



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 2845

To cite this document :

Chivallier, Laura (2009) [Isolement et étude du pouvoir pathogène de souches de terrain de virus myxomateux issues d'élevages cunicoles de l'ouest de la France](#) Thesis

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER,
Professeur des Universités,
Praticien hospitalier
Virologie

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

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie infectieuse

Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN
Maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Elevage et Santé avicoles et cunicoles

Qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail et de participer à notre jury de thèse
Qu'ils trouvent ici la marque de toute notre considération

A MERIAL,

Pour son soutien financier

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

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

PROFESSEURS 1^{re} CLASSE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
M. SAUTET Jean, *Anatomie*
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Réproduction, Endocrinologie*
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique Equine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*

M SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

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

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme BENNIS-BRET Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mle BOLLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du Bétail*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mle LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants.*
Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie Chirurgicale*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
Mme TROEGELER-MEYNADIER Annabelle, *Alimentation*
M. VOLMER Romain, *Microbiologie et Infectiologie*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle BUCK-ROUCH, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DOUET Jean-Yves, *Ophthalmologie*
M. SEQUELA Jérôme, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. VERSET Michaël, *Chirurgie des animaux de compagnie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. GIN Thomas, *Production et pathologie porcine*
M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales*
Mle TREVENNEC Karen, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

Sommaire

Table des illustrations	page 9
Introduction	page 10
Première partie : synthèse bibliographique	page 12
I. LA MYXOMATOSE	
A. HISTORIQUE	page 13
1. La myxomatose en Australie	page 13
2. Myxomatose en France	page 21
3. Myxomatose en Europe	page 22
B. ETUDE CLINIQUE	page 23
1. Epidémiologie	page 23
i. Les sources de virus	page 23
ii. Le mode de contagion	page 25
2. La maladie : symptômes et lésions	page 26
i. Forme typique	page 27
ii. Forme atypique, pulmonaire ou non myxomateuse	page 29
3. Etiologie	page 30
i. Taxonomie	page 30
ii. Morphologie et structure	page 31
iii. Biologie virale	page 33

4. pouvoir pathogène	page 36
i. Variabilité du pouvoir pathogène	page 37
ii. Tropisme d'hôte	page 41
iii. Tropisme de tissus	page 41
iv. Echappement au système immunitaire	page 34
II. L'HOTE ET CO – EVOLUTION HOTE – VIRUS	
A. LE LAPIN	page 48
B. FACTEURS ET RESISTANCE DE L'HOTE	page 49
1. Réponse immunitaire	page 49
2. Immunité passive	page 50
3. Effets de la température	page 50
4. Effet individu	page 51
C. CO-EVOLUTION VIRUS – HOTE	page 51
Deuxième partie : Etude expérimentale	page 55
I. OBJECTIFS ET GRANDES ETAPES	page 56
A. VERIFICATION DE LA PRESENCE EFFECTIVE DE VIRUS DANS LES ECHANTILLONS REÇUS	page 56
B. ISOLEMENT VIRAL EN CULTURES CELLULAIRES	page 56
C. ETUDE IN VIVO DE LA PATHOGENICITE DES SOUCHES ISOLEES	page 56

II. MATERIEL ET METHODE	page 57
A. MATERIEL BIOLOGIQUE	page 57
B. EXTRACTION D'ADN	page 57
C. AMPLIFICATION PAR POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)	page 57
D. ELECTROPHORESE HORIZONTALE D'ADN	page 58
E. ISOLEMENT DES VIRUS EN CULTURE CELLULAIRE	page 59
F. TITRAGE DU VIRUS	page 60
1. Dilution des échantillons	
2. Milieu de maintien gélose pour dénombrement de plages de lyse	
G. INOCULATION IN VIVO DU VIRUS	page 62
III. RESULTATS	page 63
A. NATURE ET ORIGINE DES ECHANTILLONS	page 63
B. DETECTION DES VIRUS MYXOMATEUX PAR PCR	page 63
C. ISOLEMENT DES VIRUS EN CULTURE CELLULAIRE	page 64
D. INOCULATION IN VIVO DU VIRUS	page 65
Discussion et conclusion	page 74

Annexes

page 80

Bibliographie

page 82

Table des Illustrations

Table des figures

- Figure 1** : Représentation schématique des poxvirus (sauf Parapoxvirus) (d'après Van Regenmortel et al., 2000) page 33
- Figure 2** : Cycle de réplication du virus de la vaccine (MOSS, 1992) page 36

Table des tableaux

- Tableau 1** : poxvirus des vertébrés (d'après Buller et Palumbo, 1991) page 31
- Tableau 2** : Classification adaptée de Fenner and Marshall (1957) des souches de virus myxomateux en fonction de leur virulence page 37
- Tableau 3** : Pouvoir pathogène expérimental comparé des souches de référence de virus myxomateux par inoculation au lapin *Oryctolagus cuniculus* (Joubert L., « la myxomatose », 1973) page 40
- Tableau 4**: critères d'observations cliniques page 63
- Tableau 5**: résultats de la présence de virus myxomateux, les lapins positifs sont notés (+) et les lapins négatifs (-) page 64
- Tableau 6**: échantillons choisis pour isolement page 65
- Tableau 7**: titres des virus obtenus après le troisième passage en culture cellulaire page 65
- Tableau 8** : résumé des principales observations cliniques des différentes souches virales testées in vivo page 73

Table des photographies

- Photo 1** : lésions plates, légèrement surélevées, délimités au niveau du pavillon de l'oreille page 66
- Photo 2** : lésions secondaires sur la deuxième oreille : plates, délimitées mais légèrement surélevées page 67
- Photo 3** : œil avec de la chassie importante page 68

Photo 4 : blépharoconjunctivite observée sur un lapin	page 68
Photo 5 : dépilation périoculaire et périnasale	page 69
Photo 6 : mouchage chez un lapin avec présence d'un écoulement épais et purulent avec des croûtes	page 69
Photo 7 : animal en position d'orthopnée	page 70
Photo 8 : animal avec les oreilles pendantes, une chassie marquée (les yeux sont collés et fermés) et un écoulement nasal purulent	page 71
Photo 9 : œdème anogénital avec présence de croûtes	page 71

Table des annexes

Annexe 1 : tableau type des observations cliniques quotidiennes	page 81
--	---------

Introduction

La myxomatose est une maladie virale spécifique du lapin européen *Oryctogalus cuniculus*. Elle fut introduite en Australie pour enrayer la surpopulation de lapins puis fut importée en France à partir d'où la maladie se répandit à travers l'Europe.

Ainsi au cours de sa propagation, le virus myxomateux n'a cessé d'évoluer et différentes souches de virulence variables sont ainsi apparues, résultant de la sélection et de la co évolution avec le lapin au cours du temps.

Notre étude, « Isolement et étude du pouvoir pathogène de souches de virus myxomateux issues d'élevages cunicoles de l'Ouest de la France » a pour but d'observer les différences de pathogénicité pouvant exister entre souches virales issues d'échantillons prélevés dans différents élevages de l'ouest de la France.

Nous commencerons dans une première partie par des rappels historiques, cliniques et étiologiques puis nous aborderons le thème de l'évolution de ce virus en parallèle de celle du lapin, afin de permettre la compréhension générale de l'étude expérimentale réalisée au sein de l'UMR 1225 à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse qui suit en deuxième partie.

PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA MYXOMATOSE

A. HISTORIQUE

1. La myxomatose en Australie

La maladie est décrite pour la première fois en Uruguay en 1898 à Montevideo par Guisepe Sanarelli, médecin et chercheur à l'institut pasteur, après avoir importé pour son laboratoire des lapins brésiliens malades. Il nomme cette maladie « myxomatose », du grec muxa, mucus et oma, tumeur, à cause des principaux signes cliniques observés.

Dès 1919, Aragão propose alors d'introduire cette maladie en Argentine et en Australie afin de contrôler la population de lapins. Il écrit en effet au Dr Breinl, directeur de l'institut australien des maladies tropicales, « que le virus de cette maladie, peut être utilisé avec avantages et sans danger de tuer les lapins autochtones dans les pays où ils sont devenus une plaie, comme en Australie, en Nouvelle Zélande, en Argentine et dans d'autres pays ». Le gouvernement australien refuse car cela constitue un grand risque sanitaire et que le résultat est incertain.

Cette idée est alors reprise par Martin, professeur de physiologie et de biochimie, et Lockley ; plusieurs essais d'introduction du virus sont mis en place entre 1936 et 1938 dans des îles britanniques, au Danemark et dans le sud de la Suède mais la myxomatose ne s'y développe point. La raison de ce résultat sera comprise quelques années plus tard, à savoir, qu'il n'y avait pas de puces du lapin sur ces îles et que la propagation de la maladie ne pouvait, de ce fait, pas avoir lieu.

Macnamara, diplômée de médecine, travaillant sur la poliomyélite, au cours d'un voyage en 1932-1933, rencontre Shope, diplômé en médecine et intéressé par la médecine vétérinaire qui lui parle de son projet d'utiliser le virus du fibrome de Shope, immunologiquement proche du virus de la myxomatose, en tant que vaccin pour protéger les lapins de la myxomatose. Dès lors elle conçoit l'idée d'utiliser la myxomatose comme moyen d'éradiquer le problème de surpopulation de lapins en Australie, sans avoir eu connaissance que cette idée a déjà été

proposée quelques années plus tôt. Son idée est alors rapidement soumise au premier ministre australien Bruce puis transmise au directeur du CSIR (Council for Scientific and Industrial Research), Martin. Ce dernier met au point cinq critères à respecter afin de contrôler une population de nuisible par un pathogène :

- 1-la maladie doit être suffisamment virulente afin de se répandre à toute la population concernée
- 2-il existe une telle virulence que peu d'animaux se rétablissent et développent une résistance
- 3-cette virulence demeure même après de nombreux passages naturels entre animaux sinon les épizooties stoppent ; si un animal se rétablit et développe une immunité, sa progéniture ne doit pas hériter suffisamment de résistance pour échapper à l'infection
- 4-la maladie doit être spécifique de l'animal à exterminer et sans danger pour l'animal domestique ou autre animal utilitaire.
- 5-elle ne doit pas être trop difficile à se propager, à rester active et à mettre en place sur le terrain.

Fort de ces principes, il poursuit ses recherches et conclut que la myxomatose peut être utilisée afin de contrôler la population de lapins en Australie ; seule, la contagion de la maladie ne correspond pas aux critères requis puisque celle-ci est peu importante et dépend de vecteurs tels que le moustique ou la puce.

Cumpston, directeur général de la santé et officier en chef de la Quarantaine, est quant à lui septique quant à la valeur d'une maladie infectieuse pour méthode de contrôle d'une population de lapins. De plus, il pense que la connaissance actuelle du virus est insuffisante, que les conséquences de son introduction peuvent être inimaginables, mais il est conscient que ces peurs ne sont pas suffisantes pour stopper les recherches. Ainsi, il autorise la poursuite des recherches dans des conditions strictes, sur des lapins parfaitement isolés du milieu extérieur.

Aux vues des résultats favorables obtenus, c'est-à-dire la mortalité totale de la population de lapins testés avec la souche B, Cumpston permet l'expérimentation sur le terrain mais ceci, toujours dans des conditions de sécurité optimales.

Ainsi est choisie en 1937 une île dans le sud de l'Australie. Mules et Bules, mènent les opérations et il en ressort dans un premier temps que la moitié de l'effectif de lapins meurt de la maladie et dans une deuxième expérience, malgré le fort taux de mortalité, les lapins deviennent capables de rétablir leur effectif initial.

Les résultats sont rapidement ébruités dans la communauté rurale australienne et l'idée que la myxomatose peut être utilisée pour délivrer l'Australie du fléau que représentent les lapins est dès lors majoritairement admise.

En 1941, les recherches se poursuivent au sein du continent ; la péninsule de Point Pearce est ainsi choisie. Cette fois-ci la propagation de la maladie est plus spectaculaire, due au fait de la présence de puces, absentes lors des expériences précédentes.

Aussi, il est mis en évidence que la myxomatose n'agit pas de façon continue et que la sécheresse à l'intérieur du continent peut limiter sa propagation.

De plus amples études sont ainsi permises, bien que des facteurs extérieurs, tels que le problème de l'inoculation d'une grande quantité de lapins, la sécheresse de 1940-41 et 1941-42, ainsi que la seconde guerre mondiale, repoussent l'obtention de résultats jusqu'en 1942 : le taux de mortalité est élevé mais la propagation de la maladie parmi les lapins n'est pas importante.

Ainsi, Mules et Bull concluent de façon pessimiste que la myxomatose ne peut être utilisée pour contrôler la population de lapins sauf dans des conditions particulières, incluant la présence d'un vecteur type moustique ou puce, l'absence de prédateurs naturels du lapin et la possibilité de réinfecter régulièrement les lapins.

Puis la guerre atteint le continent australien et les recherches sont ajournées jusqu'en 1948.

Puis, la guerre terminée ainsi que le manque de récoltes sont des motifs qui poussent le CSIR à reconsidérer la myxomatose comme une méthode de contrôle des lapins, malgré les incertitudes du directeur général de la santé. Les lapins, jusque là considérés comme un des principaux animaux de l'agriculture australienne, exploités pour la peau et la chair, sont protégés par un lobby. Mais leur explosion numérique, due à l'abandon de l'extermination pendant la guerre et aux conditions climatiques favorables, ainsi que la connaissance que la myxomatose pouvait enrayer cette croissance font augmenter la pression économique.

Aussi Ratcliffe, chargé de la section surveillance de la vie sauvage du CSIR et Bull, vétérinaire et directeur de la division santé animale du CSIR essayent encore d'introduire la myxomatose en nouvelle Galle du sud, mais les conditions environnementales, semblables à celles des autres territoires étudiés, ne permettent pas au virus de se propager malgré la grande quantité de lapins présents.

Cela fortifie Bull dans son pessimisme quant à l'utilisation de la myxomatose comme moyen de régulation d'une population de lapins.

Ratcliffe continue cependant les recherches et repère tout de même une zone idéale, le domaine de Gunbower, proche de la vallée de Murray infestée de lapins, de moustiques et de puces. Les expériences ne débutent qu'en 1950, délai utilisé par Fennesy, alors chargé de la section surveillance de la vie sauvage du CSIR pour préparer le virus ; ces expériences ont pour objectif la réponse à la question suivante :

Si la myxomatose est introduite dans une colonie de lapins quelles sont les chances d'avoir :

- une extermination complète
- une réduction numérique importante
- un échec complet nécessitant une ré infection ou un autre agent infectieux ?

Une fois encore la maladie disparaît progressivement sur 3 mois ; Ratcliffe, convaincu que la transmission de la maladie se fait par contact, choisit cette fois ci quatre zones infestées par des lapins dans la Riverina de l'est et trois dans la nouvelle Galle du sud.

La encore, malgré les conditions optimales de contacts entre lapins, quatre mois plus tard, la maladie semble avoir disparu.

De son côté, Macmanara, passionnée plus que jamais par la myxomatose et « son idée » de l'utiliser pour réguler la population de lapins, fait jouer ses connaissances afin de comprendre pourquoi les études réalisées jusqu'à présent sont laissées de côté, à cause de simples résultats décevants.

Puis, en décembre 1951, sans aucun présage, des lapins malades sont aperçus dans la vallée de Murray dans laquelle les expériences précédentes avaient apparemment échoué. A partir de

là, la maladie se propage de façon régulière à travers le pays, suivant les rivières du sud est de l'Australie sur une surface de 1600 km x 1760 km. En juin, à nouveau, la maladie semble avoir disparu.

La forme de cette propagation permet à Ratcliffe de déduire qu'un vecteur en est très certainement responsable, survivant pendant l'hiver et suivant les cours d'eau, à savoir le moustique, vraisemblablement *Anopheles annulipes*.

Fort de ces résultats encourageants, la nouvelle Galle du sud finance une partie des projets ; une grande quantité de virus lyophilisé est ainsi préparée en vue de poursuivre l'introduction du virus sur le terrain. Aussi les régions de nouvelle Galle du sud et de Victoria acceptent l'introduction du virus sur leurs territoires.

Pour Ratcliffe, l'objectif est avant tout de réaliser une évaluation fiable du fonctionnement de la propagation du virus, de comprendre où et quand l'infection peut être utilisée pour tuer les lapins ou non et de comprendre pourquoi dans les deux cas.

Enfin, Fenner (Fenner et Fantini, 1999), professeur de microbiologie, certainement stimulé par Macnamara, s'intéresse à l'immense potentiel que représente l'introduction d'une telle maladie au sein d'un continent entier.

Parallèlement à cela, une nouvelle maladie, nommée maladie X, une encéphalite, se déclare dans la même région que la myxomatose, c'est-à-dire la vallée de Murray en février 1951. Ainsi l'opinion publique fait rapidement l'amalgame et demande à Burnet et au ministre, Casey de tester la myxomatose sur eux même dans la mesure où ces derniers prétendent que le virus est inoffensif. Après des tests in vivo, le virus de la myxomatose est certifié spécifique du lapin et de ce fait sans danger pour l'homme.

L'activité de cette véritable épizootie se poursuit au-delà des attentes et en 1952, malgré l'apparition de nouveaux foyers naturels de contamination, des campagnes d'inoculation voient le jour.

Dès la fin de la saison 1954-55, la myxomatose atteint pratiquement toutes les zones de l'Australie peuplées par des lapins.

Enfin, en 1955, la propagation de la maladie se stabilise et évolue en fonction du taux de lapins sensibles et de vecteurs présents ; apparaît alors la possibilité que les souches de virus

présentes sur le territoire soient des souches atténuées et que les lapins présentent une résistance face à l'infection.

La mise en place d'une surveillance de cette maladie nécessitant au départ de simples études sur les vecteurs potentiels ainsi que sur son épidémiologie est alors réalisée dans la région de Lakana Urana en Australie. Les lapins sont inoculés avec la souche Standart Laboratory Strain (SLS), puis le nombre de lapins est établi et suivi au cours des années 1951 à 1955. Ainsi la première année le taux de mortalité atteint la valeur extrême de 99.8% puis 90% l'année suivante. Les animaux guéris possèdent dès lors une immunité qui les protègent de l'infection ; ainsi dans une région où la population de lapins a presque totalement disparu grâce au virus de la myxomatose, celle-ci est capable de se reformer assez rapidement (Myer *et al*, 1954).

Puis apparaissent des études sur la résistance génétique des lapins sauvages ainsi que sur la variation de virulence de souches de virus de la myxomatose menées au départ par les laboratoires de Fenner puis reprise et poursuivie par l'institut de recherche de Keith Turnbull.

