractérisé par l'ensemble des pathologies observées. Réciproquement une perturbation des conditions environnementales peut entraîner une perturbation de l'équilibre préexistant entre ces pathogènes qui va tendre vers une nouvelle pathocénose.

En raison de l'apparition récente de la VHD, une modification de la pathocénose de la population de lapins de garenne s'est produite. Notamment, la VHD est suspectée de pouvoir renforcer la virulence de la myxomatose en fractionnant la population et en affectant ainsi un des facteurs permettant à cette dernière de fonctionner en endémie.

2. Impacts actuels de la myxomatose en France

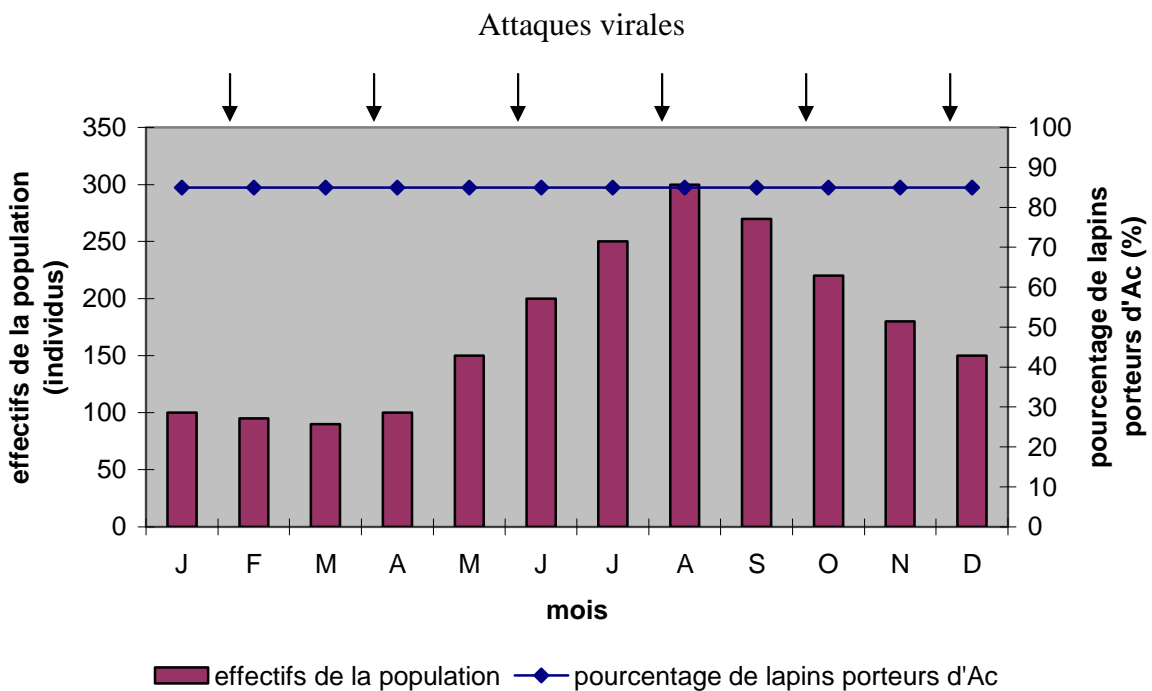
Certains paramètres structuraux et biologiques de la population de lapins concernée influent sur l'impact de la myxomatose dans cette population.

Les travaux de Ross et *al.* (1989) ont démontré, les premiers, que la taille des populations influe sur le fonctionnement de la myxomatose, sans toutefois pouvoir définir la limite entre une forte et une faible population. Puis d'autres études ont confirmé et précisé ce phénomène, notamment grâce à des modélisations mathématiques (Fouchet et *al.*, 2006 ; 2007).

Dans les fortes populations, la taille et la densité de la population permettent une circulation efficace du virus toute l'année. Le taux de porteurs d'anticorps est ainsi entretenu en permanence à un niveau élevé chez les adultes notamment. De plus, les jeunes issus de la période de mise bas de l'année se contaminent très vite, du fait de la circulation permanente du virus, pendant la période où ils sont encore porteurs d'anticorps maternels, et développent pour la majorité des formes cliniques atténuées.

L'immunité acquise, même si elle disparaît avec le temps, est entretenue par les réinfections au cours de l'année. Les animaux sont plus fréquemment exposés au virus, et chaque nouvelle exposition relance la réponse immunitaire spécifique, renforçant ainsi la protection clinique. L'impact de la myxomatose est alors très limité puisque la majorité de la population adulte est porteuse d'anticorps, la situation est endémique (Fouchet *et al.*, 2006).

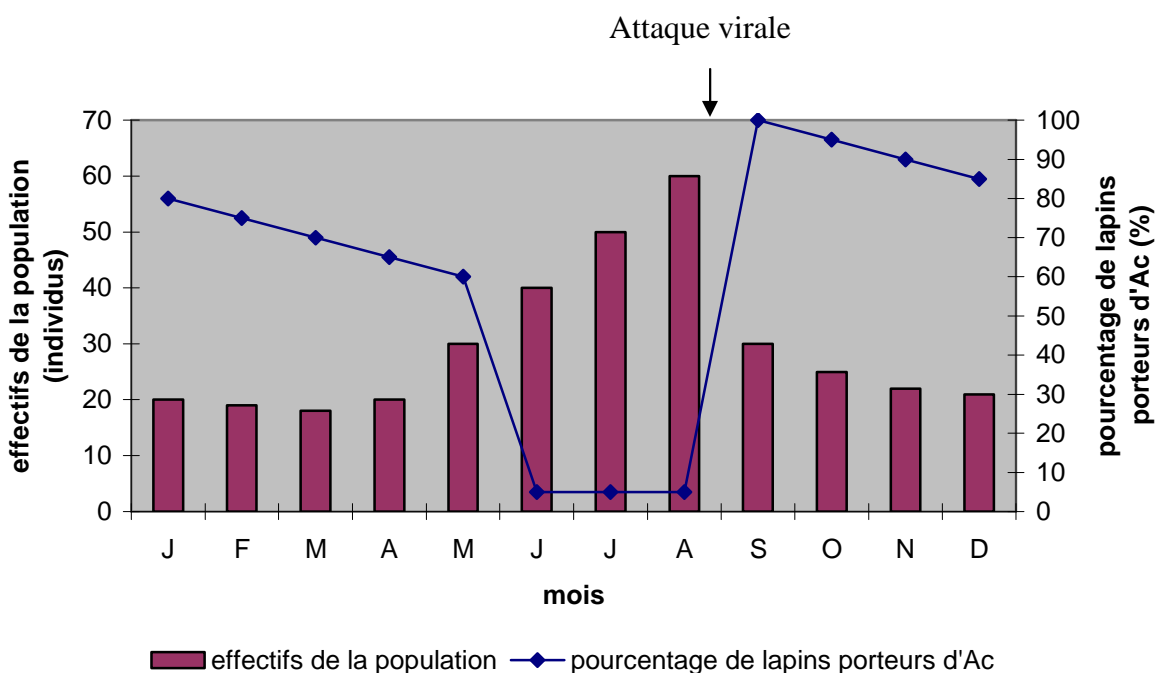
Figure 3 : Schéma théorique de l'évolution de la myxomatose dans une forte population



Dans le cas de faibles populations, on a un faible taux de transmission virale. On enregistre généralement un pic épizootique annuel en période estivo-automnale. La majorité des lapins concernés sont les nouveau-nés qui sont touchés souvent à des âges assez avancés lorsque les anticorps maternels ont disparu. A la fin de l'année 95 % des lapereaux ont été touchés et la mortalité peut être très importante. Les animaux survivants ayant fabriqué des anticorps, on observe après chaque épizootie une forte augmentation du taux de porteurs d'anticorps.

Ensuite, l'immunité protectrice des lapins convalescents décroît progressivement mais les lapins ne redeviennent pas assez sensibles pour entraîner une deuxième épidémie avant le début de l'hiver. Au début de la saison de mise bas suivante, le nombre de lapins infectés est très bas et quand le nombre de jeunes augmente, le nombre de lapins sensibles augmente également et l'épizootie estivo-automnale se renouvelle tous les ans (Fouchet *et al.*, 2006).

Figure 4: Schéma théorique de l'évolution de la myxomatose dans une faible population



Une étude portant sur une forte population sauvage de lapins de garenne suivie par capture-marquage-recapture pendant trois ans (1995-1997) confirme l'hypothèse d'une circulation permanente des virus de la myxomatose et de la VHD au sein d'une forte population, entretenant en permanence l'immunité vis-à-vis de ces deux maladies. Un faible taux de morbidité (18 %) et à une absence de cas de mortalité avérés pendant trois ans, associés à un taux de porteurs d'anticorps supérieurs à 75 % et atteignant 100 % la troisième année, prouve le faible impact de la myxomatose sur une forte population (Marchandeu et Boucraut-Baralon, 1999).

Une étude équivalente d'observation clinique et sérologique d'une population de lapins de garenne a été réalisée en Espagne pendant quatre ans (Calvete et *al.*, 2002). Le taux de porteurs d'anticorps chez les adultes reste de 100 % tout au long de l'étude, tandis que chez les jeunes ce taux est plus bas et augmente progressivement jusqu'à la fin de l'année. Généralement endémique, la myxomatose provoque ici quelques pics épidémiques ponctuels lors du recrutement de jeunes lapins sensibles pendant la période de reproduction.

D'autres paramètres influencent la régulation de la transmission du virus dans les populations de lapins. La durée de la période de mise bas varie selon les conditions nutritionnelles et climatiques d'une année à l'autre. Lorsque les conditions environnementales

le permettent, la période de mise bas s'étend de janvier jusqu'à septembre, ce qui facilite la transmission virale toute l'année car on a des lapereaux sensibles toute l'année. Lors de période de mise bas courte (janvier-juin) on a une interruption de la circulation virale au cours de l'année (Fouchet et *al.*, 2006).

L'ampleur de la transmission virale varie aussi en fonction de la qualité et de la durée de persistance de l'immunité acquise. On estime que les anticorps anti-myxomateux ne confèrent pas aux individus séropositifs une protection totale et qu'ils peuvent développer une forme atténuée de myxomatose à la faveur de réinfections (Marchandeu et Boucraut-Baralon, 1999), et pour certains auteurs, d'une réactivation de virus latents (Williams et *al.*, 1972 ; Ross et *al.*, 1989). Le titre en anticorps décroît avec le temps mais la durée de persistance des anticorps dépend de la virulence de la souche à l'origine de la réponse immunitaire et du nombre de réinfections. Paradoxalement, si le taux d'anticorps individuel se maintient durablement à un niveau élevé, ce sont uniquement les jeunes non immunisés et sensibles qui assurent la transmission du virus dans la communauté, et le nombre d'infectés chutent alors à des niveaux très bas en hiver, ce qui est préjudiciable pour l'efficacité de la transmission virale. Par contre, une décroissance rapide du taux d'anticorps, permet des recontaminations fréquentes avec le développement de formes atténuées et ainsi la diffusion du virus dans la population (Fouchet et *al.*, 2006). Cependant, dans une forte population exposée en permanence, les durées d'immunité durent jusqu'à 30-36 mois pour certains individus et il est probable que ce type d'immunité ainsi entretenue soit acquise à vie (Marchandeu et Boucraut-Baralon, 1999).

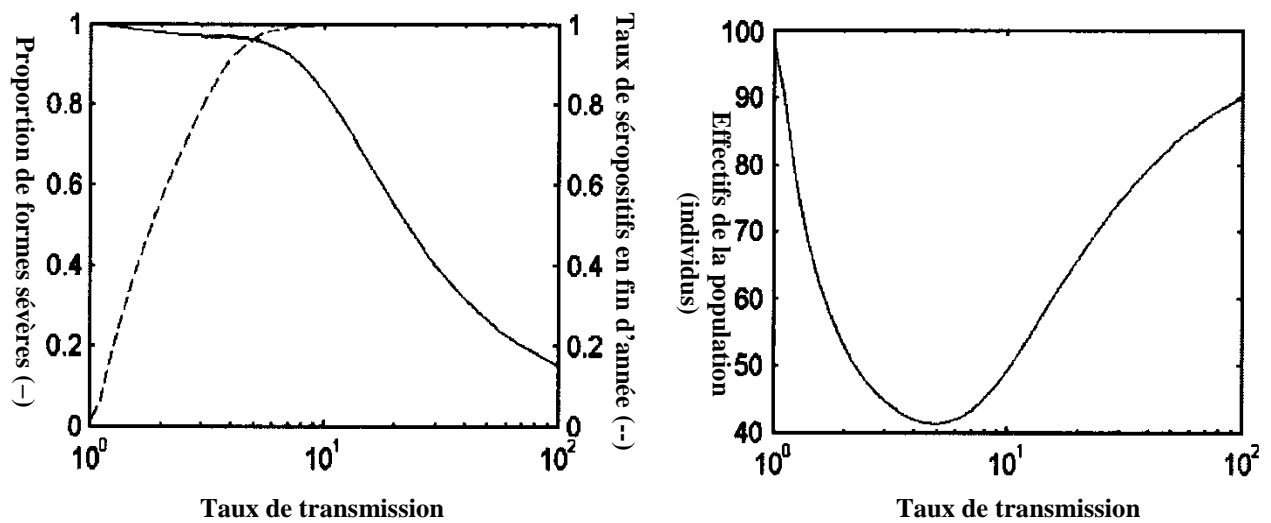
Enfin, la fragmentation des populations, en déstabilisant la circulation virale, contribue fortement à l'émergence de formes cliniques plus sévères et moins fréquentes (Fouchet et *al.*, 2007).

