

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 080 027**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : **18 00323**
⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 39/275 (2018.01), A 61 K 35/64, A 61 P 31/20**

①②

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ PROCÉDE DE LUTTE CONTRE LE VIRUS DE LA MYXOMATOSE.

②② Date de dépôt : 13.04.18.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 18.10.19 Bulletin 19/42.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 10.09.21 Bulletin 21/36.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : ANCLATRA AVEYRON — FR.

⑦② Inventeur(s) : COMMEYRAS AUGUSTE.

⑦③ Titulaire(s) : ANCLATRA AVEYRON.

⑦④ Mandataire(s) : ANCLATRA AVEYRON.

FR 3 080 027 - B1



PROCEDE DE LUTTE CONTRE LE VIRUS DE LA MYXOMATOSE

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé permettant de lutter contre la myxomatose qui frappe des populations de lapins de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) et d'accroître en conséquence la taille de ces populations, sans avoir à les capturer. Pour cela, ce procédé stabilise la présence d'une résistance épigénétique contre la myxomatose et en même temps immunise ces populations de lapins de garenne contre cette maladie.

HISTOIRE DE LA MYXOMATOSE EN EUROPE ET SES CONSEQUENCES

En 1952, pour contrôler une population de lapins de garenne, le Dr Armand Delille inocule le virus de la myxomatose de virulence I à quelques lapins de garenne de son parc. La maladie s'est ensuite transmise rapidement dans toute l'Europe de lapin à lapin *via* les insectes hématophages, les autres modes de transmission identifiés (contact ou respiratoire) étant certainement très rares dans le milieu naturel. Au cours de cette dispersion géographique, le virus a spontanément muté, et 5 à 10 ans plus tard on le retrouve avec ses variants de virulence plus faible II, III, IV et V distribués dans les milieux naturels selon une courbe en cloche centrée autour de la virulence III (FENNER, F. & ROSS, J. (1994). *Myxomatosis. In the European Rabbit. H. V. Thompson and G. M. King eds. Oxford University Press.*). Cette distribution (*cf.* Figure 1) étant ci-après appelé « virus sauvage».

En 2018, ce « virus sauvage » toujours présent dans le milieu naturel reste très pathogène et hautement transmissible. Pour preuve, sur une population naïve de lapins de garenne qui n'a donc jamais rencontré le virus sauvage de la myxomatose, 80 % de lapins meurent suite à l'introduction du virus sauvage de la myxomatose et les 20% restant très affaiblis deviennent dès lors des proies faciles. Victimes de cette maladie et de ses conséquences, les populations de lapins de garenne frôlent désormais l'extinction et même si après plusieurs années, elles ré-émergent à partir des quelques rares lapins survivants, le cycle recommence

et l'extinction devient la règle avec pour conséquences majeures :

- 1/ Depuis l'introduction de la myxomatose, ce gibier de base de la chasse populaire française est remplacé par du petit gibier d'élevage entraînant des perturbations génétiques importantes sur l'ensemble du petit gibier sauvage.
- 2/ Globalement l'espèce Lapin, fondamentale pour l'équilibre de la faune sauvage carnivore, est actuellement menacée ([http://uicn.fr/wpcontent/uploads/2009/02/Tableau Liste rouge Mammiferes de metropole.pdf](http://uicn.fr/wpcontent/uploads/2009/02/Tableau%20Liste%20rouge%20Mammiferes%20de%20metropole.pdf)) au point que les tentatives de réintroductions d'espèces en voie de disparition (e.g. lynx, aigles, loups, etc.), prédateurs naturels des lapins, sont en grandes difficultés par manque de proies naturelles et le report sur les animaux d'élevage des carnivores réintroduits pose de sérieux conflits sociologiques sans solution.
- 3/ Les élevages de lapins doivent prendre de grandes protections très onéreuses pour se protéger du « virus sauvage » de la myxomatose hautement transmissible.
- 4/ L'absence de ce gibier dans les forêts françaises fait que les hommes chasseurs et protecteurs de ces forêts sont remplacés à grand frais par les combattants du feu.
- 5/ Mais en même temps et paradoxalement, on voit émerger, dans quelques rares micro secteurs, des surpopulations de lapins de garenne, sans que l'on sache en expliquer les raisons et sans que l'on sache les contrôler, au point que les dégâts aux cultures que ces surpopulations occasionnent dans ces micro secteurs véhiculent l'image du lapin ravageur du continent Australien, bloquant toute forme de réflexion pour une gestion raisonnée de cette espèce.

Au final, le constat sévère actuel met en avant que l'introduction du virus de la myxomatose et donc de la myxomatose en Europe (1952) a conduit à une très forte raréfaction des lapins de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) ainsi qu'aux graves conséquences biologiques, agronomiques et sociologiques mentionnées ci-dessus.

Faute d'un traitement curatif contre la myxomatose, lequel aurait d'ailleurs été difficile voire impossible à mettre en place sur des populations sauvages de lapins de garenne, le seul moyen imaginable pour protéger des populations de lapins de garenne contre le virus de la myxomatose est la vaccination.

En conséquence, pour tenter de freiner l'appauvrissement de la biodiversité et les conséquences qui ont résulté de l'introduction du virus de la myxomatose, différents moyens de vaccination ont été développés. Par exemple, il a été envisagé d'effectuer une vaccination *via* le virus atténué du fibrome de Shope, seulement celle-ci a rapidement été jugée d'une efficacité insuffisante. Puis, un premier vaccin stable obtenu par atténuation du virus sauvage de la myxomatose a été obtenu en 1970 par René MARAL (Brevet R. MARAL n°INPI 70.17836), lequel a ensuite été amélioré en 1976 par Pierre SAURAT et Yves GILBERT (Brevet P. SAURAT & Y.GILBERT n°INPI 76.24243) avec la participation des associations ANCLATRA et BIO ESPACE. Ce vaccin optimisé, dénommé SG33 (de SAURAT-GILBERT 33°C), faiblement pathogène, stable et avec un bon pouvoir immunisant pour les animaux d'élevage paraissait *a priori* avoir toutes les propriétés requises pour protéger les populations de lapins de garenne sauvages contre le virus de la myxomatose. Son utilisation ne paraissant pas devoir poser de problèmes réglementaires, celle-ci a reçu une Autorisation de Mise sur le Marché (N° AMM : FR/V/29294594/2000) et la commercialisation du SG33 fut lancée.

