

# 5-Lutte contre la myxomatose

## **BIO ESPACE**

### **Laboratoire de Biotechnologie**

Mas des 4 Pilas

34570 Murviel Lés Montpellier. Fr

#### **Objectifs :**

Recherche et développement de moyens naturels,  
pour rééquilibrer certains écosystèmes Européens après les dégâts causés  
par l'introduction de la myxomatose dans les populations de lapins de  
garenne.

Par un moyen de lutte efficace contre la myxomatose,  
diminuer la pression sur l'ensemble des autres espèces cynégétiques,  
leur permettre de récupérer leur caractère sauvage,  
favoriser le reste de la faune sauvage.

En donnant aux chasseurs une raison de gérer les espaces naturels,  
protéger ces derniers contre les risques d'incendies.

#### **Moyens :**

**VACCINATION DES LAPINS  
SAUVAGES,  
SANS AVOIR A LES CAPTURER,  
PAR UNE DE LEURS PUCES  
SPECIFIQUE.**

#### **Abrégé des résultats obtenus :**

La vaccination de population d'animaux sauvages, sans avoir à les capturer,  
en utilisant une seringue vivante constituée d'un insecte spécifique de

l'animal cible est devenue une réalité scientifique grâce aux travaux du laboratoire Bio-Espace.

Ces travaux pourraient contribuer, par des moyens naturels, à rééquilibrer les écosystèmes après les dégâts sur l'ensemble de la faune Européenne causés par l'introduction de la myxomatose dans les populations de lapins de garenne.

Ces travaux, en apportant aux chasseurs des moyens de gestion efficace d'un gibier sédentaire très localisé, pourraient fixer l'attention d'une grande majorité d'entre eux sur cet objectif. Leur participation efficace à l'aménagement des espaces naturels pourrait alors contribuer à protéger ces espaces contre les incendies et autres aléas climatiques qui chaque années détruisent des dizaines de milliers d'hectares dans le sud de l'Europe.

Cette nouvelle et très originale technologie devrait pouvoir être élargie à l'étude de moyens de lutte contre d'autres zoonoses et zoonothroponoses.

L'utilisation en nature de ces moyens contre la Myxomatose, pourrait permettre de tester sans risques les aspects techniques de cette nouvelle méthode de vaccination, et d'en apprécier rapidement les retombées sociologiques.

## **Préambule**

### **Objectif :**

"Vacciner les animaux sauvages sans avoir à les capturer est un objectif qui permet d'aborder des problèmes généraux jusque-là mal résolus de Santé animale et au-delà de Santé publique au niveau de la planète."

### **Moyens :**

**A)** Une telle vaccination implique, dans chaque cas de figure, de prendre en considération 3 éléments fondamentaux :

- l'animal sauvage,
- le vaccin,
- le mode de transmission,

auxquels on doit ajouter les contraintes de l'environnement ainsi que la situation économique et quelquefois religieuse du pays concerné.

**B)** Les vaccins : classiquement sont de 2 types :

- Micro-organismes vivants (virus ou bactéries atténuées, pouvant inclure des recombinants génétiques)
- Micro-organismes inactivés, protéines immunogènes.

**C)** Modes de transmission :

- Deux sont aujourd'hui utilisés :

- l'injection intradermique : elle nécessite la capture ou l'approche de l'animal.

- la voie orale, méthode non générale (le vaccin contre la rage, transmissible oralement aux renards, ne l'est pas aux chiens)

- Dans ce rapport, un troisième mode est proposé par le laboratoire Bio-Espace :

Il consiste à transmettre le vaccin par des insectes spécifiques des animaux cibles. D'autres cibles que celles qui sont discutées ici pourraient être étudiées.

Le plan du rapport est le suivant :

**CHAPITRE I - Introduction : choix du lapin comme cible privilégiée. (Ce chapitre fait partie de la [partie B](#) de la page 2 de ce site)**

**CHAPITRE II - Le lapin et la myxomatose : considérations sur les paramètres intervenants dans l'épidémiologie.**

**CHAPITRE III - Les vaccins.**

**CHAPITRE IV - Chargement des pièces buccales des puces en vaccin.**

**CHAPITRE V - Les puces de lapins : élevage, technique de lâcher.**

**CHAPITRE VI - Etude des capacités vaccinales des puces : en laboratoire, en parcs et en nature.**

**CONCLUSIONS.**

## **CHAPITRE II :**

**Le lapin et la myxomatose : Considération sur les paramètres intervenants dans l'épidémiologie.**

a) Historique :

Reconnue pour la première fois en 1898 par SANARELLI, en Amérique du Sud, la myxomatose est décrite comme une maladie spécifique des lapins européens "*Oryctolagus cuniculus*". Le germe de cette maladie est un poxvirus.

Dès 1918, l'utilisation de la myxomatose est suggérée pour contrôler les populations de lapins sur le continent Australien. Les premières expérimentations dans ce sens sont effectuées en 1950. À ce jour, la population de lapins sauvages est, en Australie, toujours contrôlée par de nouvelles introductions du virus myxomateux.

Ce virus myxomateux est introduit en France le 14 juin 1952 par le Docteur DELILLE. L'épizootie gagne rapidement toute l'Europe.

L'émotion est telle que l'Assemblée Nationale Française vote à l'unanimité une loi réprimant toute introduction de virus sur le territoire national sans autorisation, mais le mal est fait. La suite de ce document propose un moyen de le réparer.

#### b) Virus de la myxomatose :

Le virus de la myxomatose fait partie du groupe des poxvirus dont le prototype est le virus de la vaccine. C'est un virus enveloppé, de forme ovoïde (280 x 230 nm) à ADN bicaténaire et de symétrie hélicoïdale (RICHARD, 1981).

#### c) Mécanismes de transmission :

Même si un mode de transmission "respiratoire" est décrit dans la littérature (BRUN, 1981), la myxomatose se transmet essentiellement par les insectes et préférentiellement par les moustiques et les puces (FENNER, 1994).

La transmission par les insectes est strictement mécanique ainsi que cela est montré par FENNER et DAY pour les moustiques (FENNER. 1952, 1956 ; DAY. 1956) et par MUIRHEAD-THOMSON (1956) pour les puces. Le terme "transmission mécanique" signifie une absence de multiplication du virus dans l'insecte (BERGOIN. 1980).

#### d) Changement de virulence du virus et courbe de distribution dans les milieux naturels :

Dans la nature, le virus de la myxomatose a spontanément évolué de la force I (au moment de l'introduction) à la force V.

L'échelle de virulence de I à V établie par FENNER (FENNER, 1957) est basée sur le pourcentage de mortalité des lapins d'élevages ou sauvages mais n'ayant jamais rencontré la myxomatose, couplé au temps moyen de survie  
Schéma 5 :

Degré de virulence	I	II	III	IV	V
Taux de mortalité (%)	>99	95-99	70-95	50-70	<50
Temps moyen de survie (jours)	<13	14-16	17-28	29-50	....

### Schéma 5

Lorsque ces mêmes populations ont été soumises à la pression de la maladie, les % de mortalité diminuent considérablement toutes choses égales par ailleurs, comme on le verra ci-après.

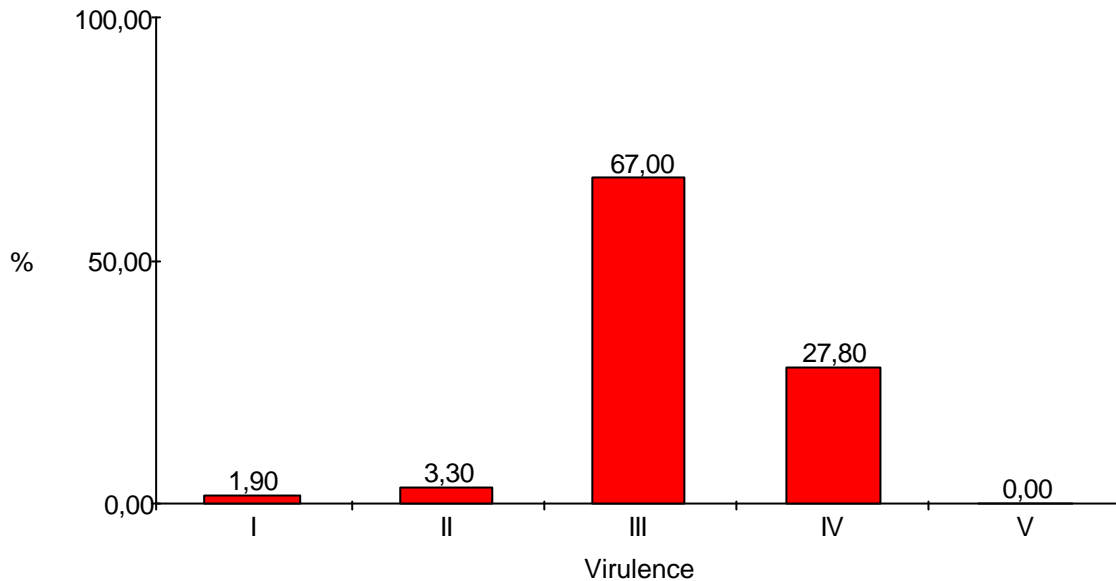
Lorsqu'on introduit le virus de la myxomatose de force 1 dans une population naturelle de lapins, ce virus mute rapidement et environ 5 ans après on retrouve tous les virus de force I à V dans cette population.

### Virulence des souches de virus myxomateux, isolés du terrain en Australie, en Grande-Bretagne et en France, entre 1953 et 1981 (FENNER et ROSS, 1994).

Degré de virulence	I	II	III	IV	V
Taux de mortalité (%)	>99	95-99	70-95	50-70	<50
Temps moyen de survie (jours)	<13	14-16	17-28	29-50	....
<b>Australie</b>					
1950-51	>99				
1952-55	13.3	20.0	53.3	13.3	0.0
1955-58	0.7	5.3	54.6	24.1	15.5
1959-63	1.7	11.1	60.6	21.8	4.7
1964-66	0.7	0.3	63.7	34.0	1.3
1967-69	0.0	0.0	62.4	35.8	1.7
1970-74	0.6	4.6	74.1	20.7	0.0
1975-81	1.9	3.3	67.0	27.8	0.0
<b>Grande Bretagne</b>					
1953	>99				
1962	4.1	17.6	63.6	14.0	0.9
1972	1.6	25.8	66.4	5.5	0.8
1981	0.0	35.8	62.6	1.6	0.0
<b>France</b>					
1953	>99				
1962	11	19.3	55.4	13.5	0.8
1968	2.0	4.1	35.1	58.8	4.3

### Schéma 6

Dans un milieu naturel la distribution des virus est représentée par une courbe en cloche, centrée sur la virulence III (schéma 7).



**Schéma 7**

La reproductibilité de ces conclusions sur 6 campagnes de mesures réalisées entre 1955 et 1981, montre qu'**en nature la distribution des virus (schéma 7) est celle d'un équilibre thermodynamique atteint en 5 ans maximum.**

La conséquence extrêmement importante de ce fait est que :

- si l'on tente de modifier la position de cet équilibre par des interventions humaines,
- soit en introduisant un virus très virulent,
- soit en introduisant un virus non pathogène (vaccins),
- cet équilibre retrouvera naturellement, et rapidement sa position de départ, lorsque cesseront les interventions.

#### Remarque

Pour expliquer la distribution virale ci-dessus, tous les auteurs s'accordent. Ils considèrent que : Le faible % des virus I, II et IV,V, retrouvés dans la nature est due au fait :

-que les animaux infectés par les virus I, II meurent très vite et n'ont pas le temps de transmettre ces virus.

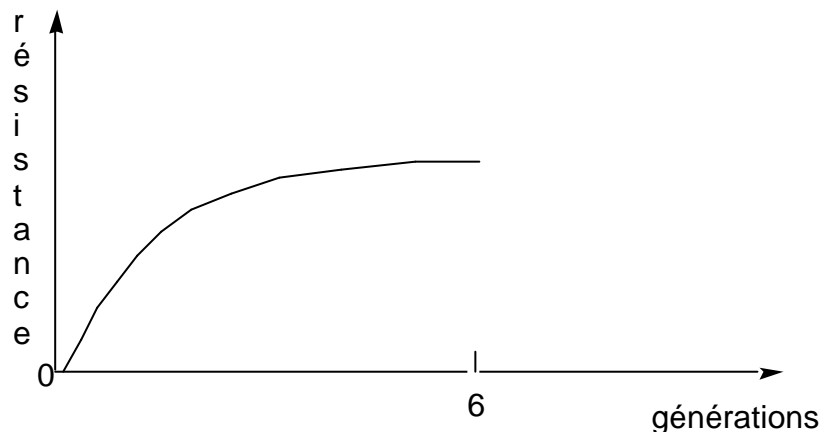
-à l'inverse les animaux infectés par les virus de force IV et V survivent très longtemps et même se guérissent, mais le faible nombre de particules virales dans leur myxomes ne leur permet de se transmettre que très difficilement.

Si par contre le virus de force III se transmet très bien, c'est parce qu'il est le meilleur compromis possible entre le temps de survie et le nombre de particules virales par volume. Pour résumer "les lapins infectés par une souche virale modérément virulente III présentent la meilleure combinaison entre les concentrations virales des lésions cutanées et le temps de survie des lapins", et ceci, aussi bien dans la transmission par les moustiques (FENNER, 1965) que par les puces (SHEPHER, 1977).

e) Changement dans la résistance génétique des lapins :

Note : le terme de génétique généralement employé dans la littérature spécialisée, nous paraît abusif. Cette résistance, en effet, disparaît en absence de pression myxomateuse. Elle ne peut donc être inscrite dans les gènes et exprimable. Nous continuerons malgré cela à parler de "résistance génétique" dans ce texte pour se conformer aux publications majeures parues dans ce domaine.

**1)-** Il est maintenant clairement établi qu'une population de lapins soumise à la pression de la myxomatose voit sa résistance augmenter pendant 6 générations, jusqu'à atteindre un maximum schéma 8.