Ainsi 33 années après qu'Aragão eut suggéré l'idée que la myxomatose pouvait être le moyen de contrôler la population de lapins sauvages en Australie, celle-ci est testée de nombreuses fois pour enfin obtenir avec succès un moyen biologique de lutte contre le lapin australien.

A partir de 1960, dans certaines régions de l'Australie, la population de lapins recommence à grandir et redevient un fléau. Après de nombreuses observations en France, en Grande Bretagne puis en Australie en zone de quarantaine, la puce *spilopsyllus cuniculi*, spécifique du lapin européen et du lièvre, semble être un vecteur potentiel de la myxomatose, vecteur qui s'affranchit partiellement du facteur « saison », à la différence du vecteur « moustique ». Ce dernier est en effet surtout présent en été alors que la puce est présente sur toute la durée de l'année bien qu'un pic soit observé au printemps, durant la saison de reproduction du lapin, et en hiver (King et Wheeler, 1986).

Jusque là absente du territoire australien, cette puce y est introduite dès 1966. En 1968, des études montrent que cette puce est effectivement vectrice de la maladie en inoculant une souche spécifique de virus à des lapins, souche qui est retrouvée chez d'autres lapins après morsure par cette puce (Sobey et Conolly, 1971). Devant le succès de cette découverte, la

puce relâchée à plus grande échelle se répand alors de façon progressive mais continue, surtout si elle est introduite lors de la saison de reproduction des lapins. En effet, cette puce doit nécessairement mordre une lapine gestante ou un des lapereaux afin de pouvoir se reproduire à son tour.

Ainsi, quatre années après l'introduction de cette puce, 95% des lapins en sont porteurs (Shepherd et Edmonds, 1976).

Cependant, en 1976, une sécheresse retarde le printemps et la saison de reproduction des lapins ; la population de puces décroît alors fortement ce qui favorise à nouveau la ré émergence de lapins. D'autres études confirment cela et montrent aussi que la puce se développe bien dans la région de Victoria. Ceci montre que cette puce ne résiste pas au climat trop chaud et sec et après dix années de recherches supplémentaires, la puce *xenopsylla cunicularis*, (Fenner et Fantini, 1999) originaire d'Espagne, et résistant mieux en zones arides, est introduite en 1990 en Australie où elle se répand progressivement à raison de deux kilomètres par année environ.

Parallèlement à cela, la propagation d'une autre maladie, la maladie hémorragique virale du lapin a lieu à travers le continent australien.

Williams et *al.* poussent les recherches afin de comprendre la ré apparition de la maladie dans certaines régions de l'Australie bien qu'il n'y ait ni campagne d'inoculation ni présence de moustiques sur le territoire incriminé. L'hypothèse ainsi mise en avant est la possible existence d'animaux porteurs du virus. Ces porteurs seraient séropositifs mais ne déclareraient pas de signes cliniques. Cependant, le virus, persistant sous forme latente, pourrait être réactivé avec productions de lésions cutanées lors d'un stress. Cette hypothèse semble corroborée par quelques études (Marlier *et al*, 2000, Williams *et al.*, 1972a) : la persistance et la réactivation d'un poxvirus ont aussi été mises en évidence pour la première fois.

Puis de nouvelles initiatives voient le jour, après que la population de lapins croît à nouveau, s'appuyant sur le concept d'immunocontraception. Des études sont effectuées sur des souris, infectées par un poxvirus exprimant une protéine de la zone pellucide (ZP3) des ovules. Les souris développent ainsi des anticorps anti ZP3 et tant que le taux d'anticorps demeure élevé, les femelles restent infertiles. Lorsque le taux d'Ac anti ZP3 diminue, la fertilité redevient normale.

Cependant, pour être applicable aux lapins, cette méthode doit répondre aux cinq questions suivantes :

- Quelle proportion de lapines sauvages doivent être stériles afin de permettre de réduire de façon optimale la croissance de la population ?
- les composants des gamètes ou des sécrétions locales peuvent-ils provoquer une réponse immunocontraceptive durable chez les lapins ?
- est ce que les lapins infectés par le virus recombinants seront effectivement stériles ?
- est ce qu'un tel virus pourra se propager dans une population parmi laquelle le virus de la myxomatose est enzootique ?
- est ce que ce virus mutant n'est pas dangereux pour d'autres espèces animales ?

A la première question, Twigg *et al.* (1999) établissent qu'il faut 60 à 80% des lapines stériles afin de pouvoir abaisser de façon notable le taux de natalité de lapins. Ceci n'est possible que si le virus mutant se propage de façon efficace et que toutes les lapines infectées qui survivent restent stériles. En pratique seules 25% des lapines deviennent infertiles avec un virus recombinant pour ZBP, une autre protéine de la zone pellucide (Kerr *et al.*, 1998). Ainsi cette idée est abandonnée, d'autant plus que le recul nécessaire pour savoir si ce virus recombinant est vraiment spécifique des lapins est insuffisant.

2. Myxomatose en France

Le Docteur Delille, bactériologiste et médecin français, apprend en 1952 les résultats obtenus en Australie après l'introduction du virus de la myxomatose comme moyen de lutte contre les lapins ; possédant un vaste domaine à Maillebois infesté par des lapins, il décide d'introduire le virus en juin 1952. Malgré les murs de pierre qui marquent la limite de son domaine, le virus est retrouvé à une cinquantaine de kilomètres de chez lui dès octobre 1952. Puis une année plus tard, 35% des lapins domestiques et 45% des lapins sauvages sont touchés. Alors que les agriculteurs approuvent cette introduction, les chasseurs et les éleveurs expriment leur mécontentement. Puis, il est mis en évidence que la souche utilisée par le Dr Delille, la souche Lausanne, diffère de la souche retrouvée sur des lapins morts de myxomatose dans d'autres régions, à savoir la souche Moses (Fenner et Fantini, 1999).

Les choses sont rapidement légalisées et le code rural et le code pénal pénalisent toutes importations délibérées de maladies infectieuses touchant les animaux domestiques ou sauvages (CP articles 452, 454-1, 31 octobre 1955 ; CR articles 393-395) ; les méthodes pour détruire les lapins y sont également précisées. Dès 1953, un décret interdisant les mouvements de lapins dans les zones touchées par la myxomatose est instauré. Des mesures de destruction des lapins sont alors mises en place afin de limiter la propagation de la maladie et en même temps que des mesures de protection à l'aide de la vaccination (virus du fibrome de Shope) afin de créer une barrière sanitaire à l'extension de la myxomatose à travers le pays.

Bien que de nombreuses mesures draconiennes aient été mises en place, la maladie n'est pas éliminée et de périodiques épidémies voient le jour dans la population sauvage de lapins et de temps en temps sur des lapins domestiques non vaccinés.

En France, il devient évident que c'est le moustique le principal vecteur de la propagation du virus entre les régions et entre lapins sauvages et domestiques (Jacotot *et al.*, 1954). La puce quant à elle, présente de façon commune sur les lapins sauvages, contribue à maintenir la myxomatose à l'état enzootique au fil des ans.

3. Myxomatose en Europe

Après la propagation de la maladie en France, celle-ci continue son expansion à travers les pays européens continentaux et arrive en dernier en Suède dès 1961. En Grande Bretagne cependant, seuls les lapins sauvages sont touchés. Ceci s'explique par le fait que le moustique n'est pas le principal vecteur comme dans les autres pays d'Europe, le principal vecteur étant la puce du lapin, *Spilopsyllus cuniculi*. En grande Bretagne, bien que le lapin soit considéré comme un fléau, l'inoculation des lapins sauvages par le virus de la myxomatose est interdite, considérée comme cruelle. En effet, « cette méthode ne correspond pas au tempérament national et ne reçoit pas d'encouragement officiel » (Thompson et Worden, 1956). Cependant, la maladie s'installe tout de même outre manche, véhiculée par *Anopheles atroparvus* selon Sellers (1987) ou par l'introduction d'un lapin malade par un fermier selon Thompson (Fenner et al, 1994).

Puis malgré les mesures prises pour éradiquer la maladie avant sa propagation, celle-ci survit tout de même à l'hiver et contre toute attente se répand rapidement durant l'été suivant ; dès la fin 1955, toute la Grande Bretagne est touchée.

Des tests sur la résistance des lapins sauvages montrent qu'il y a aussi une diminution progressive du taux de mortalité après infection par un virus de fort pouvoir pathogène, celui-ci passant de 98% à 92% en 1966-67 puis 45% en 1978-79. En 1975, la souche Lausanne de grade I devient rare et laisse place à des souches de grade II et surtout des grades IIA. Les souches atténuées restent rares.

L'introduction du virus en Ecosse est d'abord précédée par des études sur une île : après l'introduction de lapins infectés entre 1952 et 1953, la maladie se répand rapidement aux lapins sauvages et cause une forte mortalité. Cependant, la maladie ne devient pas enzootique et en 1954 la population de lapins retrouve son effectif primitif.

L'introduction du virus en Espagne se fait par le passage de lapins malades à travers la frontière pyrénéenne dès 1953 ; en 1955 de nombreuses régions sont touchées et en 1956 le Portugal est à son tour atteint.

B. ETUDE CLINIQUE

1. Epidémiologie

i. Les sources de virus

Les animaux *malades* excrètent de grandes quantités de virus par la peau, souillée d'exsudats en regard des pseudotumeurs, en particulier au niveau des myxomes primaires (seulement 15 % des myxomes secondaires sont infectants). Les particules desséchées de squames, d'exsudats ou de croûtes peuvent être contagieuses. L'importance des exsudats est capitale pour la propagation vectorielle, car les moustiques absorbent ces produits virulents et servent en conséquence de vecteurs mécaniques de la maladie.

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

La myxomatose peut également être transmise par voie sexuelle, puisque le virus est présent dans les fluides sexuels jusqu'à 20 jours après la guérison clinique (Castellini *et al.*, 1994).

Les animaux *porteurs* (soit en phase de virémie préclinique soit les animaux convalescents) constituent également une source de contagion puisqu'ils restent potentiellement porteurs de virus jusqu'à la disparition complète des lésions.

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

Cependant, la forme classique ou nodulaire se transmet rarement par le contact entre individus malades et jamais par voie digestive (Fenner et Ratcliffe, 1965) mais quasi systématiquement par la morsure d'insectes qui entament le derme du lapin. Ce sont les puces (*Spillopsyllus cuniculus*) et les moustiques (*Anopheles* spp, *Aedes* spp, *Culex* spp) qui sont ainsi principalement concernés bien que d'autres ectoparasites peuvent être concernés.

Ces *vecteurs* arthropodes piqueurs (moustiques et puces) jouent dès lors le rôle de réservoirs, soit de façon temporaire de l'été à l'automne, soit de façon prolongée d'un hiver à l'autre lorsque le moustique conserve une infectiosité pendant l'hibernation ou lorsque la puce quiescente hiverne dans le terrier vidé de ses occupants par la maladie. Cependant, pour que le virus puisse rester infectant, il faut que les conditions climatiques soient favorables.

Anopheles annulipes, bien réparti sur le territoire australien serait le principal moustique vecteur de la maladie (Myers *et al.*, 1954). Les *Culex annulirostris* sont également des moustiques vecteurs de la maladie mais à moindre échelle, dans la mesure où leur répartition n'est pas homogène sur le continent.

Des études menées par Aragão de 1942 à 1943 (Fenner et Fantini, 1999) sur les réservoirs de la maladie montrent que les moustiques qui piquent un lapin malade au niveau du myxome restent contaminant jusqu'à 17 jours après l'infection et ceci, dès le repas infectant. Fenner et Ratcliffe découvrent en 1965 que les puces ou les moustiques peuvent rester infectieux sur des durées supérieures à 100 jours, et Chapple et Lewis isolent des puces dans des tubes à essai et ces dernières restent contaminantes jusqu'à 112 jours (Fenner et Fantini, 1999).

La puce est également un très bon vecteur de la maladie. En effet, un terrier dévasté par la myxomatose reste peuplé de puces infectées quiescentes et la terre elle-même favorise la conservation du virus myxomateux dans un milieu à température constante, à l'abri de la lumière, avec une texture grossière de la terre. Les puces peuvent rester contaminantes pendant environ dix semaines et le virus myxomateux se conserve dans la terre des terriers infectés, pendant 26 mois au moins (Joubert *et al.*, 1974). Le caractère contaminant de terriers infectés, dépourvus d'arthropodes, par fouissement, est démontré (Joubert *et al.*, 1974). Au total, pour ces vecteurs mécaniques, seule la contrainte de piquer ou mordre un animal malade au niveau d'un myxome puis un animal sain est nécessaire et suffisant pour transmettre le virus.

La virulence des souches dépend alors de la capacité des virions à se fixer sur les pièces buccales des arthropodes ainsi que de la charge virale cutanée présente au moment de la morsure ; celle-ci doit être supérieure à 10^7 unités infectieuses par gramme de peau pour un moustique (Fenner *et al.*, 1956).

Ainsi pour des souches hautement pathogènes, l'infectiosité n'est présente que peu de temps, ce qui laisse de ce fait peu de possibilités de rencontre hôte – vecteur. De même, pour des souches de faible pathogénicité, l'infectiosité est rapidement contrôlée par l'hôte. Seules les souches de pathogénicité intermédiaire permettent une persistance prolongée de l'infectiosité au sein de la peau augmentant les chances de transmission de la maladie. Ce rapport pathogénicité – transmission expliquerait l'apparition rapide et le maintien dans la nature de souches moyennement pathogènes (Fenner et Marshall, 1957).

ii. Le mode de contagion

Le virus myxomateux ne peut se développer en dehors des cellules de l'animal hôte. De ce fait, il doit y avoir de façon obligatoire un contact soit direct par effraction du revêtement cutanéomuqueux, par dépôt virulent sur un tégument initialement lésé, soit par la piqûre inoculatrice d'un vecteur mécanique (puces, moustiques, épines, .. ;).

Le *contact immédiat*, d'efficacité générale très réduite, consiste dans le dépôt d'un produit pathologique pollué sur la peau ou les muqueuses saines ou érodées. Ceci dépend également de la richesse en virus de la lésion.

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

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

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

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

Ainsi, pour la forme amyxomateuse, la voie respiratoire est la voie principale de contamination (Joubert *et al.*, 1982) mais uniquement par contacts directs.

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

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

Cependant, la transmission de la myxomatose par piqûre d'arthropode se révèle le fondement même de la transmission et de l'entretien du virus, tant chez les garennes qu'en élevage traditionnel.

2. La maladie : symptômes et lésions

Il existe deux formes de myxomatose (Brun *et al.*, 1981 ; Joubert *et al.*, 1982) à savoir une forme dite classique présentant des lésions cutanées typiques telles que des nodules cutanés et une forme atypique ou amyxomateuse associée à des signes non spécifiques ; ces derniers sont souvent limités à une blépharoconjonctivite associée ou non à des signes respiratoires tels qu'une détresse respiratoire importante, ou des problèmes de reproduction (Brun *et al.*, 1981 ; Joubert *et al.*, 1982 ; Rosell *et al.*, 1984, Marlier et Vindevogel, 1996 ; Marlier *et al.*, 1997, 1999, 2000b).

i. Forme typique

Standard laboratory strain SLS

Cette souche, prototype du grade I est dérivée de la souche MOSES (isolée en 1911 à Rio de Janeiro) ; elle fut utilisée par Shope et Martin en 1926 afin de vérifier son efficacité sur le contrôle de la population de lapins, importée en Australie en 1937 puis relâchée en 1950 afin de contrôler la population locale de lapins.

Au point d'inoculation, à la base des oreilles ou en périphérie des orbites lors des contaminations naturelles par les puces ou moustiques, apparaît, au bout de 3 jours environ, un nodule cutané rougeâtre de 0.5 à 2 cm (le myxome primaire) qui s'élargit progressivement, devient convexe de la taille d'une noisette et s'ulcère ; ils sont le plus souvent confluents mais demeurent indolores.

Puis des lésions secondaires apparaissent dès le 6^{ème} jour et au 9^{ème} jour après inoculation, les lésions sont réparties sur l'ensemble du corps et des oreilles, ce qui donne au lapin un aspect léonin et déforme la silhouette du dos et des membres postérieurs. Les paupières s'épaississent dès le 6^{ème} jour et une blépharoconjonctivite s'installe, et au 9^{ème} jour, les yeux sont complètement fermés.

Parallèlement des écoulements oculaires apparaissent d'abord clairs puis épais et troubles, associés à des œdèmes de la tête, de la base des oreilles ainsi que du périnée. La région ano-génitale apparaît alors gonflée, douloureuse, de couleur rose à rouge foncé. Enfin des sécrétions respiratoires parfois purulentes, engendrées par des complications bactériennes, gênent la respiration du lapin. Ce sont souvent des bactéries Gram négatifs qui sont isolés avec *Pasteurella multocida* et *Bordetella bronchiseptica*.

La mort apparaît de façon invariable entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jour, en moyenne entre le 10 et 11^{ème} jour (Fenner et Ratcliffe, 1965 ; Arthur, 1988) sous l'effet conjugué de dégâts tissulaires, des complications bactériennes et d'un épuisement important, les myxomes les rendant aveugles et incapables de s'alimenter.

Le derme du lapin possède alors une grande quantité de virus, absorbée lors d'une potentielle pique de moustique.

L'évolution des souches de grade II à V est similaire à celle de grade I mais l'apparence du myxome primaire varie, et les signes cliniques se signalent par une progression moins rapide et une intensité moindre ; on parle alors de myxomatoses subaigües.

Souche KM13

Cette souche est le prototype du grade III, isolée en 1952 à Corowa.

Les principaux signes cliniques sont similaires à ceux de la souche SLS mais ils apparaissent de façon plus progressive après une incubation de 3 à 5 jours. La généralisation ne survient qu'entre le 10^{ème} et le 18^{ème} jour. Les yeux ne se ferment en effet que rarement avant le 14^{ème} jour post infection et les paupières sont plus déformées qu'épaissies. Les œdèmes sont quant à eux moins importants ; cependant, sur des animaux ayant survécu plus de 20 jours, la respiration est laborieuse, les yeux deviennent globuleux et se ferment, il y a une importante sécrétion nasale ; l'animal est émacié. Sur des animaux ayant survécu à la maladie, les myxomes finissent par se dessécher laissant place à des plages croûteuses ou dépilées.

La peau du lapin contient également une grande quantité de virus.

Souche URIARRA

Cette souche est le prototype du grade IV, dérivée de cas observés à Uriarra en 1953. Les lésions locales apparaissent dès le 3^{ème} jour et deviennent rapidement dures, rouges et convexes. Ces lésions se démarquent du reste de la peau environnante, exceptés chez les individus qui meurent avant. Puis le centre de la lésion se nécrose au cours de la 3^{ème} ou 4^{ème} semaine ; les lésions secondaires sont nombreuses, rouges mais plates ; la quantité de virus présente au sein des lésions cutanées est toujours importante entre le 8^{ème} et le 14^{ème} jour, puis soit reste importante pour encore deux autres semaines soit diminue rapidement.