L'impact de la myxomatose est donc très dépendant du taux de transmission du virus dans la population. Celui-ci se définit dans une population donnée comme la proportion de lapins infectés transmettant effectivement le virus, ou autrement dit comme la probabilité qu'un lapin infecté transmette le virus à un lapin réceptif. L'étude de l'impact de la maladie sur une population donnée en fonction du taux de transmission est réalisée grâce à un modèle mathématique. L'évolution de trois critères en fonction du taux de transmission est représentée graphiquement (figure 5) :

- la proportion de lapins développant une forme clinique sévère lors de la première infection
- le taux de porteurs d'anticorps en fin d'année
- la taille globale de la population en nombre d'individus

Figure 5 : Impact de la myxomatose en fonction du taux de transmission

(Fouchet et *al.*, 2006)



Lorsque le taux transmission est faible (<1), le virus ne peut pas diffuser dans la population, il n'y a donc aucun impact. Pour des taux de transmission intermédiaires (entre 1 et 10), le nombre de jeunes lapins touchés par des formes cliniques sévères reste très élevé et la taille de la population chute. Enfin, en atteignant de forts taux de transmission (> 10), tous les jeunes lapins ont déjà été infectés au moins une fois avant le début de la saison de reproduction suivante et l'impact global diminue.

Ainsi, il apparaît que l'impact de la myxomatose est fort essentiellement dans les populations de petite taille et isolées. Les maladies virales, myxomatose et VHD, n'interviennent donc qu'indirectement sur la régression des effectifs de lapins de garenne. La disparition et la fragmentation de l'habitat constituent en revanche une des causes majeures de cette régression en contribuant à la baisse de la taille des populations et à l'isolement des noyaux de population.

La prophylaxie sanitaire de la myxomatose doit donc également être envisagée en terme de gestion de l'habitat des garennes mais aussi de gestion cynégétique. D'autre part, dans les populations de lapins sauvages de taille suffisante, en région endémique, il est défavorable d'essayer de limiter à tous prix la circulation du virus myxomateux, par la démoustication ou le tir des lapins touchés par des formes atténuées de myxomatose.

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE

Introduction

L'objectif de nos travaux est d'étudier le comportement épidémiologique des lapins séropositifs lors d'infection par une souche virulente. Pour cela, des lapins préalablement vaccinés sont inoculés avec une souche d'épreuve hypervirulente et leur évolution clinique et virologique est étudiée en fonction de leur titre en anticorps initial. Leur contagiosité éventuelle est testée en plaçant chacun d'entre eux en cohabitation étroite avec un lapin séronégatif dans une cage unique dès le jour de l'épreuve virulente. L'importante promiscuité ainsi créée entre le lapin inoculé et le lapin séronégatif encourage la contagion directe de la myxomatose.

Deux expériences distinctes sont réalisées. Lors de l'expérience n°1, les lapins sont inoculés dix jours seulement après la vaccination de manière à étudier la protection virologique de la vaccination dans la phase précoce de séroconversion des animaux. A l'inverse, lors de l'expérience n°2 les lapins sont inoculés en fin de période de protection vaccinale.

I. Matériels et méthodes

A. Principe

Le but de ces expériences est d'étudier le statut épidémiologique d'un lapin séropositif vis-à-vis de la myxomatose.

Pour cela, des lapins séronégatifs sont placés en cohabitation étroite avec des lapins vaccinés puis éprouvés, de manière à étudier le statut épidémiologique des lapins séropositifs. La transmission éventuelle du virus d'épreuve aux lapins sentinelles est analysée par une surveillance clinique soutenue mais aussi par des examens de laboratoire direct et indirect.

La recherche directe du virus s'effectue par PCR sur un prélèvement sanguin sur anticoagulant (analyse virologique). Des dosages d'anticorps anti-myxomatose sont également réalisés par ELISA sur sérum (analyse sérologique).

B. Animaux utilisés

Les lapins utilisés lors de ces expériences sont des lapins européens *Oryctolagus cuniculus* âgés de 6 semaines, de sexe mâle, de race New-Zealand White et tatoués à l'oreille gauche.

Les animaux sont logés, deux par deux, dans des cages grillagées identiques disposées dans des locaux fermés et désinsectisés. L'alimentation, identique pour tous les animaux, est distribuée à volonté, et l'abreuvement est assuré *ad libitum* par des pipettes automatiques.

C. Souches virales utilisées

Les souches virales que nous avons utilisées sont de 2 types : les souches vaccinales d'une part permettant d'immuniser les lapins vis-à-vis de la myxomatose et une souche historique de terrain d'autre part, utilisée comme épreuve virulente sur les lapins préalablement immunisés.

La principale souche vaccinale utilisée est la souche SG33. Elle a été obtenue par Saurat et Gilbert à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse par passage en séries sur des cultures cellulaires à 33°C (successivement sur des cellules rénales de lapins et sur cellules d'embryon de poulet) à partir d'un virus isolé sur un lapin sauvage de la région toulousaine (Saurat *et al*, 1978).

Deux virus recombinants issus de la souche SG33 ont également été utilisés : le virus myxomateux recombinant SG33-NS2 et le virus myxomateux recombinant SG33-GFP. Ces deux virus porteurs respectivement des séquences NS2, du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine, et GFP ont été constitués lors de précédentes expériences pour l'intérêt du laboratoire. Ils ont les mêmes propriétés antigéniques et immunogènes que le virus SG33 classique.

Un autre virus recombinant a été utilisé comme souche vaccinale : le virus myxomateux recombinant T1-M022L-N-gfp. Ce virus recombinant a été conçu lors de précédentes expériences. Le pouvoir pathogène du virus T1 a été atténué par l'intégration d'un gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP), en fusion avec le gène M022L en région aminoterminal. L'innocuité de ce virus recombinant a été testée sur 6 lapins qui ont développé une immunité protectrice intense et précoce sans signe clinique (Bertagnoli, données non publiées).

La vaccination se fait par injection intradermique à l'oreille, de 5.10^3 UFP pour SG33 et de 1.10^4 UFP pour les recombinants avec un rappel à 4 semaines pour SG33-NS2.

La souche de terrain T1 (pour Toulouse 1) est la souche d'épreuve. Elle a été isolée en France en 1954 par le Professeur Saurat à partir d'une forme nodulaire mortelle. Elle est de virulence élevée, et entraîne, chez des lapins neufs, une mortalité proche de 100 % après 10 à 12 jours d'évolution.

L'épreuve se fait par injection intradermique à l'oreille de 1.10^3 UFP sous 100 μ L.

D. Protocoles

Dans cette partie les prélèvements sanguins réalisés sont symbolisés par un V lorsqu'ils sont destinés à une analyse Virologique (PCR) et par un S lorsqu'ils sont destinés à une analyse Sérologique (ELISA).

1. Expérience n°1

Elle vise à étudier les lapins immunisés en phase précoce de séroconversion.

Cinq lapins sont inoculés avec la souche SG33, puis sont éprouvés 10 jours après vaccination.

Chaque lapin vacciné est placé en cohabitation étroite avec un lapin neuf, le jour de l'épreuve (J0).

Un couple de lapins témoins est placé dans une pièce voisine du même bâtiment, il comporte un lapin éprouvé sans vaccination préalable, associé à un lapin sentinelle.

Les lapins subissent deux analyses sérologiques réalisées le jour de la vaccination (J-10) et le jour de l'épreuve (J0) de manière à contrôler leur séronégativité avant la manipulation et à déterminer leur titre en anticorps anti-myxomateux lors de l'épreuve (tableau 4). De plus des analyses virologiques sont effectuées au cours des trois jours suivants la vaccination, pour vérifier la non détection d'une virémie post-vaccinale par nos analyses, le vaccin étant composé d'un virus vivant atténué. Ceci ayant pour objet de ne pas avoir d'interaction entre le virus vaccinal et le virus d'épreuve lors des analyses virologiques effectuées sur les trois jours suivants l'épreuve virulente.

Chaque lapin n'est prélevé qu'une seule fois sur les trois jours dans un souci de ménager les artères auriculaires qui peuvent se fibroser lors de ponctions répétées.

Tableau 4 : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les lapins inoculés

Numéros des lapins	J-10	J-9	J-8	J-7	J0	J1	J2	J3	J6
Lapin 1 (48450)	S	V			S	V			
Lapin 2 (48382)	S	V			S	V			
Lapin 3 (48112)	S		V		S		V		
Lapin 4 (48340)	S		V		S		V		
Lapin 5 (48501)	S			V	S			V	
Lapin 6 (48692) : témoin	S								V

De la même manière que les lapins vaccinés, les lapins sentinelles sont soumis à une analyse sérologique préalable, effectuée ici trois jours avant la mise en contact, pour vérifier leur séronégativité. Par la suite, trois séries de prélèvements destinés à des sérologies sont effectuées à J6, J13 et J27. Les analyses virologiques sont effectuées à partir des prélèvements réalisés à J10, J13 et J17 (tableau 5).

Tableau 5 : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les lapins sentinelles

Numéros des lapins	J-3	J6	J10	J13	J17	J27
Lapin 1' (48461)	S	S	V	V S	V	S
Lapin 2' (48490)	S	S	V	V S	V	S
Lapin 3' (48130)	S	S	V	V S	V	S
Lapin 4' (48654)	S	S	V	V S	V	S
Lapin 5' (48134)	S	S	V	V S	V	S
Lapin 6' (48658)	S	S	V	V S	V	S

2. Expérience n°2

Elle est similaire à la précédente mais étudie les phases tardives de l'efficacité vaccinale.

Cinq lapins vaccinés lors de précédentes expériences indépendantes de la notre, sont éprouvés plusieurs mois après. Le protocole vaccinal et le délai entre la vaccination et le jour de l'épreuve (J0) varient d'un animal à l'autre.

De la même manière que pour l'expérience 1, chaque lapin vacciné est placé en cohabitation étroite avec un lapin neuf le jour de l'épreuve, et un couple de lapins témoins est placé en isolation mais dans des conditions environnementales similaires.

Les vaccinations ont été réalisées grâce à des virus vaccinaux recombinants, selon le protocole détaillé dans le tableau 6.

Tableau 6 : Protocole vaccinal

Numéros des lapins	Souche vaccinale	Rappel	Délai vaccination-J0
Lapin 7 (40506)	T1-M022L-N-gfp	Non	307 jours
Lapin 8 (40561)	SG33-NS2	Oui	311 jours
Lapin 9 (40517)	T1-M022L-N-gfp	Non	307 jours
Lapin 10 (48130)	SG33-GFP	Non	133 jours
Lapin 11 (48654)	SG33-GFP	Non	133 jours

Le titre en anticorps anti-myxomateux des lapins vaccinés est déterminé par un test ELISA réalisé sur des prélèvements effectués 28 jours avant l'inoculation. Les prélèvements destinés aux analyses virologiques ont été effectués sur les trois jours suivants l'épreuve de la même manière que pour l'expérience n°1. Cependant, une série de prélèvement a été réalisée à J7 pour confirmer les résultats obtenus à J1, J2 et J3 (tableau 7).

Tableau 7 : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les lapins inoculés

Numéros des lapins	J-28	J1	J2	J3	J7
Lapin 7 (40506)	S	V			V
Lapin 8 (40561)	S	V			V
Lapin 9 (40517)	S		V		V
Lapin 10 (48130)	S		V		V
Lapin 11 (48654)	S			V	V
Lapin 12 (62370) : témoin	S			V	V

Les lapins sentinelles sont soumis à une analyse sérologique préalable, effectuée ici 17 jours avant la mise en contact, pour vérifier leur séronégativité. Par la suite, quatre séries de prélèvements destinés à des sérologies sont effectuées à J7, J13, J20 et J30. Les analyses virologiques sont effectuées à partir des prélèvements réalisés à J3, J7, J10, J13, J17 et J20 (tableau 8).

Tableau 8 : Protocole des prélèvements sanguins effectués sur les animaux sentinelles

Numéros des lapins	J-17	J3	J7	J10	J13	J17	J20	J30
Lapin 7' (62389)	S	V	V S	V	V S	V	V S	S
Lapin 8' (62692)	S	V	V S	V	V S	V	V S	S
Lapin 9' (62306)	S	V	V S	V	V S	V	V S	S
Lapin 10' (62394)	S	V	V S	V	V S	V	V S	S
Lapin 11' (62206)	S	V	V S	V	V S	V	V S	S
Lapin 12' (48134)	S	V	V S	V	V S	V	V S	S

E. Surveillance clinique

Les lapins sont soumis à une surveillance clinique quotidienne durant les 30 jours suivants la mise en contact. Les signes cliniques locaux (réaction inflammatoire locale, myxome primaire) et les signes cliniques de généralisation (blépharoconjunctivite, orchite, myxomes secondaires), sont recherchés et notés.

Au niveau du site d'injection du virus d'épreuve, les signes de réaction inflammatoire d'un éventuel myxome primaire sont recherchés. La taille et l'évolution des lésions sont notées. On recherche la présence de myxomes secondaires sur la tête et le dos, les symptômes respiratoires (blépharoconjunctivite, jetage, dyspnée) sont recensés.

On considère ici trois formes cliniques de myxomatose, différenciées selon le type et l'intensité des symptômes.

La forme aiguë :

- dégradation de l'état général, apathie
- présence de myxomes sur la face, les oreilles et les yeux
- blépharoconjunctivite sévère et jetage avec gêne respiratoire marquée à sévère.
- anorexie et amaigrissement progressif conduisant à la mort en moins de 15 jours.

La forme subaiguë :

- dégradation passagère de l'état général avec un abattement modéré
- présence de myxomes secondaires sur la face, les yeux et les oreilles
- blépharoconjunctivite, jetage et dyspnée modérés
- rémission complète des signes cliniques en moins de 30 jours

La forme atténuée :

- bon état général
- myxomes secondaires en nombre restreint d'évolution croûteuse

Lors de l'apparition d'un myxome primaire, l'intensité de la réaction inflammatoire locale (RIL) est estimée selon l'échelle faible (+), modérée (++) , marquée (+++) et sévère (++++), de manière à hiérarchiser les formes cliniques locales sans signe de généralisation.

F. Réalisation des prélèvements sanguins

Chez le lapin, le prélèvement de sang s'effectue au niveau de l'artère auriculaire présente sur la face externe de l'oreille. Le lapin est tout d'abord placé dans une cage de contention spécifique permettant d'immobiliser l'animal d'une part et de faciliter l'accès aux oreilles d'autre part.

Après désinfection de l'oreille à l'aide d'un coton imbibé d'alcool, l'artère est ponctionnée puis cathétérisée à l'aide d'une aiguille de 25 mm de long et de 0,6 mm de diamètre à usage unique. Le sang est recueilli dans un tube prêt à l'emploi.