**Schéma 8**

De nombreuses expériences attestent ce résultat (MARSHALL. 1958, 1961 ; SOBEY 1969 ; FENNER 1983).

En exemple : Le tableau ci-dessous (FENNER. 1994) montre l'évolution de la résistance d'une population de lapins sauvages. Après les épizooties, un échantillon de jeunes lapins séronégatifs est soumis à un virus d'épreuve de virulence III.

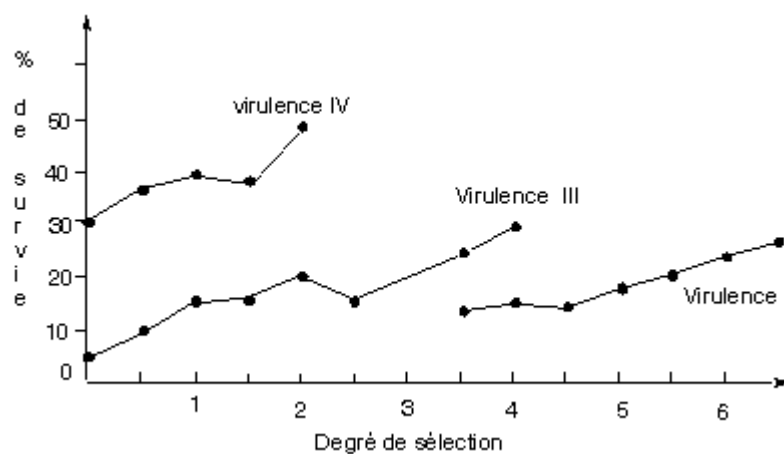
Nombre d'épizooties à laquelle la population a été exposée	Taux de Mortalité (%)	Signes cliniques des lapins éprouvés (%)		
		sévères (mort comprise)	moyens	légers
0	90	93	5	2
2	88	95	5	0
3	80	93	5	2
4	50	61	26	12
5	53	75	14	11
7	30	54	16	30

### Schéma 9

Il se dégage de ces résultats qu'une population de lapins après avoir été soumise à 6 épizooties de myxomatose, a acquis une résistance telle que, soumise à un virus d'épreuve de virulence III, les cas de mortalité passent de 90 % à 30 %, en même temps que se réduisent les symptômes cliniques.

2)- Acquisition de la résistance génétique en fonction de la force du virus auquel est soumis cette population.

Le tableau suivant, montre que lorsqu'on soumet une population de lapins (de laboratoire n'ayant jamais rencontré la myxomatose) à des virus de virulences variables I, III et IV, la résistance de chacune de ces populations croit rapidement.



### Schéma 10

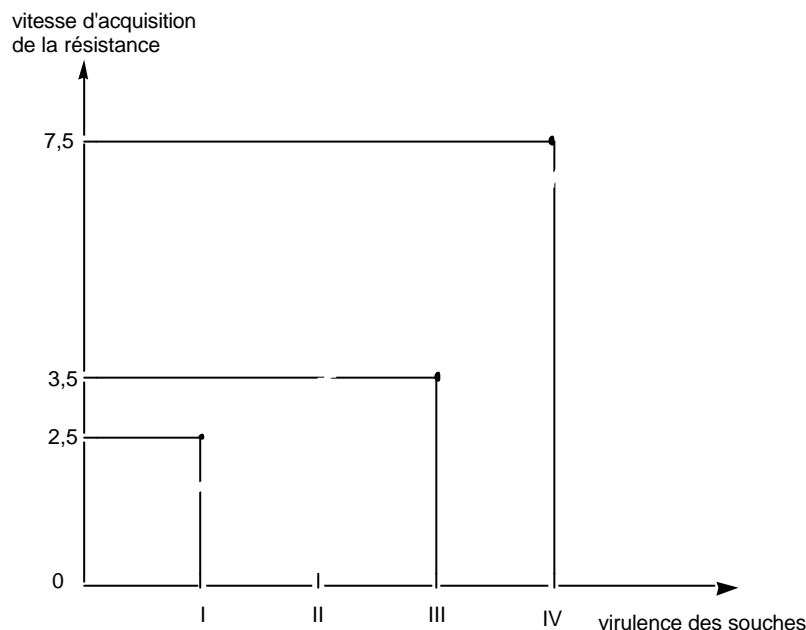
**Schéma 10** : changement dans la résistance génétique des lapins de laboratoire soumis au virus myxomateux lors de la reproduction d'animaux ayant survécu à l'infection de plusieurs souches de virus. Le "degré de sélection" indique le lien de parenté des lapins expérimentés : 0,5, un parent a survécu à la myxomatose ; 1, les 2 parents ont survécu ; 2, les 2 parents et les 2 grands-parents ont survécu, etc... Pour la sélection initiale, 2 souches atténuées ont été utilisées : **Uriarra** (virulence IV) du degré de sélection 0 à 2, **KM13** (virulence III) du degré de sélection 0 à 4. Au degré de sélection 3,5, une lignée de sélection a débuté avec



du virus myxomateux virulent **SS** (Standard Laboratory Strain), souche qui tue 99 % des lapins non sélectionnés génétiquement (SOBEY, 1969).

En dehors du fait que la notion de résistance est ainsi clairement établie, ces résultats montrent que la vitesse de cette résistance croît plus rapidement lorsque la virulence du virus passe de I à IV (cf schéma 11, dans lequel nous avons calculé cette vitesse d'acquisition de la résistance en fonction de la virulence. Cette virulence est exprimée en pourcentage de survie/degré de sélection )

Il est toutefois à noter qu'une grande vitesse d'acquisition de résistance ne signifie pas nécessairement que l'on atteigne une valeur élevée de cette même résistance, ainsi que nous l'analysons dans le paragraphe ci-après :



***schéma 11***

**3)- Niveau de la résistance génétique en fonction de la force du virus.**

Dans les paragraphes précédents, nous avons défini la résistance génétique selon la courbe présentée dans le schéma 8.

- Cette courbe a une partie ascendante (acquisition) en accord avec les résultats de SOBEY (1969), suivie d'un palier dont la stabilité est maintenue tant que dure la pression myxomateuse sur la population de lapins étudiée.

La rupture de pente entre l'acquisition et le palier se situe aux environs de la sixième génération (SOBEY- Communication personnelle) et FENNER (1983).

L'existence de ce palier de résistance, est par ailleurs confirmé dans le dernier mémoire de FENNER et ROSS (1994).

**La première question** qui se pose et à laquelle on peut trouver une réponse est de savoir si le niveau du palier de résistance (c'est-à-dire la résistance maximale) varie ou non avec la virulence des virus utilisés.

Les premiers éléments de réponse à cette question fondamentale pour la compréhension de la myxomatose sont donnés dans les travaux de SOBEY (1983), et PARER (1985). Ces auteurs ont tout d'abord isolé et purifié 2 virus de virulence I et IV. Ils ont ensuite soumis entre 1978 et 1981, deux populations de lapins sauvages à la pression de ces 2 virus.

Ils ont observé que la population initiale soumise au virus de force IV subissait une augmentation de 8 à 12 fois, alors qu'au contraire la population soumise au virus de force I était maintenue ou légèrement diminuée.

À l'issue des 4 ans d'expérience, des lots de jeunes animaux (séronégatifs), issus des 2 types d'expériences, ont été éprouvés avec des virus sauvages non purifiés, afin de tester le niveau de leur résistance génétique.

- Les jeunes animaux (dont les parents ont été soumis pendant 4 ans à un virus de force I) ont résisté à l'épreuve dans une proportion de 95 %.

- Les jeunes animaux (dont les parents ont été soumis pendant 4 ans à un virus de force IV) ont résisté à l'épreuve dans une proportion de 59 %.

La première explication donnée par les auteurs à ces résultats est que les animaux, issus des secteurs soumis au virus IV, étaient plus nombreux donc plus affaiblis par sous alimentation, que ceux qui sont issus des secteurs soumis au virus I. Selon cette hypothèse, le niveau de la résistance génétique des deux populations soumises aux virus de force I ou IV serait donc restée la même.

La seconde explication donnée, par les mêmes auteurs, est que le niveau du palier de la résistance génétique varie en fonction de la virulence du virus utilisé. Plus le virus est virulent (force I), plus le niveau du palier de résistance est élevé. Lorsque la virulence du virus baisse (force IV), le niveau du palier de résistance baisse également.

Cette dernière hypothèse est cohérente avec le fait que les populations de lapins soumises au SG33 (virus de la myxomatose artificiellement atténué, utilisé comme vaccin, cf. chapitre III) depuis plus de 10 générations, ne présentent aucune résistance génétique.

En effet, nous avons maintes fois observé que lorsqu'on soumet des lapins d'élevage (séronégatifs) issus de parents vaccinés avec le SG33 depuis plus de 10 générations à un virus de force IV ils présentent un taux de survie de l'ordre de 40 %, montrant que leur résistance n'est pas supérieure à celle des animaux de laboratoire n'ayant jamais rencontrés la myxomatose et dont la résistance est qualifiée de nulle.

**La deuxième question** qui se pose concernant cette "résistance génétique" acquise sous la pression myxomateuse est de savoir si elle est définitive ou si elle est récessive.

À notre connaissance, aucune publication scientifique ne parle de cette question. On peut néanmoins faire état de nombreuses observations concernant des élevages de lapins dont les géniteurs étaient à l'origine sauvages et résistants ainsi qu'on l'a dit précédemment.

Après 3 ans d'élevage, les jeunes animaux étant vaccinés au SG33, les produits de la quatrième génération avaient perdu toute résistance génétique. Lorsqu'ils étaient éprouvés avec un virus de force IV, ils se comportaient exactement comme des animaux d'élevage (40% de survie).

On peut donc conclure que la "résistance génétique" qui s'acquiert en 6 générations, sous la pression de virus de force I, II, III ou IV, se perd en environ 3 générations en l'absence de pression myxomateuse ou même sous la pression finalement très faible du virus artificiellement atténué SG33.

Il est donc raisonnable de dire que le SG33 ne confère aux descendants des animaux qu'il vaccine aucune résistance génétique, contrairement aux virus de virulence plus élevée tels que ceux de force IV, III, II et I. Ces résultats sont à prendre en considération en ce qui concerne les possibilités de lutte contre la myxomatose des lapins sauvages ainsi que nous allons l'examiner ultérieurement.

#### f) Description du fonctionnement de la myxomatose (épidémiologie) :

Cinq paramètres sont en interaction équilibrée dans le fonctionnement de la myxomatose (SEYMOUR, 1992) :

- la densité des lapins,
- la virulence du virus,
- les vecteurs et leur nombre,
- les ressources alimentaires,
- et la résistance des lapins.

Le paramètre clé du modèle dynamique de SEYMOUR (modèle le plus complet à ce jour) est la résistance des lapins.

Savoir, en effet, si oui ou non une myxomatose d'une virulence particulière va se déclencher dans une population donnée de lapins dépend du niveau moyen de résistance de ces derniers.

- **Si la résistance est très forte, la maladie ne se déclenche pas**, quel que soit le niveau d'exposition, principalement en raison du fait que l'efficacité de la transmission puces infectantes - lapins sains sera trop faible.

- Si, au contraire, **la résistance est très faible**, en dessous d'un seuil critique, **la maladie se déclenche** quel que soit le niveau d'exposition.

Lorsque la maladie s'établit, trois différentes situations en résultent :

1ère situation : la population est complètement éliminée,

2ème situation : il s'installe une épizootie récurrente avec de larges cycles. Dans ce cas, à chaque cycle, au moment de l'effondrement de la population de lapins, on frôle l'élimination. Cette situation sélectionne une haute virulence et une faible résistance. Cette situation conduit facilement à l'élimination totale. Les derniers rescapés peuvent en effet facilement disparaître, éliminés par les prédateurs.

3ème situation : il s'installe une maladie à l'état endémique qui sélectionne une bonne résistance des lapins et une virulence moyenne à faible du virus. Un équilibre s'établit alors dans une population relativement nombreuse. Dans une telle population, la mortalité des jeunes reste de l'ordre de 30 %.

Dans les conditions naturelles, on rencontre les conséquences des 3 situations précédentes.

Seule la situation 3 conduit inéluctablement par la sélection d'une bonne résistance, à un accroissement de la population.

On doit ajouter que l'augmentation de la résistance découle d'interactions complexes mais qui commencent à être comprises entre la virulence des virus, la densité des lapins, les vecteurs et leur nombre, la capacité de l'environnement.

Cette modélisation mathématique de l'épidémiologie de la myxomatose explique convenablement les observations expérimentales. Elle démontre, le rôle capital de la résistance génétique qu'il faut donc à tout prix conserver, voire créer, si l'on veut accroître une population d'animaux sauvages.

Les résultats présentés dans le schéma 12 (FENNER,1994) illustrent et complètent l'analyse mathématique de SEYMOUR. Ils démontrent qu'en régime endémique, l'équilibre est atteint en environ 5 ans, qu'il est centré sur la virulence III, et dans une moindre mesure IV avec de légères oscillations périodiques.

**Virulence des souches de virus myxomateux isolés du terrain dans les régions de Mallee et Victoria Australie.**

Degré de virulence	I	II	III	IV	V	Nombre d'échantillons
Taux de mortalité (%)	>99	95-99	70-95	50-70	<50	
Temps moyen de survie (jours)	<13	14-16	17-28	29-50	....	
<b>Région de Mallee</b>						
1959-63	0.0	4.3	57.1	34.3	4.3	70
1964-66	2.0	0.0	64.7	31.3	2.0	51
1967-69	0.0	0.0	68.1	31.9	0.0	31
1970-74	1.0	6.9	77.5	14.7	0.0	102
1975-81	3.0	5.8	67.8	23.4	0.0	121
<b>Victoria (sans la région de Mallee)</b>						
1959-63	2.1	12.4	61.2	19.5	4.7	379
1964-66	0.4	0.4	63.5	34.5	1.2	255
1967-69	0.0	0.0	61.6	36.4	2.0	198
1970-74	0.0	1.4	69.4	29.2	0.0	72
1975-81	0.0	0.0	65.8	34.2	0.0	91

### **Schéma 12**

Nous allons, dans les chapitres III à VI suivants, examiner les possibilités qui peuvent permettre de protéger les populations de lapins sauvages (vaccination) tout en leur maintenant, voire en leur permettant de créer, une bonne résistance.