Seulement, l'utilisation/l'administration de ce vaccin SG33 que ce soit par aérosol, lancette intradermique ou *via* une puce hématophage spécifique des lapins de garenne (*Spilopsyllus cuniculi*) a aggravé considérablement les effets négatifs de cette maladie et fait sévèrement chuter la taille des populations de lapins de garenne (<http://www.bioespace.fr/5-luttecontrelamyxo.pdf>). Sans comprendre les raisons de cet échec et enfermés inconsciemment dans la logique thérapeutique officielle, pour chercher à lutter contre la myxomatose il a alors été tenté :

- 1/ de réduire le nombre d'insectes vecteurs de cette maladie en pulvérisant un insecticide du groupe carbamate en poudre dans les terriers de lapins ;
- 2/ et en parallèle en poudrant du même insecticide les lapins de repeuplement lâchés dans des terriers actifs.

Les résultats tout aussi incompréhensibles ont de nouveau été négatifs et aucune augmentation de la population de lapins de garenne n'a été observée. Finalement, le virus sauvage de la myxomatose est présent, voire en expansion et aucune solution ne semble venir à bout du désastre écologique qu'il représente.

DESCRIPTION DE L'INVENTION & DEFINITIONS

L'un des aspects de l'invention est de fournir précisément ce moyen de lutte contre le virus sauvage de la myxomatose robuste et efficace tant attendu sur les milieux naturels demandeurs pour inverser le processus d'appauvrissement des populations de lapins de garenne en cours et de résorber les conséquences de leur disparition. Avantagement, l'invention propose également un moyen de gestion des micro surpopulations locales et permet globalement de créer un climat favorable à la gestion des populations de lapins de garenne offrant à cette espèce l'opportunité d'enfin jouer les rôles sociaux là où elle est attendue.

Par avance, il est précisé que tous les termes permettant de définir l'invention s'entendent dans leur sens le plus commun et le cas échéant des précisions sont apportées dans le présent texte.

Sous son aspect le plus général, l'objet de l'invention concerne une composition comprenant au moins une puce vivante spécifique des lapins de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) porteuse d'un virus de la myxomatose de virulence IV (BE4) pour son utilisation dans la vaccination d'une population desdits lapins de garenne sans avoir à les capturer et le maintien au sein de ladite population d'une résistance épigénétique à la myxomatose pour la protéger des attaques du virus sauvage de la myxomatose.

La présente invention permet en effet grâce à la circulation d'un virus de la myxomatose de virulence IV (BE4) dans des populations de lapins de garenne, transmise *via* une des puces vivantes spécifiques de ces lapins (*e.g. Xenopsylla cunicularis*), de maintenir la présence au sein de ces populations de lapins de garenne d'une résistance épigénétique contre la myxomatose et en même temps de les immuniser contre cette maladie ce qui les protège

totallement des attaques subséquentes du virus sauvage de la myxomatose. Avantageusement, la présente invention permet donc de protéger la population de lapins de garenne d'intérêt sans avoir à les capturer. Autrement dit, la population de lapins de garenne reste libre et à l'état sauvage et l'intervention de l'Homme consiste seulement à réaliser des lâchers de puces selon la composition décrite ci-dessus. Les puces vivantes et porteuses du virus de la myxomatose vont alors au gré de leur déplacement et de leur appétit évoluer dans cet environnement, identifier les lapins de garenne et se nourrir de leur sang, leur transmettant ainsi le virus de la myxomatose qui permet de les protéger. Aussi, ce moyen naturel qui tire avantage du système tripartite « hôte/pathogène/vecteur » (= « lapin de garenne /virus de la myxomatose / puce spécifique du lapin ») permet *in fine*, de manière simple, efficace et de faible coût, à ces populations de se développer ce qui résout de nombreux aspects biologiques, agronomiques et sociologiques en souffrance liés aux territoires demandeurs.

1/ LES PUCES

Par « puce vivante spécifique des lapins de garenne », on entend l'une des 4 espèces de puces hématophages se nourrissant quasi exclusivement sur des lapins de garenne (*Launay H. 1980 - Approche d'une prophylaxie de la myxomatose : écologie des puces du lapin de garenne. Bulletin mensuel de l'ONC, n° sp. Scien. Techn., décembre, 213-241*). Il s'agit des espèces :

Spilopsyllus cuniculi,

Xenopsylla cunicularis,

Odontopsyllus quirosi episcopalis , et

Caenopsylla laptevi relict

Leur présence est très bien supportée par les lapins et elles n'affectent pas le développement de leurs populations.

Par « puce vivante [...] porteuse d'un virus de la myxomatose », on entend une puce vectrice du virus de la myxomatose, laquelle lors de son repas sanguin sur un myxome d'un lapin infecté transmet le virus dudit myxome à un lapin sain, lequel se retrouve infecté par le même virus de la myxomatose.

2/ LE VIRUS

Par « virus de la myxomatose de virulence IV (BE4) », on entend un virus de la myxomatose dont la virulence appréciée par l'échelle de FENNER est à un stade IV, lequel est capable d'infecter les lapins de garenne, lesquels développent dès lors une myxomatose (FENNER, F. & 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.*). Cette échelle de virulence établie par FENNER utilise des lapins d'élevages naïfs, c'est-à-dire dont les ascendants n'ont jamais rencontré la myxomatose, pour juger de la virulence d'un virus selon le tableau ci-après.