Souches CALIFORNIENNES

Les souches californiennes semblent diverger des autres souches par la présence de symptômes nerveux, la présence d'hémorragies ainsi que par la présence de myxomes assez plats. La souche prototype est découverte en 1950 et est nommée MSW. La souche MSD est assez semblable à ce prototype.

Le myxome apparaît en 3 jours environ mais reste assez plat. On observe alors un œdème palpébral et génital assez important. Peu de myxomes secondaires sont notés. On observe cependant des troubles non caractéristiques de la myxomatose classique : des tremblements, des convulsions. Parallèlement à ce neurotropisme, un syndrome hémorragique est également noté en fin d'évolution de la maladie (sur les viscères et au niveau des lésions cutanées). Le

taux de mortalité est de 100 %, le temps moyen de survie de 9.2 jours (limites de 7 à 14 jours).

Le faible nombre de lésions cutanées ainsi que leur brièveté ne permet pas une grande dissémination vectorielle de cette souche. Cependant l'infectiosité des lésions est élevée.

Souche neuromyxomateuse

Cette souche de Hurst est une souche artificiellement atténuée, développée en Angleterre en 1937, après de nombreux passages en séries sur des cerveaux de lapins à partir de la souche MOSES. Elle est le prototype du degré IV d'infectiosité artificielle.

La lésion primaire est dure, rouge et convexe puis devient dépressible, violette et bien démarquée du tissu environnant au bout de 5 jours. Il y a peu de lésions secondaires et les œdèmes du périnée ainsi que de la tête n'ont jamais été observés. La lésion primaire contient une grande quantité de virus au bout du 6^{ème} jour mais cela reste toujours en dessous des quantités observées pour les autres souches plus virulentes. L'état général du lapin est peu affecté.

ii. Forme atypique, pulmonaire ou non myxomateuse

Cette forme atypique a pour origine des variants de la souche Lausanne et ne possède aucune relation avec les souches vaccinales ou Californiennes, même si son origine demeure floue : deux hypothèses ont ainsi été proposées, la première selon laquelle la souche atypique serait issue de la mutation d'une souche typique et la deuxième selon laquelle elle serait une forme latente, portée à bas bruit.

Ainsi la forme atypique de myxomatose est soit une cause primaire, soit un facteur prédisposant aux maladies respiratoires.

Cette forme est observée pour la première fois en 1980 en France (Brun *et al.*, 1981b, Joubert *et al.*, 1982). Au départ, cette forme fut mise en évidence chez le lapin domestique, élevé de façon intensive et vacciné avec le vaccin SG33 (Chantal, 1981). Ce syndrome fut par la suite vu dans des clapiers traditionnels et également sur des lapins sauvages.

L'évolution de cette forme est généralement plus longue que pour celle des formes dites classiques, 17 à 28 jours environ après une longue période d'incubation qui, elle, dure de une à trois semaines.

Il existe un certain degré de saisonnalité de cette forme, le taux de morbidité et de mortalité variant respectivement entre 5 et 40% et 30 à 35%.

Les signes prédominants sont des signes respiratoires primaires et des signes cutanés secondaires ; les nodules cutanés sont de taille inférieure à celle des nodules de la forme classique et ne sont ni proéminents ni exsudatifs sauf pour la souche 801 (Marlier, Mainil *et al*, 2000). Cette dernière entraîne des lésions cutanées planes similaires à celles produites par la souche classique SLS.

Il y a souvent des papules roses voire rouges sur les oreilles mais pas de lésions cutanées nodulaires typiques (Arthur et Louzis, 1988). La transmission est directe, par voie respiratoire. Les survivants deviennent souvent stériles ce qui pose des problèmes économiques aux éleveurs.

3. Etiologie

i. Taxonomie

Le virus de la myxomatose appartient à la famille des *Poxviridae* et plus particulièrement au genre des *Leporipoxvirus*.

Une première classification des Poxvirus, basée sur les aspects cliniques et lésionnels, fut mise en place dès 1957 (Fenner et Burnett, 1957). Elle regroupe diverses maladies dont les agents étiologiques sont quant à eux très disparates.

Une deuxième classification fut dès lors envisagée, établie sur les caractères morphologiques communs des virus, sur la base de données publiées par Fenner et Burnett en 1957. Deux sous-famille, les *Entomopoxvirinae* spécifiques des insectes et les *Chordopoxvirinae* spécifiques des vertébrés, sont constituées. Les membres de cette dernière sous famille à laquelle appartient le virus de la myxomatose, peuvent alors être regroupés comme suit (tableau 1) (Buller et Palumbo 1991) :

GENRE	ESPECE TYPE	PRINCIPALES AUTRES ESPECES
Orthopoxvirus	Virus de la vaccine	Mousepox Cowpox (variole du buffle et du chameau et du singe) Virus de la variole humaine
Parapoxvirus	Orf virus	Virus de l'ecthyma contagieux Virus de la stomatite papuleuse pseudocowpox
Avipoxvirus	Virus de la variole aviaire (fowlpox)	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille
Capripoxvirus	Virus de la clavelée	Virus de la variole caprine Lumpy skin disease virus
Leporipoxvirus	Virus de la myxomatose	Virus du fibrome de Shope Virus du fibrome du lièvre Virus du fibrome de l'écureuil
Suipoxvirus	Virus de la variole porcine	
Molluscipoxvirus	Virus du Molluscum contagiosum	
Yatapoxvirus	Tanapox virus de l'homme	Virus de la tumeur Yaba du singe

Tableau 1 : poxvirus des vertébrés (d'après Buller et Palumbo, 1991)

Cette subdivision en genres repose sur la morphologie virale, le tropisme viral (spectre d'hôte), l'aptitude à réactiver un autre virus ainsi que sur la composition antigénique de la capsid ou de l'enveloppe (Joubert *et al*, 1972 ; Hu Fang Qi *et al*, 1974).

Il existe également une protection croisée in vivo entre membres d'un même genre.

ii. Morphologie et structure

Les Poxvirus sont de volumineux virus de forme ovale ou rectangulaire, mesurant de 200 à 400 nm de long. Le virus de la myxomatose mesure 286 (+ / - 15) nm x 230 (+ / - 20) nm x 75 (+ / - 10) nm (Farrant et Fenner, 1953).

Le virus produit deux formes infectieuses différentes, à savoir un virus intracellulaire mature (IMV) ainsi qu'un virus extracellulaire enveloppé (EEV) (Smith, 1993). Ces derniers possèdent une enveloppe supplémentaire par rapport aux IMV, dérivée de l'appareil de Golgi (Schmelz *et al*, 1994).

Les Poxvirus sont composés de différents constituants, répartis en quatre entités :

- une enveloppe formée d'une bicouche lipo-protéique,
- un core viral biconcave en forme d'altère, ou nucléoïde central, composé d'une molécule d'ADN de 80 µm de long et de protéines dont certaines sont des enzymes impliquées dans la transcription ou la modification des ARN (Moss, 1992),
- deux corps latéraux se logeant dans les concavités (Vilagines, 1985)
- une membrane.

Cette dernière est constituée de phospholipides et de protéines, dont certaines sont exposés à sa surface (IMV) et sont ainsi la cible des anticorps produits par l'hôte infecté. La face externe de cette membrane est également tapissée par des éléments tubulaires de surface (STE) ce qui lui confère un aspect muriforme.

Le core loge une molécule d'ADN linéaire bicaténaire dont les extrémités en épingle à cheveux sont constituées d'ADN monocaténaire. La taille du génome est comprise entre 130 et 300 kb (Moss, 1991) ; celui du virus de la myxomatose mesure 163kb (Russel et Robbins, 1989). La portion centrale du génome des Poxvirus est conservée d'une espèce à l'autre, portion codant pour des gènes essentiels (Moss, 1992) tandis que les extrémités sont le siège de nombreuses recombinaisons et portent par conséquent des gènes non essentiels à la survie du virus. On retrouve notamment dans ces zones les gènes codant les facteurs de pathogénicité et de spectre d'hôte.

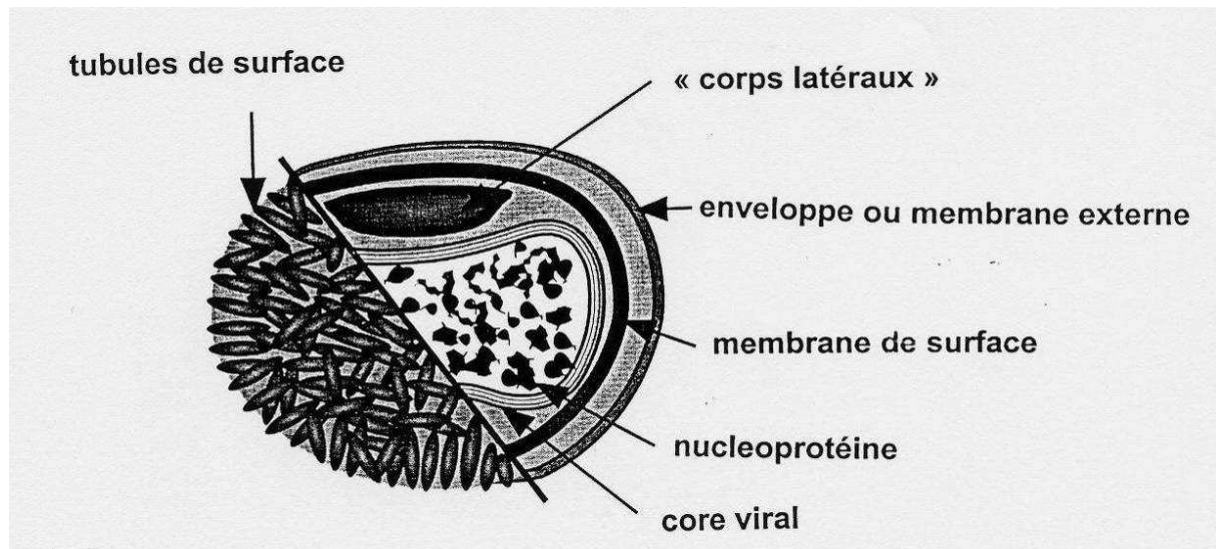


Figure 1 : Représentation schématique des poxvirus (sauf Parapoxvirus).
(d'après Van Regenmortel et al., 2000)

iii. Biologie virale

La totalité du cycle de réplication a lieu dans le cytoplasme de la cellule infectée et sa durée varie de quelques heures (12 à 24h pour le virus de la vaccine) à quelques jours (35 à 75h pour le yatapoxvirus) selon la souche virale et le type de cellule infectée. Il comprend six grandes étapes, à savoir, l'entrée et le déshabillage du virus dans la cellule, l'expression des gènes précoces, la réplication de l'ADN viral, l'expression des gènes intermédiaires puis celle des gènes tardifs et enfin l'assemblage du virion ainsi que son expulsion (Moss, 1991).

Entrée du virus dans la cellule et expansion du core

Cette phase dure de 30 minutes à 4 heures et comprend deux parties :

- une phase d'adsorption, réversible
- une phase d'attachement, irréversible (Fields, 1993).

Le virus se fixe à la cellule via des récepteurs : pour le virus de la vaccine il existe au moins deux sortes de récepteurs, spécifiques des deux formes virales (système chondroïtine sulfate pour les IMV et héparane sulfate pour les EEV (Hsiao, Chung et Chang, 1999)). Pour le virus de la myxomatose, aucun récepteur spécifique n'a encore été clairement identifié.

Le virus pénètre alors dans le cytoplasme par deux grands mécanismes, soit par endocytose (Dales et Kajioka, 1964) soit par fusion membranaire directe (Chang et Metz, 1976 ; Vanderplasschen *et al*, 1998)), les deux n'étant pas exclusifs l'un de l'autre. Puis, il perd ses enveloppes : il perd d'abord ses phospholipides et la moitié de ses protéines, le génome étant toujours protégé au sein du core, puis le core se désagrège laissant le génome au contact des DNAses exogènes. La transcription des gènes viraux débute alors même que le core semble intact.

Transcription des gènes viraux

Les Poxvirus sont capables de synthétiser leurs ARNm dans le cytoplasme de la cellule hôte puisqu'ils possèdent leurs propres enzymes et facteurs de transcription tels que une ARN polymérase, une poly A polymérase ainsi que des enzymes de coiffe et de méthylation.

Environ une heure après l'entrée du virion dans la cellule, les ARNm précoces, qui représentent environ 50% du génome (Buller et Palumbo, 1991), sont synthétisés ; parmi ces gènes précoces transcrits, il existe au moins un facteur transactivateur des gènes intermédiaires, permettant la transcription de ces derniers après la répllication du génome. Il en est de même pour les gènes tardifs, gènes codant pour des protéines indispensables au développement des nouveaux virions mais aussi pour des protéines nécessaires à la transcription des gènes précoces et qui sont enfermées dans la capsidie des virions néoformés, bouclant ainsi le cycle viral.

Répllication du génome

Le génome du virus se réplique de façon autonome dans le cytoplasme de la cellule infectée au niveau de zones spécifiques appelées virosomes. Des unités génomiques, considérées comme des intermédiaires de répllication, sont formés ; ce sont des concatémères. Ceux-ci sont ensuite transformés en molécule d'ADN mature, incorporées par la suite au sein des particules virales. Cette maturation, appelée « résolution » est sous la dépendance de protéines tardives.

Recombinaison et réparation de l'ADN

L'ADN de tous les Poxvirus subit fréquemment des recombinaisons homologues (fréquence apparente de recombinaisons intramoléculaires de 6.10^{-5} par paire de base) inter ou intramoléculaires. Ces échanges d'information génétique peuvent aboutir à la formation de nouveau virus possédant des caractères biologiques qui lui sont propres (Strayer *et al*, 1993 ; Block *et al*, 1985).

Maturation des virions

La maturation des virions se fait également au niveau des virosomes. Environ quatre à cinq heures après le début de l'infection, les membranes virales formées s'accumulent ; elles sont de forme demie sphérique et recouvertes de spicules puis s'arrondissent. Elles possèdent en leur centre des particules qui mûrissent pour produire des virus infectieux de type IMV, dont certains sont transportés, grâce au cytosquelette, jusqu'à la périphérie de la cellule (Cudmore *et al*, 1995). Ils s'enveloppent alors d'une double membrane supplémentaire, dérivée de l'appareil de Golgi (Schmelz *et al*, 1994). La plus externe fusionne avec la membrane plasmique de la cellule infectée, ce qui permet la sortie du virus infectieux de type EEV avec à terme la lyse de la cellule par perturbation des synthèses protéiques (Petit *et al*, 1997) ce qui permet la libération des IMV quelques heures après la libération des premiers virions.

Finalement, le cycle infectieux ne dure seulement que 10 à 12 heures permettant la production de 2 000 à 3 000 particules par cellules infectées pour le virus de la vaccine et 14 à 16 heures pour le virus myxomateux (Duteyrat *et al*, 2006 : Duteyrat JL, Gelfi J, Bertagnoli S.

Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. Arch Virol. 2006 Nov;151(11):2161-80).

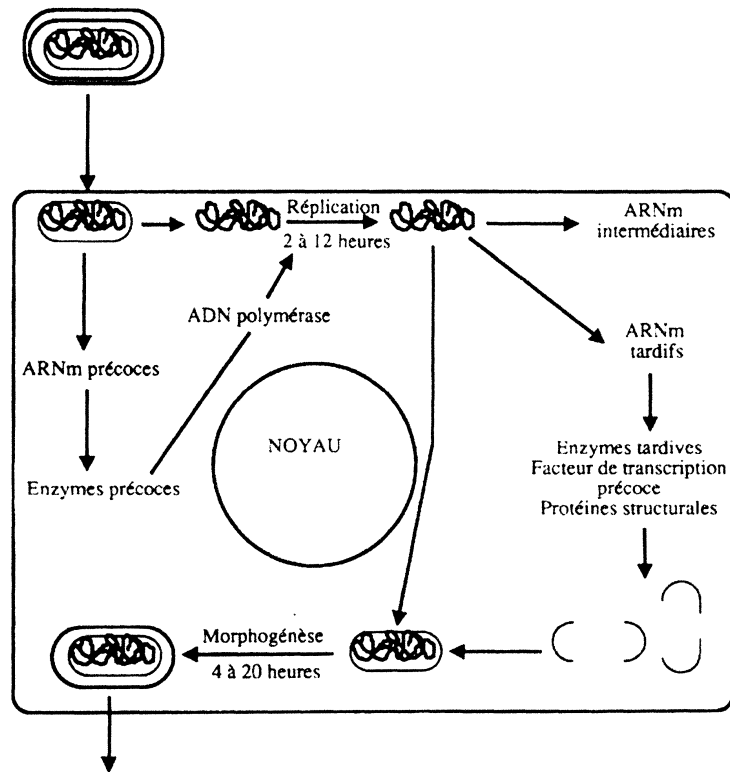


Figure 2 : Cycle de répllication du virus de la vaccine (MOSS, 1992)

4. Pouvoir pathogène

L'infection d'un hôte dépend de trois facteurs principaux : la sensibilité de l'hôte (espèce, lignée, âge, individu), l'infectiosité et la dose virales et enfin les modalités de contagion et de pénétration du virus.

La sensibilité de l'hôte découle ainsi de l'espèce puisque *qu'Oryctolagus cuniculus* est incomparablement plus sensible que les autres espèces. Elle tient aussi de la lignée car certaines sont plus résistantes que d'autres ainsi que de l'âge puisque les jeunes sont naturellement plus sensibles que les adultes.

L'infectiosité dépend quant à elle du caractère infectant du virus, c'est-à-dire de sa capacité à être transmis au cours du temps tout en restant virulent. La transmission est souvent corrélée au pouvoir pathogène du virus. En effet, lorsque celui est important, l'hôte meurt plus rapidement et le virus n'est de ce fait que peu transmis. A l'inverse, lorsque le virus est faiblement pathogène, la transmission peut se faire sur un laps de temps plus long.