## **CHAPITRE III :**

### **Les vaccins :**

#### **1) Définition d'un vaccin antiviral :**

"Un vaccin antiviral est une suspension de virus vivant atténué, inactivé, ou d'une fraction de virus, capable de provoquer chez le sujet vacciné une réponse immunitaire le prémunissant contre la maladie".

Lorsqu'il s'agit d'un vaccin vétérinaire, les textes officiels indiquent : "la protection de l'animal en tant qu'être vivant doit être prise en considération ; toutefois, il est reconnu qu'en ce qui concerne les médicaments vétérinaires, une certaine toxicité et un certain risque pour l'animal sont acceptables, à condition que cette toxicité n'ait pas de conséquences sur l'homme et lorsque le traitement de l'animal est justifié par l'effet thérapeutique et (ou) économique" (réglementation pharmacie vétérinaire).

À ces considérations générales, on doit ajouter les critères d'éligibilité cités ci-dessous, auxquels doit satisfaire le vaccin au moment de la demande de mise sur le marché :

- la pureté,

- le pouvoir pathogène résiduel,
- la stabilité,
- la diffusibilité,
- la nocivité secondaire à long terme par administrations multiples réitérées,
- la nocivité foetale,
- l'examen de la fonction reproductrice.

Une telle définition peut naturellement s'appliquer aux vaccins contre la myxomatose.

## **2) Vaccin contre la myxomatose (SG33) :**

Le SG33 est un virus artificiellement atténué de la myxomatose (SAURAT-GILBERT, 1978). Il a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 1978 après avoir satisfait aux critères précédents. Très largement utilisé dans les élevages de lapins, il protège efficacement ces derniers contre toute attaque des virus sauvages. Mais ainsi qu'on l'a vu précédemment, il ne confère aux animaux vaccinés, aucune résistance génétique.

Si on utilise donc le SG33 pour vacciner une population d'animaux sauvages résistants, ou d'animaux de lachers non résistants, les jeunes non vaccinés nés de ces populations n'auront aucune résistance et seront très vulnérables à la moindre attaque de la maladie naturelle.

## **3) Autre vaccin contre la myxomatose des lapins sauvages, permettant de maintenir une bonne résistance dans les populations :**

### **a- Sélection d'une souche sauvage atténuée de la myxomatose, de virulence IV (BE4) :**

Au cours de l'année 1993, en étudiant une forte population de lapins sauvages (environ 30 lapins/ha) située sur "l'île de la Grande Motte, Hérault", population régulièrement atteinte par la myxomatose, nous avons observé au cours des épizooties, que quelques rares jeunes animaux présentaient, à la base des oreilles, un ou plusieurs nodules extrêmement faibles dont la taille ne dépassait pas 1 cm<sup>2</sup>, que l'on pouvait, à priori, attribuer à des piqûres d'insectes.

Nous avons alors sacrifié plusieurs de ces animaux et avons cherché à savoir si les nodules correspondants contenaient ou non le virus de la myxomatose. L'inoculation du broyat de ces nodules à des lapins domestiques a provoqué sur ces derniers une myxomatose classique à évolution lente de faible mortalité (2 lapins sur 4 à 35 jours).

Le virus correspondant a alors été isolé, sur culture cellulaire (RK13) et cloné par la technique des plages. Parmi les clones obtenus et étudiés, l'un d'eux a été amplifié. Ce clone testé sur deux lots de lapins domestiques (17 et 20 lapins par lots) a donné un pourcentage de survie de 41 % et un temps moyen de survie égal à 42,6 jours. Ces valeurs situent la virulence de ce virus au niveau IV dans l'échelle de FENNER et MARSHALL (1957). Ce clone a été dénommé BE4.

b- Etude du pouvoir pathogène de la souche BE4 sur lapins domestiques et sauvages

Lapins domestiques :

Trois lots de 10 lapins domestiques séronégatifs, provenant de 3 élevages différents, (régulièrement vaccinés au SG33) ont reçu une injection de 100 DI 50 de BE4 à l'aide du dermojet. Tous ces lapins ainsi inoculés ont développé des symptomatologies moyennes à fortes. Leur pourcentage de survie s'est situé autour de la moyenne de 40 % avec un temps moyen de survie de l'ordre de 40 jours, conformément aux observations réalisées dans le paragraphe précédent.

Lapins sauvages :

Trois lots de lapins sauvages séronégatifs, en provenance de territoires sur lesquels les épizooties de myxomatose sont régulières (Grande Motte, Aérodrome de Rodez) ont reçu une injection de 100 DI 50 de BE4 au dermojet.

Ces expériences se sont déroulées en parallèle aux précédentes, ces dernières servant de témoin.

<b>Provenance des lapins sauvages</b>	<b>Taille échantillon</b>	<b>Temps de survie observé en jours, s = survie &gt; 60j</b>	<b>% survie</b>
Rodez, 1993	12	45, 49, 55, s, s, s, s, s, s, s, s, s,	75
Grande Motte, 1994	24	45, 55, s,	92
Grande Motte, 1995	11	s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s,	100

**Schéma 13**

Les résultats obtenus indiqués dans le schéma ci-dessus montrent que sur un total de 47 lapins sauvages, 5 sont morts de la myxomatose, avec des temps de survie long à très long et une symptomatologie faible soit une moyenne de 89 %

de survie. L'ensemble des autres animaux, soit 41 sur 47 n'ont développé qu'une symptomatologie très faible localisée au point d'inoculation, avec quelquefois une légère virémie oculaire, caractérisée par une paupière enflée et rougeâtre.

#### Commentaires :

Les différences de pathologies observées entre lapins domestiques et sauvages sont attribuables à l'acquisition d'une résistance par les lapins sauvages ainsi que cela a été discuté précédemment.

#### c- Etude de la stabilité de la souche virale BE4 :

La stabilité de la souche BE4 a été testée sur des lapins sauvages (La Grande Motte). Le protocole choisi a été le suivant :

Un lot de 10 jeunes lapins séronégatifs (7 femelles "f" et 3 mâles "m") a été divisé en 5 lots de 2 lapins. Le premier lot (2f) a reçu, au dermojet, 4 injections de 1000 DI 50 par lapins. 14 jours après la première injection, le virus contenu dans les myxomes primaires de chaque lapin a été prélevé à l'aide d'une lancette et transmis au deuxième lot (2f), et ainsi de suite pour les lots suivants (1f + 1m), (1f + 1m), (1f + 1m).

Au cours de ces 4 passages successifs de lapin à lapin, nous n'avons pas observé de variation dans le comportement des lapins éprouvés. La symptomatologie est restée faible (léger épaissement des paupières) à très faible (localisée au seul myxome d'inoculation).

Aucune mortalité n'a été constatée. Cette expérience confirme ainsi les résultats relatés précédemment sur la faible pathologie du BE4 vis-à-vis des lapins sauvages.

Cette expérience porte à 51 survivants sur 57 soit 91,2 % de survie.

#### Conclusion :

La souche BE4 apparaît donc comme ayant une excellente stabilité, et une innocuité vis-à-vis des populations de lapins sauvages d'ores et déjà très supérieure au virus sauvage constitué d'un mélange de souches I à IV. Ce dernier point sera complété ultérieurement après les expériences de transmission par les puces.

### **CHAPITRE IV :**

#### **CHARGEMENT DES PIÈCES BUCCALES DES PUCES EN VACCIN:**

##### **1 - Premier exemple de transmission d'un vaccin à l'aide d'Arthropodes :**



En 1986, notre laboratoire a décrit pour la première fois dans un brevet (SAURAT, 1986), un procédé de vaccination d'animaux sauvages (les lapins) à l'aide d'insectes porteurs d'un virus vaccin.

Il est très justement dit dans ce brevet que la vaccination des animaux sauvages à la seringue ou au dermojet est quasiment impossible en raison de la difficulté qu'il y a à capturer ces animaux.

Ce brevet analyse alors les différentes possibilités qui ont été jusqu'à présent étudiées pour vacciner les animaux sauvages sans avoir à les capturer.

La vaccination par voie orale, utilisée dans certains cas, (celle des renards contre la rage) est loin d'être une méthode générale.

La vaccination par aérosol, par exemple des lapins contre la myxomatose en utilisant le vaccin SG33, a montré très vite des limites en nature, en raison de la mauvaise diffusion du virus dans les terriers naturels.

Devant les difficultés rencontrées pour vacciner les animaux sauvages sans avoir à les capturer, notre laboratoire a alors été envisagée la vaccination par arthropodes en considérant que si certains insectes sont dans de nombreux cas propagateurs d'un virus pathogène, ces mêmes insectes pourraient, à priori, être utilisés pour transmettre à ces mêmes animaux un vaccin.

Pour tenter d'appliquer cette méthode, qui pourrait avoir une bonne généralité, notre laboratoire (Professeur P. SAURAT), indique, que la principale difficulté à vaincre dans ce cas est le "chargement" des pièces buccales des insectes en vaccin.

En effet, lorsqu'un insecte pique naturellement dans le courant sanguin d'un animal récemment inoculé avec le virus vaccin SG33, ou même dans un myxome créé par ce même virus, il se charge insuffisamment en ce virus en raison de la faible concentration de ce virus vaccin, aussi bien dans le sang que dans le myxome. Ces insectes alors trop faiblement chargés ne sont pas capables de vacciner un autre animal lors du repas sanguin suivant.

Dans notre brevet, le Professeur P. SAURAT décrit une méthode pour tourner cette difficulté. Il montre que les puces peuvent être artificiellement chargés en virus vaccin en les trempant pendant 2 minutes dans une suspension de ce même vaccin. Le pourcentage de puces infectées de cette façon est fonction du titre du vaccin. Pour un titre viral égal à 108,5 DI 50/ml, avec 5 puces par lapin, 3 lapins sur 4 sont vaccinés. Pour un titre égal à 109 DI 50/ml, 4 lapins sur 4 sont vaccinés avec 5 puces par lapin.

La concentration virale est un paramètre important dans cette technique mais elle reste d'un coût à optimiser.

Depuis les travaux décrits dans notre brevet, nous n'avons dans la littérature, noté qu'une seule étude portant sur une tentative, d'ailleurs non

couronnée de succès, de transmission par des moustiques d'un virus atténué, celui de la fièvre de la vallée du Rift (TURELL, 1991).

Tout progrès dans le domaine du chargement en vaccin des pièces buccales des insectes devenait, en conséquence, impératif pour rendre opérationnel ce nouveau procédé de lutte biologique dont on ne fait aujourd'hui, qu'entrouvrir le champ des possibilités

Dans le paragraphe suivant, nous développons l'étude du chargement en vaccin des pièces buccales des puces de lapin *Spilopsyllus cuniculi* et *Xénopsylla cunicularis*.

Indispensable à la bonne marche de notre protocole, l'étude de l'élevage en masse de ces insectes, étroitement inféodés au lapin, ainsi que l'étude de la façon dont il convient de lâcher les puces dans la nature afin qu'elles retrouvent leur hôte est décrite dans le chapitre V.

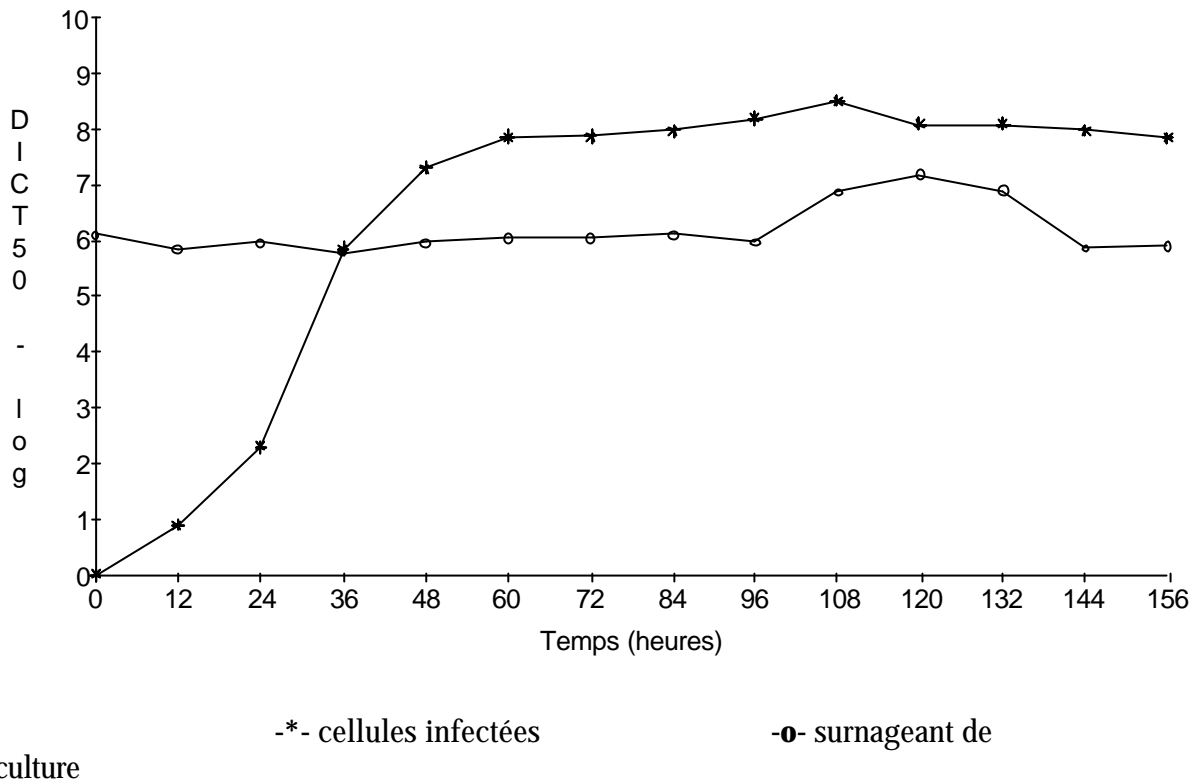
## **2- Etude des techniques de production expérimentale et de concentration des virus SG33 et BE4 :**

### **SG33 :**

La production du virus SG33 se réalise à 33°C sur cellules d'embryon de poulet mises en culture conformément aux techniques classiques (PAYMENT, 1989).