Lapin d'élevage naïf (n'ayant jamais rencontré la myxomatose)					
Taux de mortalité (%)	>99	95-99	70-95	50-70	<50
Temps moyen de survie (jours)	<13	14-16	17-28	29-50	>50
Définition de l'échelle de virulence	I	II	III	IV	V

Tableau 1. Echelle de virulence des virus de la myxomatose établie par FENNER (FENNER, F. & MARSHALL, I. D. 1957) définie par le pourcentage de mortalité et le temps de survie qu'ils provoquent sur des lapins d'élevages naïfs c'est-à-dire dont les ascendants n'ont jamais rencontré la myxomatose.

3/ RESISTANCE EPIGENETIQUE DES LAPINS DE GARENNE

Par « résistance épigénétique à la myxomatose », on entend la faculté que possèdent les lapins de garenne à devenir, au contact du virus de la myxomatose, résistants à ce même virus. L'apparition de cette résistance est d'ailleurs bien documentée (Sobey W R et al *The Journal of hygiene* (1970), 68(1), 137-49, Ross J et al *The Journal of Hyg* 1984, 92 :255-261 ; Sobey W R *Aust Wildl Res* 1986, 13:177-187 ; Silvers, L et al *Virology* (2006), 348(1), 72-83 ; Kerr, P. J et al *Virology* (2004), 324(1), 117-128). Dans l'ensemble de ces travaux les auteurs

parlent de co-évolution ou course aux armements entre l'hôte et le pathogène et il est ici montré que cette résistance liée à l'environnement est réversible (exemple 9). Elle est donc « épigénétique », mais l'acquisition de cette résistance épigénétique en moyenne sur 6 générations sous la pression myxomateuse (cf. Tableau 2) est héritable pendant deux générations, voire trois, lesquelles se retrouvent à l'abri d'une telle pression. En effet, cette « résistance épigénétique » a été observée dans les milieux naturels dès la cinquième année après l'introduction de la myxomatose en même temps que la mutation du virus. Elle est visualisée par l'évolution du comportement de jeunes lapins séronégatifs issus de populations soumises à un nombre croissant d'épizootie de myxomatose face à un virus d'épreuve de virulence III (FENNER, F. *et al.* (1994). *Myxomatosis. In the European Rabbit. H.V.Thompson and G. M. King eds. Oxford University Press*).

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

Tableau 2. Evolution du comportement de jeunes lapins séronégatifs issus de populations ayant subi un nombre croissant d'épizooties de myxomatose sauvage, éprouvés par un virus de virulence III.

Faute d'échelle quantitative pour caractériser cette « résistance épigénétique » en fonction de la virulence du virus présent dans les populations de lapins, on ne peut aujourd'hui que parler de « présence » ou « d'absence » de cette résistance épigénétique. Aussi, par

l'expression « maintien au sein de ladite population d'une résistance épigénétique à la myxomatose », on entend la caractéristique que possède l'objet de l'invention à faire apparaître et à maintenir présente cette résistance épigénétique contre le virus de la myxomatose au sein d'une population de lapins de garenne, ce qui *de facto* la protège de ce virus.

Alternativement et au vu des définitions ci-dessus, l'objet de l'invention concerne une composition comprenant au moins une puce vivante spécifique des lapins de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) porteuse d'un virus de la myxomatose de virulence IV (BE4) pour son utilisation dans la vaccination d'une population desdits lapins de garenne libre et à l'état sauvage, et qui assure le maintien au sein de ladite population d'une résistance épigénétique à la myxomatose et en même temps assure l'immunisation de ladite population et ainsi la protège totalement contre le virus sauvage,

Sous un autre aspect plus précis, l'objet de l'invention concerne l'une des compositions précédemment décrites, dans laquelle ladite au moins une puce vivante porte dans son rostre un nombre de particules virales dudit virus de la myxomatose de virulence IV (BE4) compris de 1 à 10, et plus particulièrement 5. Cela signifie par conséquent que le nombre de particules virales dans le rostre de la puce peut-être 1 ou 2 ou 3 ou 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 ou 10. Et par « particules virales », on entend les entités biologiques du virus de la myxomatose sous formes virales libres, extracellulaires et capables d'infecter un nouvel hôte.

Un autre des aspects de l'invention concerne l'une des compositions précédemment décrites, dans laquelle ladite au moins une puce vivante est choisie parmi le groupe constitué des espèces :

- *Spilopsyllus cuniculi*,
- *Xenopsylla cunicularis*,
- *Odontopsyllus quirosi episcopalis*,
- *Caenopsylla laptevi relict*

et est plus particulièrement la puce *Xenopsylla cunicularis*.

Par conséquent, un mode de réalisation préféré de l'invention concerne l'une des compositions précédemment décrites, dans laquelle ladite au moins une puce vivante est la puce *Xenopsylla cunicularis*.

Un autre des aspects de l'invention concerne l'une des compositions précédemment décrites, dans laquelle la concentration de ladite au moins une puce vivante est de 10 puces par hectare, ladite composition étant utilisée 5 fois par an pendant la période de reproduction desdits lapins de garenne.

Avantageusement, la distribution particulière et régulière (5 fois/an/10puces chargées de BE4/ha) du virus de virulence IV (BE4) sur une population de lapins de garenne sauvages favorise le développement de ladite population du fait :

- 1/ qu'elle maintient en permanence la présence de la résistance épigénétique dans ladite population ; et
- 2/ qu'en même temps on immunise totalement les lapins de garenne de ladite population contre le virus sauvage de la myxomatose sans aucune mortalité.