Le prélèvement sanguin destiné à une analyse virologique directe par PCR est effectué dans un tube de 5 ml de type Vacutainer® contenant un anticoagulant. L'anticoagulant utilisé est l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra acétique). Le prélèvement sanguin destiné à une analyse sérologique est effectué dans un tube sec. Le sérum est récolté après coagulation, par centrifugation du surnageant. Les échantillons de sang et de sérum sont conservés à - 20 °C.

G. Analyse sérologique et titrage des anticorps par la méthode ELISA

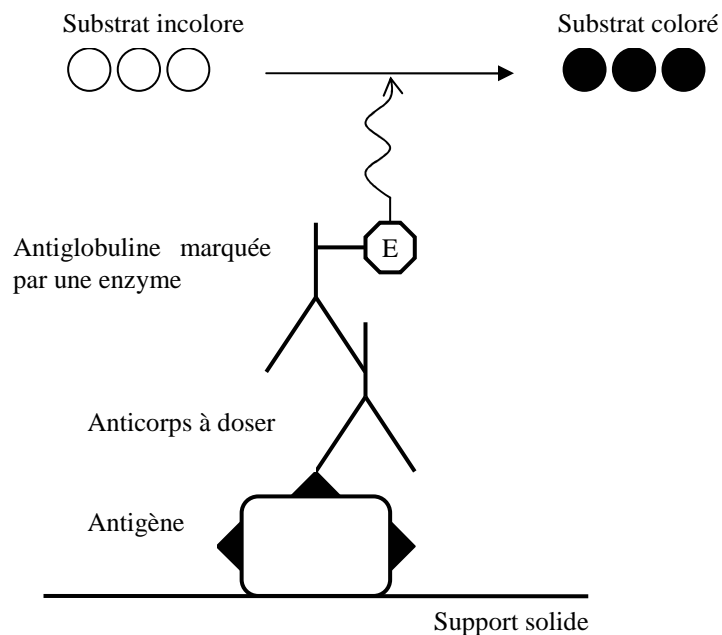
1. Principe

La technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est une méthode de dosage immunoenzymatique. Les dosages immunoenzymatiques consistent à mettre en évidence une réaction Ag-Ac au moyen d'une enzyme capable de modifier la coloration d'un substrat (Gelfi *et al.*, 1999).

Les anticorps à doser réagissent dans un premier temps avec l'antigène immobilisé sur une microplaque, et dans un deuxième temps, la quantité d'anticorps est mesurée à l'aide d'un deuxième anticorps (anti-immunoglobuline) marqué par une enzyme. L'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité d'anticorps à doser. Le dosage est qualitatif par l'observation du virage du substrat chromogène de l'enzyme ajouté à la réaction, et il peut être quantitatif par mesure de la densité optique du substrat coloré. Dans notre manipulation, le para-nitro-phénylphosphate (PNPP) est hydrolysée par la phosphatase alcaline en para-nitro-phénol de coloration jaune (Gelfi *et al.*, 1999).

Le tampon utilisé est le Phosphate Buffer Saline (PBS).

Figure 6 : Principe schématisé de la détection d'anticorps par la technique ELISA



2. Réalisation (Gelfi *et al.*, 1999)

Des microplaques de 96 cupules (type Becton Dickinson Falcon Probind) sont tapissées, pendant une nuit à 37°C, avec une suspension de virus myxomateux semi purifié dilué dans du tampon PBS (1µg à 1,5 µg de virus dans 100 µL de PBS par cupule), ou avec du tampon PBS seul pour la colonne de référence ou "blanc".

Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du PBS, puis sont saturés par de la gélatine diluée dans du PBS à la concentration de 15 mg/mL (100 µL par cupule), que l'on laisse pendant 1 heure à 37 °C.

Après 3 lavages au PBST (PBS à 0,1 % de Tween 20), des dilutions doubles successives des échantillons de sérum à tester dans du PBST sont réalisées et déposées dans les cupules, à raison de 100 µL par cupule. La dilution initiale est généralement de 1/100. Des sérums positif et négatif standards sont inclus dans chaque plaque et constituent les témoins. Ainsi les anticorps s'adsorbent sur les antigènes immobilisés sur la plaque pendant une heure à 37°C.

Après 3 lavages au PBST, un sérum de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline, est dilué au 1/3000 dans du PBST, puis déposé dans les cupules (100 µL par cupule). L'incubation est d'une heure à 37°C.

Enfin, après 4 rinçages, 100 µL du substrat para-nitrophényl phosphate disodium à la concentration de 1mg/mL dans du tampon diéthanolamine à 10 % (pH = 9,7) est ajouté dans chaque cupule.

Après 12 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, la réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 50 µL de soude 2N par cupule.

La lecture de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre à une densité optique de 405 nm.

Le titre en anticorps du sérum testé est égal à l'inverse de la dilution dont la densité optique est supérieure ou égale à trois fois celle du témoin négatif interne.

3. Intérêts de la méthode ELISA

La méthode ELISA se révèle être une des méthodes sérologiques les plus fiables pour détecter des titres d'anticorps faibles. De plus, c'est une technique extrêmement spécifique (Sp = 100 %) et sensible (Se = 100 %, 21 jours après vaccination homologue).

Comparée à d'autres méthodes de détection sérologique (fixation du complément, immunofluorescence indirecte), la méthode ELISA est un excellent test sérologique pour le diagnostic, l'évaluation vaccinale et la surveillance épidémiologique de la myxomatose.

H. Analyse virologique et recherche d'ADN viral par PCR

1. Extraction et purification de l'ADN

Les acides nucléiques sont isolés des échantillons de sang grâce au kit "High Pure PCR Template Preparation Kit[®]" de Roche.

a. Principe

Les cellules sont lysées au cours d'une courte incubation avec une protéinase K, en présence d'un sel (guanidine-HCl) inhibant toutes les nucléases. Les acides nucléiques s'adsorbent sélectivement sur des fibres de verre spéciales liées au filtre des colonnes d'extraction (High Pure Purification filter tube). Les acides nucléiques adsorbés sont purifiés par une série de lavages destinés à éliminer les impuretés cellulaires. Enfin, le tampon d'élution, libère les acides nucléiques des fibres de verre.

b. Réalisation pratique

Un échantillon de 200 µL de sang sur anticoagulant est mélangé à 200 µL de "Binding Buffer" (6 M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100, pH 4,4) et à 40 µL de protéinase K reconstituée, puis est mis à incuber pendant 10 minutes à 72°C.

100 µL d'isopropanol sont ajoutés puis le mélange est placé dans une colonne de filtration du kit, puis centrifugé pendant 1 minute à 8000 rpm. Le filtrat est éliminé.

Un premier lavage est réalisé par l'ajout de 500 µL d'"Inhibitor Removal Buffer" (5 mM guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) dans la colonne, suivi d'une centrifugation pendant 1 minute à 8000 rpm.

Deux lavages successifs sont réalisés grâce à un tampon de lavage à base d'éthanol sur le même principe : ajout de 500 µL de "Wash Buffer" (20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5) dans la colonne puis centrifugation pendant 1 minute à 8000 rpm. Le filtrat est éliminé après chaque lavage.

Après le dernier lavage, une centrifugation très rapide et de courte durée (10 secondes à 14000 rpm) permet d'éliminer les résidus d'alcool.

Enfin, 200 µL d'"Elution Buffer" (10 mM Tris, pH 8,5) préchauffé à 70°C, sont placés dans la colonne et une centrifugation d'une minute à 8000 rpm permet de récupérer la solution d'élution contenant les acides nucléiques purifiés.

Ces échantillons sont ensuite conservés à – 20°C.

2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

a. Principe

Cette réaction permet d'amplifier sélectivement en quelques heures un segment d'ADN choisi. Cela consiste à provoquer in vitro de multiples réplifications d'un gène ou d'une portion de gène connu. Pour cela, la PCR nécessite deux outils de base : des amorces spécifiques et une ADN polymérase.

Un cycle de PCR se compose de 3 étapes :

- L'ADN est tout d'abord dénaturé par chauffage à 94°C, ce qui provoque la séparation des 2 brins complémentaires de la séquence à amplifier.

- Deux oligonucléotides (amorces) complémentaires respectivement de 2 courtes séquences situées aux extrémités 3' des brins sens et anti-sens du fragment d'ADN à amplifier, s'hybrident à une température d'hybridation dépendante de la taille et de la composition des amorces (en moyenne 60 °C).

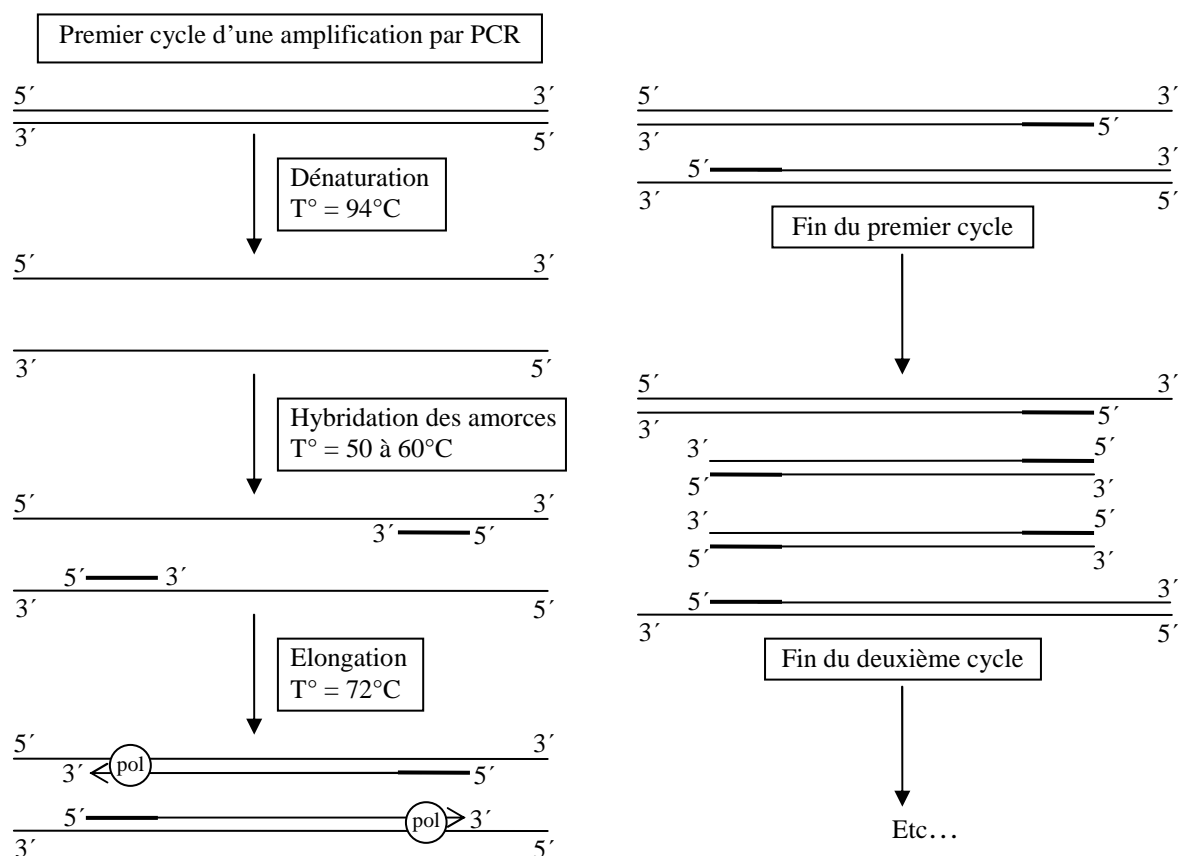
- Les extrémités 3' des oligonucléotides hybridés servent d'amorces à une ADN polymérase. Chaque brin du fragment sert alors de matrice à l'enzyme qui synthétise les brins complémentaires à la température de 72°C.

A l'issue d'un cycle de PCR le facteur de multiplication du fragment à amplifier est de 2.

Au cours du deuxième cycle, les produits issus du premier cycle sont dénaturés par la chaleur, puis les amorces s'hybrident à nouveau avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à l'ADN polymérase. Le facteur d'amplification sera alors de quatre et ainsi de suite. A chaque cycle il y a doublement des copies du fragment d'ADN.

La succession de plusieurs cycles de PCR (en moyenne 30 cycles) permet donc d'amplifier la séquence recherchée un grand nombre de fois.

Figure 7 : Principe de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)



Pour augmenter la spécificité et la sensibilité de la méthode, on réalise ensuite une PCR nichée à partir des produits d'amplification (amplicons) de la première PCR.

Pour cela on utilise d'autres amorces complémentaires de séquences situées à l'intérieur du gène déjà amplifié lors de la première PCR. On obtient alors une séquence amplifiée plus petite que la première.

b. Réalisation pratique

La première PCR vise à amplifier M022L, gène de 1,1 kb. Les amorces employées sont les suivantes :

M.F.30.AS : 5'-TCA GTT TTT TAC CAC CGT ATT GCG GGG ATT-3'

M.F.30.S : 5'-CTC TTT TTC ATG TAT TAA ATG CTA TCA CTT-3'

Une PCR semi nichée est réalisée ensuite, grâce à la même amorce sens et à l'amorce antisens R-R245A et permet d'amplifier une séquence de 750 pb.

R-R245A : 5'-CAG TCT TCT CAT CTT CTC GGA TCA CGG GCA CGA G-3'

Préparation du mix de réaction :

Pour 100 µL de réaction :

Tampon de réaction 10 X (trisCl 100mM pH 8,3, KCl 500mM, MgCl₂ 15mM) : 10 µL

Mélange de dNTP (2,5 mM de chaque dNTP) : 2µL

Taq polymérase (Qbiogene) : 0,8 µL

Amorces 5' et 3' 20 X (10 mM) : 5 µL de chaque

Eau nanopure : qsp 100 µL

Le mix est réparti dans les tubes de réaction à raison de 23 µL par tube, complétés à 25 µL par l'ajout de 2 µL de solution d'ADN purifié issu des échantillons de sang.

Un témoin positif est réalisé en mélangeant 1 µL de solution d'ADN purifié issu d'une culture cellulaire infectée par du T1, dans 24 µL de mix.

Un témoin négatif contenant 25 µL de mix est également réalisé.