Afin de se mettre dans les meilleures conditions de production, nous avons étudié le cycle de multiplication du SG33. Le schéma 14 présente la cinétique de multiplication du SG33.

Cycle de multiplication du virus SG33 dans les cellules d'embryons de poulet



#### **Schéma 14**

L'étude de cette cinétique nous a permis de déterminer le temps post infection où le titre viral de la culture cellulaire est maximum. (Dans le cas du SG33, il faut 4 à 5 jours après infection des cellules pour obtenir le titre maximum de 108 DI 50/ml).

#### **BE4 :**

La production du virus BE4 se réalise sur lignée cellulaire RK13 (rein de lapin) à 37°C. Comme dans le cas du SG33, la cinétique de multiplication du BE4 sur RK13 a été étudiée. Le titre viral maximum se situe 5 jours après infection des cellules.

#### **Titrage :**

Le titrage des virus SG33 et BE4 est obtenu en étudiant l'effet cytopathogène sur microplaques de culture de cellules RK13.

La lecture des microplaques, quatre jours après infection, permet de déterminer un titre infectieux selon la méthode de REED et MUENCH (1938). Il est exprimé en doses infectieuses en culture cellulaire 50 % (DICT 50).

### **3- Concentration des suspensions virales :**

Afin de charger les pièces buccales des puces en virus (voir paragraphes suivants) avec le maximum d'efficacité, il est nécessaire de concentrer

les suspensions virales. Après avoir testé la technique d'ultra centrifugation (méthode efficace mais lourde d'emploi et onéreuse), nous avons utilisé deux techniques de concentration qui nous permettent d'obtenir régulièrement des titres viraux de l'ordre de 10<sup>8</sup> à 10<sup>8,5</sup> DICT 50/millilitre.

- 1°) Concentration par précipitation au polyéthylène glycol.

Après infection des cultures cellulaires, la suspension virale obtenue est mise en contact avec du polyéthylène glycol (PEG 6000 ou 8000) qui permet la précipitation des particules virales. Après une nuit à 4° C, le précipité obtenu est centrifugé (10.000g pendant 30'). Le culot viral ainsi obtenu est suspendu dans un volume de milieu de culture.

- 2°) Concentration à partir des cellules infectées

Après infection de plusieurs cultures cellulaires, les cellules infectées sont récupérées par centrifugation, et le surnageant écarté. Le culot cellulaire obtenu subit, 3 cycles de congélation-décongélation (azote liquide / 37° C) qui permettent de faire éclater les cellules et d'obtenir des suspensions virales concentrées.

Cette deuxième technique de concentration est celle que nous avons employée pour obtenir des suspensions virales titrant 10<sup>8,5</sup> DICT 50/ml, afin de charger les pièces buccales des puces en vaccin

#### **4- Chargement en vaccin des pièces buccales des puces et mesure de l'efficacité des techniques de chargement.**

a- Etude du chargement en SG33 et BE4 par la technique du trempage :

À partir des virus SG33 et BE4 obtenus comme il a été dit précédemment à des concentrations 10<sup>7,8</sup> et 10<sup>8,5</sup>, nous avons étudié l'influence des paramètres mentionnés dans le schéma 15 sur l'efficacité du chargement en virus des pièces buccales des puces *Spilopsyllus cuniculi*. Aucune expérience n'a été réalisée avec une concentration du vaccin à 10<sup>9</sup> DICT50/ml , en raison des difficultés et des coûts de production pour obtenir de telles concentrations. De telles expériences nous ont paru irréalistes du point de vue économique.

Virus	[C]	additifs		temps de trempage	agitation vortex
		tween 20	sang de lapin lyophilisé		
SG33	10E7,8	x	x	x	x
	10E8,5	x	x		
BE4	10E7,8		x	x	x
	10E8,5		x		

**Schéma 15**

Le protocole général suivi pour réaliser de telles expériences a été le suivant :

- 100 puces (âge entre 3 et 8 jours) sont placées dans un tube à hémolyse. 100 µl de virus aux concentrations variables sont ajoutés, avec ou sans additifs. Les temps de contact ont varié entre 2 et 5 minutes. Les puces sont agitées ou non au vortex 1 ou 2 fois 30 secondes. Après trempage, les puces sont séchées sur un papier absorbant tapissant le fond d'un cristalliseur.

- Ainsi conditionnées, les puces, en nombre variable, sont déposées sur des lapins séronégatifs maintenus en cages individuelles.

- 14 et 21 jours après le lâcher des puces, la mesure de l'efficacité de la transmission sont réalisés en dosant les anticorps anti-myxomateux dans le sang des lapins, par une méthode E.L.I.S.A. indirecte, inspirée des travaux antérieurs (CHANTAL, 1983 ; DUCLOS, 1988 ; WETHERALL, 1983) et améliorés par nos soins.

Ces améliorations ont en particulier porté sur l'optimisation de la méthode, et surtout de sa sensibilité. Elles ont permis de montrer qu'il est désormais possible de doser avec une totale sûreté les anticorps anti-myxomateux sur une pastille de 6 mm de diamètre de papier filtre Whatman n°1 imprégnée de sang de lapin séché. Les anticorps de la myxomatose sont décelables à partir du dixième jour après l'infection.

Nous les avons recherchés au 14ème et 21ème jour. Nous n'avons, en fait, jamais détecté d'anticorps au 21ème jour lorsqu'ils étaient absents au 14ème. Cette information montre que les puces piquent les lapins rapidement après le lâcher, délai inférieur à 4 jours et très probablement inférieur à 1 jour.

### Résultats :

Le schéma suivant donne un échantillonnage des résultats obtenus :

<b>Espèces de puces</b>	<b>Technique de chargement</b>	<b>Nombre de puces / lapin</b>	<b>Nombre de lapins</b>	<b>Nombre de lapins positifs</b>
Spilopsyllus	Trempage SG33 = 10E8,5 tween 20 2mn	10	4	2
Spilopsyllus	Trempage SG33 = 10E8,3 tween 20 2mn	5	5	1
Spilopsyllus	Trempage BE4 = 10E8,3 sang lyophilisé 2mn	10	5*	3
Spilopsyllus	Trempage BE4 = 10E8 tween 20 2mn	10	5*	1
Spilopsyllus	Trempage BE4 = 10E8,2 2mn	5	5*	2

### Schéma 16

\* Les expériences sur le BE4 ont été faites sur des lapins sauvages en provenance de La Grande Motte. Ces lapins ont développé un léger symptôme. Aucune mortalité n'a été observée.

De l'ensemble de ces résultats, nous n'avons pas pu dégager de lignes directrices capables de les améliorer ni de les reproduire parfaitement.

- Il est également apparu, au cours de ces travaux, que l'état physiologique des puces après le trempage n'était pas satisfaisant. Une mortalité des puces comprise entre 10 et 20 % était en effet observée.

- La technique de trempage apparaissait, en conséquence, trop perturbante pour ces insectes, qui se montraient par ailleurs (voir élevage chapitre V) sensibles au stress.

- Il devenait donc important de rechercher des conditions meilleures pour le chargement de leurs pièces buccales en vaccin.

b- Etude du chargement des pièces buccales des puces en SG33 et BE4 par une technique d'alimentation artificielle sur membrane. Technique ci-après dénommée "MAC-FLEAS".

En parallèle à ces travaux, nous avons mis au point, un système d'alimentation artificielle des puces sur membrane. Nous décrivons les résultats obtenus dans ce domaine dans le chapitre V.

En nous servant de la même technique d'alimentation artificielle sur membrane (MAC-FLEAS) nous avons chargé dans d'excellentes conditions, les pièces buccales de ces insectes en vaccin.

#### Piqûres sur myxomes primaires d'inoculation :

Au préalable et pour situer ces résultats, nous avons réalisé une étude comparative sur les possibilités de chargement des pièces buccales des puces en virus SG33 et BE4 sur myxomes primaires. Une telle étude permet également de mieux comprendre le rôle de la puce dans la transmission naturelle de la maladie.

Pour cela, nous avons provoqué des myxomes sur lapins domestiques, à partir des virus SG33 et BE4.

Nous avons alors fait piquer des puces âgées de 3 à 7 jours sur ces myxomes et avons vérifié leur possibilité de transmettre ce virus en les faisant piquer des lapins sains (lapins domestiques pour SG33, et lapins sauvages pour BE4).

Les résultats obtenus, présentés dans le schéma 17, montrent que les puces ne peuvent quasiment pas se charger lorsqu'elles piquent dans un myxome primaire provoqué par le SG33, probablement en raison de la trop faible concentration en virus de ces myxomes.

Au contraire, les puces se chargent parfaitement et très efficacement lorsqu'elles piquent dans un myxome primaire provoqué par le BE4. Une seule puce devient en effet capable de transmettre ce virus à un lapin avec une très grande efficacité (cf. schéma 17).

<b>Espèces de puces</b>	<b>Chargement sur myxomes primaires</b>	<b>Virus</b>	<b>Nombre de puces/lapin</b>	<b>Nombre de lapins</b>	<b>Nombre de lapins positifs</b>
Spilopsyllus	oui	SG33	30	5	0
Spilopsyllus	oui	SG33	30	5	1
Spilopsyllus	oui	BE4	30	5*	5*
Spilopsyllus	oui	BE4	5	10*	10*
Spilopsyllus	oui	BE4	2	5*	4*
Spilopsyllus	oui	BE4	1	15*	13*

Schéma 17

\* Les expériences sur le BE4 ont été réalisées sur des lapins sauvages (origine La Grande Motte). Tous les lapins sont devenus séropositifs après 14 jours, et ont survécu sans qu'apparaissent des lésions apparentes.

La concentration virale dans les myxomes provoqués par le SG33 s'est avérée maximale (105,5 DICT /g de myxome) entre le 4ème et le 6ème jour après l'inoculation.

La concentration virale dans les myxomes provoqués par le BE4 s'est au contraire avérée maximale (108 à 108,5 DICT/ g de myxome) entre le 12ème et le 14ème jour en accord avec les travaux de FENNER, (1965).

Ces résultats nous ont servis de témoins comparatifs, pour tester la technique de chargement sur membrane artificielle (MAC-FLEAS).

#### Chargement des puces sur "MAC-FLEAS" :

Les paramètres variables suivants ont été examinés :

- Les membranes et leurs technologies,
  - L'aliment (de différente composition, sang provenant de différentes espèces, âges et sexes des lapins, +/- stocké, +/- défibriné, +/- anticoagulants, +/- lyophilisé, +/- appetants, +/- phagostimulants)
- Nature des matériaux constituant le MAC-FLEAS,
- Aération, humidité, température,
- Etat physiologique des puces faisant intervenir les multi-paramètres de leur élevage et les conditions de leur manipulation,
- L'espèce et l'âge des puces,
- Les virus SG33 et BE4, leur concentration, l'importance de leur microencapsulation.

Une optimisation multivariable de ces paramètres a donné les résultats présentés dans le schéma 18.



Espèces de puces	Technique de chargement	Virus $10^{8,0} < [C] < 10^{8,5}$	Nombre de puces	Nombre de lapins	Nombre de lapins positifs
Spilopsyllus	MAC-FLEAS	SG33	30	5	4
Spilopsyllus	MAC-FLEAS	SG33	5	5	2
Spilopsyllus	MAC-FLEAS		30	5*	5
Spilopsyllus	MAC-FLEAS	BE4	5	10*	7
Spilopsyllus	MAC-FLEAS	BE4	2	5*	3
Spilopsyllus	MAC-FLEAS	BE4	1	10*	4
Xenopsylla	MAC-FLEAS	BE4	5	5*	4
Xenopsylla	MAC-FLEAS	BE4	1	5*	2

### Schéma 18

\* Ces expériences sur le BE4 ont été réalisées sur des lapins sauvages (Grande Motte). Ceux qui sont devenus séropositifs après 14 jours n'ont pas développé de lésions apparentes..

#### Conclusion :

La technique de chargement sur membrane s'est donc avérée très prometteuse aussi bien quantitativement que qualitativement (l'état physiologique des insectes est conservé, voire amélioré lors de la prise d'un repas sanguin). Elle respecte l'animal, aussi bien que les normes sanitaires et éthiques. Son emploi est extrêmement souple et facile d'utilisation.

Nous reportons dans ce chapitre des expériences de vaccination réussies de 57 lapins sauvages avec le BE4 via les puces. Tous ces lapins ainsi vaccinés n'ont développé qu'une myxomatose bénigne avec au maximum un léger épaissement des paupières. La guérison a été totale après 30 jours

## **CHAPITRE V : Elevage , technique de lâcher.**

### **A) Elevage d'une puce *Xenopsylla cunicularis***

**1) Origine des puces :** Nos puces *Xenopsylla cunicularis* proviennent de l'élevage de la Faculté Vétérinaire de l'Université de Zaragosse Espagne (cf. document ci-dessous).



FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

### ATTESTATION

Je, soussigné, Javier LUCIENTES, Docteur Vétérinaire et Professeur Titulaire de la Faculté Vétérinaire de Zaragoza, certifie que le lot de puces *Xenopsylla cunicularis* SMIT, fourni au Laboratoire d'Entomologie de BIO ESPACE (Faculté de St Jérôme à Marseille - France) en Mars 1994, est exempt de tout organisme pathogène, quel qu'il soit. Ce lot de puces provient de l'élevage maintenu depuis 2 ans dans le Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires de la Faculté Vétérinaire.

Pour faire et valoir ce que de droit.