Aussi, un des nombreux aspects de l'invention concerne l'une des compositions précédemment décrites pour son utilisation dans l'accroissement d'une population de lapins de garenne sans avoir à les capturer. Pour cette raison, la présente invention a des conséquences multiples. Elle permet notamment :

- 1/ sur les territoires traités d'accroître les populations de lapins de garenne sans aucun signe apparent de myxomatose ;
- 2/ de limiter les lâchers de gibiers de tir, la population de lapins pouvant devenir suffisante pour satisfaire les prélèvements souhaités par les chasseurs et les prédateurs ;
- 3/ de retrouver sur les territoires demandeurs, un équilibre proies/prédateurs au bénéfice de la biodiversité ;
- 4/ de diminuer la menace que fait peser le « virus sauvage » de la myxomatose sur les élevages par la diminution de la taille du réservoir du « virus sauvage » ;
- 5/ aux hommes de réoccuper les espaces naturels et de minimiser le coût des moyens de lutte contre les incendies ; et

6/ au lapin de garenne sauvage de jouer les rôles biologiques, agronomiques et sociologiques là où il est attendu tout en étant facilement gérable.

Bien que l'invention vise principalement à protéger les populations de lapins de garennes afin d'en accroître leur taille (nombre d'individus), la présente invention permet surtout de fournir un moyen de réguler (diminuer ou augmenter) la taille de ces populations.

Sous un aspect particulier de l'invention, celle-ci concerne par conséquent l'utilisation d'un insecticide ciblant la population de puces vivantes spécifiques du lapin de garenne pour en limiter la taille et pour supprimer la résistance épigénétique à la myxomatose au sein d'une population de lapins de garenne, la rendant très sensible aux attaques du virus sauvage de la myxomatose.

Par « pour en limiter la taille », on entend le fait de diminuer le nombre d'individus de puce au sein de la population de puces vivantes spécifiques du lapin de garenne par l'action de l'insecticide qui tue lesdites puces.

Sous un autre aspect particulier de l'invention, celle-ci concerne l'utilisation du vaccin SG33 sur une population de lapins de garenne pour supprimer la résistance épigénétique à la myxomatose au sein de ladite population desdits lapins de garenne sans avoir à les capturer, les rendant très sensibles aux attaques de la myxomatose sauvage.

Par « la rendant très sensible aux attaques du virus sauvage de la myxomatose », on entend le fait que la population de lapins de garenne, faute d'une résistance au virus sauvage de la myxomatose, ces derniers en cas d'infection par ledit virus développent une myxomatose sévère pouvant aller jusqu'au décès de l'animal. Par conséquent, l'utilisation d'insecticide pour tuer les puces vectrices du virus et/ou l'utilisation du vaccin SG33 qui supprime la résistance épigénétique de la population de lapins de garenne permet à l'Homme de gérer à la baisse la taille (nombre d'individus) de la population de lapins de garenne

LEGENDE DES FIGURES**Figure 1**

Schéma illustrant la distribution des virus de la myxomatose dans les milieux naturels, 5 ans au moins, après l'introduction du virus de la myxomatose de virulence I.

Cette distribution est la somme de deux courbes :

1. la première est la décroissance de la concentration virale dans les myxomes générés par les virus de virulence I à V ; et
2. la seconde est celle de l'augmentation du temps de survie des animaux portant les virus de virulence I à V.

Autrement dit, les myxomes provoqués par un virus de virulence I sont très concentrés en virus et donc facilement transmissibles, mais comme le temps de survie du lapin est très court la transmissibilité est très faible. Inversement les myxomes provoqués par le virus de virulence V sont moins concentrés et quasiment non transmissibles malgré la très longue survie jusqu'à la guérison des lapins.

Figure 2

Photographie d'un rostre de la puce *Spilopsyllus cuniculi*.

Figure 3

Deux photographies représentant chacune un type de territoire du Nord (A) et du Sud (B) de la France sur lequel des puces *X.cunicularis* chargées en virus BE4 ont été lâchés pendant plus de 3 ans, 5 fois/an entre mars et juin à raison de 10 puces/hectare.

EXEMPLES

Exemple 1

Cet exemple illustre l'impossibilité de vacciner les lapins sauvages en leur faisant respirer un aérosol portant le vaccin (SG33).

Sur un territoire non chassé de la commune de Pennautier (CP 11610 Fr) en juin 1978, 180 lapins ont été repris. Après marquage et prélèvement sanguin tous les animaux ont été immédiatement relâchés dans leurs propres terriers. L'analyse sérologique ultérieure (recherche d'immunoglobuline G [IgG]) réalisée par le Pr SAURAT à l'ENV Toulouse a permis de montrer que 71 d'entre eux (39%) étaient séronégatifs. 15 jours après 5 cm³ de vaccin SG33 (titré à 10⁵ dose infectante par cm³, correspondant à une énorme surdose/lapin) ont été pulvérisés en aérosol dans chaque terrier ayant précédemment produit des lapins. Un mois plus tard, une recapture a été réalisée dans le même secteur. Au cours de cette recapture 139 lapins ont été repris et parmi eux 28 qui 45 jours plutôt étaient séronégatifs. L'analyse sérologique (Pr Saurat à l'ENV Toulouse) de ces 28 lapins a montré que seuls 3 d'entre eux avaient été séroconvertis (= présence d'IgG).

Exemple 2

Cet exemple illustre une condition de chargement du rostre des puces et l'utilisation des puces chargées pour la vaccination des lapins sauvages.