Cette transmission dépend aussi de la quantité de virus prélevée par le vecteur et donc de la multiplication virale au sein de l'organisme hôte.

i. Variabilité du pouvoir pathogène

Il existe de nombreuses souches de virus myxomateux dont le pouvoir pathogène est déterminé par une série de gènes codant pour des facteurs de pathogénicité. Ces derniers modifient la réponse immunitaire de l'hôte infecté de façon plus ou moins importante, ce qui permet de qualifier des souches de pathogénicité différente. Fenner et Marshall (1957) ont défini la virulence des souches de virus myxomateux en termes de taux de mortalité puisque cette dernière était bien corrélée à la virulence. Ils ont ainsi établi le « virulence grading system », tableau gradant les souches de virus en fonction du taux de mortalité exprimé en %. Cette échelle de virulence, allant de I à V, est un standard fiable permettant de comparer le pouvoir pathogène de souches de terrain. En pratique, pour discriminer deux taux de mortalité proche, il faudrait un nombre important de lapins ce qui n'est pas possible. Or, le taux de mortalité et le temps moyen de survie exprimés en jours sont des paramètres fortement corrélés et faciles d'utilisation (Fenner et Ratcliffe, 1965). Ainsi, sur le terrain, le temps moyen de survie était le seul paramètre utilisé pour grader les souches de virus.

Grade	Taux de mortalité (%)	Temps moyen de survie TMS (jours)
I	95-99.5	< 13
II	95-99	13 < TMS < 16
III	70-95	16 < TMS < 28
IV	50-70	28 < TMS < 50
V	< 50	

Tableau 2 : Classification adaptée de Fenner and Marshall (1957) des souches de virus myxomateux en fonction de leur virulence

Depuis, la corrélation entre les deux paramètres « taux de mortalité » et « temps moyen de survie » a été réévaluée (Parer, 1995). Selon cet auteur, cette relation entre ces deux paramètres induirait des erreurs de classifications des souches de virus selon leur virulence et seule la mesure directe du taux de mortalité renseignerait sur la virulence des souches.

On apprécie également la virulence d'une souche virale étudiée en laboratoire lorsqu'elle est inoculée dans des conditions particulières, à savoir, mode d'inoculation de type naturel (stylet intradermique mimant la pique d'un moustique), sur des espèces hôtes sensibles, d'antécédents immunologiques connus, et élevés dans des conditions spécifiques, par :

- la formation du myxome primaire (délai d'apparition, forme, exsudation, ...)
- la généralisation, l'apparition de lésions oculaires ou cutanées secondaires
- l'apparition de signes nerveux
- le taux de mortalité
- le temps de survie moyen
- la teneur en virus, la virulence des lésions (c'est-à-dire la possibilité d'une contamination rapide des vecteurs ou encore la capacité de propagation de la souche) (Clarrington et Sobey, 1955)

Ainsi, les souches de pouvoir pathogène différents mises en évidence sur le terrain ont pu être classées de façon précise (cf Tableau 3).

Au départ, en effet, seule la souche de référence « Standard Laboratory Strain », de forte pathogénicité était connue. Puis des études menées en Australie montrèrent que la souche Lausanne produisait des lésions plus importantes que celles causées par la souche SLS. Cette souche Lausanne est donc de virulence plus importante induisant un taux de mortalité de 99% (contre 60 à 80% pour la souche SLS), (Fenner et Marshall, 1957).

Puis dès 1955, les souches atténuées du virus de la myxomatose sont pour la première fois reconnues, dans le département français du Loiret (Jacotot *et al.*, 1955). Les lésions cutanées produites par cette souche « Loiret 55 » sont similaires à celles produites par la souche Lausanne mais la maladie évolue plus lentement. Le taux de mortalité est en effet de 65% et le temps moyen de survie de 33.1 jours. Cette souche fut plus tard désignée comme étant la souche européenne prototype de la virulence de grade IV.

De 1955 à 1980, apparaissent des souches de virulence intermédiaire, le grade III étant divisé en IIIA et IIIB, avec respectivement, un taux moyen de survie de 17-22 jours et 23-28 jours et un taux de mortalité de 90-95% et 70-90%.

Le pouvoir pathogène de deux souches californiennes de virus myxomateux, MSW et MSD a fait l'objet d'une étude (Silver et al, 2006) sur des lapins sauvages ainsi que sur des lapins de laboratoire : la souche MSW est mortelle pour les deux types de lapins avec une survie maximale de 9.4 jours ; malgré la bonne résistance des lapins sauvages vis à vis de la souche SLS, ceux-ci ne résistent pas à la souche californienne MSW. Cette dernière est donc classée dans le grade I selon la classification de Fenner et Marshall. Ceci montre que le devenir de l'infection dépend non seulement de la souche incriminée mais aussi de la résistance naturelle de l'hôte infecté.

La souche MSD est quant à elle plus atténuée et entraîne un taux de survie de 12.4 jours en moyenne sur des lapins de laboratoire.

Tableau 3 : Pouvoir pathogène expérimental comparé des souches de référence de virus myxomateux par inoculation au lapin *Oryctolagus cuniculus* (Joubert L., « la myxomatose », 1973)

		SUD AMERICAINES BRESILIENNES							CALIFORNIE NNE	
		AUSTRALIE				EUROPE				
		Sauvage			Modifiée	Sauvages				
		I-II	III A et B	IV	V	I-II	III	IV		V
		Standard	KM 13 Corowa	Uriarra	Neuromyxome de Hurst	Lausanne	France, Grande Bretagne	Loiret 55 France		Nottingham 55 (atténuée)
Myxome	Apparition	3 ^{ème} j	3-4 ^{ème} j	3-4 ^{ème} j	5 ^{ème} j	3 ^{ème} j	3 ^{ème} j	3 ^{ème} j	5 ^{ème} j	3 ^{ème} j
	Forme	Convexe Circulaire Non délimités	Plate Irrégulière délimitée	Peu convexe Irrégulière délimitée	Convexe Régulière délimitée	Très convexe Régulière Non délimitée	Convexe +/- irrégulière +/- délimitée	+/-plate Irrégulière délimitée	Plate Irrégulière délimitée	Plate Régulière Non délimitée
	Exsudation	+++	+++	+	+/-	++++	+++	++	+	+
	Epiderme	intact	nécrosé	Ombiliqué nécrosé	-	Ulcéré	nécrosé	nécrosé	nécrosé	intact
Généralisatio n	Intensité	+++	++	+	+/-	++++	+++	++	+	++++ rapide (hémorragies)
	Œil	6 ^{ème} j	15 ^{ème} j +/-	+/-	0	4 ^{ème} j	10 ^{ème} j	18 ^{ème} j	+/-	+
	Peau	+++	++	+	+/-	++++	++	++	+	+/-
Symptômes nerveux		0	0	0	0	0	0	0	0	++
Taux de mortalité en %		100	88 (A : 90-95 et B : 70-90)	58	50	100	90 ?	65	23	100
Temps moyen de survie en jours		10.8 (8-15)	21.5 (A : 17- 22 et B : 23- 28) (13 à guérison)	30 (15 à guérison)	guérison	12.9 (10-16)	20 ? (10 à guérison)	33 (19 à guérison)	40 ? (14 à guérison)	9.2 (7-14)
Infectiosité des lésions		+	++	+	+/-	+	+	+	+	++
Vecteurs		++				+++	+++	++		

ii. Tropisme d'hôte

Une des causes du retard de la mise en place sur le terrain des expériences concernant le potentiel du virus de la myxomatose comme agent de régulation de la population de lapins fut la question de la spécificité du virus. En effet, comme pour toute autre méthode de lutte, il est nécessaire de connaître les animaux, ou végétaux sensibles, ainsi que le caractère zoonotique de l'agent de lutte biologique. De plus, un virus est un agent transmissible et de ce fait, possède un grand avantage s'il est spécifique de l'hôte nuisible mais est très dangereux dans le cas contraire.

Aragão (1927) confirma les affirmations de Sanarelli concernant la grande spécificité d'hôte du virus de la myxomatose, après avoir en vain testé de nombreuses espèces telles que chevaux, bovins, canards, pigeons, chèvres, moutons, singes, souris, cochons d'inde, furets ou encore hamsters. Aussi, in vivo, le spectre d'hôte semble limité aux lagomorphes. Ces études sont reprises par Fenner et Ratcliff en 1965 : les singes, cobayes, souris, rats et le hamster, après inoculation, ne développent pas de signes cliniques ; de même des animaux sauvages ont été testés, tels que le wallaby de Tasmanie, le wombat commun, le cacatoès à crête jaune, ... ainsi que des animaux domestiques : mouton, chèvre, cheval, porc, bovin, chien, chat, pigeon, canard, poule.

Enfin, l'homme est réfractaire à l'infection par ce virus (Jackson *et al*, 1966).

Aussi, après de nombreuses études, la myxomatose apparaît comme étant une maladie très spécifique, affectant seulement un nombre limité d'espèces appartenant à la famille des Léporidés. Le lièvre européen (*Lepus europaeus*) est généralement insensible bien que quelques cas de contamination naturelle ont été décrits (Jacotot *et al*, 1954). La sensibilité des lapins dépend de l'espèce : les espèces américaines (*Sylvilagus*) sont peu ou pas sensibles à la myxomatose, à l'inverse, l'espèce européenne (*Oryctolagus cuniculus*) est particulièrement vulnérable à ce virus (Fenner et Ratcliff, 1965).

iii. Tropisme de tissus

Forme nodulaire

Pour les souches myxomateuses fortement pathogènes, il y a d'abord une diffusion dans la peau en périphérie de la zone d'inoculation, puis aux nœuds lymphatiques drainant ainsi

qu'aux petites artérioles ; 24heures après inoculation, le virus peut être réisolé du site au niveau duquel une multiplication a eu lieu. Au 4^{ème} jour après infection, il y a apparition de la phase de virémie avec généralisation de la maladie. Le virus se multiplie au sein du système lymphoïde, dans la moelle osseuse, la rate, les poumons, ainsi que sur les surfaces des omenta et de la cavité péritonéale (Kerr et Best, 1998). Cette virémie est associée à une réplication du virus au sein des lymphocytes T et des monocytes.

La détection d'un titre infectieux est alors possible à distance du point d'inoculation, au niveau du derme et des testicules, notamment au sein des cellules tubulaires et des cellules de l'épididyme.

Associée à cette réplication testiculaire, on remarque une diminution de la fertilité du mâle; il y a en effet une azoospermie suite à l'infection, liée à l'épididymite et à l'orchite ainsi qu'à une augmentation du taux d'hormone lutéinisante et une diminution du taux de testostérone. Cette infertilité peut durer jusqu'à un an après l'infection même si le virus est généralement absent au bout d'une trentaine de jours, et que les taux d'hormones retournent dans des valeurs usuelles.

Un antigène soluble est détecté sur le site primaire à partir du 3^{ème} jour, au niveau des nœuds lymphatiques de drainage à partir du 5^{ème} jour puis dans tout le sérum de l'hôte dès le 7^{ème} jour qui suit l'inoculation. Par contre, le sérum ne contient jamais de particules virales libres (Fenner et Ratcliffe, 1965).

Dans les cas les plus graves, la mort survient généralement le 10^{ème} jour après infection (Fenner et Ratcliffe, 1965).

Pour les souches myxomateuse de plus faible pouvoir pathogène, la chronologie est la même bien que la virémie reste transitoire et de plus faible amplitude (Fenner et Ratcliffe, 1965).

Chez les animaux qui survivent à l'infection, des anticorps sériques peuvent être mis en évidence dès le 10^{ème} jour après inoculation ; ces derniers sont décelables jusqu'à 6 mois par fixation du complément, jusqu'à 20 mois par la méthode de séro-neutralisation (Fenner *et al*, 1953) et jusqu'à 2 ans par la méthode ELISA (Kerr, 1997).

Forme amyxomateuse

Dans la forme amyxomateuse, le virus possède un hypo – ectodermotropisme (Joubert *et al*, 1982) ; il entre par voie aérienne jusqu'aux alvéoles des poumons où il se réplique ; puis les nœuds lymphatiques locaux sont atteints et il y a généralisation de la maladie. Le virus s'étend des poumons jusqu'aux paupières ; apparaissent également des surinfections secondaires avec bronchopneumonie et conjonctivite puis de possibles lésions cutanées secondaires.

iv. Echappement au système immunitaire

Les lapins sauvages qui développent une résistance vis-à-vis des souches de haute virulence, limitent en fait la propagation du virus dans les tissus éloignés du lieu d'inoculation, en particulier, les nœuds lymphatiques de drainage (Best et Kerr, 2000). Cependant, la réplication du virus au niveau du site d'inoculation n'est pas sensiblement différente entre les animaux sensibles et résistants ; de même, une fois la propagation réalisée, la multiplication du virus semble identique dans les tissus contaminés.

Une hypothèse a ainsi été formulée : chez les hôtes résistants il existerait une réponse immunitaire initiale innée, qui ralentirait la propagation du virus suffisamment longtemps ce qui permettrait à la réponse immunitaire à médiation cellulaire d'être opérationnelle (Kerr et Mc Fadden, 2002). Cette réponse initiale, basée sur les cellules NK (natural killer), les interférons α / β ainsi que les cytokines Th1 (IFN γ , TNF, IL-12) serait absente chez les lapins sensibles dont la réponse initiale serait quant à elle dominée par une réponse de type Th2 (cytokines IL-4 et IL-10).

La construction de virus exprimant la cytokine IL-4 de lapin sous 2 promoteurs différents, et dans deux environnements différents (environnements SLS ou Ur) a permis de mettre en évidence que l'IL-4 joue un rôle dans le devenir de l'infection (Kerr, Perkins *et al*, 2004). Ainsi les lapins sauvages, résistants à la souche SLS deviennent sensibles au virus recombinant SLS-IL4. De même, la souche virale Ur normalement atténuée devient mortelle sous la forme Ur – IL4 pour les lapins de laboratoire et entraîne de graves signes cliniques de

myxomatose chez les lapins sauvages. L'IL4 empêcherait en effet le développement d'une réponse Th1 et diminuerait l'activité des cellules NK.

Aussi, une réponse Th2 est délétère pour le lapin et seule une réponse Th1 permet au lapin de mieux résister à la maladie.

Le virus de la myxomatose a cependant développé diverses stratégies permettant de contourner la réponse immunitaire mise en place par l'hôte. Un grand nombre de protéines dont l'action est de moduler et/ou de contrôler le système immunitaire et la réponse inflammatoire mise en place par l'hôte ont été identifiées. On parle de « facteurs de virulence » ; ainsi lors de délétion des gènes codant pour ces protéines les souches résultantes ont un pouvoir pathogène fortement atténué. Ces protéines sont appelées « virokines » ou « virocepteurs (Nash P, Barrett J, Cao JX, Hota-Mitchell S, Lalani AS, Everett H, Xu XM, Robichaud J, Hnatiuk S, Ainslie C, Seet BT, McFadden G. Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story. *Immunol Rev.* 1999;168:103-20) . selon que leur mode d'action est de mimer l'effet des cytokines ou de piéger les messagers cellulaires.

Ces facteurs agissent selon différentes modalités (non exhaustives) :

Optimisation de la réplication virale

Il existe une forte multiplication des fibroblastes au sein des lésions induites par le virus de la myxomatose. Cette prolifération est induite par des protéines proches des « vaccinia growth factor » (VGF) qui stimulent la mitogenèse des cellules non infectées à proximité des cellules infectées, ce qui favoriserait la dissémination de l'infection (Stroobant *et al.*, 1985 ; Twardzik *et al.*, 1985 ; Buller *et al.*, 1988a, 1988b). Ce polypeptide pour le virus myxomateux est nommé de façon similaire « myxoma growth factor » (MGF) (Upton *et al.*, 1987). Ainsi les virus mutants n'exprimant pas le gène *mgf* sont d'une virulence nettement inférieure à celle de la souche sauvage (Opgenorth *et al.*, 1992). On observe alors une diminution marquée de la multiplication épithéliale des lésions nodulaires de la myxomatose. Le pouvoir pathogène de ces mutants MGF(-) peut être réinstauré par insertion du gène manquant codant pour MGF ou par celui du virus du fibrome de Shope, SFGF (Opgenorth *et al.*, 1993).

Inhibition de la réaction inflammatoire

Il existe au moins trois protéines responsables de l'inhibition de la réaction inflammatoire, les protéines M11L, SERP-1, et MNF.

M11L est une protéine synthétisée par le virus et exprimée à la surface des cellules infectées (Graham *et al.*, 1992). Le gène codant pour cette protéine chevauche celui codant pour la protéine MGF (Opgenorth *et al.*, 1992). Ainsi un virus mutant pour une partie de M11L est aussi mutant pour MGF et voit sa virulence très atténuée (Opgenorth *et al.*, 1992). M11L entraîne une atténuation de la réaction inflammatoire locale au niveau des myxomes et retarde l'arrivée des macrophages et des hétérophiles au niveau de la lésion.

SERP-1 est une glycoprotéine virale, dont le gène est présent en double exemplaire dans le génome du virus. Cette protéine est un inhibiteur de protéase à sérine (Upton *et al.*, 1990). Le virus mutant pour ce gène voit la encore sa virulence atténuée (Upton *et al.*, 1990 ; Macen *et al.*, 1993). L'intensité des lésions inflammatoires semblent toutefois identiques entre celles engendrées par le virus mutant ou sauvage ; mais la réaction inflammatoire induite par l'hôte infectée par un virus mutant évolue de manière plus rapide et son contrôle demeure efficace (Macen *et al.*, 1993). SERP-1 inhibe donc des éléments de la réaction inflammatoire ; in vitro, elle inhibe une urokinase, un activateur du plasminogène tissulaire et la première enzyme de la cascade du complément, C1s (Lomas *et al.*, 1993).

MNF est une protéine virale codée par le gène M150R, à répétitions ankyrines, capable de se transloquer dans le noyau (Camus-Bouclainville *et al.*, 2004). Ce facteur de virulence est nommé MNF pour Myxoma Nuclear Factor à cause de son tropisme pour le noyau des cellules infectées. Cette protéine possède des similarités avec I-kappa Balpha qui régule l'activité de NF-kappaB en le séquestrant dans le cytosol. Or NF-kappaB est un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes de l'inflammation. Cette séquestration n'étant plus permise chez le virus mutant, on observe ainsi une amélioration de la réponse inflammatoire de l'organisme. De ce fait, les virus mutants deviennent non pathogènes.

Ainsi, en inhibant la réaction inflammatoire de l'hôte, le virus peut échapper à un processus de défense non spécifique mis en place précocement lors de toute agression de l'organisme.

Modulation de l'action des cytokines

Action anti interféron

Le virus myxomateux possède une protéine **M-T7**, codée par le gène T7, qui intervient en bloquant de façon spécifique l'interféron (IFN) gamma; cette protéine empêche en effet la fixation des IFN sur les récepteurs cellulaires et possède une grande affinité pour les IFN des lapins (Upton *et al.*, 1992). L'activité de M-T7 a été mise en évidence *in vitro* par l'observation de la suppression de la résistance d'une lignée de cellules traitées avec M-T7 et soumise à une infection virale (Mossman *et al.*, 1995). Cette activité biologique a aussi été testée *in vivo*, en inoculant des lapins avec un virus mutant, n'exprimant plus cette protéine : la virus se trouve alors être fortement atténué. De plus, sa dissémination au niveau des lésions secondaires ainsi que la réaction inflammatoire sont amoindries et ceci est accompagné d'une importante infiltration lymphocytaire (Mossman *et al.*, 1996b).