A Zaragoza, le 4 Mars 1994.  
Javier LUCIENTES

Miguel Serrat, 177 • Tel. (976) 41 48 00 • Fax (976) 58 19 94 • 50013 ZARAGOZA

## 2-Spécificité :

La grande majorité des espèces du genre *Xenopsylla* est inféodée aux rongeurs. *Xenopsylla cunicularis* est la seule espèce à être parasite d'un lagomorphe. D'après Beaucournu et Launay (1977), ainsi que Launay et Beaucournu (1982), *Xenopsylla cunicularis* dérive de *Xenopsylla ramesis* (puce de Gerbillidés, du groupe *conformis*). Le passage de cette dernière sur les lapins se serait fait au Miocène (-15 millions d'années), en Espagne.

Sur le lapin, *Xenopsylla cunicularis* se localise uniquement sur la partie postérieure de l'animal, quels que soient le sexe et la période de l'année (Launay, 1980).

Deux à trois jours de présence sur le lapin sont strictement nécessaires à la maturation ovarienne des femelles de *Xenopsylla cunicularis*. Le sang de lapin est la seule

alimentation à ne pas nécessiter d'additif pour assurer le développement de la larve (Vallier, 1997).

Il ressort donc de ces informations que *Xenopsylla cunicularis* a une étroite adaptation à son hôte.

### **3-Cycle biologique.**

Les adultes de *Xenopsylla cunicularis*, après s'être alimentés sur un lapin, s'accouplent dans le sable des terrier (Launay, 1989). La maturité sexuelle est atteinte au bout de 2 à 3 jours (Vallier, 1997). *Xenopsylla cunicularis* passe la plupart de son temps dans le sable. L'œuf est pondu dans le sol. Les larves naissent entre 7 à 9 jours après la ponte. Les nouvelles puces adultes émergent entre le 30<sup>ème</sup> et le 40<sup>ème</sup> jour.

### **4-Nombre maximal de *Xenopsylla cunicularis* par lapin dans notre élevage.**

En raison du fait que *Xenopsylla cunicularis* passe la plupart de son temps dans le sable du terrier, le nombre de *Xenopsylla cunicularis* porté en permanence par un lapin est faible. Il a été estimé à environ 5 % de la charge initiale introduite, soit environ 25 pour une charge maximale de 500 dans notre élevage. Une telle charge est à comparer aux charges moyennes en *Spilopsyllus cuniculi* (autre puce spécifique du lapin) que portent les lapins de garenne dans leur milieu naturel en France (Launay, 1980) et qui varient de 20 à 100 selon les régions, ou même 800 aux Iles Kerguelen (Chapuis, 1999). On rappelle que contrairement à *Xenopsylla*, *Spilopsyllus cuniculi* est essentiellement localisé sur la tête et plus particulièrement sur les oreilles de l'animal et que celui-ci ne paraît pas en souffrir. Il est donc raisonnable de croire que la présence d'une vingtaine de *Xenopsylla* répartie sur la moitié du corps ne le fait pas souffrir davantage, d'autant qu'il a toujours vécu en partenariat avec ses parasites.

### **5-Coévolution du couple Hôte-Parasite.**

Généralités.

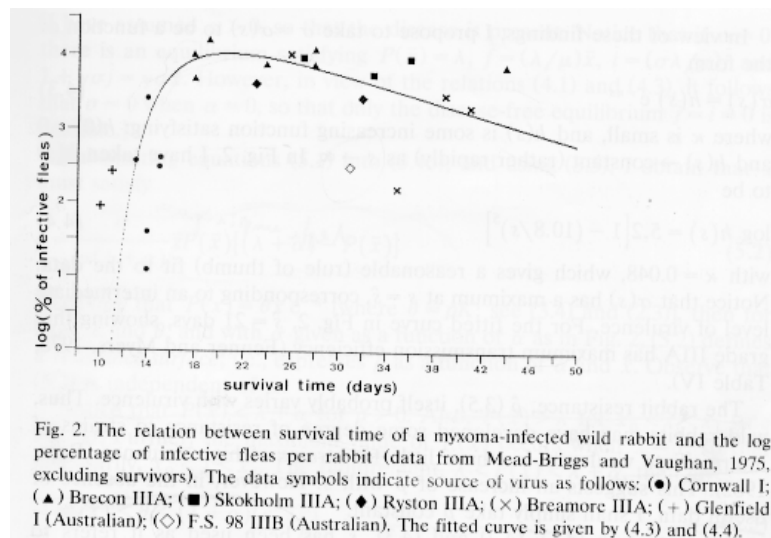
Tout être vivant est en effet concerné par le parasitisme, soit en tant qu'hôte, soit en tant que parasite (Barbault, 1992). Les interactions hôtes-parasites ont joué et jouent encore un rôle essentiel dans l'évolution biologique et dans le fonctionnement de la biosphère (Combes, 1995; Combes, 1996). Le parasite a intérêt à ce que l'hôte ne soit pas trop faible et vive le plus longtemps possible. L'hôte n'a pas intérêt à ce que le parasite arrive à un effet pathogène zéro, cela supprimerait chez lui toute pression sélective et toute possibilité d'évolution.

Les parasites qui savent se faire accepter sont certainement plus nombreux qu'on ne le pense, et les conséquences sont parfois extraordinairement positives pour les hôtes. Le succès de ces associations a été tel, que la face du monde vivant en a été changée (Combes, 1997). Les réalisations les plus abouties de l'Évolution (les vertébrés supérieurs, l'homme inclus) se trouvent au sommet d'une pyramide construite sur des associations entre des organismes dont les destinées, au départ, étaient entièrement distinctes (Combes, 1997).

Couple Lapin-Puce.

La population des puces n'a pas d'effet sur la dynamique de la population des lapins (Seymour, 1992).

Dans une population de lapins infectés par la Myxomatose, le temps de survie (allant jusqu'à la guérison) des lapins infectés augmente avec le nombre de puces infectantes portées sur les lapins, ainsi que cela est résumé dans le graphe ci-dessous, réalisé par Seymour (1992), à partir des travaux de Mead-Briggs et Vaughan (1975). En effet, lors d'une infection virale (dans ce cas par le virus de la Myxomatose), la présence des puces infectantes, en sélectionnant le virus le moins pathogène, contribue largement à la survie de la population des lapins. C'est un exemple parfait de coévolution Hôte-Parasite.



Ainsi, si les puces spécifiques des lapins ne peuvent pas survivre sans leurs hôtes, les lapins par contre, sans que cela affecte leur dynamique, peuvent tirer un bénéfice évident de la présence des puces qu'ils hébergent.

Cette information quantifiée par Seymour avait été mise en évidence dix ans plus tôt par John Ross (1982)

## 6-ORIGINE DES LAPINS Hôtes.

Les lapins proviennent du Laboratoire Scientifique des Dombes (Roman, 01 400 Châtillon Sur Chalaronne).

## 7-ANIMALERIE .

Les lapins sont maintenus dans l'animalerie décrite ci-dessous.

Plan de l'animalerie.