Les 35 cycles d'amplification sont réalisés dans un thermocycleur :

- étape de dénaturation : 30 secondes à 94°C
- étape d'hybridation des amorces : 30 secondes à 50°C
- étape d'élongation par la Taq polymérase : 30 secondes à 72°C

c. Intérêts de la PCR

La PCR est une méthode très sensible car elle permet de détecter de très petite quantité de matériel génétique dans l'échantillon de départ.

La spécificité de cette méthode est également excellente, car les amorces utilisées sont spécifiques de la séquence recherchée.

L'utilisation de la PCR nichée permet d'augmenter l'amplification et donc la sensibilité de la technique mais aussi sa spécificité car le deuxième couple d'amorces permet de mieux cibler la séquence recherchée en contournant les éventuelles erreurs d'hybridation du premier couple d'amorces.

3. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

Une solution contenant 0,7 à 1 % d'agarose dans un tampon TBE (Tris Borate d'EDTA) est réalisée. Après fusion, le gel est coulé sur support plastique muni d'un peigne servant à former les puits. Lorsque le gel a refroidi, le peigne est ôté et le gel est immergé dans du TBE.

Les échantillons, composés de 8µL d'amplicons et de 2 µL de tampon de charge (bleu de bromophénol), sont chargés dans les puits. Le premier puit est réservé au marqueur de poids moléculaire (marqueur 1 kb Gibco BRL).

La migration de l'ADN est effectuée sous une tension de 100 à 120 volts.

Le gel est immergé dans une solution de Bromure d'éthidium (BET) à 10 µg/mL pendant 15 minutes puis rincé.

Le gel est ensuite examiné sous rayonnement UV ($\lambda = 312 \text{ nm}$) et photographié.

II. Résultats

A. Manipulations préliminaires

Avant chaque expérience, tous les animaux ont subi un dosage d'anticorps anti-myxomateux par ELISA pour connaître leur statut sérologique avant toute manipulation.

1. Détermination du titre d'anticorps des lapins vaccinés

Le titre en anticorps a été calculé selon la définition énoncée au § 7 de la partie matériels et méthodes et en prenant comme référence le témoin négatif interne dilué au 1/200.

a. Expérience n°1

Les lapins ont été prélevés le jour de l'épreuve (J0), 10 jours après la vaccination, ils se situent donc dans la phase de croissance du titre d'anticorps.

Tableau 9 : Titre en anticorps des lapins vaccinés (J0)

Numéros des lapins	Titre en Anticorps
Lapin 1 (48450)	800
Lapin 2 (48382)	200
Lapin 3 (48112)	200
Lapin 4 (48340)	1600
Lapin 5 (48501)	800

b. Expérience n°2

Les lapins ont été prélevés plusieurs mois après la vaccination, ils se situent donc dans la phase de décroissance du titre d'anticorps.

Tableau 10 : Titre en anticorps des lapins vaccinés (J0-28)

Numéros des lapins	Titre en Anticorps
Lapin 7 (40506)	3200
Lapin 8 (40561)	1600
Lapin 9 (40517)	1600
Lapin 10 (48130)	800
Lapin 11 (48654)	400

2. Vérification du statut sérologique des lapins sentinelles et témoins

Les lapins sentinelles et témoins ont été testés par ELISA et contrôlés séronégatifs avant le début des manipulations.

B. Protection clinique et virologique de la vaccination vis-à-vis des lapins inoculés

1. Expérience n°1

a. Protection clinique

Seule une réaction inflammatoire locale au niveau du point d'inoculation, d'intensité faible a été notée dans les jours suivant l'injection. Ce myxome primaire légèrement érythémateux et non exsudatif a disparu en quelques jours. Aucun autre signe local ou général n'a été observé.

Le lapin témoin a développé une forme aiguë classique de myxomatose. Un myxome primaire s'est formé au niveau du point d'inoculation puis les signes de généralisation sont apparus 5 jours après l'inoculation. L'évolution normale de la maladie a conduit à la mort du lapin témoin en 14 jours.

b. Protection virologique

Les résultats des PCR révélés par l'électrophorèse (figure 8) sont regroupés dans le tableau 11.

Les analyses virologiques effectuées juste après la vaccination (J-9, J-8 et J-7), montrent bien l'absence de virémie avec le virus vaccinal. Ainsi, une virologie positive après inoculation sera forcément due au virus d'épreuve et non au virus vaccinal.

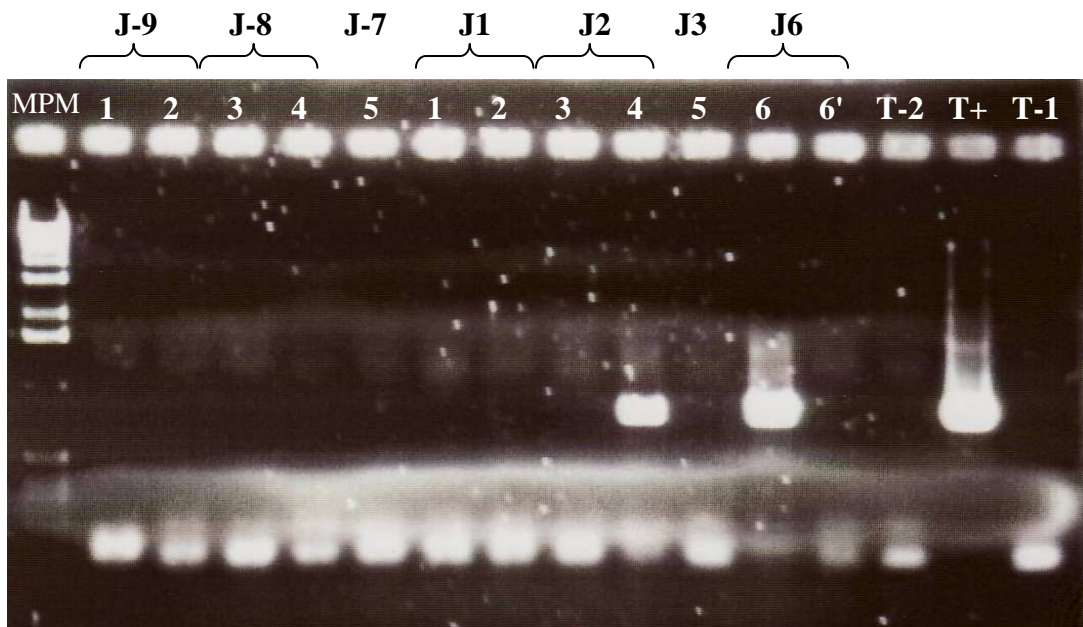
La virémie du lapin témoin, ayant développé une forme clinique aiguë de myxomatose, a été confirmée par la PCR de J6.

En ce qui concerne les lapins vaccinés, les analyses virologiques ont mis en évidence une virémie chez un des animaux : le lapin n°4 à J2. Un signal très faible a été détecté à l'issue de la PCR semi nichée uniquement, la PCR simple ne permettant pas cette détection. Aucune virémie post-inoculation n'a été détectée chez les 4 autres lapins vaccinés.

Tableau 11 : Résultats des PCR des lapins vaccinés

Numéros des lapins	PCR						
	J-9	J-8	J-7	J1	J2	J3	J6
Lapin 1 (48450)	-			-			
Lapin 2 (48382)	-			-			
Lapin 3 (48112)		-			-		
Lapin 4 (48340)		-			+		
Lapin 5 (48501)			-			-	
Lapin 6 (48692) : témoin							+

Figure 8 : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins vaccinés de l'expérience n°1



Légende :

MPM : Marqueur de poids moléculaire (1 kb)

T-1 : Témoin négatif n°1 : il correspond aux produits issus de l'amplification d'un échantillon du témoin négatif de la première PCR, par la PCR nichée. Ce témoin négatif permet donc de valider la PCR nichée en écartant une erreur de manipulation lors de la première PCR.

T-2 : Témoin négatif n°2 : c'est le témoin normal de la PCR semi nichée.

T+ : Témoin positif

2. Expérience n°2

a. Protection clinique des animaux inoculés

La surveillance clinique des lapins inoculés a révélé des formes cliniques différentes d'un animal à l'autre (Annexe 1).

Le lapin 7 (n°40506) n'a présenté aucune manifestation clinique suite à l'inoculation.

Les lapins 8, 9 et 10 ont présentés des signes locaux au point d'inoculation sans aucun signe clinique général.

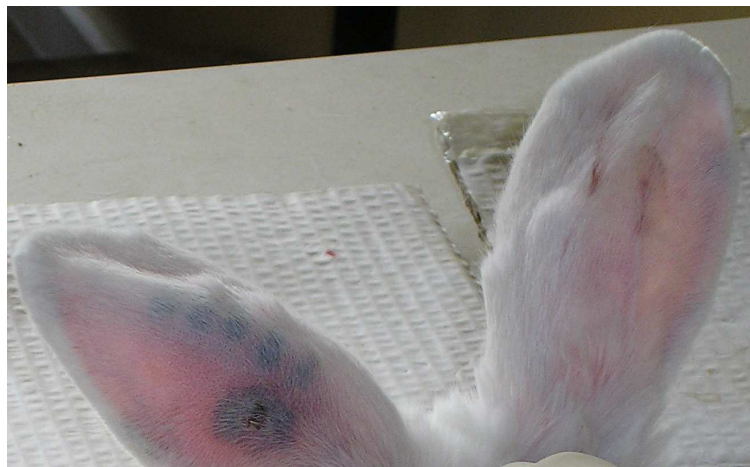
Le lapin 8 (n°40561) a présenté une lésion légèrement érythémateuse non exsudative au niveau du point d'inoculation. Cette réaction inflammatoire locale de faible intensité a disparu à partir de J8. Un nodule ferme et froid de 1cm de diamètre au maximum a persisté tout au long de l'expérience.

Le lapin 9 (n°40517) a présenté un myxome primaire érythémateux et non exsudatif correspondant à une réaction inflammatoire locale modérée qui a disparu à partir de J10 sans laisser de séquelle.

Le lapin 10 (n°48130) a présenté un myxome primaire sous la forme d'une macule rougeâtre de 4 cm de diamètre (réaction inflammatoire locale marquée). Une scarification (nécrose) est apparue à J8 au centre et a persisté tout au long de l'expérience pour atteindre un diamètre maximum de 1,5 cm.

Le lapin 11 (n°48654) a présenté un myxome primaire de 5 cm de diamètre. Une scarification identique à celle du lapin précédent est apparue à J8 autour du point d'inoculation et a persisté pour atteindre une taille maximum de 2 cm de diamètre (Photo 1).

Photo 1 : Scarification locale de l'oreille gauche du lapin n°11 à J8



Les signes généraux sont apparus à partir de J6 : blépharoconjonctivite bilatérale faible, quelques myxomes secondaires sur la face et les oreilles, une gêne respiratoire modérée et un léger abattement. Une amélioration clinique a été observée à partir de J11, avec une guérison totale progressive.

Le lapin 12 (n°62370), c'est-à-dire le lapin témoin a développé une forme clinique aiguë classique de myxomatose. Le myxome primaire s'est étendu sur 5 cm de diamètre.

Les signes cliniques généraux sont apparus à partir de J6 : abattement marqué, blépharoconjonctivite bilatérale sévère avec de nombreux myxomes secondaires sur la face, les yeux et les oreilles, et une gêne respiratoire sévère (Photo 2). L'anorexie et l'amaigrissement progressif de l'animal ont conduit à sa mort à J18.

Photo 2 : Lapin n°12 à J11



b. Protection virologique

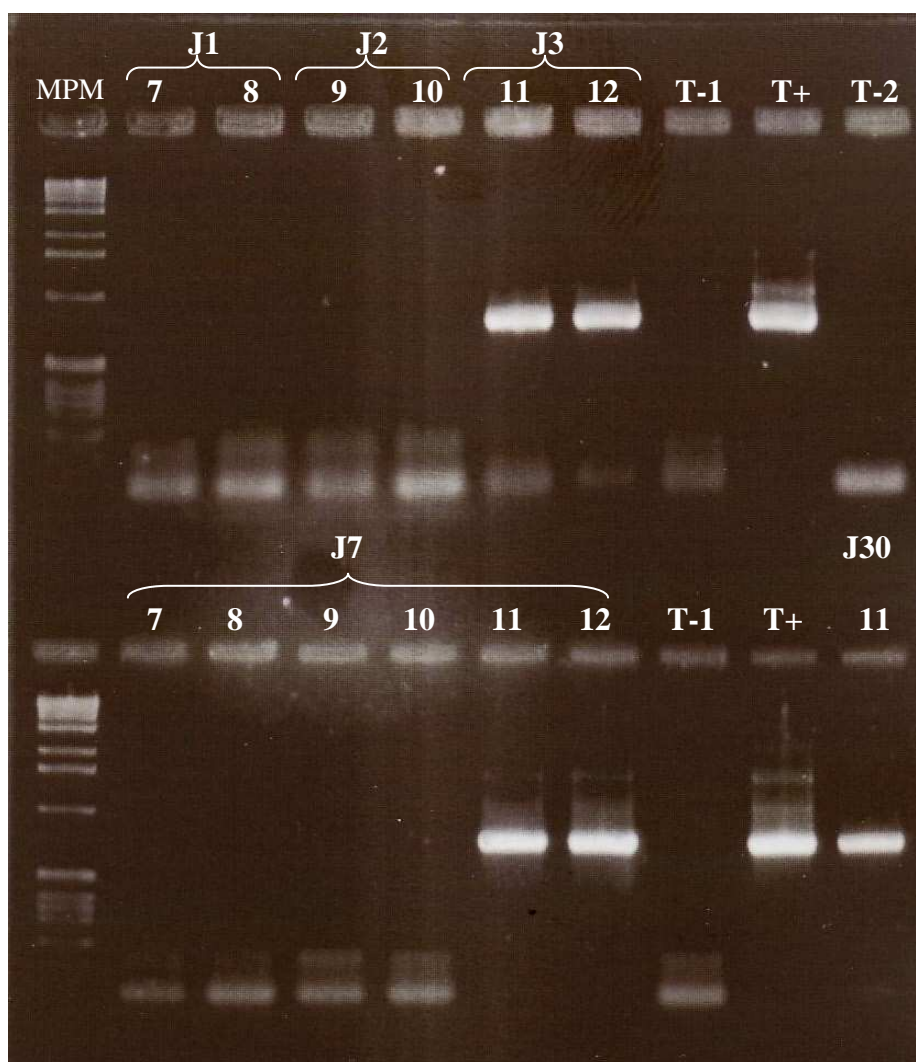
Les résultats des PCR visibles sur la photo du gel d'électrophorèse de la figure 9 sont recensés dans le tableau 12.