Inhibition de l'activité des cytokines pro inflammatoires

Le virus de la myxomatose inhibe l'action de l'interleukine (IL) 1 β (Petit *et al.*, 1996a ; Messud-Petit *et al.*, 1998) et du « tumor necrosis factor » (TNF) (Upton *et al.*, 1991 ; Schreiber et Mc Fadden, 1994). Il possède une protéine, **SERP-2** qui inhibe l'enzyme de maturation de la pro-IL-1 β et de ce fait rend impossible la synthèse de pro-IL-1 β active (Petit *et al.*, 1996a). La délétion du gène codant pour la protéine SERP-2 se traduit par une réaction inflammatoire plus rapide par rapport à celle obtenue chez un animal inoculé avec un virus sauvage ; le pouvoir pathogène est ainsi atténué (le taux de mortalité est alors de 30%) et la présence de myxomes secondaires est rare (Messud-Petit *et al.*, 1998).

Le virus de la myxomatose possède une autre protéine impliquée dans l'inhibition de cytokines pro inflammatoires. Cette protéine, **M-T2**, existant sous forme monomérique ou dimérique, la deuxième forme étant plus puissante (Schreiber *et al.*, 1996), inhibe l'action cytolytique du TNF α du lapin. Une fois encore, l'obtention d'un virus mutant pour les gènes codant pour cette protéine permet de mettre en évidence que ce dernier possède un pouvoir pathogène amoindrie par rapport à celui du virus sauvage. La taille et le nombre de myxomes secondaires sont réduits, les infections bactériennes secondaires sont plus rares et le taux de mortalité diminue (Upton *et al.*, 1991).

Inhibition de l'apoptose

Les lymphocytes sont impliqués dans le transport et la dissémination du virus de la myxomatose ; ce dernier en inhibant le processus de mort cellulaire par apoptose des lymphocytes permet sa dissémination plus rapide. Les facteurs intervenants dans ce processus sont les protéines M11L, M-T2, SERP-2 et M-T5 (Macen *et al.*, 1996 ; Schreiber *et al.*, 1997).

La capacité anti-apoptotique de la protéine **M11L** a été mise en évidence sur des lignées cellulaires RL-5 puis confirmée en culture cellulaire de splénocytes de lapin (Opgenorth *et al.*, 1992).

Celle de la protéine **M-T2** a été également mise en évidence sur des lignées de cellules RL-5 ; cependant, une fois purifiée, cette protéine doit être synthétisée *de novo* afin d'exercer son action (Macen *et al.*, 1996).

L'action de la protéine **SERP-2** a été démontrée en inoculant un virus mutant, délété du gène codant pour SERP-2 : une déplétion lymphocytaire est ainsi observée au niveau du nœud lymphatique drainant le site d'infection et est imputable à ce phénomène d'apoptose (Messud-Petit *et al.*, 1998).

La protéine **M-T5** possède une action apoptotique pour les cellules RL-5 (lymphocytes T CD4+) avec un arrêt total des synthèses cellulaires et virales de façon spécifique (rien au niveau cellules épithéliales de lapin) (Mossman *et al.*, 1996a). L'inoculation de lapins avec une souche mutante permet de mettre en évidence une diminution de la virulence de la souche avec une infection localisée au niveau du site d'injection sans réaction des nœuds lymphatiques de drainage ou des organes lymphoïdes secondaires (Mossman *et al.*, 1996a). Le rôle de cette protéine est ainsi de permettre la dissémination virale par voie lymphatique au niveau des sites secondaires de multiplication (Mossman *et al.*, 1996a).

Diminution de l'expression des protéines de membranes de l'hôte

Perte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I)

Le virus de la myxomatose empêche non seulement la synthèse de protéines cellulaires mais aussi la présentation des molécules du CMH-I, soit en masquant, soit en détruisant les molécules déjà présentes à la surface des cellules infectées (Boshkov *et al.*, 1992). Or l'activation des lymphocytes cytotoxiques requiert à la fois la présentation à la surface de la cellule d'épitopes viraux et des molécules du CMH-I. Ainsi cette perturbation de l'expression de ces molécules du CMH-I à la surface de la cellule empêche le fonctionnement normal des lymphocytes.

Cette action est dépendante de la protéine MV-lap (M153R) (Collin *et al.*, 2005 ; Guerin *et al.*, 2002 ; Mansouri *et al.*, 2003), scrapine à activité ubiquitine ligase.

Baisse de l'expression des molécules CD4

L'infection de lignées cellulaires RL-5 est marquée par la diminution du taux de CD4 à la surface des cellules (Barry *et al.*, 1995). Ces CD4 sont internalisés puis sont dégradés dans des vésicules lysosomiales. Là encore la protéine MV-lap semble jouer un rôle clé (Mansouri *et al.*, 2003).

II. L'HOTE ET CO – EVOLUTION HOTE - VIRUS

A. LE LAPIN

Le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) appartient avec les lapins américains genre *Sylvilagus* et les lièvres au super ordre des glires, à l'ordre des lagomorphes, à la famille des *Leporidae* ainsi qu'à la sous famille des *Leporinae*. Le genre *Oryctolagus* vient du grec « oryct », creuser et de « lagus » ou « lagid » qui veut dire « lascif » ou « débauché », tandis que les dénominateurs « *cuniculus* » et « *Sylvilagus* » indiquent le mode de vie à savoir respectivement dans un terrier ou dans les bois.

B. FACTEURS DE RESISTANCE DE L'HOTE

1. Réponse immunitaire

La mise en place de la réponse immunitaire contre le virus de la myxomatose débute avec l'infection des cellules dendritiques, cellules de Langerhans (dans le derme) et des LT (au niveau des nœuds lymphatiques drainant). Les lapins développent des IgM et IgG contre le virus. Si ces anticorps peuvent neutraliser le virus et peuvent persister jusqu'à 19 mois après l'épidémie de myxomatose (Fenner *et al*, 1953), il semble cependant ne pas être suffisants pour protéger les lapins (Fenner & Marshall, 1954).

Pour des souches virales très pathogènes, les lapins résistants développent en 6-7 jours une réponse immunitaire de type cellulaire avec une activation du complément, qui se fixe alors sur les antigènes viraux et les neutralise. Sur des souches de moindre virulence, l'activité du complément est également présente à partir du 7^{ème} et jusqu'au 28^{ème} jour. L'apparition d'immuns complexes se fait dès le 11^{ème} jour, demeure à un niveau élevé jusqu'à 6 mois puis diminue pour rester stable. La neutralisation des antigènes est présente dès 10 jours et atteint un pic au 14^{ème} jour ; celle-ci reste à un niveau élevé jusqu'à 6 mois.

De plus, 14 à 20 mois plus tard, après l'inoculation d'une petite dose de virus, aucun signe clinique n'est observé (Fenner et Ratcliffe, 1965) quelle que soit l'origine de la souche de départ et celle de l'épreuve ; on a donc une réaction croisée (Fenner et Ratcliff, 1965). On peut dès lors considérer qu'un lapin qui survit à la myxomatose possède alors une immunité post infectieuse à vie.

De plus, il a été observé que les vaccins à virus inactivés ne permettent pas de protéger les lapins contre la myxomatose, alors même que des anticorps sont produits (Fenner & Ratcliffe, 1965), contrairement aux vaccins à virus atténués qui sont eux bien protecteurs. Ces données suggèrent que si des anticorps préexistants confèrent une relative protection, les anticorps développés durant la phase clinique ne sont pas une donnée cruciale dans la survie des lapins.

Tout ceci fait donc apparaître l'importance de la réponse à médiation cellulaire dans le contrôle de l'infection par le virus myxomateux, même si ce dernier possède des armes pour contourner et interférer avec les acteurs responsables de la mise en place de la réponse cellulaire.

2. Immunité passive

Les lapereaux ne seraient pas complètement protégés par les anticorps maternels, persistants jusqu'à 6 à 9 semaines d'âge et détectables par fixation du complément (Fenner *et al.*, 1953) ou ELISA (Best, 1997), mais ces derniers atténueraient la sévérité de la maladie (Fenner et Marshall, 1954), et ce, seulement pour des souches de faible pathogénicité. En effet, dans un milieu à fort risque infectieux, les anticorps maternels n'apportent que peu d'avantages. Une étude portant sur des lapins porteurs d'anticorps maternels élevés depuis la naissance dans des enclos contenant des puces infectées, montre que les premiers symptômes apparaissent en moyenne à 38 jours d'âge avec une souche hypervirulente (Lausanne) et à 36 jours d'âge pour une souche atténuée de terrain (FS/98). L'immunité maternelle transmise ne permet pas d'éviter l'infection mais seulement de la retarder, sans permettre un allongement du temps de survie (Sobey et Conolly, 1975).

Au-delà de 6 semaines, les lapins ne possèdent plus d'immunité maternelle suffisamment efficace et deviennent pleinement sensibles à l'infection, qu'elle soit par contact direct, piqure de moustiques ou morsure de puces.

Il existerait un « effet mâle » (Sobey et Conolly, 1986 ; Williams et Moore, 1991 ; Parer *et al.*, 1995) : des lapins issus d'un croisement entre une femelle naïve et un mâle guéri d'une myxomatose aiguë et préalablement vacciné avec le virus du fibrome de Shope (Sobey et Conolly, 1986) résistent mieux à l'inoculation d'une souche pathogène de virus. Cependant cet « effet mâle » n'est valable qu'entre 7 et 10 mois après l'infection ; il se transmet aux femelles saillies, de façon permanente pour les générations de lapereaux futures même si ces dernières ne sont pas issues d'un croisement avec un mâle guéri et vacciné. Cet avantage, transmis par le mâle et également observé sur le terrain, permet de diminuer de 25% le risque de mortalité chez le lapereau (Williams *et al.*, 1990 ; Williams et Moore, 1991). Son mécanisme est inconnu jusqu'ici.

3. Effets de la température

La température environnementale a un effet marqué sur la sévérité des signes cliniques et sur les taux de mortalité (Marshall, 1959 ; Fenner et Ratcliffe, 1965). Au-delà de 36°C, température d'environnement, la sévérité de l'infection diminue de façon progressive

(Thompson, 1938, Parker et Thompson, 1942). Alors que seuls de légers signes cliniques ont été observés chez les lapins placés au delà de 36°C, ils ont été extrêmement sévères chez les animaux logés à des températures inférieures à 4°C et d'intensité moyenne à variable chez les animaux placés à température tempérée (20-22°C). Les taux de mortalité respectifs ont suivis la même évolution à savoir 8% à haute température, 65% à température tempérée et 92% à basse température. La virémie est de moindre importance chez les individus placés à haute température et leur taux d'anticorps est plus haut, et inversement lors de température basse, une virémie importante et prolongée avec une absence d'anticorps sériques sont observés (Marshall, 1959).

4. Effet individu

Apparaît au fil des épizooties une sélection naturelle des individus ayant survécu ce qui joue un rôle capital dans l'apparition de souche d'infectiosité plus faible. Ainsi on observe une évolution parallèle entre la sensibilité de l'hôte et l'infectiosité des souches (voir phénomène de co-évolution).

C. CO-EVOLUTION VIRUS – HOTE

La co – évolution virus – lapin est illustrée par la propagation délibérée de la maladie sur un territoire donné, notamment en Australie, Grande Bretagne et en France, et apporte de nombreuses informations sur les résistances génétiques acquises par le lapin au cours des années et parallèlement sur les moyens mis en place par le virus pour échapper au système immunitaire de son hôte (Hudson et Mansi, 1955 ; Fenner et Ross, 1994, Kerr et Best, 1998).

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

Progressivement, ces souches de virulence intermédiaire deviennent prédominantes en raison des mécanismes de transmission vectorielle de la myxomatose, en Australie avec les moustiques (Fenner et *al.*, 1956) comme en Grande Bretagne avec les puces (Meads-Briggs et Vaughan, 1975). En effet, d'un côté l'infectiosité des lésions est assez importante pour permettre la transmission du virus et de l'autre la gravité de la maladie est telle que la

mortalité des lapins ne survient pas trop rapidement ce qui permet d'allonger la durée de transmission potentielle du virus.

Dans tous les cas, le taux de mortalité, initialement proche de 99 à 100% a rapidement diminué suite à l'émergence de souches de moindre virulence ainsi qu'à la sélection de lapins ayant développé une résistance génétique. Les premiers isolements de souches de moindre virulence commencèrent dès 1952-1953 : la souche Uriarra (Mykytowycz, 1953 ; Russel et Robbins, 1989), issue de la souche SLS, est isolée seulement deux ans après l'introduction du virus en Australie. Cette dernière entraîne des signes cliniques très polymorphes sur les lapins de laboratoire avec une moindre mortalité ainsi que quelques signes de myxomatose sur les lapins sauvages et ce, pas de manière constante.

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

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

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

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

En situation épizootique, au cours desquelles la pression virale est forte, seuls les lapins les plus résistants survivent ce qui permet alors leur sélection et la transmission de cette résistance à leur descendance ; ce phénomène est indissociable de l'atténuation des souches virales. L'apparition de ces lignées résistantes entraîne par la suite une recrudescence des souches de virulence élevée, notamment de grade II, en Australie (Edmonds et *al.*, 1975) puis en Grande Bretagne (Ross et Sanders, 1987). En effet, ce phénomène favorise la transmission vectorielle de souches virulentes qui entraînent, chez les lapins résistants, des formes cliniques subaiguës avec un titre viral cutané et un temps moyen de survie suffisants pour contaminer les vecteurs.

L'épizootie suivante sélectionne de la même façon des lapins résistants et l'évolution globale de la population cunicole se fait vers une plus grande résistance à la maladie.

D'un autre côté, la pathogénicité d'un virus a été étudiée et traduite de façon mathématique ; elle est notée sous la forme d'un taux R_0 (Anderson et May, 1991). R_0 est ainsi écrit sous la forme suivante :

$$R_0 = \text{infections secondaires d'un hôte infecté} / \text{taux de mortalité et de guérison}$$

Bremermann et Thieme (1989) montrent que les pathogènes qui permettent d'obtenir un taux maximal possèdent un avantage vis-à-vis d'un autre pathogène.

Ainsi dans le système de co evolution, cette équation montre que le pathogène possède deux moyens de réussir ; en effet, pour que R_0 soit maximal, soit le numérateur doit être maximal ce qui correspond à un pathogène facilement transmissible, soit le dénominateur doit être le plus bas possible c'est-à-dire que la souche virale doit posséder une faible virulence. Ceci montre qu'il existe une relation étroite entre la transmission, la virulence et l'avantage acquis par une souche de virus.

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

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

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE

I. OBJECTIFS ET GRANDES ETAPES

Cette étude a pour but l'isolement et l'étude du pouvoir pathogène de différentes souches de virus myxomateux, réalisée à partir de prélèvements pratiqués sur des lapins cliniquement atteints de la myxomatose, issus d'élevages intensifs de l'ouest de la France.

Ce travail a suivi une méthodologie classique :

A. VERIFICATION DE LA PRESENCE EFFECTIVE DE VIRUS DANS LES ECHANTILLONS REÇUS

A partir des prélèvements reçus, on réalise un protocole d'extraction et d'amplification d'ADN (digestion tissulaire, extraction d'ADN, PCR, électrophorèse sur gel d'agarose) afin de déterminer les échantillons qui contiennent effectivement du virus myxomateux.

Il en ressort que dans chaque élevage prélevé, il y a au moins un échantillon positif, soit potentiellement 12 souches différentes de virus.

B. ISOLEMENT VIRAL EN CULTURES CELLULAIRES

A partir des échantillons trouvés positifs dans l'étape précédente, on choisit un échantillon positif par élevage afin de l'isoler en culture cellulaire. Les virus isolés sont amplifiés et titrés avant l'inoculation aux lapins.

C. ETUDE IN VIVO DE LA PATHOGENICITE DES SOUCHES ISOLEES

On inocule à des lapins une quantité connue de virus myxomateux obtenu à partir des souches isolées précédemment. On observe ensuite l'apparition des signes cliniques afin de les grader et ainsi de caractériser le pouvoir pathogène des souches virales étudiées.

II. MATERIEL ET METHODE

A. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les échantillons sont issus de 13 élevages différents de l'ouest de la France, suivis par le Cabinet Labovet; ce sont des prélèvements tels que des oreilles, des bouts de nez, de paupières ou des morceaux de la région ano génitale, réalisés sur des lapins présentant des symptômes correspondant à ceux de la myxomatose.

Puis on vérifie la présence effective du virus myxomateux dans ces échantillons par PCR uniquement sur des morceaux de paupières, ce qui représente 79 échantillons à tester.

B. EXTRACTION D'ADN

Elle est réalisée grâce au kit « high pure PCR template (Roche) selon le protocole proposé par le fournisseur. Pour 25-50 mg de tissus (on utilise en priorité des morceaux de paupières de lapins apportés sinon des échantillons de narines) :

200 μ L de tampon de lyse de tissu sont mélangés au tissu et à 40 μ L de protéinase K, puis laissés à incuber toute la nuit à 55°C. Après ajout d'un tampon dit « binding » et d'isopropanol, l'ADN est fixé sur un filtre et purifié après plusieurs étapes de lavage et une étape d'élution.

C. AMPLIFICATION PAR POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)

On prépare un mélange (mix) qui sera réparti dans les tubes de PCR, auxquels sera ajouté l'ADN, comme suit : Préparation du MIX PCR pour 250 μ L soit 10 tubes PCR (20 μ L de mix + 5 μ L d'ADN) :

H ₂ O ultra pure qsp	185.5 μ L
Tampon 10 X (MgCl ₂)	+ 25 μ L
Amorces TK 5'	+ 12.5 μ L
Amorces TK 3'	+ 12.5 μ L
dNTP 40X (0.5 mM)	+ 12.5 μ L
TAQ polymérase (5U / μ l)	+ 2 μ L
	<hr/>
	= 250 μ L

Les séquences des amorces sont les suivantes :

TK 5' : ggtgttgataaggaagttacg

TK 3' : gaggtcgctgctcggagacg

On prépare toujours un MIX pour notre nombre d'échantillons auxquels on ajoute le témoin positif et le témoin négatif. Ici on utilise la souche T1 comme témoin positif et de l'eau pour le témoin négatif.

Puis on choisit le programme PCR comme suit :

94°C pendant 5 minutes, qui correspond à l'étape de dénaturation des brins d'ADN

Puis les 35 cycles commencent avec :

94°C pendant 30 secondes,

52°C pendant 30 secondes, qui correspond à l'étape d'hybridation des amorces sur l'ADN,

72°C pendant 30 secondes, qui correspond à l'étape d'élongation

Enfin, une dernière étape de 72°C pendant 7 minutes,

D. ELECTROPHORESE HORIZONTALE D'ADN

L'électrophorèse horizontale d'ADN est une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % dilué en tampon TBE (tris-Borate-EDTA) 1 X. Après fusion au micro onde, on ajoute un intercalant d'ADN, le SYBERSAFE, à raison de 1/10 000 (1 µL pour 10 mL de gel). La solution est disposée sur un support plastique contenant un peigne afin de délimiter les futurs puits dans lesquels seront introduits les échantillons. Le gel est laissé à refroidir à l'abri de la lumière.

Les échantillons d'ADN sont préparés avec un tampon de charge 10 X (200 mM d'EDTA, 50 % de glycérol, 0.2 % de bleu de bromophénol). Puis les échantillons ainsi préparés sont chargés dans les puits du gel ; un des puits est réservé au marqueur de poids moléculaire (1 kb Invitrogen).

La migration dure environ 1 h 30 heures avec un voltage de 85 V et un ampérage de 180 mA puis le gel est photographié sur une table UV.

L'électrophorèse a pour rôle dans notre étude de nous indiquer la taille ou poids moléculaire du matériel et ainsi de savoir si ce dernier est bien issu du virus myxomateux, c'est-à-dire si l'échantillon de départ contenait ou non du virus.

E. ISOLEMENT DES VIRUS EN CULTURE CELLULAIRE

Nous avons choisi dans notre étude d'isoler les virus sur des cellules de reins de lapins, à savoir les cellules RK13, à partir de paupières.

- Les échantillons de paupières sont coupés et le tissu conjonctif récupéré (racler avec un scalpel) en veillant à bien écarter les poils ;
- on saupoudre avec du sable de Fontainebleau et on broie à l'aide d'un mortier et d'un pilon ;
- on ajoute l'équivalent poids-poids de milieu (optiMEM-AB soit de l'optiMEM additionné de pénicilline 100 U / ml, streptomycine 100% g / ml et amphotéricine B 1 µg / ml) et on poursuit le broyage ;
- on effectue un lavage avec une quantité équivalente de milieu optiMEM-AB ;
- on centrifuge 10 minutes à 2 000 rpm et on récupère le surnageant ;
- on dépose 0.5 ml de surnageant sur des cellules RK13 (boîte de culture à 6 puits)
 - un surnageant dilué au 1/2 (250 µL de surnageant + 250 µL de milieu optiMEM-AB)
 - un surnageant dilué au 1/10 (50 µL de surnageant + 450 µL de milieu optiMEM-AB) ;
- on dépose 0.5ml de milieu optiMEM AB sur les cellules (témoin) ;
- on laisse adsorber pendant 2 heures à 37°C dans une étuve à CO₂ en agitant de temps en temps (toutes les 5 minutes pendant le premier quart d'heure puis toutes les 15 minutes) ;
- on enlève l'inoculum ;
- on lave trois fois avec du milieu optiMEM AB (soit 1 ml de milieu par lavage) ;
- on ajoute 2ml de milieu de maintien (optiMEM AB + 2 % de sérum de veau foetal) ;

-on laisse incuber à 37°C et on observe quotidiennement au microscope pour détection éventuelle d'un effet cytopathogène ; on congèle après une semaine d'incubation maximum.

Après incubation, l'action du virus sur les cellules est observée directement au microscope ; les résultats se traduisent par un effet cytopathogène, c'est-à-dire la formation de plages décollées de la couche monocellulaire adhérente aux parois.

Les effets cytopathogènes du virus myxomateux sur les cellules épithéliales de rein RK 13 se résument par une perte de l'aspect typique de l'épithélium et un détachement progressif des cellules infectées du tapis cellulaire. Les cellules s'arrondissent puis se rétractent en amas et enfin se désolidarisent du tapis cellulaire basal ; au final elles sont lysées par le virus.

On réalise alors le deuxième passage sur cellule RK 13 dans des boîtes de culture de type F25 :

- on décongèle et récongèle trois fois pendant 15 minutes minimum à -80°
- on récupère 1 ml de la suspension de cellules infectées obtenue (on choisit soit l'échantillon dilué au 1/2 soit au 1/10 en fonction de la quantité de virus mis en évidence) et on fait un deuxième passage sur cellules RK 13, cette fois ci dans des F₂₅ (le lavage se fait avec 5 ml de milieu optiMEM AB et on ajoute 6 ml de milieu de maintien final optiMEM AB +2% de SVF) et on observe de la même façon un éventuel effet cytopathogène.

On réalise alors un 3^{ème} passage dans les mêmes conditions que celles du deuxième passage.

F. TITRAGE DU VIRUS

Le dénombrement des plages permet le titrage *in vitro* exprimé en UFP / ml (unité formant plaque par millilitre), calculé selon la formule suivante : $T \text{ (UFP / ml)} = n \times 1/d \times 1/v$ (n étant le nombre de plaque, d la dilution et v le volume de l'échantillon).

On choisit de titrer le virus à partir des dilutions suivantes : 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (cette dernière étant doublée).

1. Dilution des échantillons

-Pour un total de 1 ml,

-100 μ L de l'échantillon + 900 μ L de milieu optiMEM AB \rightarrow dilution 10^{-1}

-100 μ L de la dilution 10^{-1} + 900 μ L de milieu optiMEM AB \rightarrow dilution 10^{-2}

-100 μ L de la dilution 10^{-2} + 900 μ L de milieu optiMEM AB \rightarrow dilution 10^{-3}

-100 μ L de la dilution 10^{-3} + 900 μ L de milieu optiMEM AB \rightarrow dilution 10^{-4}

-on dépose 200 μ L de la dilution choisie sur des cellules RK13 en boîte P6, après avoir enlevé le milieu de maintien

-on laisse adsorber pendant 1 h 30 à 37°C dans une étuve à CO₂ en agitant de temps en temps (toutes les 5 minutes pendant le premier quart d'heure puis toutes les 15 minutes)

-on enlève l'inoculum

-on ajoute 2 ml de milieu de maintien (optiMEM AB + 2 % de sérum de veau foetal)

-on laisse incuber à 37°C, 48 heures

2. Milieu de maintien gélose pour dénombrement de plages de lyse

1- Milieu MEME 2X

MEME 2X (+ pénicilline – Streptomycine) qsp

4 % de SVF

60 μ L / ml de NaHCO₃ à 7.5 %

HEPES 1 M (50 μ L / ml)

2-milieu AGAROSE LM (spécial culture cellulaire)

2 % agarose dans H₂O stérile (spécial culture cellulaire)

Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète

3-mélanger volume à volume 1- et 2-

On obtient un milieu final :

Agarose 1 %,
 MEME 1 X
 SVF 2 %
 NaHCO₃ 30 µL / ml
 HEPES 1 M (25 µL / ml)

Quand le mélange est suffisamment refroidi (entre 37 et 40°C), le couler lentement sur les cellules sans faire de bulles (2 ml par cupule pour une P₆) ; laisser prendre le milieu puis mettre à incuber à 38°C.

G. INOCULATION IN VIVO DU VIRUS

On réalise une prise de sang sur l'artère centrale de l'oreille gauche puis on inocule $5 \cdot 10^{-3}$ UFP / 100 µL d'échantillon par lapin en intradermique sur l'oreille droite. On vérifie par un test systématique (ELISA) sur les sérums ainsi récoltés à J0 la présence ou non d'anticorps anti myxomatose.

On observe les symptômes de façon quotidienne en remplissant le tableau suivant (voir aussi en annexe) :

		Jour		
Myxome	Apparition en jours			
	Forme convexe / plate, circulaire, délimité ou non, régulière ou non			
	Exsudation de 0 à ++++			
	Epiderme intact, nécrosé, ombiliqué, ulcéré			
Généralisation	Nez de 0 à ++++			
	Œil en jours			
	Peau de 0 à ++++			
 amaigrissement				
Taux de mortalité en %				
Temps moyen de survie en j				

Tableau 4 : critères d'observations cliniques

III RESULTATS

A. NATURE ET ORIGINE DES ECHANTILLONS

Les échantillons testés correspondent à des morceaux de paupières de lapins issus de 13 élevages différents de l'ouest de la France, expédiés par le cabinet Labovet. Un numéro est présenté sur chaque feuille accompagnant les échantillons d'un élevage (3133, 38387, LH3194, ...); celui est conservé et une lettre y est ajouté pour chaque échantillon (3133 A, B, C...).

Au total, 79 prélèvements sont testés (les autres correspondent à des morceaux de narines, d'oreille, de région ano génitale).

B. DETECTION DES VIRUS MYXOMATEUX PAR PCR

Les résultats de la présence de virus myxomateux au sein des échantillons choisis sont présentés dans le tableau suivant:

	NUMERO			NUMERO			NUMERO			NUMERO	
			20	BP4083J	+	40	LH4423F	+	60	LH341 3	+
1	3133A	+	21	4204D	+	41	LH3194K	+	61	BP4260H	+
2	3133B	-	22	4204E	+	42	LH3194J	+	62	BP4260F	+
3	3133C	-	23	4204F	+	43	BP4083P	+	63	BP3879G	+
4	3133D	-	24	4204I	+	44	BP4083O	+	64	BP3879H	-
5	38387B	+	25	LH18D	+	45	LH4423E	+	65	BP245A	+
6	38387C	+	26	LH18E	+	46	BP4260M	+	66	BP3879I	+
7	38387D	+	27	LH18F	+	47	BP4260L	+	67	38387A	+
8	38387E	+	28	LH18G	+	48	LH4423D	+	68	LH3082A	+
9	38387F	-	29	BP4083U	+	49	BP4083N	+	69	LH3082B	+
10	38387G	-	30	BP4083Q	-	50	LH341 5	+	70	LH3082C	+
11	BP3879E	+	31	BP4083T	-	51	LH3194F	+	71	LH3082D	+
12	BP3879F	+	32	BP4260G	+	52	LH3194G	-	72	LH3082E	+
13	LH3194E	+	33	BP4260N	+	53	LH3194H	+	73	LH3082F	-
14	LH3194D	+	34	LH341 1	+	54	LH3194I	-	74	LH3082G	-
15	BP4083S	+	35	BP4260I	+	55	LH341 4	+	75	LH3082H	-
16	BP4083I	+	36	BP245B	+	56	BP4083L	+	76	LH3082I	+

17	BP4083R	-	37	LH3194L	+	57	BP4083K	+	77	QQ3176A	-
18	4204A	+	38	BP4260J	+	58	BP4083M	+	78	QQ3176B	-
19	4204B	+	39	BP4260K	+	59	LH341 2	+	79	QQ3176C	-

Tableau 5 : résultats de la présence de virus myxomateux détecté par PCR, les lapins positifs sont notés + et les lapins négatifs –

Ainsi, on obtient 62 prélèvements avec effectivement du virus myxomateux et 17 prélèvements dont le résultat PCR est négatif, ce qui représente 12 élevages sur 13 avec présence d'un foyer myxomateux.

C. ISOLEMENT DES VIRUS EN CULTURE CELLULAIRE

Nous avons choisi les échantillons suivants parmi tous les prélèvements positifs (donc des morceaux de paupières), sur la base d'un échantillon par élevage (un élevage est représenté par un numéro, la lettre qui suit désigne l'échantillon) : parmi les différents échantillons positifs d'un même élevage, nous avons choisis celui dont la bande de migration de l'électrophorèse sur gel d'agarose était la mieux marquée, c'est-à-dire l'échantillon qui semble contenir le plus de virus.

On a ainsi au total 12 échantillons (puisque l'élevage QQ3176 ne contient pas de prélèvements positifs), présentés dans le tableau suivant :

	NUMERO	
1	3133A	+
5	38387B	+
11	BP3879E	+
13	LH3194E	+
15	BP4083S	+
18	4204A	+
25	LH18D	+
32	BP4260G	+
40	LH4423F	+
60	LH341 3	+

65	BP245A	+
68	LH3082A	+

Tableau 6: échantillons choisis pour isolement

Remarque : l'échantillon 3133A étant épuisé, la mise en culture a été tentée à partir de bouts de narine. Aucun virus n'a pu être isolé.

Après trois passages successifs, les virus isolés ont été titrés par la méthode des plages.

Les titres des virus mis en culture sont présentés dans le tableau suivant :

	NUMERO	TITRE en UFP/ml
1	3133A	échec
5	38387B	3.0 10⁶
11	BP3879E	2,8 10⁶
13	LH3194E	> 10⁷
15	BP4083S	2,5 10⁶
18	4204A	1,1 10⁷
25	LH18D	2.11 10⁶
32	BP4260G	1,2 10⁶
40	LH4423F	2 10⁷
60	LH341 3	1,5 10⁶
65	BP245A	5,3 10⁶
68	LH3082A	2.9 10⁶

tableau 7 : titres des virus obtenus après le troisième passage en culture cellulaire

D. INOCULATION IN VIVO DU VIRUS

Cinq virus ont été choisis pour les essais in vivo destinés à définir le pouvoir pathogène des souches circulant actuellement en élevage. Tous les lapins ont été inoculés avec $5 \cdot 10^3$ UFP de virus, préalablement isolé et titré, par voie i.d. (oreille droite).

La répartition des lots (5 lapins initialement) a été la suivante :

Groupe	Virus	Date d'inoculation
1	38387 B	29/10/07
2	LH 3082 A	29/10/07
3	LH 18 D	29/10/07
4	BP 245 A	13/06/08
5	4204 A	13/06/08

Les lapins ont ensuite été observés quotidiennement. Trois lapins (un du lot 5 et deux lapins du lot 4) sont morts rapidement après inoculation pour des raisons indépendantes de l'expérience (problèmes digestifs).

De façon générale, on observe une évolution de la maladie correspondant à la forme amyxomateuse.

Lésions cutanées

Sur l'oreille, au point d'inoculation apparaît en très peu de temps, en environ 2 - 3 jours après inoculation un érythème. Celui-ci s'étend, puis l'oreille s'épaissit chez 54.5 % des lapins (12/22) en 14.8 jours en moyenne (de 9 à 31 jours), et on observe une lésion plate, légèrement surélevée, assez délimitée. Cette lésion se pigmente en marron clair.



Photo 1 : lésions plates, légèrement surélevées, délimités au niveau du pavillon de l'oreille

On observe chez 36 % des individus (8/22) un épaissement de la base des oreilles qui apparaît en 10.5 jours en moyenne (de 9 à 17 jours) et chez 13.6 % des lapins (3/22) une dépilation de la base des oreilles en 16.7 jours en moyenne (de 16 à 18 jours).

Un oedème apparaît chez tous les lapins (22/22) en 10.4 jours environ (de 10 à 11 jours), l'oreille est chaude, rouge et légèrement épaissie.

De, même, de nouvelles lésions sont observées d'abord en périphérie du point d'inoculation, toujours sur l'oreille droite, puis d'autres sur la deuxième oreille : des lésions secondaires (assez délimitées, légèrement surélevées) apparaissent en 10.8 jours (de 10 à 11 jours) chez 59.1% des lapins (13/22) ; puis des croûtes se forment en 27.1 jours (de 18 à 35) chez 50 % des lapins (11/22).



Photo 2 : lésions secondaires sur la deuxième oreille : plates, délimitées mais légèrement surélevées

Des plaques blanchâtres sur la face interne des pavillons des oreilles sont vues sur 22.7 % des lapins en 23.5 jours en moyenne (de 21 à 29 jours).

Signes respiratoires

Un épiphora apparaît chez 90.9 % des lapins (20/22) en 10.1 jours en moyenne (de 8 à 14 jours). Il est au départ peu important et devient progressivement abondant et s'épaissit à cause de la surinfection bactérienne ; on observe alors de la chassie puis des croûtes chez 45.5 % des lapins (10/22) en 26.3 jours (de 21 à 35 jours) qui gênent l'ouverture palpébrale. Ainsi 95.5% des lapins voient leur yeux se fermer au cours de l'évolution de la maladie en 17.5 jours en moyenne (de 12 à 25 jours).

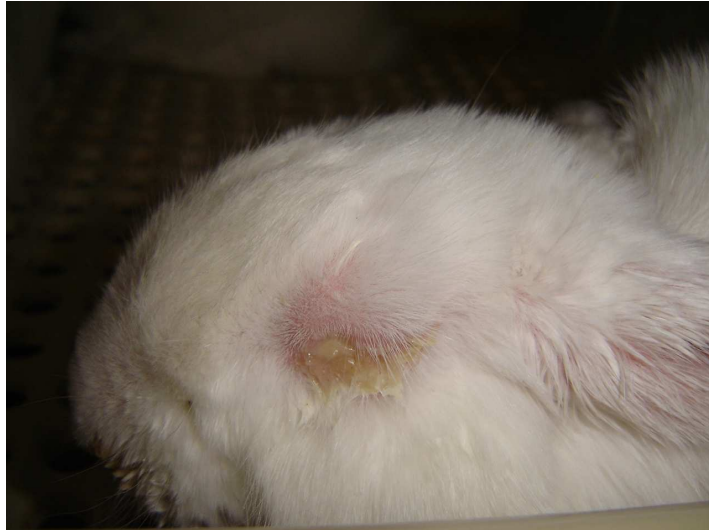


Photo 3 : œil avec de la chassie importante

18.2 % des lapins (4/22) ont des écoulements hémorragiques en plus, apparus en 22.8 jours (de 18 à 25 jours).

Parallèlement, une blépharo-conjonctivite est observée chez 95.5 % des lapins (21/22) ; celle-ci apparaît en 8.6 jours (de 7 à 10 jours).



Photo 4 : blépharo-conjonctivite observée sur un lapin

Un œdème palpébral est quant à lui observé chez 72.7 % des lapins (16/22), apparus en 16.6 jours en moyenne (soit de 11 à 23 jours).

Chez 31.8 % des lapins (soit 7/22), une dépilation périoculaire (et périnasale pour 2 lapins) est visible et apparaît en 17.9 jours (de 14 à 28 jours).



Photo 5 : dépilation périoculaire et périnasale

De même, des éternuements sont observés chez 50 % des lapins (11/22) assez rapidement après l'inoculation du virus, à savoir en 8.1 jours (de 7 à 9 jours).

Puis des écoulements nasaux apparaissent chez 95.5 % des lapins (21/22) en 10.3 jours (de 8 à 14 jours) ; ceux-ci sont d'abord clairs et peu abondants puis s'épaississent et finissent par sécher formant de grosses croûtes chez 77.3 % des lapins (17/22) en 16.5 jours (de 14 à 22 jours).