Les conditions pour charger le rostre de ces puces en vaccin SG33 ont été le trempage des insectes dans une solution contenant des concentrations de plus en plus élevées de SG33 obtenues par ultracentrifugation (par exemple 10^{8,3} DI₅₀/mL), solution dans laquelle ont été ajouté des ingrédients connus comme porteurs d'oxygène (Brevet ANCLATRA n° INPI 86 00851). Le nombre de puces chargées croît avec la concentration virale, mais celle-ci nécessite l'utilisation de matériel de laboratoire inadapté pour une exploitation à grande échelle. Ces puces chargées (3 sur 4) en SG33 ont été lâchées sur le territoire de la commune de Pennautier (CP 11610) à raison de 20 puces par lapins supposés présents sur ces territoires et ceci 5 fois par an pendant 4 ans. Une séroconversion (présence d'IgG) des jeunes lapins a été constatée (32% *via* capture et analyse des anticorps par le Pr SAURAT à

l'ENV Toulouse). Aucune augmentation de la population des lapins n'a néanmoins été constatée et les cas de myxomatose visuellement rencontrés sur ces territoires n'ont pas disparu, au contraire.

Exemple 3

Cet exemple illustre la vaccination intradermique des lapins sauvages par le vaccin SG33.

Parallèlement aux travaux précédents des chasseurs des départements suivants ce sont mobilisés : Vaucluse, Ardèche, Drome, Gard, Hérault, Marne, Yonne, Aube, Landes, Alpes de Haute Provence, Hautes Alpes, Finistère, Morbihan, Calvados, Pas de Calais, Charente, Bouches du Rhône, Var.

Dans le seul département de l'Hérault ce sont les chasseurs des communes suivantes : Prades-le-Lez, Grabels, St Mathieu de Trévières, Clapiers, Les Matelles, Viols le fort, St Martin de Londres, Teyran, St Christol, Mauguio, Ganges, Laroque, St Bazile du Putois, Béziers, Cournontéral, St Georges d'Orques) qui ont vacciné les lapins sauvages avec le SG33 (fournit par le Pr SAURAT de l'ENV Toulouse à la concentration de 10^5 DI₅₀/mL) par voie intradermique (0,1 mL de la solution initiale diluée au millième *via* seringue ou dermojet ou en plaçant une goutte de la solution concentrée de SG33 sur la peau du lapin et en scarifiant ladite peau par une lancette). Ici, l'énorme difficulté rencontrée fût la capture des lapins. Les chasseurs ont néanmoins poursuivi cet effort pendant 10 ans (1975-1985). Force a été de constater que dans ces territoires, aucune augmentation de la population de lapins n'a été constatée par ces chasseurs. Au contraire les cas visuels de myxomatose ont paru de plus en plus nombreux. Au dire des chasseurs « plus on vaccine moins ça marche ».

Exemple 4

Cet exemple illustre une condition utilisée pour diminuer la population d'insectes vecteurs de la myxomatose chez les lapins sauvages.

Sur les territoires de chasse (des communes et départements précédemment listés) les chasseurs ont pulvérisé un insecticide en poudre (de type carbamate) dans les terriers de lapins pendant 5 ans (1987-1992). En complément les lapins de repeuplement ont été lâchés dans des terriers actifs enduits de la même poudre insecticide.

Les résultats ont été négatifs. Aucune augmentation de la population de lapins n'a été observée. Visuellement la myxomatose sauvage a toujours été présente, voire en augmentation, dans ces différents territoires. Les comptages, toujours difficiles en milieu naturel, ont néanmoins été cohérents.

Exemple 5

Cet exemple illustre la recherche d'un virus de virulence IV :

1. A partir de la population de lapins de garenne sauvages de l'île de la Grande Motte (34280) soumise depuis de longues années à la pression myxomateuse, entre l'Étang de l'Or et le Canal du Midi, 5 prélèvements ont été réalisés sur des jeunes lapins portant des myxomes plats non exsudatifs d'environ 1 cm² au bas d'une oreille afin d'isoler un virus de la myxomatose.
2. L'un de ces prélèvements broyé et dilué au millième a été inoculé à 10 lapins domestiques naïfs sans IgG. 4 d'entre eux sont morts d'une myxomatose caractérisée entre 25 et 30 jours. Les 6 autres ont survécu après 45 jours. Le virus isolé au point 1. a par conséquent été considéré comme caractéristique de la virulence IV.
3. Une culture cellulaire de rein de lapin a été infectée par ce même virus dilué au 10 000^{ème} et après 4 jours un îlot cellulaire a été prélevé et multiplié sur RK13 (lignée cellulaire de cellule épithéliale de rein de lapin ; ATCC® CCL-37™).

4. La stabilité de la souche obtenue a été testée par passage en série de lapins domestiques naïfs sans IgG à lapins domestiques naïfs sans IgG :
- le premier passage a consisté à inoculer par voie intradermique 0,1 mL d'une dilution au millièbre d'une culture sur RK13 à 10^5 DI₅₀/mL sur deux de ces lapins domestiques naïfs sans IgG ;
 - le deuxième passage a consisté à inoculer par voie intradermique 0,1 mL d'une dilution au millièbre du broyat des deux nodules vaccinaux récoltés sur les deux lapins du premier passage sur deux autres lapins domestiques naïfs sans IgG;
 - le troisième passage a consisté à inoculer par voie intradermique 0,1 mL d'une dilution au millièbre du broyat du nodule vaccinal récolté sur les lapins du deuxième passage sur deux nouveaux lapins domestiques naïfs sans IgG;
etc.

Au huitième passage, les suites de l'inoculation ont été identiques à celles après le deuxième passage. L'isolat obtenu et ainsi purifié à partir du point 1 a été nommé BE4.

5. Pour mesurer la concentration virale provoquée par l'inoculation de BE4 sur un lapin domestique naïf sans IgG, 13 jours après l'inoculation du virus BE4 il a été prélevé le premier millimètre d'épaisseur du myxome. Après broyage et dilutions successives, il a alors été montré que le nombre de particules virales par cm³ est égal à $10^{8,2}$ DI₅₀/mL.