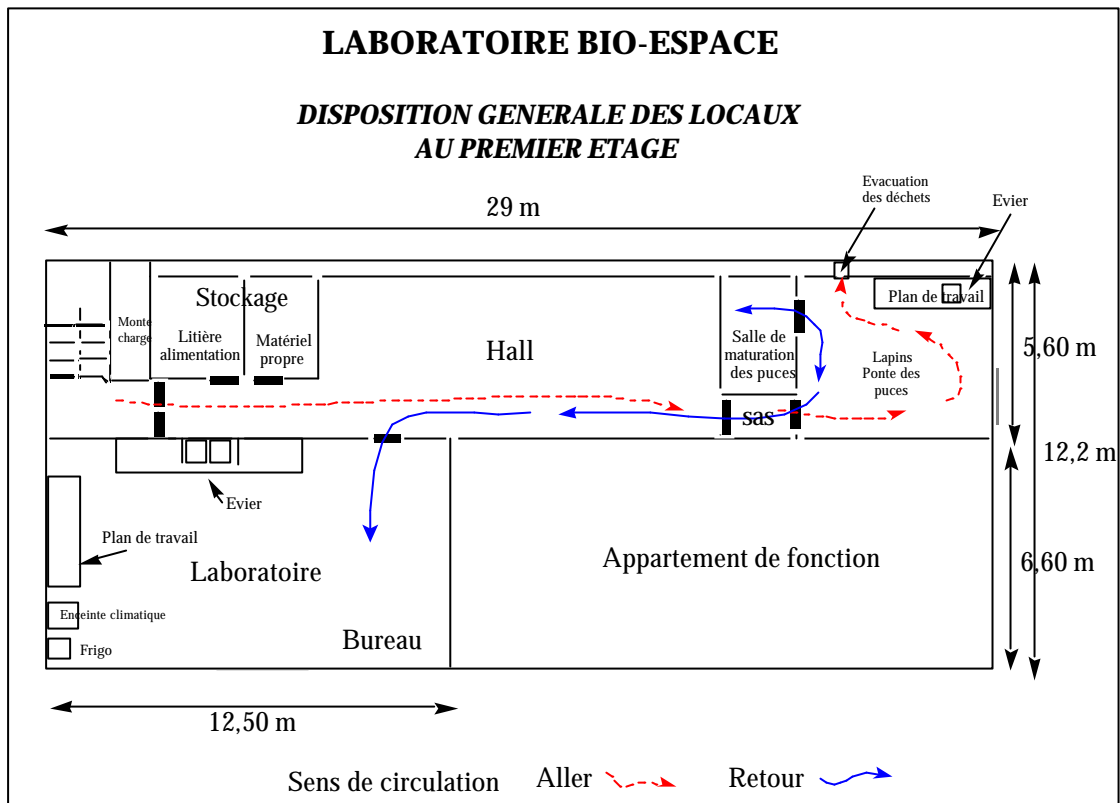


Schéma 1

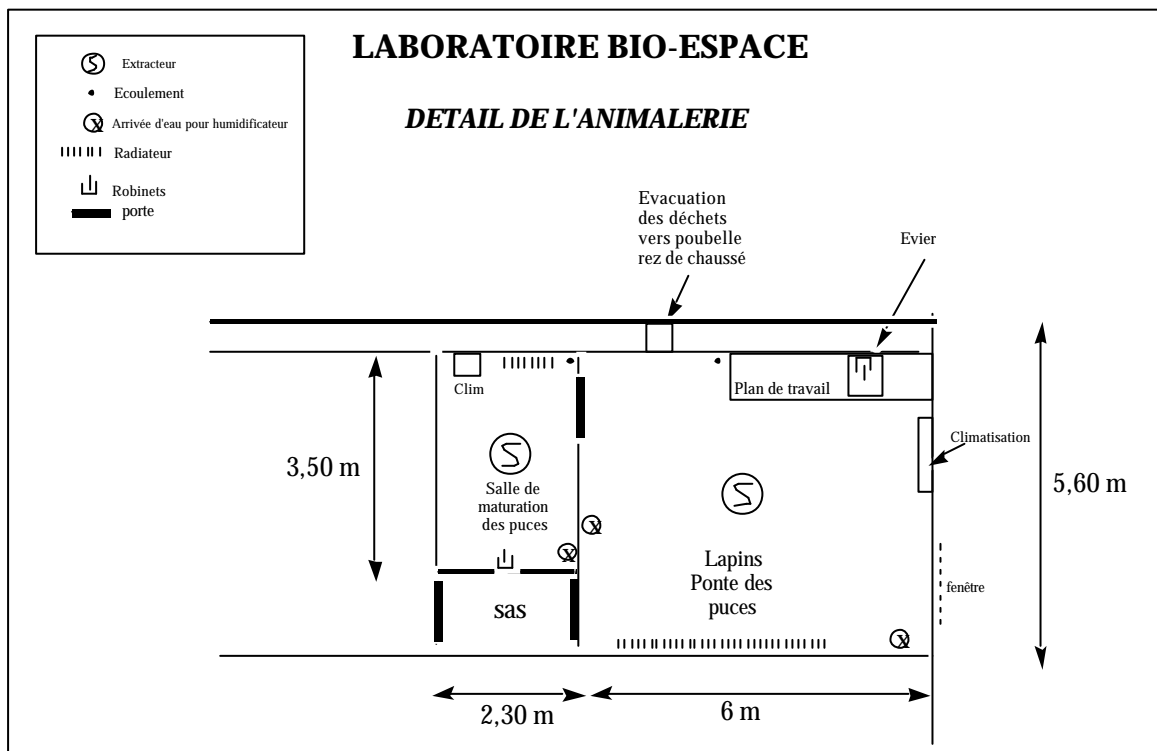


Schéma 2

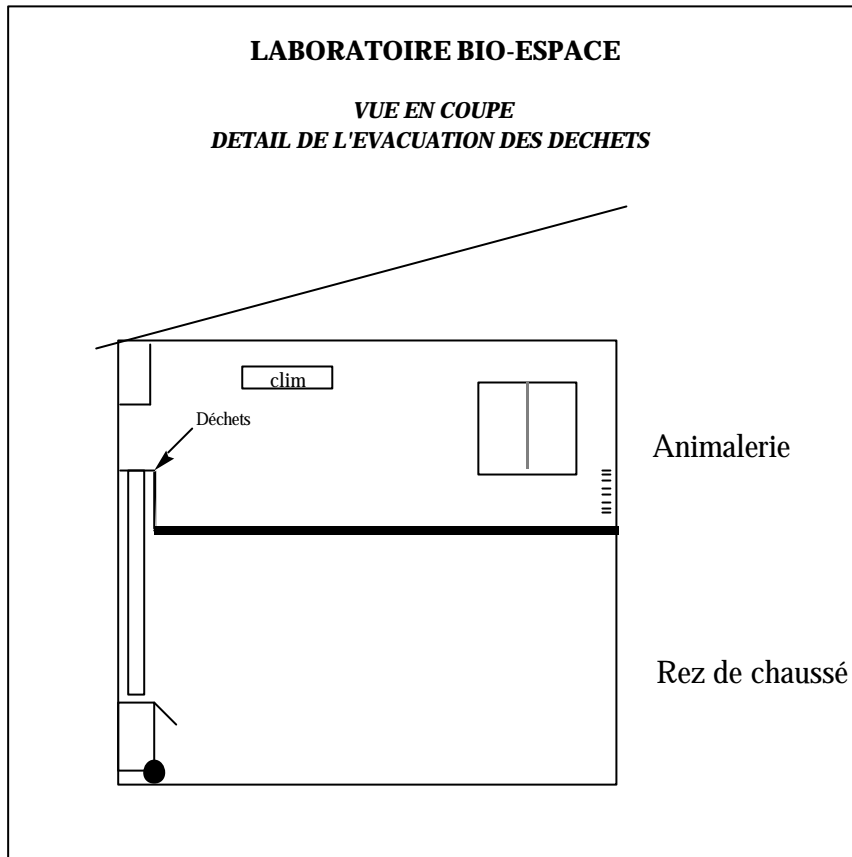
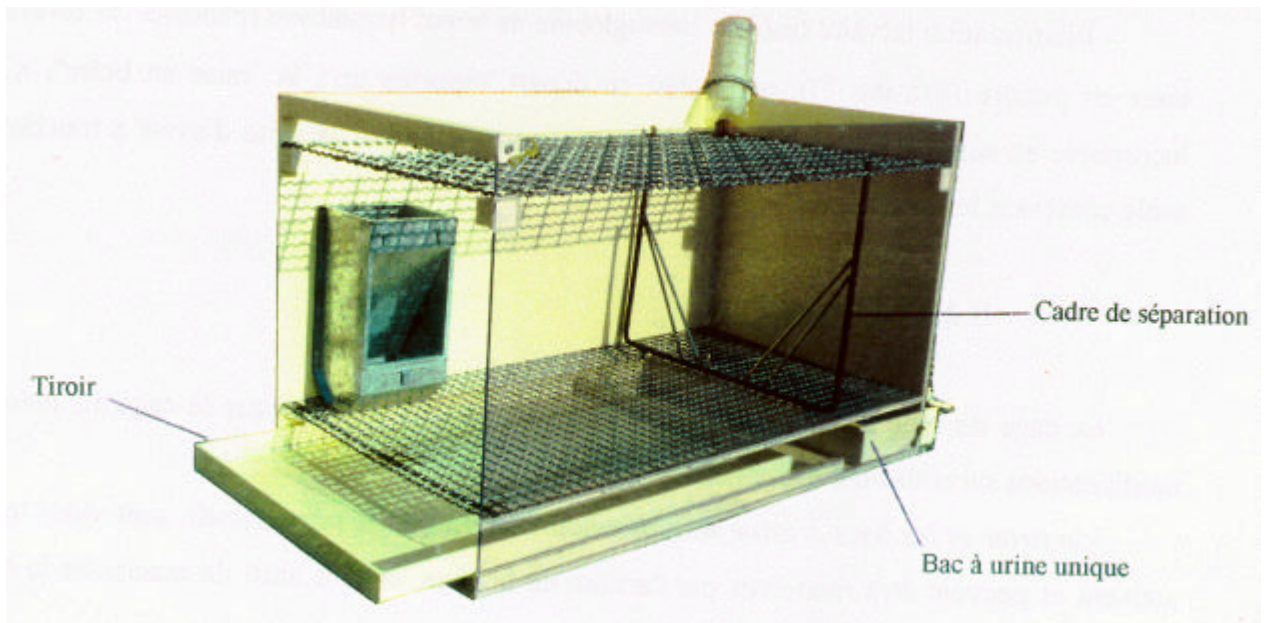


Schéma 3

Photographie d'une cage (dimensions L x 75 cm, l x 40 cm, H x 45 cm)



Les lapins sont maintenus dans des cages individuelles spécialement adaptées à l'élevage de la puce *X. cunicularis*. Ils sont sélectionnés parmi les lapins propres de nature et éduqués pour qu'ils fassent toujours leurs besoins au même endroit, au fond de la cage. Cette étape, bien que difficile, est primordiale pour la survie ultérieure des œufs et des larves de *X. cunicularis*.

La cage (3000 cm<sup>2</sup> au sol) a été conçue pour limiter le stationnement du lapin au-dessus du bac à urine et l'obliger à rester au-dessus du tiroir contenant le sable dans lequel s'effectue la ponte des puces.

Le bac à urine occupe toute la largeur de la cage et peut être récupéré par l'arrière

Les animaux sont entretenus avec tous les soins possibles jusqu'à leur disparition naturelle.

## **8-PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'ANIMALERIE.**

L'animalerie se compose d'un sas d'entrée (3,4 m<sup>2</sup>), d'une pièce principale (30 m<sup>2</sup>), ou salle de ponte des puces, et d'une pièce plus petite (8 m<sup>2</sup>), ou salle de maturation (schéma 2).

L'entrée dans l'animalerie se fait par l'intermédiaire du sas dans lequel le personnel de service met une blouse et des bottes. Les vêtements de travail sont lavés toutes les semaines. Les personnes étrangères au service enfilent obligatoirement des blouses et des surchaussures à usage unique (pour éviter une éventuelle contamination des salles d'élevage par des microorganismes, acariens ...)

Dans la salle principale, on trouvera les lapins dans des cages individuelles, portées par 2 tables roulantes, à raison de 5 cages par table. Les cages en PVC (3000 cm<sup>2</sup> et 45 cm de haut chacune) ont été spécialement mises au point pour l'élevage de *Xenopsylla cunicularis*. Elles tiennent compte à la fois du comportement du lapin et des puces.

Elles permettent aux puces qui se trouvent sur les lapins de pondre leurs œufs dans un tiroir qui se trouve sous l'animal.

Une paille a été prévue pour permettre les manipulations liées à l'élevage des puces. En bout de pièce, un bac de lavage sur roulettes est rangé sous la paille.

L'urine et les fèces des lapins sont retirées trois fois par semaine. Les déchets, placés dans des sacs-poubelles, sont évacués par un vide-ordures qui débouche sur un contenant à l'étage inférieur. Les sacs sont ensuite congelés pendant 1 semaine afin de détruire les œufs, les larves ou les adultes éventuellement restés dans ces déchets.

La dernière salle est la salle de maturation. Les tiroirs contenant les œufs de puces sont retirés des cages et placés dans cette pièce, sur des chariots, jusqu'à l'éclosion des adultes. Ces derniers sont ensuite stockés dans une enceinte climatique.

Dans les deux dernières pièces (ponte et maturation), la température est régulée à l'aide d'un chauffage durant l'hiver, et d'une climatisation pendant l'été (thermostat de régulation). L'humidité est contrôlée par des humidificateurs (alimentation d'eau en continu) reliée à un hydrostat. Dans la pièce de maturation, un humidificateur de secours prend le relais en cas de panne. Le renouvellement de l'air se fait de manière automatique grâce à un extracteur (situé au milieu du plafond) commandé par une horloge.

Température et humidité sont reliées à un système d'alarme en cas de défauts, mais peuvent être contrôlés visuellement grâce à des thermohygromètres enregistreurs.

Les humidificateurs sont démontés et désinfectés mensuellement ; les filtres des climatisations sont nettoyés toutes les semaines.

Le matériel (cages, biberons, tiroirs, chariots ...) est désinfecté toutes les semaines. Le sol et le vide-ordures sont brossés avec un produit désinfectant spécifique une fois par semaine. Les salles sont désinfectées entièrement une fois par an.

Les aliments (pour lapins et puces) et les litières sont stockés dans une pièce sèche, extérieure à l'animalerie. Il en est de même pour le matériel propre, stocké dans un autre local.

## **B) Les puces de lapin : choix de la meilleure technique de lâcher**

### **1) Objectifs :**

L'utilisation de puces pour vacciner les lapins de garenne nécessite, outre la mise au point de leur élevage, la connaissance de leur comportement sur le terrain afin de pouvoir choisir l'espèce de puce la plus efficace et de définir les conditions et la technique du lâcher.

Pour cette première série d'expérimentations, nous avons voulu :

- comparer 2 espèces de puces : *Spilopsyllus cuniculi* et *Xenopsylla cunicularis*,
- étudier l'influence du climat et du lieu de lâcher sur :
  - la rapidité de chaque espèce à retrouver son hôte,
  - leur taux de survie.

### **2) Principe des expérimentations :**

Les essais ont été réalisés dans 4 parcs aménagés, mis à disposition par la Fédération des Chasseurs des Bouches du Rhône : 3 terrains de 1400 m<sup>2</sup> et un de 900 m<sup>2</sup> environ. Ils ont tous été entourés d'un film plastique de 50 cm de haut pour éviter les passages de puces d'un parc à l'autre. Une garenne artificielle (pouvant s'ouvrir par le haut) a été construite dans chaque parc.

Pour chaque expérimentation, nous avons lâché de 10 à 16 lapins provenant de l'élevage de Suberoque. La structure naturelle des populations de lapins a été prise en compte en respectant les proportions de la sex ratio, des jeunes par rapport aux adultes et des femelles en gestation.

Trois à quatre jours après le lâcher de lapins (temps d'adaptation à leur nouveau milieu), nous avons lâché de 10 à 50 puces/lapin. Les puces étaient âgées de 3 à 15 jours et marquées à l'aide d'une poudre fluorescente qui nous a permis (au laboratoire sous lampe UV) de les distinguer des puces "indigènes".



Les lâchers de puces ont été effectués à l'intérieur ou à l'extérieur des garennes selon les expériences, autour des points d'alimentation, sur les lieux de passage privilégiés des lapins, ou effectués de façon aléatoire sur l'ensemble du parc.

Le peignage (récupération des puces sur les lapins) a eu lieu le même jour ou le lendemain (P1), 2, 3 et 7 jours après (P2, P3, et P7) du lâcher de puces, en fonction des essais envisagés.

Afin de connaître l'efficacité du peignage (= taux de récupération des puces), nous avons effectué, au préalable, une série de tests qui nous a permis d'estimer à :

- 90 % le taux de récupération de *Spilopsyllus cuniculi*,
- 80 % celui de *Xenopsylla cunicularis*.

Pour la première série de manipulations, les lapins ont tous été rabattus dans la garenne juste avant le peignage. Cette facilité de récupération s'est avérée très perturbante sur les résultats. En effet, à l'intérieur de la garenne, du fait des contacts étroits et du stress des lapins, d'importants échanges de puces avaient lieu, modifiant leur répartition initiale. Aussi, pour les essais suivants, les lapins ont été capturés directement dans le parc à l'aide de filets ou rabattus un par un dans la garenne.

Dans les différents essais, 4 paramètres entrent en jeu :

- 2 facteurs biotiques : la puce et le lapin,
- 2 facteurs abiotiques : le climat et l'environnement (sol et végétation).

Aussi, pour arriver à comprendre le comportement des puces et à en dégager les points importants, il était nécessaire de partir de situations "simples", contrôlées au maximum (milieu artificiel) puis de prendre en compte les interactions des différents facteurs écologiques afin de simuler et cerner au mieux les écosystèmes naturels.

La puce *Xenopsylla cunicularis* a été testée à l'intérieur de la garenne, en obligeant ou non les lapins à y entrer après le lâcher de puces.

Toutefois, la majorité des expériences a été effectuée à l'aide de *Spilopsyllus cuniculi*. Seuls les résultats les plus significatifs, directement applicables et lorsque les lapins n'ont pas été obligés à rentrer dans la garenne ni avant ni après le lâcher de puces, ont été retenus dans ce rapport.

### **3) Synthèse des résultats :**

Afin de pouvoir comparer l'ensemble des lieux de lâcher et des différentes répétitions, dont le nombre de puces lâchées et le nombre de lapins varient, nous avons calculé la densité :

$$\text{densité} = \frac{\text{nombre de puces lâchées}}{\text{nombre de lapins}}$$

a) Lieux de passage :

<b>N° de répétition</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<b>Nbre de puces lâchées</b>	420	420	435	440	233	224	224	130	132	215	208	
<b>Nbre de lapins</b>	10	10	15	13	18	15	14	10	10	16	16	
<b>Densité</b>	42	42	29	33.8	12.9	14.9	16	13	13.2	13.4	13	
<b>% de récupération</b>	88%	80%	65.6 %	62.9 %	96.1 %	86%	60%	89%	89%	63%	80%	x = 78 %
<b>Ecart-type</b>	32.3	22.1	1	8	8.4	14	13.8	11.1	8.6	8.7	5.5	

b) Aléatoire :

<b>N° de répétition</b>	1	2	3	
<b>Nbre de puces lâchées</b>	160	160	800	
<b>Nbre de lapins</b>	16	16	16	
<b>Densité</b>	16	16	50	
<b>% de récupération</b>	43%	66%	58%	x = 55.60 %
<b>Ecart-type</b>	2.6	4.3	18.6	

c) Garenne :

<b>N° de répétition</b>	1	2	
<b>Nbre de puces lâchées</b>	800	800	
<b>Nbre de lapins</b>	16	15	
<b>Densité</b>	50	53.3	
<b>% de récupération</b>	83.5 %	78%	x = 80.75 %
<b>Ecart-type</b>	53.4	51	

**d) Alimentation :**

<b>N° de répétition</b>	1
<b>Nbre de puces lâchées</b>	800
<b>Nbre de lapins</b>	15
<b>Densité</b>	53.3
<b>% de récupération</b>	82%
<b>Ecart-type</b>	37.4

**4) Discussion :**

La proportion de puces récupérées est meilleure lorsque les lâchers de puces sont effectués à l'intérieur des garennes (80,7 %), autour de points d'alimentation (82 %) et sur les lieux de passage préférentiels des lapins (78 %) que lorsque les lâchers sont faits de façon aléatoire (55,6 %).

Ces résultats sont vérifiés lorsque nous prenons en compte les densités de lapins et de puces lâchées initialement.

Ainsi que nous le verrons ultérieurement, seule la première piqûre étant vaccinante, il était indispensable de prendre également en compte la répartition initiale des puces sur les lapins.

En effet, dans un premier temps, on aurait pu craindre que les femelles gestantes soient "colonisées" préférentiellement, du fait de leur importante attractivité liée au cycle de reproduction de *Spilopsyllus cuniculi*.

A terme, ceci aurait eu pour conséquence de les vacciner sélectivement par rapport aux autres lapins, dont les chances d'attraper les puces auraient été plus faibles.

Or, toutes les expérimentations qui ont été faites nous ont montré que la distribution initiale des puces sur les différentes catégories d'âge, de sexe et d'état physiologique des lapins était aléatoire.

Une puce à la recherche d'un hôte saute sur le premier qui passe. Ce n'est que plus tard, au hasard des contacts, que l'attractivité des femelles entrent en jeu. D'ailleurs, cette attractivité a été mise en évidence dans les essais où les lapins étaient rabattus dans la garenne avant peignage car nous avons observé pour la puce *Spilopsyllus cuniculi* une nette tendance à la colonisation préférentielle des femelles adultes (gestantes ou non). Cette tendance disparaît avec *X. Cunicularis*.

Cette tendance a également disparu quand nous avons cessé de regrouper les lapins avant peignage.

Cependant, bien que tous les lapins étaient porteurs de nos puces (sauf rares exceptions), les quantités retrouvées étaient variables d'un hôte à l'autre. Ce phénomène dépend de l'ordre et de la vitesse de passage des lapins et, bien sûr, du lieu de lâcher des puces.

Les répartitions les plus homogènes correspondent aux lâchers effectués sur les lieux de passage et de façon aléatoire sur l'ensemble du parc; les lâchers à l'intérieur des garennes et autour d'une source d'alimentation donnant des résultats peu intéressants (hétérogénéité élevée).

Une étude plus précise indique que plus la densité de puces/lapin est élevée, plus la répartition est hétérogène (écart-type plus élevé). Cela signifie qu'il y a davantage de puces qui retrouvent les lapins mais toujours sur le même nombre de lapins (toujours les mêmes lapins concernés). Il est donc inutile de lâcher un nombre de puces trop important (gaspillage).

On peut noter, toutefois, que la répartition des puces la plus homogène correspond à une densité puces/lapin optimale d'environ 30.

Par ailleurs, tous nos essais ont mis en évidence la rapidité de *Spilopsyllus cuniculi* à retrouver son hôte, en moins de 2 jours en fonction de la proximité et du comportement des lapins, ce qui correspond tout à fait à la capacité de survie de la puce et à son aptitude à retrouver le lapin dans de bonnes conditions.

Quant aux expériences faites avec *Xenopsylla cunicularis*, de par ses caractéristiques biologiques, nous avons rencontré des difficultés de manipulations. En effet, cette espèce de "terrier" ne reste sur le lapin que le temps de s'alimenter (du moins au printemps et en été), ce qui nous a obligé à intervenir très rapidement après le lâcher.

Après de nombreux essais d'adaptation, nous avons obtenu un très bon taux de récupération des puces (79 %), et avons pu faire les mêmes observations

que pour *Spilopsyllus cuniculi* concernant leur rapidité à retrouver l'hôte et leur répartition aléatoire au sein de la population de lapins.

Il est à noter que *Xenopsylla cunicularis* est une espèce qui a la capacité de s'enfouir dans le sol très rapidement et présente l'avantage de mieux résister aux températures élevées.

### Conclusion :

Si l'on tient compte, à la fois du taux global de puces qui retrouvent les lapins, et de la répartition initiale de ces insectes sur les populations hôtes, effectuer les lâchers de puces préférentiellement sur les lieux de passage fréquentés par les lapins nous donnera les meilleurs résultats de vaccination.

Choisir les coulées comme site de lâcher présente plusieurs autres avantages : en plus d'être potentiellement utilisées par plusieurs colonies de lapins, elles sont l'assurance de leur présence sur le site, tout en étant plus facile à trouver pour le manipulateur que des entrées de garenne (parfois bien cachées par la végétation).

De plus, il est important de constater que tous les lapins, quels que soient leur âge et leur état physiologique, sont susceptibles de récupérer rapidement nos puces (*Spilopsyllus cuniculi* et *Xenopsylla cunicularis*), à partir du moment où ils passent à proximité d'une zone de lâcher.

Nos puces vont-elles pouvoir réellement vacciner les lapins au cours de leur premier repas sanguin ?

C'est ce que nous allons nous avoir démontré dans le chapitre suivant.

## CHAPITRE VI

### Etude des capacités vaccinales des puces chargées, en parc et en nature :

En utilisant des puces chargées en vaccin SG33 ou BE4 par la technique MAC-FLEAS, nous avons étudié la transmission du vaccin en distinguant 2 étapes : initiation et réaction en chaîne.

#### A - En parc :

##### 1) Etape initiation :

L'étape initiation ne devrait, à priori, pas poser de problèmes compte tenu des résultats préalables obtenus en laboratoire. Néanmoins, nous avons réalisé deux expériences en parc pour la confirmer :

- Dans la première expérience, nous avons placé 20 lapins domestiques dans un parc de 1000 m<sup>2</sup> contenant un abri pour la nourriture (aliments + eau) et une garenne aménagée pour pouvoir reprendre les lapins.

Après avoir laissé les lapins s'acclimater pendant 5 jours, nous avons lâché 200 puces (*spilopsyllus cuniculi*) chargées au SG33 par la technique MAC-FLEAS (soit 10 puces / lapin) en 7 points différents du parc.

15 jours après le lâcher, les lapins étaient repris. Un prélèvement sanguin montrait que 10 d'entre eux étaient séropositifs.

- Dans une deuxième expérience, nous avons répété les conditions précédentes en utilisant le même nombre de lapins, sauvages cette fois, et le même nombre de puces chargées au BE4 par la technique MAC-FLEAS.

15 jours après le lâcher de puces, les lapins étaient capturés. Une analyse sanguine montrait que 18 d'entre eux étaient séropositifs. Aucune mortalité n'a été constatée sur ces animaux.

## 2) Etude de l'étape de réaction en chaîne :

### SG33 :

Nous n'avons pas envisagé d'étudier la réaction en chaîne à partir du SG33. Il est connu, en effet, que la concentration en particules virales dans le myxome provoqué par ce virus est trop faible pour pouvoir se transmettre de lapin à lapin via les insectes vecteurs (JOFFRE, 1978 ; SAURAT, 1978).

### BE4 :

Le virus BE4 est un virus, purifié, et naturellement atténué. En conséquence, puisqu'il existe en nature, c'est qu'il doit avoir la capacité de survivre dans les conditions naturelles et donc de se transmettre de lapin à lapin. Nous avons voulu savoir dans quelle mesure cette transmission était possible.

Une telle hypothèse était étayée par une expérience que nous avons réalisée auparavant à partir d'une autre souche myxomateuse de virulence IV qui était en notre possession, expérience néanmoins à réinterpréter.

En effet dans ce cas :

17 lapins sauvages avaient été placés dans un parc de 25 m<sup>2</sup>. 400 puces avaient été dispersées dans ce parc et 3 de ces lapins avait reçu au dermojet 1000 DI 50 de virus IV.

60 jours après, les 17 lapins étaient séropositifs. Tous avaient survécu.

La première analyse avait été de conclure que les puces avaient transmis ce virus.

Une autre interprétation était néanmoins envisageable. Ces animaux dans une surface trop exiguë s'étaient sévèrement battus. Il pouvait être envisagé que ce virus ait été transmis par contact au cours de ces batailles. Cette expérience devait donc être renouvelée dans des conditions différentes. Nous avons donc réalisé les 3 expériences successives suivantes :

a- 5 lapins sauvages ont été lâchés dans un parc n° 1 de 25 m<sup>2</sup>. Chaque lapin a reçu au moment du lâcher 10 puces chargées au BE4 d'après la technique MAC-FLEAS. 500 autres puces (non chargées) ont été réparties dans le parc. 15 jours après, les cinq lapins ont été capturés. Ils étaient tous porteurs de légers myxomes à la base des oreilles caractéristiques du BE4. Une analyse sérologique confirmait qu'ils étaient séropositifs. Ces lapins étaient également porteurs de nombreuses puces. Ils ont alors été peignés. 150 puces ont ainsi été récupérées.

Notre hypothèse était qu'une partie importante d'entre elles devait porter du BE4. Nous rappelons en effet qu'au 15<sup>ème</sup> jour, le myxome de virulence IV est au maximum de son infectiosité (FENNER, 1965).

b- Ces 150 puces ont alors été divisées en 5 lots de 30 puces. Chaque lot a été placé sur 1 lapin sauvage. Les 5 lapins ainsi chargés en puces ont été rassemblés dans un parc n° 2 de 25 m<sup>2</sup>. Nous avons alors apporté 350 nouvelles puces non chargées dans ce parc. 15 jours après, seulement 2 de ces lapins s'avéraient porteurs de légers myxomes. Les 3 autres devaient rester séronégatifs à 30 jours.

c- Les 150 puces récupérées sur ces 2 lapins, ont été comme dans l'expérience précédente apportées à un 3<sup>ème</sup> lot de 5 lapins sauvages, plus 350 puces vierges. Après 15 jours d'incubation, aucun de ces lapins du 3<sup>ème</sup> lot ne s'est avéré porteur de myxomes à la base des oreilles. Ils sont restés séronégatifs à 30 jours.

### Conclusion :

Pour tenter de transmettre le BE4 en chaîne, nous avons dans cette expérience placé 100 puces par lapin (trois à quatre fois plus que la moyenne des puces portées par lapins sauvages). La réaction en chaîne s'est avérée non nulle mais néanmoins très faible ("diffusibilité" < 0,4 exprimée par le quotient entre le nombre total de 2 lapins qui sont devenus séropositifs, et le nombre de lapins initialement contaminés 5). Cette valeur est probablement surestimée, par le fait que le nombre de puces utilisées est nettement supérieur à la moyenne des puces par lapin trouvées en nature.

Cette conclusion semble, en effet, très logique si l'on se souvient que les myxomes BE4, provoqués par les puces, ont environ une taille qui ne dépasse pas 1 cm<sup>2</sup> et restent faiblement attractifs pour les insectes hématophages. Le chargement en BE4 des insectes dans de telles conditions doit donc, à priori, rester très faible puisque fonction du rapport entre la surface du myxome à la surface infiniment plus grande de la partie non contaminante de l'animal. Nous avons tenté de vérifier

cette conclusion au cours d'une expérimentation préliminaire en milieu naturel contrôlé.

### **B - En nature :**

Deux sites d'expérimentation ont été choisis :

- a) Ile de La Grande Motte,
- b) bordure littorale "Pas de Calais".

L'Ile de La Grande Motte (34280) a une surface globale de 150 ha, subdivisée en plusieurs sous structures.

Au cours du printemps été 1995, 2 lâchers de 4000 puces portant du virus BE4 ont été réalisés sur des sites 1 et 2. La surface de chaque lieu de lâcher est égale à environ 2 ha. Les lâchers ont été réalisés pour moitié à l'entrée des garennes visiblement occupées, et le reste dans les passages pratiqués par les lapins aux abords de ces garennes.

Avant, et durant l'expérimentation, des reprises "témoin" ont régulièrement été effectuées sur d'autres secteurs de l'Ile, afin de connaître la sérologie de la population adulte et jeune.

Ces expériences de contrôle ont permis de montrer que sur cette île très peuplée en lapins, les adultes étaient séropositifs à 95 % témoignant des épizooties passées, et les jeunes étaient séronégatifs à 100 %, témoignant de l'absence de maladies durant tout le temps de l'expérimentation.

23 jours après le lâcher de puces vaccinales, des reprises de contrôle d'efficacité ont été effectuées dans les zones de lâcher aux points 1 et 2.

23 jeunes lapins ont été repris, ils se sont tous avérés séropositifs à l'analyse. La plupart d'entre eux, au moment de la reprise, portaient des petits myxomes à la base des oreilles caractéristiques d'une vaccination au BE4 par les puces.

12 de ces jeunes lapins, ainsi vaccinés, repris dans la zone 1 ont été placés en parc afin de vérifier l'évolution de la vaccination. 15 jours après, tous les lapins avaient survécu et les symptômes de la vaccination avaient disparu. Ces lapins ont été stockés en parc afin d'étudier l'évolution de la résistance de leurs descendants.

Dans les semaines qui ont suivi, des reprises ont été effectuées dans la zone 2, à des distances comprises entre 100 et 200 mètres des points de lâcher.

25 jeunes lapins ont été ainsi capturés. Sur ces 25 animaux seuls 3 se sont avérés séropositifs.

#### **b) Bordure Littorale "Pas de Calais" :**



De façon analogue à La Grande Motte, 2 lots respectivement de 4000 et 2000 puces chargées au BE4 ont été lâchés dans la bordure Littorale du "Pas de Calais".

3 semaines après le premier lâcher, 33 jeunes lapins ont été capturés sur le lieu de lâcher. Tous étaient séropositifs.

6 semaines après le second lâcher, des captures ont été réalisées dans un rayon de 100 m et 150 m du point de lâcher.

Dans un rayon de 100 m, 22 jeunes ont été capturés, 21 se sont avérés séropositifs.

Dans un rayon de 150 m, 10 jeunes ont été capturés, seuls 5 d'entre eux se sont avérés séropositifs. Au-delà de 150 m, aucun lapin ne s'est avéré positif.

Aucune mortalité, due à ce type de vaccination, n'a été observée dans l'expérimentation "Pas-de-Calais". Les très faibles symptômes décrits ont été identiques à ceux observés sur les lapins "La Grande Motte".

### Conclusion :

De ces 2 expériences préliminaires en nature, on peut conclure que :

- Les puces chargées au BE4 sont capables, comme dans les expériences en parc, de retrouver les lapins et de les vacciner.

- En ce qui concerne l'étape d'initiation, cette vaccination par les puces en nature est très efficace, puisque quasiment 100 % des jeunes capturés sur les lieux de lâcher ont été protégés. Il reste à optimiser le nombre de puces à lâcher par hectare, afin de pouvoir atteindre la protection optimale de la population au meilleur coût.