Photo 6 : mouchage chez un lapin avec présence d'un écoulement épais et purulent avec des croûtes

Une dyspnée importante se met alors progressivement en place chez 50 % des lapins (11/22) dès le 23.3^{ème} jour (de 8 à 31 jours) ; les individus fortement atteints se mettent en position d'orthopnée, les antérieurs écartés, le cou tendu et le nez en l'air.



Photo 7 : animal en position d'orthopnée

Des écoulements séro-hémorragiques sont aussi observés chez 27.3 % des lapins (6/22) en moyenne en 20.2 jours (de 18 à 25 jours).

Signes généraux

Les lapins voient leur appétit diminuer, ne sentant plus les granulés qui leur sont proposés. 90.9% maigrissent (21/22) (appréciation visuelle) en 15.5 jours en moyenne (soit de 12 à 18 jours), s'affaiblissent et 81.8 % des lapins (18/22) finissent par mourir en 27.7 jours (avec un écart de 16 à 46 jours), ou alors certains se réalimentent progressivement et se rétablissent (18.2 % des lapins, soit 4 lapins euthanasiés en fin de manipulation au 40^{ème} jour après inoculation).

Parallèlement à l'amaigrissement, on observe chez 40.1 % des individus (9/22) des oreilles pendantes ; ce symptôme est noté le 15.6^{ème} jour en moyenne (de 10 à 24 jours).



Photo 8 : animal avec les oreilles pendantes, une chassie marquée (les yeux sont collés et fermés) et un écoulement nasal purulent

Chez 3 individus (soit 13.6 %), on note une diarrhée vers le 25^{ème} jour (de 22 à 31 jours).

On observe aussi sur 50 % des lapins (11/22) un œdème de la région ano-génitale avec parfois des lésions croûteuses et des ulcères. Ces lésions apparaissent en 23.3 jours (de 14 à 35 jours).



Photo 9 : œdème anogénital avec présence de croûtes

Ainsi, on a bien des lésions typiques de myxomatose amygomateuse bien que des « nodules » soient observés chez 18.2 % des lapins (4/22) vers le 22^{ème} jour (de 16 à 28 jours) et de véritables myxomes chez 36.4 % des individus (9/22) en 24.8 jours (de 22 à 28 jours). Dans

notre étude, 18 individus présentent des signes respiratoires sans myxome soit 81.8 % des lapins.

Les virus étudiés provoquent en moyenne une mortalité de 81.8 % des individus (soit 18/22 lapins) avec un temps moyen de survie (TMS) de 27.7 jours (avec un intervalle de 16 à 46 jours) : on a donc des virus situés entre le grade III (TMS entre 16 et 28 jours mais taux de mortalité de 90 %) et le grade IV (taux de mortalité de 60 à 70 % et un TMS de 28 à 50 jours) mais plus proche d'un grade III.

On est donc en présence actuellement de virus de grade III à IV de type respiratoire dans l'ouest de la France.

Le tableau suivant synthétise les données cliniques pour chaque virus testé :

SOUCHES		LH 18D	LH 3082A	38387 B	BP 245A	4204 A
jour d'inoculation (j0)		29/10/07	29/10/07	29/10/07	13/06/08	13/06/08
Myxome primaire	Apparition en jours	j8 (5/5)	J8 (5/5)	J8 (5/5)		J24 (1/4)
	Forme : convexe / plate, circulaire, délimité ou non, régulière ou non	Non délimité, plat Délimitation : j15 (4/5) Œdème base oreilles : j23 (4/5)	Plats (5/5) et non délimités (5/5) Délimitation à j15 (4/5) Erythème à j2 (5/5) Epaississement oreilles j10 (5/5)	Plats (5/5), délimités (4/5) Erythème à j2 (5/5) Epaississement oreilles j14 (2/5)	Erythème j7 (3/3) Epaississement oreilles j11 (2/3)	Erythème j7 (4/4) Epaississement oreille j10 (4/4)
	Exsudation :- = absence, + = présence	-	-	-	-	-
	Epiderme intact, nécrosé, ombiliqué, ulcéré	Croutelles j29 (1/5)	Croûtes à j31 (2/5) Plaques blanchâtres à j29 (1/5)	Croûtes à j23 (2/5) et plaques blanchâtres à j26 (1/5)	Croûtes j23 (2/3)	Plaques blanches à j24 (1/4) Croûtes j35 (1/4)
Généralisation	Nez : apparition en j écoulement absent (0), séreux (+), muqueux (++) , purulent (+++)	+ à J9 (5/5) Croûtes à j15 (5/5) Eternuements j9 (4/5)	+ à j8 (5/5) Croûtes à j18 (5/5) Eternuements à j8 (4/5)	+ à j18 (5/5) Croûtes à j15 (5/5) Eternuements à j8 (3/5)	+ à j12 (3/3) Croûtes à j21 (1/3) Eternuements (0/3)	+ à j14 (4/4) Croûtes à j18 (1/4) et écoulements hémorragiques à j18 (2/4)
	Œil apparition en jours Écoulement absent (0), séreux (+), muqueux (++) , purulent (+++)	+ à j8 (5/5) Blépharoconjonctivite à j9 (5/5)	+ à j8 (5/5) Blépharoconjonctivite à j9 (5/5)	+ à j8 (5/5) Blépharoconjonctivite à j11 (4/5)	+ à j7 (3/3) Blépharoconjonctivite à j8 (3/3)	+ à j7 (4/4) Blépharoconjonctivite à j7 (4/4)
	Peau (myxome secondaire) Apparition en jours Localisation, Nombre, Forme épiderme (intact, nécrosé, ulcéré)	Myxomes Iir oreille gauche (4/5) à j11, et région anogénitale (3/5) à j22	Myxomes Iir à j11 sur oreille gauche (5/5), à j20 sur région anogénitale (3/5) et à j25 sur arcade gauche (1/5)	Myxomes Iir à j11 oreille gauche (3/5), à j22 région anogénitale (1/5) et j23 sur arcade sourcilière (1/5)	Myxomes Iir oreille droite à j28 (1/3), oreille gauche à j18 (1/3) et région anogénitale à j25 (2/3)	Myxomes Iir région anogénitale à j35 (1/4)
	Général : amaigrissement	j16 (5/5)	J16 (5/5)	J17 (5/5)	J14 (3/3)	J14 (4/4)
Taux de mortalité en %		100 %	80%	80%	66.6%	75%
Temps de survie en j		J 29	J30	J30	J24	J25

Tableau 8 : résumé des principales observations cliniques des différentes souches virales testées in vivo

Discussion et conclusion

Nous avons isolé 11 souches de virus myxomateux à partir de prélèvements réalisés dans des élevages de lapins de l'ouest de la France. Cinq de ces souches ont été caractérisées cliniquement.

La myxomatose observée après inoculation de ces cinq souches de terrain issues d'élevages français différents, ne se manifeste pas par des signes typiques de myxomatose mais essentiellement des signes respiratoires avec un mouchage important associé à de la blépharoconjonctivite.

Les résultats d'autres études confortent ces résultats : la forme amyxomateuse a été mise en évidence dans des élevages en France (Brun and al, 1981, Joubert et al, 1982) ainsi qu'en Belgique (Marlier et Vindervogel, 1996). Elle a également été observée en 2003 en Europe centrale chez des lapins vaccinés avec un vaccin contenant une souche du virus du fibrome de Shope (Farsang et al, 2003).

Existe-t-il dès lors une évolution de la forme clinique de la myxomatose au cours des dernières années avec une prépondérance de la forme amyxomateuse par rapport à la forme typique nodulaire, au moins en élevage industriel ?

Deux hypothèses ont été proposées quant à l'origine de cette forme atypique :

-elle serait due à l'introduction de souches californiennes en Europe, les lapins européens présentant ce type de symptômes lorsqu'ils sont infectés par les souches californiennes (Farsang et al, 2003) ;

-elle pourrait être due à la mutation de souches d'origine sud américaine en Europe au cours des 50 dernières années (Arthur et Louzis, 1988)

Dans ce cas, des modifications génomiques pourraient être identifiées et éventuellement être déterminantes dans l'expression clinique.

La souche BP04/2001, isolée en 2003 en Europe centrale, donnant une clinique de myxomatose atypique est dépourvue d'une protéine de 200 kDa environ. Cette perte par rapport aux souches classiques pourrait expliquer les différences phénotypiques observées.

L'absence de cette protéine pourrait être due à la délétion d'un gène ou encore à la présence d'un codon stop interne. Cependant, il faudrait des études plus approfondies pour savoir ce qu'il en est vraiment.

L'hypothèse selon laquelle il existerait un lien entre la souche vaccinale SG 33 et l'apparition de cette forme atypique (Brun et al, 1981) semble peu crédible dans la mesure où les lapins sauvages peuvent aussi exprimer les signes caractéristiques de myxomatose amyxomateuse, et cette forme clinique est aussi apparue dans des pays ne commercialisant pas le SG33 (Belgique).

Cette forme est elle peut être fortement représentée depuis de nombreuses années, mais plus difficile à mettre en évidence et de ce fait moins étudiée que la forme typique cliniquement facile à identifier.

En effet, cette forme atypique marquée par des signes respiratoires (blépharoconjonctivite, mouchage, ..), digestifs ainsi que des troubles de la reproduction, notamment de la fertilité chez les mâles, exprime des signes non spécifiques de la myxomatose. Il faut ainsi avoir recours à des analyses de laboratoire (sérologie par ELISA ou recherche de virus) pour la mettre en évidence. Les données épidémiologiques concernant cette forme n'en sont que peu nombreuses.

Entre 1978 et 1980, Deutrich et Hausburg (1989) montrent que la proportion d'élevages affectés par la myxomatose (avec présence de signes cliniques typiques) est de 13,5%. Sur la période de janvier 1986 à décembre 1990, Rosell et al. (1992) trouvent quant à eux 13,0 à 22.8% des élevages touchés. Cependant, ces études portent sur les formes typiques de myxomatose, la mise en évidence de l'infection se basant sur les lésions cutanées typiques et de ce fait plus faciles à observer.

En 1996, selon Ghram et al. (1996), 54,9% des élevages possèdent des individus avec des anticorps anti- virus myxomateux (mise en évidence par fixation du complément) et parmi les élevages positifs, seuls 28% ont des lapins avec des signes cliniques typiques.

Par contre selon Marlier et al. (2000), 100% des élevages possèdent des individus avec des anticorps antimyxomateux (méthode ELISA). De plus, cette dernière étude montre que lorsqu'il existe des signes respiratoires ou des troubles digestifs au sein des élevages, la séroprévalence de la myxomatose est plus élevée. Ces mêmes auteurs ont aussi montré que

(Marlier et al, 2000) le virus de la myxomatose pouvait être isolé chez 10% des lapins qui possédaient des lésions pulmonaires, et que 44% des lapins avec des lésions pulmonaires souffraient de myxomatose subclinique.

Lorsque l'on considère des élevages totalement ou partiellement de plein air, la séroprévalence est plus importante, ceci pouvant s'expliquer par la présence de vecteurs type moustique ou puces.

Le plus souvent, les lapins issus des élevages industriels sont censés être vaccinés de façon correcte ; alors comment la myxomatose peut-elle circuler au sein de ces élevages ?

Dans une étude réalisée en Grèce (Kristas et al, 2008), pays indemne depuis au moins 30 ans, et dans lequel les lapins d'élevages autochtones ne sont pas vaccinés contre la myxomatose, la présence de cette maladie a été confirmée au sein de deux élevages ayant un fournisseur commun. Ce dernier importait des lapins vaccinés. La vaccination, basée sur l'emploi de vaccins hétérologues (pour ne pas interférer avec l'immunité maternelle lors du jeune âge des lapereaux) puis homologues (immunité résiduelle plus longue) de souche Borghi confère une protection de 6 à 9 mois aux lapins livrés. Cependant, un défaut d'immunité ou un animal stressé ou affaibli durant la vaccination ne sera par la suite pas correctement protégé et pourra être infecté, éventuellement de façon subclinique.

Nous savons également que la vaccination n'empêche pas la contamination par des souches de haute virulence (Marlier et al., 2000).

Kristas et collaborateurs ont observé une forte mortalité chez les lapins, ce qui permet dès lors d'écarter la première hypothèse selon laquelle les individus n'étaient pas correctement vaccinés à cause d'un stress au moment de l'injection vaccinale. En effet, si tel était le cas, on observerait une plus faible mortalité des lapins, correspondant aux quelques individus ayant subis un stress lors de la vaccination. D'autre part, les lapins ne sont pas morts de suite mais vers l'âge de 5,5 mois lorsque l'immunité vaccinale diminue, ce qui montre encore une fois que la vaccination ne semble pas être défailante. Il a aussi été observé que les femelles ayant mis bas, c'est à dire dont l'immunité est plus faible, sont plus touchées et meurent quelques temps après ; les femelles vaccinées quant à elles, s'infectent plus tard, vers le moment où l'immunité vaccinale résiduelle est faible. Ainsi cette vaccination semble être relativement efficace.

Dans une autre étude (Farsang et al, 2003), les lapins vaccinés avec un vaccin homologue semblent protégés contre la forme atypique de la myxomatose. On observe en effet 75% de protection contre l'infection intradermique au niveau de la paupière et 100% d'efficacité pour des lapins infectés avec aérosols.

Ainsi, il existerait une protection contre cette forme atypique lors de l'emploi de vaccins homologues.

Par contre le vaccin hétérologue, utilisant le virus du fibrome de Shope semble quant à lui non efficace contre la myxomatose amyxomateuse (Farsang et al, 2003).

Dans une troisième étude (D. Marlier, 2000), les lapins vaccinés uniquement avec un vaccin hétérologue puis infectés avec une souche virale de terrain entraînant des signes atypiques, réagissent comme les lapins témoins non vaccinés, c'est-à-dire développent des oedèmes au niveau du point d'infection (oreilles), puis au niveau des conjonctives palpébrales, suivie d'une inflammation et de photophobie. Enfin, un œdème aigu des organes génitaux ainsi que la dyspnée se déclarent.

A l'inverse, les lapins vaccinés dans un premier temps avec un vaccin hétérologue puis homologue (utilisant la souche SG33) possèdent des lésions plus petites et localisées (surtout au niveau des oreilles) et guérissent progressivement. Cependant, il n'existe pas de différence en ce qui concerne la rapidité d'apparition des symptômes entre les lapins vaccinés à l'aide d'un vaccin hétérologue et ceux vaccinés avec les vaccins hétérologues puis homologues.

Ainsi la protection conférée par la double vaccination (hétérologue puis homologue) semble être efficace contrairement à celle induite par la vaccination hétérologue seule.

De plus, la vaccination hétérologue puis homologue diminue l'excrétion virale naso-conjonctivale à la fois dans la phase aiguë et chronique de la maladie contrairement à la vaccination hétérologue qui ne diminue cette excrétion que lors de la phase chronique. Il a été ainsi retrouvé du virus amyxomateux 100 jours après l'infection.

Ajoutons, que la vaccination hétérologue et homologue est la seule à diminuer l'excrétion testiculaire c'est-à-dire qu'il existe moins de porteurs asymptomatiques (excréteurs par les voies génitales) parmi les reproducteurs mâles vaccinés de cette façon.

Ainsi, les lapins n'ayant subi que la vaccination hétérologue possèdent une excrétion virale plus importante à la fois dans les phases aiguës et chroniques de la maladie et voient une partie de leurs reproducteurs mâles excréteurs testiculaires. De ce fait, ces lapins (mais aussi en partie ceux vaccinés avec un vaccin homologue) guéris de myxomatose atypique, sont des porteurs asymptomatiques potentiels et peuvent ainsi contaminer des élevages.

Une autre question se pose alors, à savoir comment la maladie se transmet au sein des élevages intensifs dans lesquels il n'y a pas d'arthropodes susceptibles de servir de vecteurs mécaniques entre les individus ?

Nous savons que les souches classiques de virus myxomateux peuvent se transmettre par contact direct (muqueuse à muqueuse) entre lapins.

Dans l'étude précédemment citée (Farsang et al, 2003), une expérience montre qu'un lapin témoin sain mis en contact avec des lapins au préalable infectés par des aérosols contenant du virus de la myxomatose atypique, dans un milieu clos (sans vecteurs arthropodes) développe la maladie.

Aussi peut on conclure que la maladie peut se répandre de lapins en lapins, sans aide de vecteurs.

De même, d'autres travaux (Marlier et al, 1999 ; Chapuis et al, 1994) confortent cette observation : à partir d'échantillons de sécrétions nasales et conjonctivales, du virus myxomateux a été isolé puis a permis l'infection de lapins qui ont développé une myxomatose de forme atypique.

Il est même possible de contaminer des lapins sentinelles en l'absence de contact direct avec des lapins préalablement infectés avec une souche atypique (cages voisines) (Bertagnoli, communication personnelle).

Des travaux complémentaires sont en cours au sein de l'équipe IHVV de l'UMR 1225 pour tenter de mieux comprendre certains aspects cliniques et épidémiologiques de ces formes amyxomateuses, en particulier le séquençage complet du génome de la souche LH18D isolée lors de cette étude.

Annexes

Annexe 1 : tableau type pour les observations cliniques quotidiennes

Référence protocole expérimental : PX-ANI-A2-12

Rédacteur du tableau : Laura Chivallier

JOUR					
J0 = jour d'inoculation					
Myxome	Apparition en jours				
	Forme : convexe / plate, circulaire, délimité ou non, régulière ou non				
	Exsudation :- = absence, + = présence				
	Epiderme intact, nécrosé, ombiliqué, ulcéré				
Généralisation	Nez : apparition en j écoulement absent (0), séreux (+), muqueux (++) purulent (+++)				
	Œil apparition en jours Écoulement absent (0), séreux (+), muqueux (++) purulent (+++)				
	Peau (myxome secondaire) Apparition en jours Localisation Nombre Forme épiderme (intact, nécrosé, ulcéré)				
	Général : amaigrissement				
	Taux de mortalité en %				
Temps de survie en j					

Références Bibliographiques

- ANDREWES CH, THOMPSON HV, MANSI W.

Myxomatosis: present position and future prospects in Great Britain.
Nature. 1959, **184**, 1179-80.

- ARTHUR C.P., LOUZIS C.

La myxomatose du lapin en France : une revue.
Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1988, **7**

- BARRY M, LEE SF, BOSHKOV L, MCFADDEN G.

Myxoma virus induces extensive CD4 downregulation and dissociation of p56lck in infected rabbit CD4+ T lymphocytes.
J Virol. 1995, **69**, 5243-51.