Exemple 6

Cet exemple illustre la recherche de virus BE4 sur les différentes parties du corps des puces ayant pris un repas sanguin sur un myxome provoqué par l'inoculation intradermique de 100 DI₅₀/mL de BE4 à un lapin domestique naïf sans IgG.

- 13 jours après ladite inoculation, les puces juvéniles (*Xenopsylla cunicularis*) ont été disposées dans un tube de verre dont une extrémité était fermée par un film plastique étirable et cette extrémité a été disposée sur le myxome afin que les puces

juvéniles puissent prendre un repas sanguin sur un myxome provoqué par le virus BE4.

2. Toutes les puces ont fixées rapidement leur rostre dans le myxome pour prendre leur repas sanguin puis se sont libérées en environ 2 à 4 minutes.
3. 24 heures après leur repas sanguin les puces ont été congelées et ensuite utilisées de la façon suivante :
 - a. 120 puces *Xenopsylla cucicularis* après un repas sanguin sur un myxome provoqué par le virus BE4 ont été regroupées en 6 lots de 20 puces ;
 - b. leur rostre a été séparé de leur corps et les deux parties ont constitué 6 groupes de 20 rostres et 6 groupes de 20 corps ;
 - c. chaque groupe a été broyé et les ADN viraux ont été extraits *via* les tampons de lyse du kit *Qiagen® DNeasy kit* puis purifiés sur colonnes *Qiagen®* ; et
 - d. en parallèle l'ADN viral du virus BE4 a été extrait de la même façon.

4. A partir de l'ADN viral du virus BE4 une courbe étalon a été créée (de 10^6 copies à 1 copie grâce à une mesure de la densité optique à 260 nm de l'ADN viral au Nano Drop®) et dans un deuxième temps la quantité d'ADN viral dans les échantillons issus des puces *Xenopsylla cucicularis* a été quantifiée. Pour cela il a été amplifié une partie du gène m005 situé dans les ITRs (*Inverted Terminal Repeat*) de droite et de gauche en utilisant la paire de primers suivante :

- a. *Forward primer* = 5'-GGATACGTTACGAGAGTTGG-3'
- b. *Reverse primer* = 5'-CATTGAAGGACGTTAAACCC-3'.

Pour connaître le nombre de copies de virus par groupe d'échantillon, le résultat des q-PCR (*quantitative – Polymerase Chain Reaction*) des 12 différents échantillons (6 groupes de 20 rostres et 6 groupes de 20 corps) ont été placés sur la courbe étalon. Ceci a ainsi permis de montrer :

- a. une moyenne de cent copies de virus par lots de 20 rostres, soit une moyenne de 5 ± 1 copie du virus BE4 par rostre ; et
- b. une absence du virus BE4 dans le reste des corps des puces.

Finalement, ces résultats démontrent qu'en prenant un repas sanguin sur un myxome provoqué par le virus BE4, les puces *Xenopsylla cucicularis* chargent leur rostre de 5 ± 1

particules virales. Par ailleurs, puisqu'aucun virus n'a été découvert dans le système digestif de ces puces, ceci montre que ce virus ne peut pas se multiplier dans le corps de l'insecte, lequel est donc un vecteur strictement mécanique.

Exemple 7

Cet exemple illustre la transmission du virus BE4 par les puces sur lapins domestiques naïfs sans IgG.

A partir d'un lot de puces *Xenopsylla cunicularis* ayant pris un repas sanguin sur un myxome provoqué par le virus BE4 comme décrit dans l'exemple 6, il a été déposé 2 puces par lapins domestiques sur un lot de 12 lapins domestiques naïfs (absence d'IgG). Tous les lapins ont développé une myxomatose caractéristique d'un virus de virulence 4 :

- a. 5/12 sont morts entre 28 et 40 jours ; et
- b. les 7 autres ont survécu.

Les prélèvements sanguins sur les survivants ont mis en évidence la présence d'anticorps IgG neutralisant ce qui confirme clairement :

- a. la transmission de la myxomatose par les puces *Xenopsylla cunicularis* ; et
- b. la transmissibilité du virus BE4 par ces mêmes insectes.

Exemple 8

Cet exemple illustre la transmission du virus BE4 par les puces sur lapins résistants.

Une population de lapins sur l'aérodrome de Rodez (CP 12000), était soumise à la pression myxomateuse depuis de très nombreuses années et devait avoir acquis ladite « résistance épigénétique ». Après avoir obtenu des autorités de l'aéroport les autorisations de captures, il a été inoculé le virus BE4 à la seringue (1000 DI₅₀/mL) à 6 lapins séronégatifs (absence d'IgG) issus de cette population. Par la suite, il a été observé une séroconversion totale (présence d'IgG) sans aucune mortalité (due à la résistance épigénétique) et bien qu'un seul des 6 lapins ait développé une myxomatose légère, celui-ci a survécu après 45 jours.

Pour répliquer ce résultat sur un lot plus important, il a été capturé sur le même aérodrome de Rodez 95 lapins sauvages en privilégiant la sélection de jeunes lapereaux. Après marquage par numérotation à l'oreille et prélèvement sanguin, cette population de 95 lapins

a ensuite été installée dans le sous-sol du département chimie Université Montpellier 2 (1 200 m²). L'analyse sérologique des échantillons de sang prélevés a montré que 52 lapins étaient séronégatifs et donc sans IgG.