- En ce qui concerne la réaction en chaîne : les expériences ainsi réalisées ne permettent pas de conclure à une réaction en chaîne importante, si elle existe. Nous rappelons en effet, qu'en parc la réaction en chaîne s'est avérée avoir une très faible amplitude. En nature, nous n'avons pas observé de progression notable du virus vaccinant au-delà d'un cercle de 200 m des points de lâcher, et ceci malgré la forte population de lapins sur les territoires expérimentaux ; forte population qui aurait dû favoriser la diffusion. Cela est probablement dû à la très faible symptomatologie que provoque le BE4 sur les lapins sauvages, et ainsi à la très grande difficulté que les insectes vecteurs ont à se charger en virus.

- Cette vaccination au BE4 par les puces se confirme être sans danger pour les lapins sauvages. Parmi les animaux vaccinés dans ce chapitre, 37 d'entre eux ont pu être suivi jusqu'à la disparition totale des marques de la vaccination. Aucun n'est mort des suites de cette vaccination. Ils ont tous présenté une symptomatologie très faible.

Dans ce domaine nous rappelons dans le schéma 34, le nombre d'animaux sauvages vaccinés au BE4 au cours de nos différentes expériences et leur devenir en fonction du mode de vaccination (dermojet, lancette ou puces)

<b>Chapitres</b>	<b>Vaccination au dermojet</b>	<b>Vaccination à la lancette</b>	<b>vaccination par les puces</b>	<b>mort</b>	<b>survie</b>	<b>% Survie</b>
<b>chapitre III</b>	47	—	—	5	42	89,3
	—	8	—	—	8	100
<b>chapitre IV</b>	—	—	57	0	57	100
<b>chapitre VI</b>	—	—	37	0	37	100
<b>total</b>	47	8	94	5	144	96,6

### **Schéma 34**

Si l'on examine le nombre total d'animaux vaccinés (149) et le nombre total de morts (5), on pourrait déjà être satisfait du résultat en parlant d'un pourcentage de survie très important (96,6 %).

Mais on peut aussi analyser ces résultats ligne par ligne, et dans ce cas si le pourcentage de survie lors de la vaccination au dermojet tombe à 89,3 %, au contraire le pourcentage de survie lors de la vaccination à la lancette ou par les puces monte jusqu'à 100 % avec une symptomatologie plus faible.

Certes l'expérimentation est à poursuivre, et il serait hasardeux de vouloir tirer une conclusion hâtive et définitive de tels résultats, mais on peut se demander si l'on n'est pas là devant un phénomène à approfondir. Contrairement à l'infection au dermojet que l'on pourrait qualifier de massive et provoquant des lésions importantes (comparativement à celles que provoquent les puces), on pourrait se trouver, dans le cas des puces, devant une infection beaucoup plus bénigne, et ainsi plus facilement contrôlée par le système immunitaire. On pourrait également imaginer que les cellules dermiques certainement touchées plus sélectivement par les puces que par le dermojet ont une réponse immunitaire complétant celle des systèmes déjà connus. Une telle hypothèse, réaliste au sens de l'évolution biologique correspondrait au fait que la peau (première interface milieu vivant - milieu extérieur) soit une première barrière de défenses immunitaires plus efficace que celle correspondant au milieu sous cutané.

## **Conclusion Générale :**

Nous pensons avoir démontré en étudiant le modèle lapin-puce-vaccin (contre la myxomatose), que la vaccination des animaux sauvages sans avoir à les capturer est devenue une réalité expérimentale.

Ce procédé original pourrait à terme être généralisé à d'autres vaccins, d'autres vecteurs, et d'autres cibles.

L'augmentation de la population des lapins sur un territoire donné nécessite de lâcher chaque année par lapin présent sur ce territoire environ dix (10) puces portant le vaccin (BE4) dans leur rostre. L'apport de BE4 par les puces déplace

l'équilibre naturel du virus myxomateux vers une présence majoritaire du virus de force 4 ce qui protège les animaux contre la maladie.

Pour rétablir sur un territoire une population de lapins à son niveau initial, il suffit de cesser le traitement. La distribution naturelle du virus myxomateux se rétablit alors spontanément en faveur du virus plus virulent de force 3 provoquant l'effondrement attendu de la population. Une telle possibilité de lutte peut devenir utilisable dans le cas où la régulation naturelle par les carnivores naturels ou par la chasse devient insuffisante.

Seuls les lapins **sauvages** sont visés .

Les possibilités d'une telle vaccination devraient, à terme, conduire les gestionnaires cynégétiques à ne plus lâcher d'animaux d'élevage, mais à gérer les populations sauvages de leur territoire.

Dans les secteurs dans lesquels les lapins sauvages seraient vaccinés les lapins domestiques serait davantage protégée qu'actuellement, puisque la population de virus de forte virulence aurait considérablement diminué, et ne pourrait être transmis que difficilement.

### **Abrégé :**

La vaccination de population d'animaux sauvages, sans avoir à les capturer, en utilisant une seringue vivante constituée d'un insecte spécifique de l'animal cible est devenue une réalité scientifique grâce aux travaux du laboratoire Bio-Espace.

Cette nouvelle, et très originale technologie devrait pouvoir être élargie à l'étude de moyens de lutte contre certaines zoonoses et zoonothroponoses jusqu'à présent restées sans solutions. L'autorisation d'utiliser en nature ce procédé de vaccination, permettrait de tester sans risques cette technique d'un grand intérêt potentiel.

Ces travaux contribueraient, par des moyens naturels, à rééquilibrer les écosystèmes après les dégâts causés à la faune Européenne par l'introduction de la myxomatose dans les populations de lapins de garenne.

Ces travaux, en apportant aux chasseurs des moyens de gestion efficace d'un gibier sédentaire très localisé, fixeraient l'attention d'une grande majorité d'entre eux. Leur participation efficace à l'aménagement des espaces naturels contribuerait à protéger ces espaces contre les incendies et autres aléas climatiques.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

BARBAULT, R., (1992) - Ecologie des peuplements. Structure dynamique et évolution. Masson Ed.273pp.

BEAUCOURNU, J.C. ET LAUNAY, H., (1977) - Présence en France d'une *Xenopsylla* selvatique *X. cunicularis* Smit, 1957 (*Siphonaptera, Pulicidae*) parasite du lapin de garenne. *Bull. Soc. Path. exot.*, 70, 299-301.

BEAUCOURNU, J.C. (1990). *Faune de France 76* : Les puces de France et du Bassin Méditerranéen Occidental. Ed. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles. **548**

BERGOIN, M. , ANTONY, C. , JOUSSET, F. X. ET GOURREAU, J. M. (1980). Recherches sur les modalités de transmission du virus myxomateux par les moustiques. *Bulletin Office National de la Chasse*, 265-276.

BRUN, A., SAURAT, P., GILBERT, Y., GODARD, A., ET BOUQUET, J. F. (1981). Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **132**,585-90.

CHAPUIS, J., L., (1999) - Communication personnelle (publication sous presse).

COMBES, C. (1995) - Interactions durables. Ecologie et évolution du parasitisme. Masson Ed.

524 pp.

COMBES, C., (1996) - L'écologie des interactions durables ou le parasitisme revisité. *Médecine / Sciences*, N° spécial, 158-162.

COMBES, C., (1997) - Parasitisme et évolution. *Pour la science*, janvier 1997, 134-139.

COOKE, B. D., (1990) - Note on the comparative reproductive biology and the laboratory breeding of the rabbit flea *Xenopsylla cunicularis* Smit (*Siphonaptera : Pulicidae*). *Aust. J. Zool.*, 38, 527-534.

CHANTAL, J., GILBERT, Y., PICAUVET, D.P., LACHERETZ, A. ET HAMON, F. (1983). La méthode E.L.I.S.A. et l'étude sérologique de la myxomatose. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **134(8-9)**, 465-470.

DAY, M. F., FENNER, F., WOODROOFE, G. M., AND MCLNTYRE, G. A. (1956). Further studies on the mechanism of mosquito transmission of myxomatosis in the European rabbit. *Journal of Hygiene*, **54**, 258-83.

DUCLOS, P.H. (1988). Etude épidémiologique et pathogénique de la myxomatose. Cas particulier des formes respiratoires. *Thèse de doctorat*. Université Claude Bernard. Lyon 1.

FENNER, F. (1983). The Florey Lecture. Biological control, as exemplified by smallpox eradication and myxomatosis. *Proceedings of the Royal Society of London*, **B218**, 259-85.

FENNER, F. AND MARSHALL, I. D. (1957). A comparison of the virulence of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *Journal of Hygiene*, **55**, 149-91.

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

FENNER, F. AND ROSS, J. (1994). *Myxomatosis*. In the European Rabbit. H. V. Thompson and G. M. King eds. Oxford University Press.

FENNER, F., DAY, M. F., AND WOODROOFE, G. M. (1952). The mechanism of the transmission by myxomatosis in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) by the mosquito *Aedes aegypti*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, **30**, 139-52.

FENNER, F., DAY, M. F., AND WOODROOFE, G. M. (1956). Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *Journal of Hygiene*, 284-303.

JOFFRE, F. (1978). Contribution à l'étude de la transmission de la myxomatose par les moustiques. *Thèse de doctorat vétérinaire*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

LAUNAY, H. (1982). Données préliminaires sur l'écologie de *Xenopsylla cunicularis* (Smit, Siphonaptera, Pulicidae), parasite du lapin de garenne. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* (Paris), **57** (2), 145-163.

LAUNAY, H., (1980) - Approche d'une prophylaxie de la Myxomatose : écologie des puces du lapin de garenne. ISSN 0151-4806, Bull.mens.Off.Nation. Chasse N° sp.Scién.Tech., .213-241.

LAUNAY, H., (1989).- Facteurs écologiques influençant la répartition et la dynamique des populations de *Xenopsylla cunicularis* Smit, 1957 (*Insecta* : *Siphonaptera*) puce inféodée au lapin de garenne *Oryctolagus cuniculus* L. *Vie Milieu*, 39,111-119.

LAUNAY, H., ET BEAUCOURNU, J. C., (1982) - Critères taxinomiques et essai de paléobiogéographie de 2 espèces jumelles, *Xenopsylla ramesis* Roth, 1904 et *X. cunicularis* Smit, 1957 (*Siph. Pulicidae*) - approche biométrique. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)*, 18, 43-54.

LAUNAY, H. (1988). Compte rendu d'activités dans le cadre des conventions de recherches ponctuelles n° 86/22 et 87/28. Elevage de *Spilopsyllus cuniculi* et lâchers sur le terrain. **19** p.

MARSHALL, I. D. AND FENNER, F. (1958). Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. V. Changes in the innate resistance of Australian wild rabbits exposed to myxomatosis. *Journal of Hygiene*, **56**, 288-302.

MARSHALL, I. D. AND DOUGLAS, G. W. (1961). 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. *Journal of Hygiene*, **59**, 117-22.

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

MUIRHEAD-THOMSON, R. C. (1956). The part played by woodland mosquitoes of the genus *Aedes* in the transmission of myxomatosis in England. *Journal of Hygiene*, **54**, 461-71.

PARER, I., CONOLLY, D., AND SOBEY, W. R. (1985). Myxomatosis : the effects of annual introductions of an immunizing strain and a highly virulent strain of myxoma virus into rabbit populations at Urana, N. S. W. *Australian Wildlife Research*, **12**, 407-23.

PAYMENT, P. ET TRUDEL, M. (1989). *Manuel de techniques virologiques*. Universités francophones. Les presses de l'Université du Québec, Canada, 350p.

REED, L.J. AND MUENCH, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end-joints. *American journal of hygiene*. **27**, 493-497.

RICHARD, Y. (1981). Les poxvirus. *Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et Médicales comparées*, **83**, 231-234.

ROSS, J., (1982) - Myxomatosis : the natural evolution of the disease. Symp. Zool. Soc. Lond. N° 50, 77-95.

SANARELLI, G. (1898). Das myxomatogene virus. Beitrag zum studium der krankheitsreger ausserhalb des sichtbaren. *Zentr. Bakteriol*, **23**, 865-875.

SAURAT, P., GILBERT, Y., ET GANIERE, J.P. (1978). Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **129**, 415-51.

SAURAT, P. (1986). Brevet d'invention n° 8600851. Procédé de vaccination de lapins sauvages (*Oryctolagus cuniculi*) contre la myxomatose à l'aide d'insectes vecteurs porteurs d'un virus vaccin non pathogène.

SEYMOUR, R. M. (1992). A study of the interaction of virulence, resistance and resource limitation in a model of myxomatosis mediated by the European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale). *Ecological Modelling*, **60**, 281-308.

SHEPHERD, R. C. H. AND EDMONDS, J. W. (1977). 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. *Journal of Hygiene*, **79**, 405-9.

SOBEY, W. R. (1969). Selection for resistance to myxomatosis in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Hygiene*, **67**, 743-54.

SOBEY, W.R. (1977). Myxomatosis : breeding large numbers of rabbit fleas *Spilopsyllus cuniculi* (Dale). *Journal of Hygiene, Camb.*, **78** (3), 349-353.

SOBEY, W. R., CONOLLY, D. AND WESTWOOD, N. (1983). Myxomatosis : a search for a strain of virus to immunize a wild population of rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Australian Wildlife Research*, **10**, 287-295.

TURELL, M.J. & al. (1991). Potential for mosquito transmission of attenuated strains of rift valley fever virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **44** (3), 278-282.

VALLIER, A., (1997) - Bio-écologie de 2 espèces de puces, *Spilopsyllus cuniculi* (Dale,1878) et *Xenopsylla cunicularis* (Smit,1957), ectoparasites spécifiques d'*Oryctolagus cuniculus* (Linné, 1758). Applications à la mise au point de leur élevage et d'une méthode de lâcher sur le terrain. Thèse Doctorat Aix-Marseille 1.

VAUGHAN, J.A. (1979). Laboratory breeding of the European rabbit fleas *Spilopsyllus cuniculi* (Dale). *Journal of Hygiene, Camb.*, **83** (3), 521-530.

WETHERALL, J.D., DAWN, E.C. AND KING, D.R. (1983). Humoral immunity to myxoma virus in wild rabbits. *Australian wildlife research*. **10**, 277-285.