Le lapin témoin, ayant développé une forme clinique aiguë de myxomatose, s'est révélé virémique à J3 et à J7. Pour les animaux vaccinés, seul le lapin 11 (48654), a développé une virémie. Cette virémie s'est mise en place dans les mêmes délais que le lapin témoin c'est-à-dire à partir de J3 mais a persisté malgré la guérison clinique et une virémie résiduelle a pu être mise en évidence à J30.

Tableau 12 : Résultats des PCR des lapins vaccinés

Numéros des lapins	PCR				
	J1	J2	J3	J7	J30
Lapin 7 (40506)	-			-	
Lapin 8 (40561)	-			-	
Lapin 9 (40517)		-		-	
Lapin 10 (48130)		-		-	
Lapin 11 (48654)			+	+	+
Lapin 12 (62370) : témoin			+	+	

Figure 9 : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins vaccinés de l'expérience n°2



Le tableau 13 récapitule les différents résultats obtenus pour les lapins inoculés. Les formes cliniques sont classées en fonction de leur forme épidémiologique.

Tableau 13 : Synthèse des résultats des lapins inoculés de l'expérience n°2

Numéros des lapins	Titre en Anticorps	Forme clinique	PCR				
			J1	J2	J3	J7	J30
Lapin 7 (40506)	3200	RAS	-			-	
Lapin 8 (40561)	1600	Locale +	-			-	
Lapin 9 (40517)	1600	Locale ++		-		-	
Lapin 10 (48130)	800	Locale +++		-		-	
Lapin 11 (48654)	400	Subaiguë			+	+	+
Lapin 12 (62370) : témoin	0	Aiguë			+	+	

C. Etude de la transmission du virus d'épreuve aux lapins sentinelles

1. Observation clinique des animaux sentinelles

Les lapins sentinelles des deux expériences n'ont développé aucun signe clinique.

Les deux lapins sentinelles en contact avec les lapins inoculés témoins, ont développé une forme aiguë de myxomatose. Le lapin n°6' (expérience n°1) a développé les premiers signes cliniques à partir de J17 et a été euthanasié à la fin de l'expérimentation, tandis que le lapin n°12' (expérience n°2) a débuté une symptomatologie à J15 et est mort à J31.

2. Analyses virologiques et sérologiques

a. Expérience n°1

Le tableau 14 regroupe les résultats des PCR dont l'électrophorèse est représenté sur la figure 10. L'échantillon du lapin 1' à J13 qui s'est révélé positif à l'issue de cette électrophorèse, a été contrôlé et confirmé négatif par plusieurs analyses de contrôle.

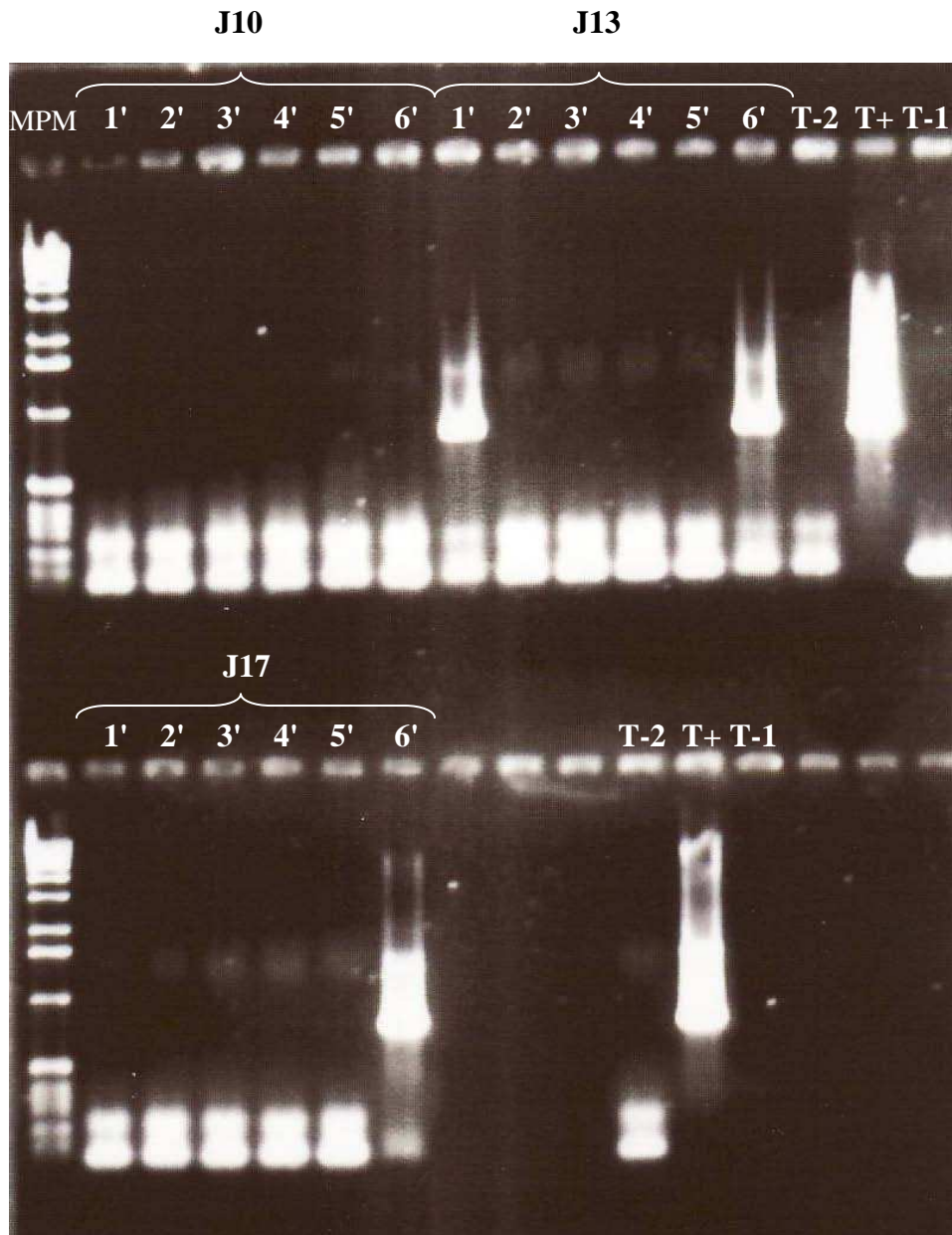
Les résultats des analyses virologiques effectuées sur les 5 lapins sentinelles, correspondent à l'observation clinique. Ainsi, aucune virémie n'a été détectée chez les lapins sentinelles sur les trois séries de prélèvements réalisées. La virémie du lapin sentinelle-témoin (lapin 6') a été mise en évidence sur les prélèvements de J13 et J17.

Deux analyses sérologiques ont été réalisées pour confirmer l'absence de transmission du virus d'épreuve aux lapins sentinelles. Ainsi, les prélèvements réalisés à J13 et J27 ont été analysés par ELISA et se sont révélés séronégatifs sans exception.

Tableau 14 : Résultats des PCR des lapins sentinelles

Numéros des lapins	PCR		
	J10	J13	J17
Lapin 1' (48461)	-	-	-
Lapin 2' (48490)	-	-	-
Lapin 3' (48130)	-	-	-
Lapin 4' (48654)	-	-	-
Lapin 5' (48134)	-	-	-
Lapin 6' (48658)	-	+	+

Figure 10 : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins sentinelles de l'expérience n°1



b. Expérience n°2

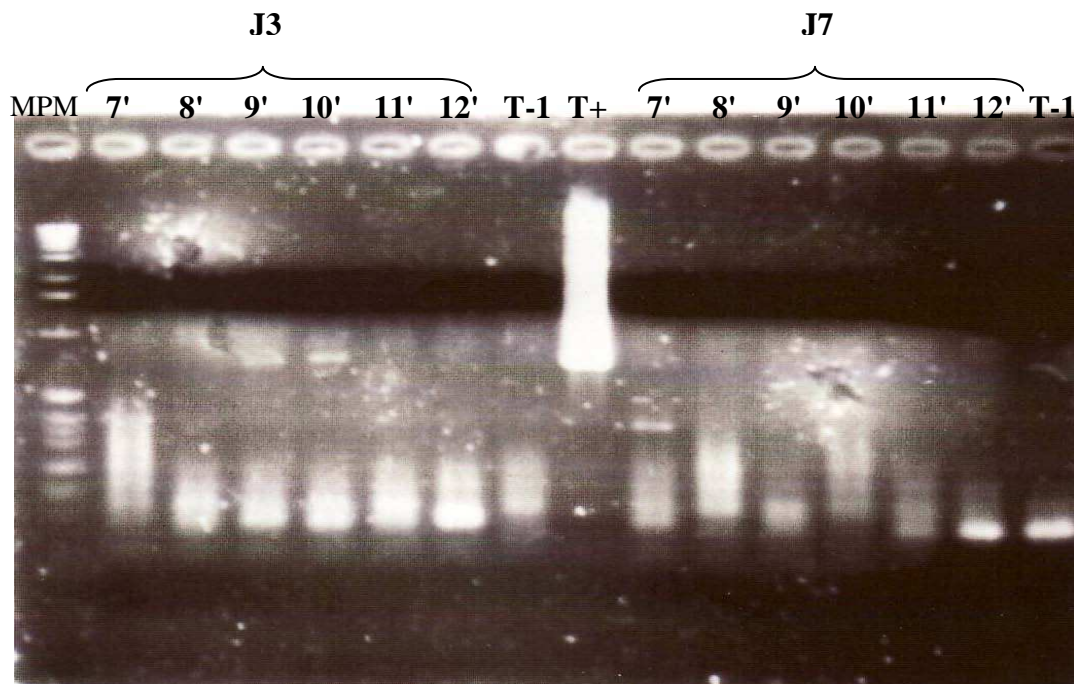
Le tableau 15 regroupe les résultats des PCR correspondant aux figures 11 et 12.

Le lapin 11' a été trouvé positif sur le prélèvement de J17 uniquement (figure 12). Aucune virémie n'a été détectée chez les quatre autres lapins sentinelles sur les six séries de prélèvements réalisées. La virémie du lapin sentinelle-témoin (lapin 12') a été mise en évidence à partir de J10 puis a été confirmée sur les prélèvements de J13, J17 et J20.

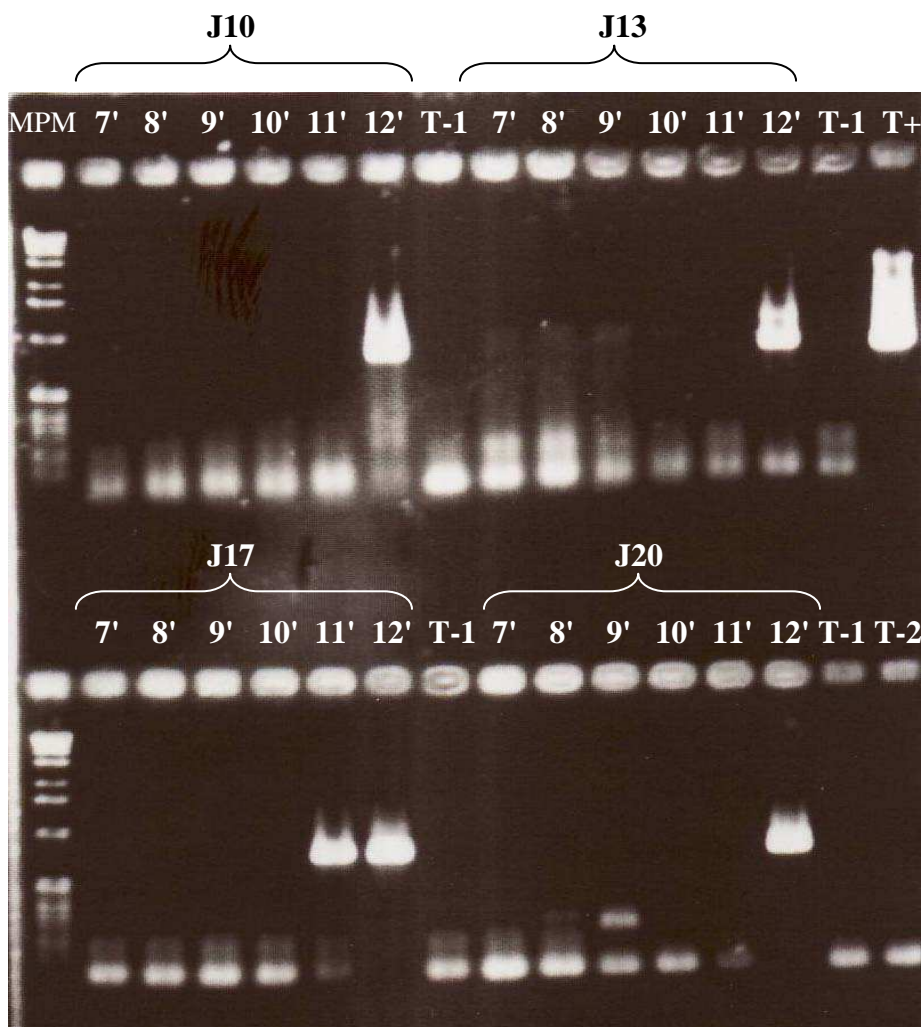
Tableau 15 : Résultats des PCR des lapins sentinelles

Numéros des lapins	PCR					
	J3	J7	J10	J13	J17	J20
Lapin 7' (62389)	-	-	-	-	-	-
Lapin 8' (62692)	-	-	-	-	-	-
Lapin 9' (62306)	-	-	-	-	-	-
Lapin 10' (62394)	-	-	-	-	-	-
Lapin 11' (62206)	-	-	-	-	+	-
Lapin 12' (48134)	-	-	+	+	+	+

Figures 11 : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins sentinelles de l'expérience n°2 pour J3 et J7



Figures 12 : Gel d'électrophorèse issu des PCR des lapins sentinelles de l'expérience n°2 pour J10, J13, J17 et 20



Les résultats des sérologies réalisées sur ces lapins sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau 16 : Résultats des sérologies des lapins sentinelles

Numéros des lapins	ELISA			
	J7	J13	J20	J30
Lapin 7' (62389)	-	-	-	-
Lapin 8' (62692)	-	-	-	-
Lapin 9' (62306)	-	-	-	-
Lapin 10' (62394)	-	-	-	-
Lapin 11' (62206)	-	-	-	-
Lapin 12' (48134)	-	-	+ (titre : 800)	(+ titre : 3200)

Seul le lapin sentinelle-témoin (lapin 12') a présenté une séroconversion. Les analyses de J20 et de J30 ont montré des résultats positifs avec un titre respectivement de 800 et de 3200. Le lapin 11' n'a pas présenté de séroconversion malgré la mise en évidence de la présence du virus à J17 sur l'analyse précédente.

Enfin, un tableau synthétique regroupant tous les résultats concernant l'expérience n°2 (Annexe 2) permet d'avoir une vision globale des observations cliniques, virologiques et sérologiques par couple de lapins.

III. Discussion générale

La myxomatose est une maladie infectieuse, virulente, inoculable, dont la transmission dans la nature est essentiellement vectorielle. Toutefois, d'autres moyens de transmission de la maladie sont connus. Le virus présent dans les sécrétions et les excréments des lapins malades se transmet par contagion directe dans certaines conditions. Le contact immédiat d'exsudats virulents avec les muqueuses autorise la transmission. La voie respiratoire est rencontrée lorsque le lapin est soumis à une atmosphère riche en virus, dans des locaux confinés, mal ventilés avec une densité importante d'animaux. En outre, tout microtraumatisme cutanéomuqueux est, en théorie, une porte d'entrée pour le virus. Ainsi, le toilettage avec des griffes porteuses du virus, le contact avec des épines contaminées, les combats entre lapins, sont autant de moyens de contamination (Joubert *et al.*, 1972).

De nombreux facteurs favorisant une transmission efficace par contagion directe sont réunis lors de la mise en cohabitation étroite de deux lapins mâles. Le comportement social et grégaire de cette espèce entraîne un contact permanent des deux animaux et favorise les combats. La voie respiratoire sur une très courte distance est également sollicitée.

Nos conditions expérimentales nous ont donc permis d'étudier la contagion directe de la myxomatose même si c'est un mode de transmission minoritaire dans la nature. En revanche, l'étude de la transmission vectorielle de la myxomatose n'a pas été réalisée. En effet, il aurait fallu, pour cela, mettre chaque couple de lapins en isolement total et en présence des vecteurs spécifiques de la myxomatose, ce qui n'était pas réalisable dans les locaux expérimentaux de l'ENVT.

Ainsi, les lapins ont simplement été placés en contact étroit dans des cages individuelles, le couple de témoins étant isolé des autres lapins. Les expériences ont été menées dans des locaux fermés, désinsectisés et aucune puce n'a été observée au cours des 2 expériences. Les manipulations se sont déroulées au mois de mai 2006 pour l'expérience n°1 et d'octobre 2006 pour l'expérience n°2 afin d'éviter les périodes de pullulation des moustiques.

La transmission de la myxomatose a bien été observée pour les couples de lapins témoins des expériences n°1 et n°2, avec des signes cliniques qui sont apparus dans les mêmes délais, à savoir respectivement 17 et 15 jours après la mise en contact. Nos expériences permettent donc de valider la transmission de la myxomatose lors de promiscuité étroite, dans un endroit confiné et en l'absence de vecteurs, entre un lapin inoculé développant une forme aiguë de myxomatose et un lapin séronégatif.

L'objectif de nos travaux était de travailler sur deux périodes critiques de la cinétique des anticorps produits par la vaccination, à savoir au moment de la période de séroconversion et en fin de la période protectrice estimée, lors de la décroissance des taux d'anticorps.

Le suivi sérologique des animaux séropositifs a été effectué par ELISA car c'est une technique semi-quantitative extrêmement spécifique ($Sp = 100\%$) et sensible ($Se = 100\%$, 21 jours après vaccination homologue), permettant de détecter des titres d'anticorps faibles (Gelfi *et al.*, 1999). Le calcul des titres en anticorps a été réalisé en choisissant comme référence le témoin négatif interne dilué au 1/200, conformément aux pratiques habituelles du laboratoire. Les valeurs des titres en anticorps permettent donc uniquement de comparer le statut sérologique des lapins entre eux et ne pourront être extrapolés dans d'autres situations qu'à condition de reproduire les mêmes méthodes d'analyse et de calcul.

Les données bibliographiques sur la souche vaccinale SG33 indiquent que la réponse immunitaire apparaît dès le 3^e jour post-vaccination (Saurat *et al.*, 1978) et que la protection clinique est assurée dès le 7^e jour (Picavet *et al.*, 1989). Les résultats de l'expérience n°1 sont en accord avec ces données et montrent que 10 jours après vaccination, l'immunité conférée est suffisante pour assurer une protection clinique vis-à-vis d'une souche hypervirulente. Cependant, le titre en anticorps des lapins vaccinés, déterminé le jour de l'épreuve, n'apporte ici que peu de renseignements. En effet, les titres sont très hétérogènes (de 200 à 1600) et ne sont pas corrélés aux résultats cliniques et virologiques. Ainsi, alors qu'aucun lapin n'a présenté de signes cliniques, le lapin ayant le titre en anticorps le plus élevé (lapin n°4) a présenté une virémie faible et transitoire (détectée à J2). La vaccination avec le vaccin vivant SG33 confère donc une protection clinique au moins à partir du 10^e jour post-vaccination, malgré un titre en anticorps hétérogène selon les lapins.

Pour l'expérience n°2, la corrélation entre le titre en anticorps anti-myxomateux et la clinique des animaux vaccinés post-inoculation semble intéressante, puisque le lapin présentant le titre en anticorps le plus bas (400) a développé une forme subaiguë de myxomatose. Les autres lapins présentant des titres plus élevés n'ont développés que des lésions locales au point d'inoculation sans signe de généralisation. Les lapins séropositifs, utilisés lors de l'expérience n°2, ont été vaccinés lors de précédentes expériences avec deux types de souches virales vivantes modifiées : d'une part les 2 virus dérivant de SG33 et d'autre part un virus issu de T1 (tableau 6). Les deux virus recombinants issus du virus SG33 possèdent les mêmes propriétés immunologiques que ce dernier. Les valeurs des titres en anticorps sont hétérogènes et varient logiquement en fonction de la date de vaccination et du type de vaccin utilisé (tableau 10).

Les lapins 10 et 11 ont reçu une monoinjection de vaccin SG33-GFP plus de 4 mois avant l'épreuve et seul le second lapin a développé une forme subaiguë de myxomatose. La protection clinique n'est donc pas totale 4 mois et demi après vaccination. Le lapin 8 a reçu, quant à lui, deux injections de SG33-NS2 à 4 semaines d'intervalle dont la première a été effectuée 10 mois avant l'épreuve et possède un titre en anticorps suffisamment élevé (1600) pour assurer une bonne protection clinique. Les travaux de Saurat *et al.* (1978) sur le SG33 indiquent une protection clinique de 6 mois lors de monoinjection et de 8 mois avec un rappel à 6 semaines, ce qui est cohérent avec nos résultats. Enfin, les lapins 7 et 9 vaccinés avec le virus recombinant issu de T1 ont de forts titres en anticorps 9 mois après vaccination. Nos résultats semblent indiquer que dans nos conditions expérimentales, un titre en anticorps minimum de 800 est associé à une protection clinique optimale.

Le délai relativement long de 28 jours entre la détermination des titres en anticorps et la mise en contact (J0), s'explique par des épisodes cliniques de pasteurelloses chez certains des jeunes lapins destinés à être sentinelles qui nous ont obligé à repousser le début de l'expérimentation. Un traitement antibiotique à base d'Oxytétracycline, administré pendant 10 jours à l'ensemble des animaux, a permis de stopper la mortalité rapidement. Considérant que les valeurs des titres en anticorps seraient inchangées après ce contretemps les analyses n'ont pas été renouvelées le jour de la mise en contact effective.

Le virus recombinant issu de la mutation d'un seul gène du virus hypervirulent T1 n'entraîne aucune expression clinique sur les animaux inoculés (Bertagnoli, données non publiées) tout en conservant un pouvoir immunogène très supérieur à celui du virus SG33. Ceci nous montre que l'immunogénécité d'une souche virale myxomateuse est d'avantage liée au fond génétique qu'à l'intensité des signes cliniques qu'elle provoque. De plus, si la cinétique des anticorps produits par la vaccination avec le virus SG33 est relativement bien connue, ce n'est pas le cas du T1-M022L-N-gfp pour lequel nous n'avons que très peu de recul. Ainsi, l'utilisation des titres en anticorps totaux des différents lapins utilisés nous a permis d'avoir une appréciation relative et comparative du niveau de protection des différents lapins entre eux. Cependant, plusieurs biais sont à déplorer. Tout d'abord, le titre en anticorps est le seul paramètre utilisé ici pour estimer le statut immunologique des lapins séropositifs ce qui signifie que l'on ne tient compte que de la réaction immunitaire à médiation humorale. Or, la réaction immunitaire à médiation cellulaire qui tient un rôle prédominant dans la protection de l'hôte face aux Poxvirus, est essentiellement déterminée par le fond génétique de la souche virale. D'autre part, nous avons travaillé d'après les valeurs des titres en anticorps totaux données par le test ELISA. La détermination des titres en anticorps neutralisants par

séroneutralisation nous aurait permis d'affiner les paramètres prédictifs d'une protection clinique et virologique optimale. Enfin, le nombre trop réduit d'animaux utilisés dans nos expériences ne permet pas de déterminer un niveau de protection clinique correspondant à un titre en anticorps donné.

Un simple titre en anticorps ne constitue pas pour l'instant un paramètre fiable pour prédire une protection clinique. Une expérience avec un nombre suffisant de lapins, vaccinés avec un même fond génétique et selon le même protocole pourrait éventuellement permettre de déterminer un seuil de titre en anticorps au dessus duquel les lapins bénéficient statistiquement d'une meilleure protection clinique. Dans tous les cas, l'utilisation de titre en anticorps pour estimer le statut épidémiologique et immunologique d'une population de lapins de garenne semble peu réaliste.

Les analyses virologiques sont réalisées par PCR, méthode très sensible, détectant de très petite quantité de matériel génétique dans l'échantillon de départ. De surcroît, l'utilisation de la PCR semi nichée permet d'augmenter nettement la sensibilité de la méthode de détection. Cependant, il est vrai que les résultats de la PCR nichée étaient souvent identiques à ceux de la PCR simple. Elle a permis notamment de détecter le virus sur les animaux témoins à des stades plus précoces que ne l'aurait permis la PCR simple. Toutefois, la multiplication des manipulations et l'augmentation de la sensibilité ont engendré l'apparition de quelques cas de faux positifs. En effet, si des problèmes de contamination peuvent survenir à chaque étape de la PCR, il est d'autant plus important de travailler proprement lors de l'utilisation de la PCR nichée. Ainsi, les analyses virologiques ont demandé plusieurs analyses de contrôle pour confirmer chaque résultat.

L'injection intradermique du virus SG33 peut engendrer dans quelques cas une virémie faible et éphémère détectable jusqu'à 5 jours après la vaccination (Saurat *et al.*, 1978). Lors de l'expérience n°1, les lapins vaccinés ont donc fait l'objet d'une série d'analyses virologiques dans les 3 jours après la vaccination pour vérifier l'absence de virus vaccinal dans le sang.

La virémie consécutive à une infection par une souche virale hypervirulente est détectable dès le 2^e jour après inoculation (Joubert *et al.*, 1972). La recherche de virémie a donc été effectuée dès les 3 premiers jours suivants l'inoculation d'épreuve pour les 2 expériences, Lors de l'expérience n°1, seul le lapin 2 a présenté, malgré la vaccination, une virémie faible et transitoire, détectable uniquement à J2.

En ce qui concerne l'expérience n°2 le lapin 11 a présenté une virémie dès J3 et qui est encore détectée lors de la dernière analyse effectuée à J30 malgré une guérison clinique

complète. La virémie de J30 n'a été détectée qu'à l'issue de la PCR nichée, les produits d'amplification de la PCR simple n'étant pas détectable à l'électrophorèse. Ceci signifie que la quantité de virus présent dans le sang était faible. Il est probable que nous avons détecté ici les dernières traces d'une virémie résiduelle, grâce à une technique de détection extrêmement sensible.

Les deux expériences tendent à montrer que la transmission du virus d'épreuve aux lapins sentinelles contacts en l'absence de vecteurs, est fortement compromise par la vaccination.

Cependant, le couple de lapins 11 et 11' apporte des informations essentielles. La PCR du lapin 11' de J17 s'est révélée positive à l'issue de l'électrophorèse de la PCR nichée, la première amplification étant négative. En outre, ce lapin 11' n'a développé aucun signe clinique et est resté séronégatif jusqu'à J30. La détection d'une virémie ponctuelle à J17 en l'absence de toute séroconversion semble très douteuse. En effet, une transmission effective du virus T1 aurait dû entraîner une expression clinique aiguë et en tous cas une séroconversion manifeste à J30. Malgré deux vérifications complètes qui ont donné les mêmes résultats, il est probable que cette PCR nichée de J17 soit faussement positive. Un suivi sérologique prolongé de ce lapin au delà de J30 aurait été intéressant, mais cela n'a pas pu être réalisé pour des raisons de disponibilité des manipulateurs.

Néanmoins, quels auraient été les résultats en présence de vecteurs. A priori, il est logique de penser que tout animal virémique ou porteur du virus au niveau du point d'inoculation est susceptible d'être une source de contagion. Le lapin n°11 qui a développé une forme subaiguë de myxomatose, peut être considéré comme une source de contamination pour un vecteur éventuel, même s'il n'a pas transmis le virus à son lapin sentinelle dans nos conditions expérimentales.

L'échec de la transmission du virus du lapin 11 à son lapin contact malgré le développement d'une forme subaiguë de myxomatose prouve que l'efficacité de la contagion directe est fortement dépendante de l'intensité des lésions. En effet, seuls les 2 lapins témoins qui ont déclaré des formes aiguës de myxomatose ont transmis le virus d'épreuve. Le caractère exsudatif et virulent des lésions myxomateuses aiguës est déterminant dans la contagion par contact immédiat. Les lésions du lapin 11 n'étaient probablement pas assez exsudatives et chargées en virus pour permettre la transmission. De plus, le délai de déclaration clinique des lapins sentinelles-témoins (17 et 15 jours) semble assez long si on considère que les lapins inoculés correspondants étaient extrêmement contagieux dès la

généralisation clinique soit J6. L'incubation étant assez courte pour les souches hypervirulentes (de 3 à 7 jours), la déclaration clinique aurait pu, en théorie, intervenir plus tôt. La contagion directe reste donc un mode de transmission marginal dont l'efficacité est largement dépendante de l'intensité des lésions et de la durée de contact. Dans la nature, les vecteurs sont essentiels dans la transmission des souches nodulaires de myxomatose.

Les résultats de notre travail qui ne concernent que les souches classiques nodulaires ne peuvent, bien entendu, pas être étendus aux souches amyxomateuses. On considère que ces formes de myxomatose « respiratoire » sont régies par les schémas épidémiologiques classiques avec une transmission vectorielle prioritaire mais aussi une transmission aérogène (Joubert et *al.*, 1982). Il est légitime de se demander si l'utilisation d'une souche amyxomateuse hypervirulente comme virus d'épreuve conduirait à des résultats similaires en matière de transmission.

Notre étude s'est appuyée sur des lapins séropositifs ayant été préalablement vaccinés. Mais qu'en est-il des jeunes lapereaux, issus de lapines séropositives ayant transmis des anticorps anti-myxomateux à leur progéniture pendant la gestation mais aussi par l'intermédiaire du colostrum et du lait ? Une pré-étude réalisée au printemps 2007 a permis de préciser la cinétique des anticorps maternels chez le lapereau (Bertagnoli, 2007, données non publiées). Une étude semblable à la notre est prévue pour déterminer dans quelles conditions les lapereaux sont protégés par l'immunité maternelle et ne transmettent pas le virus à des lapins séronégatifs.

Enfin, une expérience identique à la notre, en présence de vecteurs de la myxomatose, serait sans aucun doute très riche en enseignements. Ce type d'expérience est pour l'heure irréalisable dans les locaux expérimentaux de l'ENVT en raison des contraintes matérielles (confinement total de chaque couple de lapin) mais aussi biologiques. En effet, cela nécessiterait de maîtriser parfaitement l'élevage et la contention de ces vecteurs pour éviter une contamination accidentelle de l'environnement.

Conclusion

De cette étude nous pouvons retenir qu'en l'absence de vecteurs les lapins séropositifs inoculés ne transmettent pas le virus myxomateux aux lapins séronégatifs.

Néanmoins la protection clinique et virologique de la vaccination n'est pas totale pour tout titre d'anticorps initial. Un animal séropositif peut développer une forme atténuée de myxomatose lors de réinfections et ainsi constituer un réservoir temporaire de virus et une source de contagion pour les arthropodes piqueurs.

Notre étude rencontre ici ses limites car nous nous sommes appuyés sur un mode de contagion minoritaire dans la nature. Il est nécessaire de renouveler des expériences similaires de mise en contact de lapins inoculés et de lapins séronégatifs, en présence de vecteurs : moustiques et puces.

En outre, pour compléter l'étude du rôle épidémiologique des lapins séropositifs, l'existence de lapins porteurs latents doit être recherchée expérimentalement. A notre connaissance, aucune étude récente n'est venue attester ou infirmer formellement les travaux de Williams et *al.* (1972 et 1973), qui soulèvent l'hypothèse d'une résurgence virale lors de la décroissance du taux d'anticorps. La confirmation de l'existence de porteurs latents asymptomatiques, c'est-à-dire de réservoirs de virus à moyen ou long terme, remettrait en cause une grande partie de l'épidémiologie connue de la myxomatose.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mr BONLIEU Simon, Marie , Jacques

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 6 Juillet 2006

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Maître de Conférences, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mr BONLIEU Simon, Marie , Jacques

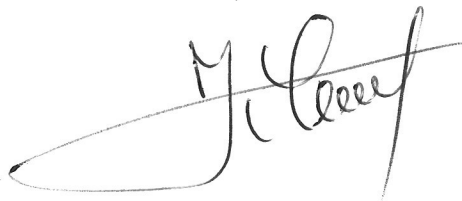
intitulée :

Etude de la protection virologique induite par la vaccination contre la myxomatose chez le lapin européen

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Stéphane BERTAGNOLI**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Christophe PASQUIER**



**Vu le : 12 JAN. 2007
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



Références Bibliographiques

ARTHUR C.P., LOUZIS C. La myxomatose du lapin en France : une revue. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1988, **7** (4), 937-957.

BEST S.M., COLLINS S.V., KERR P.J. Coevolution of host and virus : Cellular localization of virus in myxoma virus infection of resistant and susceptible european rabbits. *Virology*, 2000, **277**, 76-91.

BEST S.M., KERR P.J. Coevolution of host and virus : The pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible european rabbits. *Virology*, 2000, **267**, 36-48.

BLANC G., ASCIONE L. Quelques expériences sur le rôle possible de transmetteuse et réservoir de virus de la tique *Rhipicephalus sanguineus* Latreille dans la myxomatose. *Bull. Société de Pathologie exotique*, 1961, **54**, 935-939.

BOAG B. Observations on the seasonal incidence of myxomatosis and its interactions with helminth parasites in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Wildl. Dis.*, 1988, **24** (3), 450-455.

BOURLIERE F. Conséquences biologiques dues à la présence de la myxomatose. *Terre et Vie*, 1956, **103** (3-4), 123-130.

BROYLES S.S. Vaccinia virus transcription. *J. Gen. Virol.*, 2003, **84** (9), 2293-2303

BRUN A., SAURAT P., GILBERT Y., GODARD A., BOUQUET J.F. Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose. *Revue Méd. vét.*, 1981, **132** (8-9), 585-590.

BULLER R.M., PALUMBO G.J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, 1991, **55** (1), 80-122.

CALVETE C., ESTRADA R., LUCIENTES J., OSACAR J.J., VILLAFUERTE R. Effects of vaccination against viral haemorrhagic disease and myxomatosis on long-term mortality rates of European wild rabbits. *Vet. Rec.*, 2004a, **155** (13), 388-392.

CALVETE C., ESTRADA R., OSACAR J.J., LUCIENTES J., VILLAFUERTE R. Short-term negative effects of vaccination campaigns against myxomatosis and viral hemorrhagic disease (VHD) on the survival of european wild rabbits. *J. Wildl. Manage.*, 2004b, **68** (1), 198-205.

CALVETE C., ESTRADA R., VILLAFUERTE R., OSACAR J.J., LUCIENTES J. Epidemiology of viral haemorrhagic disease and myxomatosis in a free-living population of wild rabbits. *Vet. Rec.*, 2002, **150** (25), 776-782.

CAMERON C., HOTA-MITCHELL S., CHEN L., BARRETT J., CAO J.X., MACAULAY C., WILLER D., EVANS D., McFADDEN G. The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*, 1999, **264** (2), 298-318.

CARTER G.C., LAW M., HOLLINSHEAD M., SMITH G.L. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interaction with glycoaminoglycans. *J. Gen. Virol.*, 2005, **86**, 1279-1290.

COLLIN N., GUERIN J.L., DREXLER I., BLANIE S., GELFI J., BOULLIER S., FOUCRAS G., SUTTER G., MESSUD-PETIT F. The poxviral scrapin MV-LAP requires a myxoma viral infection context to efficiently downregulate MHC-I molecules. *Virology*, 2005, **343** (2), 171-178.

CYRKLAFF M., RISCO C., FERNANDEZ J.J., JIMENEZ M.V., ESTEBAN M., BAUMEISTER W., CARRASCOSA J.L. Cryo-electro tomography of vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102** (8), 2772-2777.

DE LANGE A.M., McFADDEN G. The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1990, **163**, 71-92.

DUBOCHET J., ADRIAN M., RICHTER K., GARCES J., WITTEK R. Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J. Virol.*, 1994, **68** (3), 1935-1941.

DUTEYRAT J.L., GELFI J., BERTAGNOLI S. Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Arch. Virol.*, 2006, **151** (11), 2161-2180.

EDMONDS J.W., NOLAN I.F., ROSAMOND C.H., SHEPHERD R.C., GOCS A. Myxomatosis: the virulence of field strains of myxoma virus in a population of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.) with high resistance to myxomatosis. *J. Hyg. Camb. (Lond.)*, 1975, **74** (3), 417-418.

EDMONDS J.W., ROSAMOND C.H., SHEPHERD R.C., NOLAN I.F. Myxomatosis: the occurrence of antibody to a soluble antigen of myxoma virus in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), in Victoria, Australia. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1978, **81** (2), 245-249.

FENNER F., DAY M.F., WOODROOFE G.M. Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1956, **54**, 284-303.

FENNER F., FANTINI B. Biological control of vertebrate pests. The history of myxomatosis-an experiment in evolution, 1999, CABI Publishing, Wallingfordb- Oxon.

FENNER F., MARSHALL I.D. A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1957, **55** (2), 149-191.

FENNER F., MARSHALL I.D. Passive immunity in myxomatosis of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): the protection conferred on kittens born by immune does. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1954, **52**, 321-336.

FENNER F., MARSHALL I.D., WOODROOFE G.M. Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits: 1. Recovery of Australian wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from myxomatosis under field conditions. *J. Hyg., Camb.(Lond.)*, 1953, **51**, 225-44.

FENNER F., RATCLIFFE F.N. Myxomatosis. (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 1965.

FLOWERDEW J.R., TROUT R.C., ROSS J. Myxomatosis: population dynamics of rabbits (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) and ecological effects in the United Kingdom. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1992, **11** (4), 1109-1113.

FOUCHET D., MARCHANDEAU S., BAHJ-JABER N., PONTIER D. The role of maternal antibodies in the emergence of severe disease as a result of fragmentation. *J. R. Soc. Interface*, 2007, **4**, 479-489.

FOUCHET D., MARCHANDEAU S., LANGLAIS M., PONTIER D. Waning of maternal immunity and the impact of diseases : The example of myxomatosis in natural rabbit populations. *J. Theor. Biol.*, 2006, **242** (1), 81-89.

GARDNER I. A., HIETALA S., BOYCE W.M. Validity of using serological tests for diagnosis of diseases in wild animals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1996, **15** (1), 323-335.

GELFI J., CHANTAL J., THANH PHONG T., PY R., BOUCRAUT BARALON C. Development of an ELISA for detection of myxoma virus-specific rabbit antibodies : test evaluation for diagnostic applications on vaccinated and wild rabbit sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1999, **11**, 240-245.

GIBAN J. Répercussion de la myxomatose sur les populations de lapin de garenne en France. *Terre et Vie*, 1956, 103 (3-4), 179-188.

GRIFFITHS G., WEPF R., WENDT T., LOCKER J.K., CYRKLAF M., ROOS N. Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis. *J. Virol.*, 2001, **75** (22), 11034-11055.

HUDSON J.R., MANSI W. Attenuated strains of myxomatosis virus in England. *Vet. Rec.*, 1955, **67**, 746-747.

ICHIHASHI Y. Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology*, 1996, **217** (2), 478-485.

JOUBERT L., CHIPPAUX A., MOUCHET J., OUDAR J. Entretien hivernovernal du virus myxomateux dans les terriers. Myxomatose d'inoculation par la puce du lapin et myxomatose de fouissement. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, 1969, **42**, 93-101.

JOUBERT L., DUCLOS Ph., TUAILLON P. La myxomatose des garennes dans le sud-est – La myxomatose amyxomateuse. *Revue Méd. vét.*, 1982, **133** (12), 739-753.

JOUBERT L., LEFTHERIOTIS E., MOUCHET J. La myxomatose (tomes 1 et 2), Collections : Maladies animales à virus. L'Expansion scientifique française Ed. Paris, 1972.

JOUBERT L., MASSIA S., PRAVE M. Conservation interépizootique prolongée du virus myxomateux. Persistance endogée en terrier-tombeau et myxomatose de fouissement. *Méd. Mal. inf.*, 1974, **4** (6 bis), 349-354

JOUBERT L., MONNET P. Vérification expérimentale du rôle des Simulies (*Tetisimulium bezzii*, Corti, 1914 et *Odagnia* groupe *ornatum*) dans la transmission du virus myxomateux en haute-provence. *Revue Méd. vét.*, 1975, **126** (5), 617-634.

JOUBERT L., OUDAR J., MOUCHET J., HANNOUN Cl. Transmission de la myxomatose par les moustiques en Camargue. Rôle prééminent de *Aedes caspius* et des Anopheles du groupe *maculipennis*. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, 1967, **40** (7), 315-322.

JOUBERT L., PRAVE M. Rôle des Simulies dans les enzooties hivernales occasionnelles de myxomatose en Haute-Provence. *Bull. Soc. Sci. vét. Méd. comp. Lyon*, 1972, **74**, 349-351.

KERR P.J. An ELISA for epidemiological studies of myxomatosis: persistence of antibodies to myxoma virus in european rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Wildl. Res.*, 1997, **24**, 53-65.

KERR P.J., BEST S.M. Myxoma virus in rabbits. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1998, **17** (1), 256-268.

KERR P., McFADDEN G. Immune responses to myxoma virus. *Viral Immunol.*, 2002, **15** (2), 229-246.

LOCKER J.K., KUEHN A., SCHLEICH S., RUTTER G., HOHENBERG H., WEPF R., GRIFFITHS G. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol. Biol. Cell.*, 2000, **11** (7), 2497-2511.

LOCKLEY R.M. The European rabbit-flea, *Spilopsyllus cuniculi*, as a vector of myxomatosis in Britain. *Vet. Rec.*, 1954, **30** (66), 434-435.

LOCKLEY R.M. The observed effects of myxomatosis on rabbit populations and behaviour and on wild life generally. *Terre et Vie*, 1956, **103** (3-4), 211-219.

MALLARDO M., LEITHE E., SCHLEICH S., ROOS N., DOGLIO L., KRIJNSE-LOCKER J. Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. *J. Virol.*, 2002, **76** (10), 5167-5183.

MARBACH A. Etude épidémiologique et statistique de la myxomatose dans les élevages cynicoles du département du Rhône en 1985-1986. Importance relative de la maladie dans la pathologie infectieuse et parasitaire du lapin, Thèse vétérinaire, Lyon, 1986.

MARCHANDEAU S. Le lapin de garenne. *Faune sauvage*, 2000, **251**, 18-25.

MARCHANDEAU S., AUBINEAU J., BAUDRON P., BLANCHET L., CHAUVET C., LEGROS E., MERLET C., SURET H. La pathologie du lapin de garenne dans l'ouest de la France. *Bull mens ONC*, 1999, **245**, 10-15.

MARCHANDEAU S., BOUCRAUT-BARALON C. Epidémiologie de la myxomatose et des caliciviroses apparentées à la VHD dans une population sauvage de lapins de garenne (*Oryctolagus cuniculus*). *Gibier Faune Sauvage, Game Wildl.*, 1999, **16** (1), 65-80.

MARCHANDEAU S., BERTAGNOLI S., PERALTA B., BOUCRAUT-BARALON C., LETTY J., REITZ F. Possible interaction between myxomatosis and calicivirus related to rabbit haemorrhagic disease affecting the European rabbit. *Vet. Rec.*, 2004, **155** (19), 589-592.

MARLIER D., COIGNOUL F., BOUCRAUT BARALON C., VINDEVOGEL H. Etude clinique et anatomopathologique de l'infection expérimentale de lapins par une souche virale amygomateuse isolée en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1997, **141**, 479-486.

MARLIER D., HERBOTS J., DETILLEUX J., LEMAIRE M., THIRY E., VINDEVOGEL H. Cross-sectional study of the association between pathological conditions and myxoma-virus seroprevalence in intensive rabbit farms in Europe. *Prev. Vét. Méd.*, 2001, **48** (1), 55-64.

MARLIER D., MAINIL J., BOUCRAUT-BARALON C., LINDEN A., VINDEVOGEL H. The efficacy of two vaccination schemes against experimental infection with a virulent amygomatous or a virulent nodular myxoma virus strain. *J. Comp. Path.*, 2000a, **122** (2-3), 115-122.

MARLIER D., MAINIL J., SULON J., BECKERS J.F., LINDEN A., VINDEVOGEL H. Study of the virulence of five strains of amygomatous myxoma virus in crossbred New Zealand White/Californian conventional rabbits, with evidence of long-term testicular infection in recovered animals. *J. Comp. Path.*, 2000b, **122** (2-3), 101-113.

MARLIER D., VINDEVOGEL H. La myxomatose amygomateuse : isolement de trois souches en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1996, **140**, 343-346.

MARSHALL I.D., DOUGLAS G.W. Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. VIII. further observations on changes in the innate resistance of Australian wild rabbits exposed to myxomatosis. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1961, **59**, 117-122.

MEAD-BRIGGS A.R., VAUGHAN J.A. The differential transmissibility of myxoma virus strains of differing virulence grades by the rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale). *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1975, **75**, 237-247.

MOSS B. *Poxviridae* : The viruses and their replication. *Fields Virology*, 4th edn, 2001, 2849-2883.

PICAVET D.P., LEBAS F., GILBERT Y., BRIGNOL E. Immunisation du lapereau contre la myxomatose à l'aide d'un vaccin homologue. *Revue Méd. Vét.*, 1989, **140** (8-9), 823-827.

PICAVET D.P., LEBAS F., GILBERT Y., CHANTAL J., PY R., PEULET M.J., BRIGNOL E. Essais d'immunisation du lapereau de chair contre la myxomatose à l'aide d'un vaccin homologue atténué. *Revue Méd. Vét.*, 1992, **143** (3), 267-271.

RATCLIFFE F.N. The ecological consequences of myxomatosis in Australia. *Terre et Vie*, 1956, **103** (3-4), 153-166.

REGNERY D.C., MILLER J.H. A myxoma virus epizootic in a brush rabbit population. *J. Wildl. Dis.*, 1972, **8** (4), 327-331.

ROSAMOND C.H., SHEPHERD R.C., EDMONDS J.W. Myxomatosis : changes in the epidemiology of myxomatosis coincident with the establishment of the European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale) in the Mallee region of Victoria. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1978, **81** (3), 399-403.

ROSAMOND C.H., SHEPHERD R.C., EDMONDS J.W. Myxomatosis : the transmission of a highly virulent strain of myxoma virus by the European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale) in the Mallee region of Victoria. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1977, **79** (3), 405-409.

ROSEL J., MOSS B. Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b. *J. Virol.*, 1985, **56**, 830-838.

ROSS J. Zoological and wildlife review. Myxomatosis and the rabbit. *Br. vet. J.*, 1972, **128**, 172-176.

ROSS J., SANDERS M.F. Changes in the virulence of myxoma virus strains in Britain. *Epidem. Inf.*, 1987, **98** (1), 113-117.

ROSS J., SANDERS M.F. Innate resistance to myxomatosis in wild rabbits in England. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1977, **79** (3), 411-415.

ROSS J., SANDERS M.F. The development of genetic resistance to myxomatosis in wild rabbits in Britain. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1984, **92** (3), 255-261.

ROSS J., TITTENSOR A.M., FOX A.P., SANDERS M.F. Myxomatosis in farmland rabbit populations in England and Wales. *Epidem. Inf.*, 1989, **103** (2), 333-357.

RUSSELL R.J., ROBBINS S.J. Cloning and molecular characterization of the myxoma virus genome. *Virology*, 1989, **170** (1), 147-159.

SAURAT P., GILBERT Y., GANIERE J.P. Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Revue Méd. Vét.*, 1978, **129** (3), 415-451.

SMITH G.L., VANDERPLASSCHEN A., LAW M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.*, 2002, **83** (12), 2915-2931.

SOBEY W.R., CONOLLY D. Myxomatosis : passive immunity in the offspring of immune rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) infested with fleas (*Spilopsyllus cuniculi* Dale) and exposed to myxoma virus. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1975, **74** (1), 43-55.

SOBEY W.R., CONOLLY D. Myxomatosis : the introduction of the European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale) into wild rabbit populations in Australia. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1971, **69** (3), 331-346.

SOBEY W.R., CONOLLY D., HAYCOCK P., EDMONDS J.W. Myxomatosis. The effect of age upon survival of wild and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with a degree of genetic resistance and unselected domestic rabbits infected with myxoma virus. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1970, **68** (1), 137-149.

SOBEY W.R., MENZIES W., CONOLLY D. Myxomatosis : some observations on breeding the European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale) in an animal house. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1974, **72** (3), 453-465.

SODEIK B., DOMS R.W., ERICSSON M., HILLER G., MACHAMER C.E., VAN'T HOF W., VAN MEER G., MOSS B., GRIFFITHS G. Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *J. Cell. Biol.*, 1993, **121** (3), 521-541.

THOMAS A.S. Biological effects of the spread of myxomatosis among rabbits. *Terre et Vie*, 1956, **103** (3-4), 239-242.

TRAKTMAN P., LIU K., DeMASI J., ROLLINS R., JESTY S., UNGER B. Elucidating the essential role of the A14 phosphoprotein in vaccinia virus morphogenesis: construction and characterization of a tetracycline-inducible recombinant. *J. Virol.*, 2000, 74, 3682-3695.

TROUT R.C., ROSS J., FOX A.P. Does myxomatosis still regulate numbers of rabbits (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) in the United Kingdom? *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1993, **12** (1), 35-38.

VANDERPLASSCHEN A., HOLLINSHEAD M., SMITH G.L. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J. Genl. Virol.*, 1998, **79**, 877-887.

VAN REGENMORTEL M.H., MAYO M.A., FAUQUET C.M., MANILOFF J. Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch. Virol.*, 2000, **145** (10), 2227-2232.

VILAGINES P., VILAGINES R. Les poxviridés : caractères généraux. *Virologie médicale, J Maurin. Flammarion Médecine Sciences*, 1985, 310-319.

WILLIAMS R.T., DUNSMORE J.D., PARER I. Evidence for the existence of latent myxoma virus in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* (L.)). *Nature*, 1972, **238** (5359), 99-101.

WILLIAMS R.T., DUNSMORE J.D. SOBEY W.R. Fluctuations in the titre of antibody to a soluble antigen of myxoma virus in field populations of rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), in Australia. *J. Hyg., Camb. (Lond.)*, 1973, **71** (3), 487-500.

		Clinique								
Lapins	Symptômes	J2	J4	J6	J8	J10	J12	J14	J16	J18
Lapin n°7 (40506)	Locaux	RAS								
	Généraux	RAS								
Lapin n°8 (40561)	Locaux	Myxome primaire - réaction inflammatoire locale (RIL) légère			disparition de la RIL	Persistance d'un nodule froid d'1 cm de diamètre				
	Généraux	RAS								
Lapin n°9 (40517)	Locaux	Myxome primaire - réaction inflammatoire locale modérée				disparition de la RIL	RAS			
	Généraux	RAS								
Lapin n°10 (48130)	Locaux	Myxome primaire - réaction inflammatoire locale marquée			Scarification locale					
					5 mm	10 mm	12 mm	15 mm		
	Généraux	RAS								
Lapin n°11 (48654)	Locaux	Myxome primaire - réaction inflammatoire locale marquée			Scarification locale					
					5 mm	15 mm	17 mm	20 mm		
	Généraux	RAS			Blépharoconjonctivite légère Myxomes secondaires sur la face et les oreilles Abattement léger			Amélioration et guérison progressive		
Lapin n°12 (62370) témoin	Locaux	Myxome primaire exsudatif et oedémateux de 25 mm			Ulcère rouge de 5 mm de diamètre au point d'inoculation					
	Généraux	RAS			Blépharoconjonctivite bilatérale sévère Nombreux myxomes secondaires sur la face, les yeux et les oreilles Gêne respiratoire sévère Abattement marqué			Aggravation clinique avec surinfections bactériennes : lésions oculaires suintantes et nécrosantes Anorexie et amaigrissement progressif		Mort

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des évolutions cliniques des lapins inoculés de l'expérience n°2

Lapins vaccinés n° :	7 (40506)	8 (40561)	9 (40517)	10 (48130)	11 (48654)	12 (62370)
Vaccination	T1-M022	SG33 (2 inj)	T1-M022	SG33	SG33	Témoin
Délai V-J0 (jours)	307	311	307	133	133	
Titre initial (J0-28)	1600	1600	1600	800	400	0
Inoculation J0 (T1)	1.10 ³ ufp	1.10 ³ ufp	1.10 ³ ufp	1.10 ³ ufp	1.10 ³ ufp	1.10 ³ ufp
Clinique	RAS	Myxome primaire - RIL faible	Myxome primaire - RIL modérée	Myxome primaire - RIL marquée	Myxome primaire - RIL marquée Myxomatose subaiguë Début des symptômes à J6 Guérison progressive	Myxome primaire - RIL sévère Myxomatose aiguë Début des symptômes à J6 Mort à J18.
PCR	J1	-	-			
	J2			-	-	
	J3					+
	J7	-	-	-	-	+
Lapins sentinelles n° :	7' (62389)	8' (62292)	9' (62306)	10' (62394)	11' (62206)	12' (48134)
Clinique	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	Myxomatose aiguë Début des symptômes à J15 Mort à J31.
PCR	J7	-	-	-	-	-
	J10	-	-	-	-	+
	J13	-	-	-	-	+
	J17	-	-	-	-	+
	J20	-	-	-	-	+
ELISA	J0-17	-	-	-	-	-
	J7	-	-	-	-	-
	J13	-	-	-	-	-
	J20	-	-	-	-	+
	J30	-	-	-	-	+

Annexe 2 : Synthèse des manipulations et des résultats de l'expérience n°2

Toulouse, 2008

NOM : Bonlieu

Prénom : Simon

TITRE : Etude de la protection virologique induite par la vaccination contre la myxomatose chez le lapin européen.

RESUME :

La myxomatose, maladie majeure du lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*), sévit de façon enzootique sur plusieurs continents. C'est une maladie infectieuse, virulente, inoculable, dont l'agent pathogène est un virus de la famille des *Poxviridae*, genre *Leporipoxvirus*. Celui-ci provoque, pour sa forme classique, une pathologie souvent létale, caractérisée par une immunodépression sévère et l'apparition de pseudotumeurs cutanées : les myxomes. L'infection myxomateuse confère aux lapins rescapés une immunité protectrice durable vis-à-vis des réinfections ultérieures. Dans ce travail, nous avons étudié le comportement clinique et virologique de lapins vaccinés vis-à-vis d'une épreuve virulente sévère en fonction de leur titre initial en anticorps, et leur éventuelle contagiosité en les plaçant en contact étroit avec des lapins séronégatifs. Dans nos conditions expérimentales, en l'absence de vecteurs, aucun des 10 lapins séropositifs inoculés n'a transmis le virus myxomateux. Néanmoins, il apparaît que la protection clinique et virologique de la vaccination n'est pas totale pour tout titre en anticorps initial.

MOTS CLES : virus myxomateux – vaccination – virémie - lapin

ENGLISH TITLE : Study of the virologic protection induced by vaccination against myxomatosis in the European rabbit.

ABSTRACT :

Myxomatosis is a major disease of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), affecting many continents in an enzootic way. It is an infectious and virulent disease whose pathogenic agent is a virus belonging to the *Poxviridae* family, genus *Leporipoxvirus*. In its classic form, it causes an often lethal pathology characterized by severe immunodeficiency and the appearance of cutaneous pseudotumors called myxomas. Rabbits that recover from myxomatosis appear to have lifelong immunity to the disease. In this work, we examined the clinical and virological behaviour of vaccinated rabbits when in contact with severe virulent test depending on initial antibody titre and their potential contagiousness by putting them in close contact with seronegative rabbits. In our experimental conditions, in the absence of any vector, none of the ten seropositive rabbits transmitted myxoma virus. Nevertheless, the clinical and virological protection is not complete for any initial antibody titre.

KEY WORDS : myxoma virus - vaccination - viremy - rabbit