- BERTAGNOLI S., GELFI J., LE GALL G., BOILLETOT E., VAUTHEROT J.F.,
RASSCHAERT D., LAURENT S., PETIT F., BOUCRZUT-BARALON C., MILON A.

Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein.
Journal of virology, 1996, **vol 70 n°8**, 5061-5066

- BEST SM, KERR PJ.

Coevolution of host and virus: the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits.
Virology. 2000, **267**, 36-48.

- BLOCK W, UPTON C, MCFADDEN G.

Tumorigenic poxviruses: genomic organization of malignant rabbit virus, a recombinant between Shope fibroma virus and myxoma virus.
Virology. 1985, **140**, 113-24

- BOSHKOV LK, MACEN JL, MCFADDEN G.

Virus-induced loss of class I MHC antigens from the surface of cells infected with myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus.

J Immunol. 1992, **148**, 881-7.

- BREMERMAN HJ, THIEME HR.

A competitive exclusion principle for pathogen virulence.

J Math Biol. 1989;**27**, 179-90.

- BRUN A., SAURAT P., GILBERT Y., GODARD A., BOUQUET J.F.

Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose.

Revue Méd. vét.,1981, **132** (8-9)

- BULLER RM, PALUMBO GJ.

Poxvirus pathogenesis.

Microbiol Rev. 1991, **55**, 80-122.

- BULLER RM, CHAKRABARTI S, MOSS B, FREDRICKSON T.

Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF.

Virology. 1988, **164**, 182-92

- CAMUS-BOUCLAINVILLE, C., FIETTE, L., BOUCHIHA, S., PIGNOLET, B., COUNOR, D., FILIPE, C., GELFI, J. & MESSUD-PETIT, F.

A virulence factor of myxoma virus colocalizes with NF-kappaB in the nucleus and interferes with inflammation.

J Virol ,2004, **78**, 2510-2516.

- CASTELLINI, C., CENCI, T., SCUOTA, S., LATTIOLI, P., BATTAGLINI, M.

La myxomatose: implications possibles sur la pratique de l'insemination artificielle.

6ème Journées de la Recherche Cunicole en France, Paris, 1994., 9-17.

- CHANG A, METZ DH.

Further investigations on the mode of entry of vaccinia virus into cells.

J Gen Virol., 1976, **32**, 275-82

- CLARINGTON P.J., SOBEY W.R.
Brit. J. exp. Path, 1955, **36**, 573
- COLLINS EJ, FRELINGER JA.
 Altered peptide ligand design: altering immune responses to class I MHC/peptide complexes.
Immunol Rev. 1998, **163**, 151-60.
- CUDMORE S, COSSART P, GRIFFITHS G, WAY M.
 Actin-based motility of vaccinia virus.
Nature, 1995, **378**, :636-8
- DALES S, KAJIOKA R.
 The cycle of multiplication of vaccinia virus in earle's strain L cells. I Uptake and penetration.
Virology. 1964, **24**,:278-94.
- EDMONDS JW, NOLAN IF, SHEPHERD RC, GOCS A.
 Myxomatosis: the virulence of field strains of myxoma virus in a population of wild rabbits
 (*Oryctolagus cuniculus* L.) with high resistance to myxomatosis.
J Hyg (Lond). 1975, **74**, 417-8.
- ESTADIEU V.
 Contribution à l'étude de la protection de lapereaux contre la myxomatose.
 Essai comparatif de primovaccination a six semaines avec deux vaccins homologues
these vet Toulouse, 1991, 1-32
- FARSANG A., MAKRANSZKI L., DOBOS-KOVACS M., VIRAG G., FABIAN K.,
 BARNA T., KULCSAR G., KUCSERA L, VETESI F.
 Occurrence of atypical myxomatosis in central Europe : clinical and virological examinations
Acta veterinaria Hungarica , 2003, **51** (4), 493-501
- FENNER F., FANTINI B.
 Biological control of vertebrate pests. The history of myxomatosis-an experiment in
 evolution,

CABI Publishing, Wallingfordb- Oxon 1999

- FENNER F., MARSHALL I.D.

A comparison of the virulence for European rabbits of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia , Europe and America
1957, **55**, 149-151

- FENNER F., RATCLIFFE F.N.

Myxomatosis

(Ed.) *Cambridge University Press, Cambridge, 1965*

- FENNER F, WOODROOFE GM.

The genomes

The pathogenesis of infectious myxomatosis; the mechanism of infection and the immunological response in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).

Br J Exp Pathol. 1953, **34**, 400-11

- FENNER F, MARSHALL ID

Passive immunity in myxomatosis of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): the protection conferred on kittens born by immune does.

J Hyg (Lond). 1954, **52**, 321-36.

- FENNER F., RATCLIFFE F.N.

Myxomatosis

Cambridge University Press, 1965

- FENNER F, DAY MF, WOODROOFE GM.

Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes.

J Hyg (Lond). 1956, **54**, 284-303

- FENNER F., ROSS J.

Myxomatosis. In “The European Rabbit. The history and biology of a successful colonizer”.

EdsH.V. Thompson, C.M. King, Oxford University Press, Oxford, UK, 1994

- FLOWERDEW JR, TROUT RC, ROSS J.

Myxomatosis: population dynamics of rabbits (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) and ecological effects in the United Kingdom.

Rev Sci Tech. 1992, **11**, 1109-13.

- GRAHAM KA, OPGENORTH A, UPTON C, MCFADDEN G.

Myxoma virus M11L ORF encodes a protein for which cell surface localization is critical in manifestation of viral virulence.

Virology. 1992, **191**, 112-24

- GUERIN JL, GELFI J, BOULLIER S, DELVERDIER M, BELLANGER FA, BERTAGNOLI S, DREXLER I, SUTTER G, MESSUD-PETIT F..

Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins.

J Virol. 2002, **76**, 2912-23

- HUDSON JR, THOMPSON HV, MANSI W.

Myxoma virus in Britain.

Nature. 1955, **176**, 783.

- I. PSIKAL and al

Atypical myxomatosis : virus isolation, experimental infection of rabbits and restriction endonuclease analysis of the isolate

J.Vet Med, 2003, **B 50**, 259-264

- JACOTOT H, TOUMANOFF C, VALLEE A, VIRAT B.

Role of mosquitos in transmission of myxomatosis

C R Hebd Seances Acad Sci., 1954, **239**, 909-11

- JACOTOT H, VALLEE A, VIRAT B

Appearance in France of a naturally attenuated mutant of Sanarelli virus

Ann Inst Pasteur (Paris), 1955, **89**, 361-4

- JOUBERT L., LEFTHERIOTIS E., MOUCHET J.

La myxomatose

Collection de monographies, Les maladies animales à virus, Edition l'expansion scientifique française, 1972, 114-213

- JOUBERT L., DUCLOS Ph., TUAILLON P.

La myxomatose des garennes dans le sud-est – La myxomatose amyxomateuse.
Revue Méd. vét., 1982, **133** (12)

- KERR P.J., PERKINS H.D., INGLIS B. *et al.*

Expression of rabbits IL-4 by recombinant myxoma viruses enhances virulence and overcomes genetic resistance to myxomatosis.

Virology, 2004, **324**, 117-128

- KERR PJ, BEST SM

Myxoma virus in rabbits.

Rev Sci Tech., 1998;**17**, 256-68

- KERR P.J.

An ELISA for epidemiological studies of myxomatosis: persistence of antibodies to myxoma virus in european rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).

Wildl. Res., 1997, **24**, 53-65.

- KOTWAL GJ, MOSS B.

Analysis of a large cluster of nonessential genes deleted from a vaccinia virus terminal transposition mutant.

Virology. 1988, **167**, 524-37.

- KRISTAS S.K., DDOVAS C., FORTOMARIS P., PETRIDOU E., FARSANG A., KOPTOPOULOS G.

A pathogenic myxoma virus in vaccinated and non-vaccinated commercial rabbits

Res. Vet. Sci, 2008

- LOMAS DA, EVANS DL, UPTON C, MCFADDEN G, CARRELL RW.

Inhibition of plasmin, urokinase, tissue plasminogen activator, and C1S by a myxoma virus serine proteinase inhibitor.

J Biol Chem. 1993, **268**, 516-21

- MACEN JL, UPTON C, NATION N, MCFADDEN G.

SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation.

Virology. 1993, **195**, 348-63.

- MACEN JL, GRAHAM KA, LEE SF, SCHREIBER M, BOSHKOV LK, MCFADDEN G.

Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes.

Virology. 1996, **218**, 232-7.

- MANSOURI M, BARTEE E, GOUVEIA K, HOVEY NERENBERG BT, BARRETT J, THOMAS L, THOMAS G, MCFADDEN G, FRÜH K.

The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4

J Virol. 2003, **77**, 1427-40.

- MARLIER, D., MAINIL J., SULON J. *et al.*

Study of the virulence of five strains of amyxomatous myxoma virus in crossbred New Zealand White / Californian conventional rabbits, with evidence of long-term testicular infection in recovered animals.

J. Comp. Path., 2000, **122**, 101-113

- MARLIER D., MAINIL J., LINDEN A., VINDEVOGEL H.

Infectious agents associated with rabbit pneumonia : isolation of amyxomatous myxoma virus strains.

The veterinary journal, 2000, **159**, 171-178

- MARLIER Didier., HERBOTS J., DETILLEUX J., *et al*

Cross-sectional study of the association between pathological conditions and myxoma-virus seroprevalence in intensive rabbit farms in Europe

Preventive veterinary medicine, 2001, **48**, 55-64

- MARLIER Didier

Etude des souches amyxomateuses du virus de la myxomatose et de leur rôle dans l'étiologie des maladies respiratoires du lapin.

Th.Med vet : Liège, 1999-2000

- MARLIER D., HERBOT J., DETILLEUX J., LEMAIRE M., THIRY E., VINDEVOGEL H.

Cross-sectional study of the association between pathological conditions and myxoma-virus seroprevalence in intensive rabbit farms in Europe

Preventive veterinary medicine 2001, **48**, 55-64

- MARLIER D., MAINIL J., BOUCRAUT-BARALON C., LINDEN A., VINDEVOGEL H.

The efficacy of two vaccination schemes against experimental infection with a virulent amyxomatous or a virulent nodular myxoma virus strain

J. Comp. Path. 2000, **Vol 122**, 115-122

- MARSHALL ID.

The influence of ambient temperature on the course of myxomatosis in rabbits.

J Hyg (Lond). 1959, **57**, 84-97

- MESSUD-PETIT F, GELFI J, DELVERDIER M, AMARDEILH MF, PY R, SUTTER G, BERTAGNOLI S.

Serp2, an inhibitor of the interleukin-1beta-converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus

J Virol. 1998, **72**, 7830-9.

- MEAD-BRIGGS AR, VAUGHAN JA.

The differential transmissibility of Myxoma virus strains of differing virulence grades by the rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale).

J Hyg (Lond). 1975, **75**, 237-47

- MOSSMAN K, UPTON C, MCFADDEN G.

The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner.

J Biol Chem. 1995, ;**270**, 3031-8.

- MOSSMAN K, NATION P, MACEN J, GARBUTT M, LUCAS A, MCFADDEN G.

Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits.

Virology. 1996, ;**215**, 17-30.

- MOSSMAN K, LEE SF, BARRY M, BOSHKOV L, MCFADDEN G.

Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits.

J Virol. 1996, **70**, 4394-410.

- MYERS, K., MARSHALL I. D., FENNER F.

Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis in rabbits. III. Observations on two succeeding epizootics in Australian wild rabbits on the Riverine Plain of South-eastern Australia

The Journal of Hygiene, 1954, **52**, no. 3, 1951-1953

- MYKYTOWYCZ R

An attenuated strain of the myxomatosis virus recovered from the field.

Nature. 1953, **172**, 448-9.

- OPGENORTH A, STRAYER D, UPTON C, MCFADDEN G.

Deletion of the growth factor gene related to EGF and TGF alpha reduces virulence of malignant rabbit fibroma virus.

Virology. 1992, **186**, 175-91.

- OPGENORTH A, GRAHAM K, NATION N, STRAYER D, MCFADDEN G.

Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and myxoma growth factor.

J Virol. 1992, **66**, 4720-31.

- OPGENORTH A, NATION N, GRAHAM K, MCFADDEN G.

Transforming growth factor alpha, Shope fibroma growth factor, and vaccinia growth factor can replace myxoma growth factor in the induction of myxomatosis in rabbits.

Virology. 1993, **192**, 701-9

- PETIT C.

Clonage et caractérisation de Serp-2 : une nouvelle protéine de pathogénicité du virus de la myxomatose ?

These Vet. : Toulouse, 1996, 1-46

- PETIT F, BERTAGNOLI S, GELFI J, FASSY F, BOUCRAUT-BARALON C, MILON A.

Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme.

J Virol. 1996, **70**, 5860-6

- PIGNOLET Laurence, Béatrice, Sylvie

Interactions virus myxomateux-cellules hôtes : applicatin à la vaccination chez les ruminants

Th med veti : Toulouse, décembre 2007

- PSIKAL, SMID B., RODAL L., VALICEK L., BENDOVA J.

Atypioca myxomatosis – Virus isolation, experimental infection of rabbits and restriction endonuclease analysis of the isolate

J. Vet. Med. 2003, **Vol 50**, 259-264

- ROSS J., TITTENSOR A.M., FOX A.P., SANDERS M.F.

Myxomatosis in farmland rabbit populations in England and Wales

Epidem. Inf., 1989, **103**, 333-357

- ROSS J., SANDERS M.F

Changes in the virulence of myxoma virus strains in Britain.

Epidem. Inf., 1987, **98** , 113-117

- ROSS J., SANDERS M.F.

Innate resistance to myxomatosis in wild rabbits in England.

J Hyg., Camb. (Lond.), 1977, **79** (3), 411-415

- ROSS J., SANDERS M.F.

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

- RUSSELL R.J., ROBBINS S.J.

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

- SAMPIETRO S.

Construction d'un virus myxomateux délété de la protéine d'enveloppe MO22L.
Th Med vet Toulouse 2002, 92

- SCHMELZ M, SODEIK B, ERICSSON M, WOLFFE EJ, SHIDA H, HILLER G, GRIFFITHS G.

Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network.
J Virol. 1994, , 130-47.

- SCHREIBER M, MCFADDEN G.

The myxoma virus TNF-receptor homologue (T2) inhibits tumor necrosis factor-alpha in a species-specific fashion.
Virology. 1994, **204**, 692-705.

- SCHREIBER M, RAJARATHNAM K, MCFADDEN G.

Myxoma virus T2 protein, a tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, is secreted as a monomer and dimer that each bind rabbit TNFalpha, but the dimer is a more potent TNF inhibitor
J Biol Chem. 1996, **271**, 13333-41.

- SCHREIBER M, SEDGER L, MCFADDEN G.

Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition.
J Virol. 1997 Mar;**71**(3):2171-81

- SELLERS RF.

Possible windborne spread of myxomatosis to England in 1953

Epidemiol Infect., 1987, **98**, 119-25

- SHEPHERD RC, EDMONDS JW

The European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* as a straggler on mammals other than the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*.

Aust Vet J., 1976; **52**, 389-90

- SILVERS L., INGLIS B., LABUDOVIC A. *et al.*

Virulence and pathogenesis of the MSW strains of Californian myxoma virus in European rabbits with genetic resistance to myxomatosis compared to rabbits with no genetic resistance.

Virology, 2006, **348**, 72-83

- SIRIEZ, Henri

La myxomatose, moyen de lutte biologique contre les lapins rongeurs nuisibles.

Edition Sep Paris, 1957

- SOBEY WR, CONOLLY D.

Myxomatosis: the introduction of the European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale) into wild rabbit populations in Australia.

J Hyg (Lond)., 1971, **69**, 331-46

- SOBEY WR, CONOLLY D.

Myxomatosis: passive immunity in the offspring of immune rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) infested with fleas (*Spilopsyllus cuniculi* Dale) and exposed to myxoma virus.

J Hyg (Lond). 1975, **74**, 43-55.

- SOBEY WR ET AL.

Myxomatosis. The effect of age upon survival of wild and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with a degree of genetic resistance and unselected domestic rabbits infected with myxoma virus.

J Hyg (Lond). 1970

- STROOBANT P, RICE AP, GULLICK WJ, CHENG DJ, KERR IM, WATERFIELD MD.

Purification and characterization of vaccinia virus growth factor.

Cell. 1985, **42**, 383-93

- TROUT RC, ROSS J, FOX AP.

Does myxomatosis still regulate numbers of rabbits (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) in the United Kingdom?

Rev Sci Tech. 1993, **12**, 35-8.

- TWARDZIK DR, BROWN JP, RANCHALIS JE, TODARO GJ, MOSS B.

Vaccinia virus-infected cells release a novel polypeptide functionally related to transforming and epidermal growth factors.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1985, **82**, 5300-4

- UPTON C, MACEN JL, SCHREIBER M, MCFADDEN G.

Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence.

Virology. 1991, **184**, 370-82.

- UPTON C, MACEN JL, WISHART DS, MCFADDEN G.

Myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus encode a serpin-like protein important for virus virulence.

Virology. 1990;**179**, 618-31.

- UPTON C, MACEN JL, MCFADDEN G.

Mapping and sequencing of a gene from myxoma virus that is related to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha.

J Virol. 1987, **61**, 1271-5.

- UPTON C, MOSSMAN K, MCFADDEN G.

Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus.

Science. 1992, ;**25**, 1369-72.

- VANDERPLASSCHEN A, HOLLINSHEAD M, SMITH GL.

Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms.

J Gen Virol. 1999;**79**, 877-87.

- VILAGINES P., VILAGINES R.

Les poxviridés : caractères généraux.

Virologie médicale, J Maurin. Flammarion Médecine Sciences, 1985, 310-319.

- WILLIAMS RT, DUNSMORE JD, PARER I.

Evidence for the existence of latent myxoma virus in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*(L.)).

Nature. 1972, **238**, 99-101.

- ZHONGHUA MIN GUO WEI SHENG WU JI MIAN YI XUE ZA ZHI

Reoviruses: replication and molecular pathogenesis.

Fields BN, 1992; 25, 56-8

AGREMENT ADMINISTRATIF

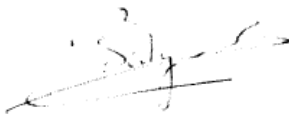
Je soussigné, Alain MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mlle CHIVALLIER Laura, Mireille
a été admis(e) sur concours en : 2004
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 10 juillet 2008
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :
Mlle CHIVALLIER Laura, Mireille
intitulée :
«Isolement et étude du pouvoir pathogène de souches de virus myxomateux issues d'élevages cynicoles de l'Ouest de la
France. »

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

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



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

12 NOV. 2008
**Vu le :
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**