Après 3 mois de stabulation dans ce même lieu (pour permettre aux anticorps maternels de ne plus jouer de rôle) il a de nouveau été prélevé du sang sur l'ensemble de ces lapins. Aucune séroconversion spontanée n'a été constatée. Il a alors été introduit dans ce même lieu 1 000 puces *Spilopsyllus cuniculi* ayant pris un repas sanguin sur un myxome provoqué par le virus BE4. Suite à cela, la population de lapins a été suivie visuellement pendant 45 jours sans que l'on détecte de signes de myxomatose, et après 45 jours de nouveaux prélèvements sanguins ont été réalisés pour une nouvelle analyse sérologique. Au cours de cette recapture pour réaliser les prélèvements, il a toutefois été découvert 2 cadavres de lapins portant le marquage des séroconvertis initiaux. Les résultats de cette dernière analyse sérologique ont montré que la totalité des lapins 93/95 était séroconvertis (présence d'IgG) alors qu'aucune marque visuelle de myxomatose n'a été découverte.

Trois des jeunes lapins parmi les derniers séroconvertis ont alors été soumis à l'épreuve d'un virus sauvage de la myxomatose (prélevé sur un lapin mourant rapporté par un chasseur). Aucun de ces 3 lapins n'a présenté de trace de myxomatose après 30 jours. Par contre un lapin domestique naïf sans IgG de référence soumis à la même épreuve est mort après 14 jours d'une myxomatose sévère. Le virus de virulence IV (BE4) permet donc d'immuniser les lapins du virus sauvage de la myxomatose et de les protéger, contrairement aux lapins non résistants.

Exemple 9

Cet exemple illustre la réversibilité de la résistance épigénétique.

Les chasseurs partenaires de ces recherches, considérant que ces lapins « Aérodrome de Rodez » (cf. Exemple 8) étaient d'une « race résistante », les ont récupérés et les ont élevés (commune de Margon, CP 34320) à l'abri de la myxomatose pendant plusieurs années en vue du repeuplement de leur chasse. Des lapereaux sont régulièrement nés de ce lot, et chaque année il a été décidé que 12 de ces jeunes lapins âgés de 6 mois seraient soumis à

l'épreuve du virus BE4 porté par la puce *Spilopsyllus cuniculi* (5 puces/lapin) et qu'un suivi serait effectué :

- a. première génération : les 12 lapins séronégatifs (absence d'IgG) ont tous été séroconvertis (présence d'IgG) sans présenter de signe de myxomatose ;
- b. deuxième génération : les 12 lapins séronégatifs (absence d'IgG) ont tous été séroconvertis (présence d'IgG) avec de légers signes de myxomatose (épaississement des paupières) ; et
- c. troisième génération : les 12 lapins séronégatifs (absence d'IgG) ont tous été séroconvertis (présence d'IgG) en présentant des signes de myxomatose :
 - i. 1 est mort à 35 jours ;
 - ii. 9 ont survécu à 45 jours après des virémies légères aux yeux et à l'anus ; et
 - iii. 2 n'ont présenté que de légers épaississements des paupières.

Ces derniers résultats démontrent clairement l'existence d'une résistance héritable sur deux voire trois générations, mais que cette résistance est réversible (augmentation des symptômes), ce qui est la marque d'une résistance épigénétique.

Exemple 10

Illustration de l'inoculation du virus BE4 et le maintien de la résistance épigénétique des lapins.

Sur un territoire de la commune de Creissel (CP 12100) où il existait quelques lots de lapins avec une myxomatose régulièrement présente des puces *X.cunicularis* chargées en virus BE4 ont été lâchés pendant plus de 3 ans, 5 fois/an entre mars et juin à raison de 10 puces/hectare. Après une année les cas de myxomatose ont disparu, et la population de lapins a progressé. La 3ème année les chasseurs ont constaté avec l'aide du Dr Brian COOKE (chercheur Australien spécialiste de la lutte contre les lapins de garenne en Australie) la présence sur ces territoires d'environ 10 lapins par hectare.

Par ailleurs, un prélèvement de 12 lapins séronégatifs (absence d'IgG) a été réalisé. Ces 12 lapins ont été éprouvés au virus BE4 transmis par *Xenopsylla cunicularis*. Les séroconversions ont été totales (présence d'IgG) sans aucune virémie. 30 jours après deux de ces lapins éprouvés avec un virus sauvage n'ont présentés aucune réaction. Au contraire la même

épreuve sur un lapin domestique naïf a conduit au décès de cet animal en 28 jours *via* une myxomatose sévère.

Exemple 11

Cet exemple illustre l'acquisition de la résistance par l'inoculation du virus BE4.

Sur un autre territoire (commune de Prémery CP 58700) où la myxomatose n'était plus présente depuis environ 3 ans la population de lapins s'était légèrement reconstituée. Son traitement par des puces *X.cunicularis* chargées en virus BE4 5 fois/an entre mars et juin à raison de 10 puces/hectare a provoqué la première année l'apparition de quelques cas de myxomatose visuellement observés. La 3^{ème} année seuls de très rares cas de myxomatose non mortels ont été observés. La population des lapins a régulièrement augmenté pour retrouver dès la 4^{ème} année la situation décrite dans l'exemple 10.

La 4^{ème} année sur ce territoire un prélèvement et des épreuves ont été réalisés comme dans l'exemple précédent. Des résultats identiques ont été observés, ce qui démontre que sous la pression du virus de virulence IV (BE4) la résistance épigénétique devient « présente » et participe à la protection totale des populations de lapins contre la myxomatose sauvage.

Aussi, à partir des exemples 10 et 11 ci-dessus on peut conclure que le virus de virulence IV (BE4) exerce sur les populations de lapins de garenne une pression suffisante pour leur permettre d'acquérir une résistance épigénétique à la myxomatose et en même temps les immunise ce qui les protège totalement des attaques subséquentes du virus sauvage.

Ces exemples prouvent également que l'environnement probablement susceptible de modifier réversiblement la conformation de tout ou partie du génome de l'hôte le rendant capable d'adapter sa réponse à la virulence de l'agresseur (épigénétisme) est un processus finement équilibré très sensible avec un temps de réponse qui se chiffre en quelques mois.

Exemple 12

Cet exemple illustre le fait que l'utilisation de la puce *Xenopsylla cunicularis* comme insecte auxiliaire n'est pas un danger pour l'environnement en France.

Avec le soutien de nombreuses Fédérations de Chasseurs et associations, des parcs de petites dimensions ($\pm 300 \text{ m}^2$) ont été créés dans les diverses régions françaises (Sud, Nord, Est, Ouest). Une dizaine de lapins ont été lâchés dans chacun de ces parcs, et après leur acclimatation 900 puces *Xenopsylla cunicularis* ont été introduites dans chaque parc. Ces parcs ont été attentivement analysés en termes de nombre de puces présentes durant 18 mois.

Il a été montré que dans les parcs hors de la zone Sud d'implantation naturelle de *Xenopsylla cunicularis* l'indice de reproduction de *Xenopsylla cunicularis* est nettement inférieur à 1. Ceci indique clairement que lorsque *Xenopsylla cunicularis* sera utilisée pour transmettre le virus BE4 elle ne sera pas un insecte invasif et ne présentera pas de danger pour l'environnement (Anne DARRIES-VALLIER et al *International Journal of Insect Science* (2013), 5:21-34.).

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant au moins une puce vivante spécifique des lapins de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) porteuse d'un virus de la myxomatose de virulence 4 (BE4) pour son utilisation dans la vaccination d'une population desdits lapins de garenne sans avoir à les capturer et le maintien au sein de ladite population d'une résistance épigénétique à la myxomatose à un niveau suffisant pour la protéger des attaques du virus sauvage de la myxomatose, ledit virus de la myxomatose de virulence 4 (BE4) entraînant une mortalité de 40% avec un temps de survie de 25 à 30 jours et provoquant des myxomes lorsqu'il est inoculé à une population de lapins domestiques naïfs.

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle ladite au moins une puce vivante porte dans son rostre un nombre de particules virales dudit virus de la myxomatose de virulence 4 (BE4) compris de 1 à 10, et plus particulièrement 5.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle ladite au moins une puce vivante est choisie parmi le groupe constitué des espèces :
 - *Spilopsyllus cuniculi*,
 - *Xenopsylla cunicularis*,
 - *Odontopsyllus quirosi episcopalis*,
 - *Caenopsylla laptevi relict*et est plus particulièrement la puce *Xenopsylla cunicularis*.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle la concentration de ladite au moins une puce vivante est de 10 puces par hectare, ladite composition étant utilisée 5 fois par an pendant la période de reproduction desdits lapins de garenne.

(1/2)

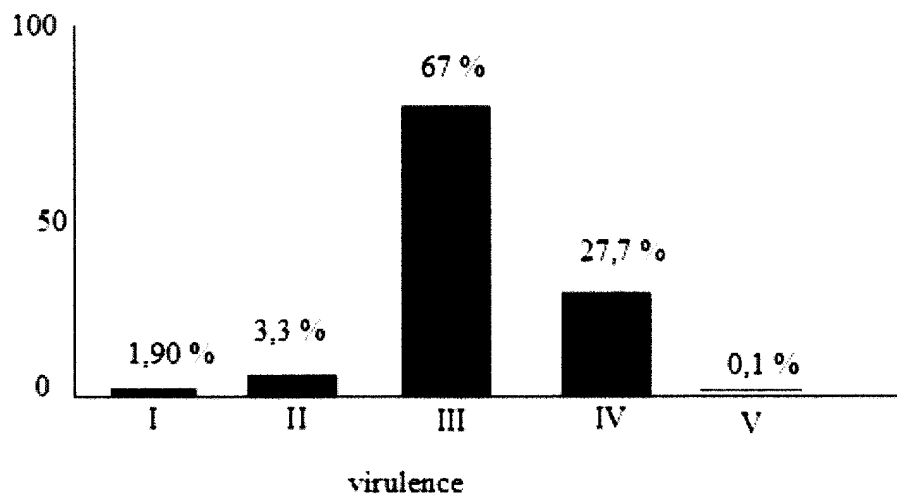


Figure 1



Figure 2

(2/2)

A



B



Figure 3

Liste de SEQ_ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> ANCLATRA AVEYRON
<120> PROCEDE DE LUTTE CONTRE LE VIRUS DE LA MYXOMATOSE
<130> ANCLATRA AVEYRON
<160> 2
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Forward primer
<400> 1
ggatacgtta cgagagttgg
20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Reverse primer
<400> 2
cattgaagga cgtaaacc
20

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

Anonymous: "5-Lutte contre la myxomatose",

,
1 janvier 2018 (2018-01-01), XP055523011,

Extrait de l'Internet:

URL: <http://www.bioespace.fr/5-luttecontrelamyxo.pdf>

[extrait le 2018-11-12]

FR 2 593 397 A1 (ASS NALE CHASSEURS LAPIN [FR]) 31 juillet 1987 (1987-07-31)

EP 0 972 840 A2 (FUNDACION PARA EL ESTUDIO Y DE [ES]; INIA [ES])
19 janvier 2000 (2000-01-19)

JUAN BÁRCENA ET AL: "Horizontal Transmissible Protection against Myxomatosis and Rabbit Hemorrhagic Disease by Using a Recombinant Myxoma Virus", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 3, 1 février 2000 (2000-02-01), pages 1114-1123, XP055523052, United States
DOI: 10.1128/JVI.74.3.1114-1123.2000

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

PETER KERR ET AL: "Myxoma Virus and the Leporipoxviruses: An Evolutionary Paradigm", VIRUSES, vol. 7, no. 3, 6 mars 2015 (2015-03-06), pages 1020-1061, XP055523105, DOI: 10.3390/v7031020

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT