



PROGRAMME DE RECHERCHE 2011

Conçu et préparé par Auguste COMMEYRAS – Professeur émérite à l'UM2 de Montpellier
Mis en page et organisé par Yves GUERIN – président-délégué de BIO-ESPACE

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr

BIO ESPACE

*LABORATOIRE DE RECHERCHES
FAUNE SAUVAGE / ENVIRONNEMENT*

Site internet : <http://www.bioespace.fr>



Copyright Mars 2011 – Tous droits de reproduction ou de copie strictement réservés
Et soumis à l'autorisation expresse des auteurs ou du conseil d'administration de BIO-ESPACE

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr

ASSOCIATION REGIE PAR LA LOI 1901

Page 2 sur 29



ETUDE DE LA CAPACITE VECTORIELLE

DE LA *XÉNOPSYLLA CUNICULARIS*



TRANSPORTER ET INOCULER UN VACCIN POUR LUTTER CONTRE LA MYXOMATOSE ET LA VHD DU LAPIN DE GARENNE EN FONCTION DE SA CONCENTRATION OU COMBINAISON

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr



Table des matières :

A/ Introduction

B/ La puce *Xenopsylla cunicularis* écologiquement compatible en France.

C/ Recherches en cours pour lutter contre la myxomatose et la VHD.

D/ La résistance génétique

E/ Réversibilité de la résistance génétique.

F/ Rôle des insectes hématophages.

G/ Mécanisme d'acquisition de la résistance génétique.

H/ Partie expérimentale.

I/ Conclusion et Conséquences.

J/ Références bibliographiques

K / Budget.



A/ INTRODUCTION

Le lapin de garenne *O. cuniculus* a vu ses populations décliner, voire disparaître, suite à l'apparition de la myxomatose en France en 1952 ([1]) et de la VHD à la fin des années 80 ([2]). Ces maladies sont venues s'ajouter à une transformation concomitante des paysages et des pratiques agricoles, concourant à la modification de l'habitat d'*O. cuniculus* et au morcellement des populations ([3, 4]). La lutte contre la myxomatose et la VHD est l'une des actions à mettre en œuvre pour espérer revoir ce lagomorphe.

Cette problématique est la préoccupation essentielle de BioEspace. L'approche de BioEspace consiste à vouloir protéger les lapins, sans avoir à les capturer, en leur transmettant à l'aide d'une de leurs puces spécifiques, un vaccin double contre la myxomatose et la VHD.

Trois objets d'études indissociables en découlent : (I) Le lapin *O. cuniculus*, (II) La puce *Xenopsylla cunicularis*, (III) Le virus (natif ou recombiné), sachant que ces trois organismes vivants sont en constante interaction.

La FNC a financé BioEspace pour réaliser un premier programme de recherche sur l'étude de la compatibilité de la puce *Xenopsylla cunicularis* avec les lapins de garenne du territoire Français.

Les résultats obtenus, très positifs, sont résumés dans le chapitre **B** de ce document.

BioEspace propose de donner une suite aux résultats de ce premier programme de recherche.

Le programme soumis par BioEspace à la FNC a pour objectif d'étudier comment se comporte un lapin naïf¹ lorsqu'il reçoit par une (ou plusieurs) puce (s) (*Xenopsylla cunicularis*) le virus de la myxomatose de virulence IV.

La charge virale transmise par une puce sera mesurée.

La variation de résistance génétique du lapin naïf sera également estimée en fonction des différentes générations.

Les lapins ainsi vaccinés seront éprouvés par un virus d'épreuve de virulence III, également transmis par les puces.

Les vaccinations par les puces seront comparées à celles effectuées par dermojet ou seringue.

¹ Dans ce document on qualifiera de naïf un lapin séronégatif dont aucun ascendant n'a rencontré la myxomatose.



B/ La puce *Xenopsylla cunicularis* écologiquement compatible en France.

Xenopsylla cunicularis est une puce spécifique du lapin de garenne ([5]). Sa répartition répond à des exigences écologiques très strictes ([6, 7]): présence de l'hôte, substrat meuble et aéré, climat chaud en été et régime de pluies au printemps (entre 280-660 mm annuel). Si le substrat ne doit pas être mouillé, l'humidité ambiante du terrier doit par contre être élevée (80-85 % HR) ([8, 9]). Ces paramètres font que cette espèce est naturellement peu abondante dans son aire de répartition ([6, 10]). L'adéquation de ces 3 facteurs est d'autant plus indispensable que l'on se rapproche de la périphérie de son aire de répartition où l'espèce est plus fragile ([11]).

De ce fait, *X. cunicularis* est cantonnée à l'extrême ouest du bassin méditerranéen. Le sud-ouest de la France marque la limite nord de sa répartition. Il y a une trentaine d'années, deux stations y avaient été décrites près de Toulouse (Haute-Garonne): au Fauga et à Portet-sur-Garonne ([5, 6, 12]). Récemment, nous avons découvert 4 nouveaux sites dans les départements du Gers, de la Haute-Garonne et du Tarn ([13]) et avons constaté qu'elle était toujours présente à Portet-sur-Garonne (*données non publiées*).

Envisager de lâcher des insectes sur le terrain sous-entend la mise au point d'une production performante de cette puce et les études de terrain préliminaires.

A ce jour, le laboratoire d'Entomologie de Bio Espace maîtrise parfaitement l'élevage de *X. cunicularis*. La puce est élevée sur son hôte naturel et nos installations actuelles ont une capacité à produire 200.000 à 250.000 puces par semaine. La mise au point d'un élevage sur membrane artificielle nous permettrait d'augmenter les rendements et de minimiser les coûts de production. Une importante synthèse bibliographique sur l'alimentation des arthropodes hématophages est en fin de rédaction ([14])

En lutte biologique, l'utilisation sur le terrain de tout agent de contrôle doit faire l'objet d'une étude minutieuse, non seulement pour vérifier l'adéquation de cet agent avec l'objectif attendu, mais aussi et surtout pour évaluer son incidence future sur l'écosystème dans lequel il est introduit. L'implantation de *X. cunicularis* à l'extérieur de son aire de répartition a fait l'objet d'une très récente étude en parcs expérimentaux. Le protocole avait délibérément favorisé l'installation de cette puce, mais les résultats ont montré que *Xenopsylla cunicularis* ne présentait aucun risque de dispersion et de prolifération anarchique ([13, 14]).



C/ Recherches en cours pour lutter contre la myxomatose et la VHD.

Les virus de la myxomatose et de la VHD sont aujourd'hui présents partout ou existent des lapins sauvages *O. Cuniculus*.

- En Australie le lapin sauvage est considéré comme une peste. Pour tenter de l'éliminer la recherche Anglo-Saxonne (Australie, UK) met en œuvre des moyens de lutte biologique utilisant les virus de la myxomatose et de la VHD. Le lapin *O. Cuniculus* acquiert une résistance génétique au moins contre le premier de ces virus. Pour contourner cette résistance la recherche Australienne réplique en recherchant des virus super virulents[15] et en utilisant la recombinaison génétique[16]. Aucune de ces solutions ne réussit à contourner cette résistance.
- En Europe il existe au contraire des forces qui considèrent que les lapins sauvages doivent être protégés contre ces deux virus pour que certains espaces retrouvent les équilibres écologiques antérieurs. Des vaccins sont imaginés contre la myxomatose seule, contre la VHD seule, ou contre les deux maladies en même temps via un virus recombinant « myxo-VHD ». Trois équipes de recherche ont été, ou sont, impliquées dans la recherche de tels recombinants :
 - L'Ecole vétérinaire de Toulouse (EVT)[17].
 - La Recherche Espagnole [18].
 - L'association BioEspace [19]

Le dit virus recombinant construit par chacune de ces trois équipes est UN virus de la myxomatose (appelé virus porteur) dans le génome duquel est placé le gène VP60 codant pour la protéine de la capsid du virus de la VHD. Dans la construction de ce recombinant le gène VP60 est associé à un marqueur. La présence de ce marqueur permet d'extraire le recombinant du milieu de culture et de l'amplifier (purifier).

- Chacune de ces 3 équipes de recherche a construit son propre recombinant. La raison n'est pas la compétition, mais au contraire la recherche d'un produit final plus aboutit, plus évolué, plus efficace que le précédent. La construction de ces trois recombinants diffère sur deux points : 1/ Sur la nature du virus porteur, 2/ sur le point d'insertion du gène VP60 dans le génome du porteur.
 - 1/ sur la nature du virus porteur.
 - Les chercheurs de l'école vétérinaire de Toulouse ont choisi comme porteur le SG33
 - Les chercheurs Espagnols, ont choisi comme porteur le virus naturel circulant « Girona 6918 » de virulence V, plus virulent que le SG33.

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr



- Les chercheurs de BioEspace, ont choisi comme porteur le virus naturel circulant BE4 de virulence IV, plus virulent que le virus choisi par les Espagnol.
- 2/ sur le point d'insertion du gène VP60.
 - Les chercheurs de l'école vétérinaire de Toulouse ont introduit le gène VP60 associé au marqueur lacZ dans le gène MJ2 (TK) du virus de la myxomatose (SG33).
 - Les chercheurs Espagnols ont introduit le gène VP60 associé au marqueur TGEV dans la région inter génique MJ2 (TK) et MJ2a du virus de la myxomatose de virulence V (Girona 6918).
 - Les chercheurs de BioEspace ont inséré le gène VP60 associés au marqueur GFP dans la région inter génique MA51 et MA52 du virus de virulence IV (BE4).
- Comme indiqué ci dessus chacune de ces trois approches s'est nourrie de l'expérience précédente. Les premières publications de l'EVT datent en effet de 1996. Les premières publications Espagnoles datent de 2000. Celle de BioEspace date de 2011. Fort des résultats antérieurs il s'est en effet progressivement **avéré nécessaire d'augmenter la virulence du virus porteur**. L'objectif étant de créer ou de maintenir une résistance génétique élevée chez les populations de lapins de garennes vaccinées.
- **Chronologie et motivation de cette recherche :**
- 1/ Les chercheurs de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, non pas été préoccupé par la résistance génétique. Ils ont utilisé le **SG33 comme porteur** certainement en raison du fait que ce virus atténué de la myxomatose avait déjà une autorisation de mise sur le marché (AMM), et qu'il était utilisé avec succès pour protéger de la myxomatose les lapins domestiques via des inoculations intra dermiques ou des nébulisation. En 1996 ce choix était logique. Il allait dans le sens de la réglementation. Il s'est par la suite avéré que l'usage du SG33 pouvait faire perdre leur résistance génétique aux lapins vaccinés. (Voir note² de bas de page)

² Ce vaccin a été produit par le Pr Saurat et le Dr Gilbert en collaboration active avec L'Association Nationale des Chasseurs de Lapins et de Défense des Chasses Traditionnelles (ANCLATRA) au nom de laquelle le brevet contre la myxomatose transmis par les puces a été déposé²⁰. Saurat P, *Procede of wild rabbit vaccination (oryctolagus cuniculi) against myxomatosis using insects vectors carrying a virus vaccine not Pathogene*, in ANCLATRA . FR 2593397 A1 1987073. 1988: France.. L'ANCLATRA et subséquemment BioEspace ont rapidement utilisé ce vaccin et ensuite demandé aux chasseurs de ne plus l'utiliser. Les observations de terrain ont en effet montré que les juvéniles des populations ainsi vaccinées devenaient très sensibles aux attaques de myxomatose sauvages. Il a alors été considéré que le SG33 très (trop) atténué faisait perdre leur résistance génétique aux populations de lapins vaccinés. La quantification de ces observations est l'objet d'une partie de ce programme de recherche que BioEspace souhaite développer.



- **2/** Les chercheurs Espagnols, alertés par le trop faible pouvoir pathogène du SG33 ont décidé dans les années 1998 de choisir un virus porteur plus virulent que le SG33. Après avoir sélectionné sur leur territoire les différentes souches circulantes de virulence I à V, ils ont choisi la souche V comme porteur pour construire leur recombinant considérant que ce virus tout en étant circulant, était sans effet néfaste sur les lapins séronégatifs sauvages, ou domestiques naïfs[18, 21]. Ce choix a certainement été guidé par le désir de trouver le meilleur compromis possible entre les deux objectifs contradictoires : -satisfaction de la réglementation future à laquelle ils seraient soumis, - protection maximale des populations de lapins de sauvages. Néanmoins dans leurs publications ils ne prennent pas en compte la notion de résistance génétique.

3/ Les chercheurs de BioEspace, tout en étant sensibles à l'aspect réglementaire mais sans motivation économique, ont recherché en priorité une solution techniquement viable, à savoir la construction d'un vaccin mixte Myxo-VHD, efficace, facilement administrable aux animaux sauvages sans avoir à les capturer, et capable de maintenir la résistance génétique à un haut niveau. Avec cette approche le choix du porteur a été un virus de virulence IV, couplée à l'insertion du gène VP60 dans la région inter génique MA51 et MA52. Cette position d'insertion a été choisie pour ne pas affaiblir la virulence IV du virus porteur compte tenue du fait que ces gènes sont considérés comme non essentiels pour l'infection virale et pour la répllication [19].

De cette analyse, il ressort, qu'en dehors de BioEspace, les chercheurs de l'EVT pas plus que les Espagnols n'ont pris en considération le paramètre « résistance génétique » des lapins dans la construction de leur recombinant Myxo-VHD. Ce paramètre il est vrai n'est pas quantitativement défini et peut apparaître flou.

Ce paramètre est pourtant extrêmement important pour la recherche Anglo-Saxonne qui considère que c'est la résistance génétique qui permet aux lapins de résister à la lutte biologique qui leur est menée. Nous citerons deux informations (parmi d'autres) tirées de cette recherche Anglo-Saxonne :

-Selon R. Seymour[22] **si la résistance génétique est très forte, la maladie ne se déclenche pas**, quel que soit le niveau d'exposition, principalement en raison du fait que l'efficacité de la transmission puces infectantes / lapins sains est trop faible.

- Au contraire, **si la résistance génétique est trop faible**, en dessous d'un seuil critique, **la maladie se déclenche** quel que soit le niveau d'exposition.

BIO ESPACE

LABORATOIRE DE RECHERCHES
FAUNE SAUVAGE / ENVIRONNEMENT

Site internet : <http://www.bioespace.fr>



- Et pour W. Sobey[23] la résistance génétique s'acquiert lors des épizooties successives de myxomatose sauvage. Le niveau de résistance génétique atteint est d'autant plus élevé que le virus contaminant a une virulence élevée. W. Sobey émet même l'hypothèse selon laquelle la transmission du virus par les insectes hématophages pourrait accroître la résistance génétique et conduire à un pourcentage de survie plus élevée que lors d'une transmission i.d. à la seringue.

Cette dernière hypothèse nous paraît extrêmement importante et est à prendre en considération

CONCLUSION

BioEspace considère en conséquence que le paramètre « résistance génétique » ne peut pas être négligée, ni dans la recherche d'un vaccin contre la myxomatose, ni dans la recherche d'un vaccin mixte MYXO-VHD.

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr



D/ La résistance génétique

Le programme de recherche proposé s'appuie sur les résultats suivants obtenus par la recherche Anglo-Saxonne.

Après l'introduction (1950) de la myxomatose en Australie (souche de virulence I) des observations de terrain ont rapidement montré (1953) : - 1/ que les virus de la myxomatose avaient tendance à s'atténuer. - 2/ que les lapins sauvages avaient tendance à résister à cette maladie. Fenner a rapidement proposé une échelle de virulence des virus de la myxomatose (I à V)[24]. Ceci a permis de confirmer la tendance naturelle des virus à s'atténuer dans le temps (cf tableau I)[25].

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

Tableau I : Indiquant l'échelle de virulence des virus de la myxomatose selon Fenner, et la variation de la distribution de ces virus[25].

W.R. Sobey[23] a alors entrepris entre 1955 à 1967 une étude pour vérifier l'adaptabilité des lapins à ces différents virus de la myxomatose. Chaque souche virales (virulence I, II, III, IV) a été inoculée à une population de **lapins domestiques naïfs**. Les survivants ont été progressivement sélectionnés selon les critères suivants : - un parent survivant a été noté (degré de sélection 0,5); - 2 parents survivant (degré de sélection 1); - 2 parents et 1 grands-parents survivant (degré de sélection 1,5), - deux parents et deux grands parents survivants (degré de sélection 2) et ceci jusqu'au degré de sélection 6,5. Au total



6000 lapins ont ainsi été testés. Cette étude a montré que pour toutes les souches virales étudiées (de I à IV) plus le degré de sélection croît, plus le pourcentage de survie augmente. Pour une population avec un degré de sélection 4 ce pourcentage s'élève à 80% pour la souche virale de virulence IV. La résistance acquise est transmissible. Elle a été qualifiée de « résistance génétique ». L'auteur de ces travaux remarque que tous les animaux testés ont été inoculés par des doses de 500 PFU. Il considère qu'avec des doses plus faibles (telles que celles inoculées par les arthropodes hématophages) c'est-à-dire de l'ordre de 5 PFU, le pourcentage de survie, donc la résistance obtenue, pourrait être plus élevée.

En re-examinant les résultats expérimentaux de W.R.Sobey (schéma 1) par la mesure de la moyenne des pentes des courbes d'augmentation du pourcentage de survie en fonction du degré de sélection, il s'avère que les vitesses d'acquisition de la « résistance génétique » varient en fonction de la virulence du virus. Pour les virus de virulence I et II la valeur de cette vitesse est en effet de l'ordre de 4%, alors que pour les virus de virulence III et IV cette valeur est de l'ordre de 15 %, soit 4 fois supérieure. La résistance génétique d'une population est en conséquence acquise environ 4 fois plus rapidement pour les virus de virulence III et IV que pour les virus de virulence I et II sans doute en raison du fait qu'un nombre plus important de lapins survivent. La probabilité de trouver les bonnes mutations de la résistance est ainsi plus grande pour ces virus de virulence III et IV.

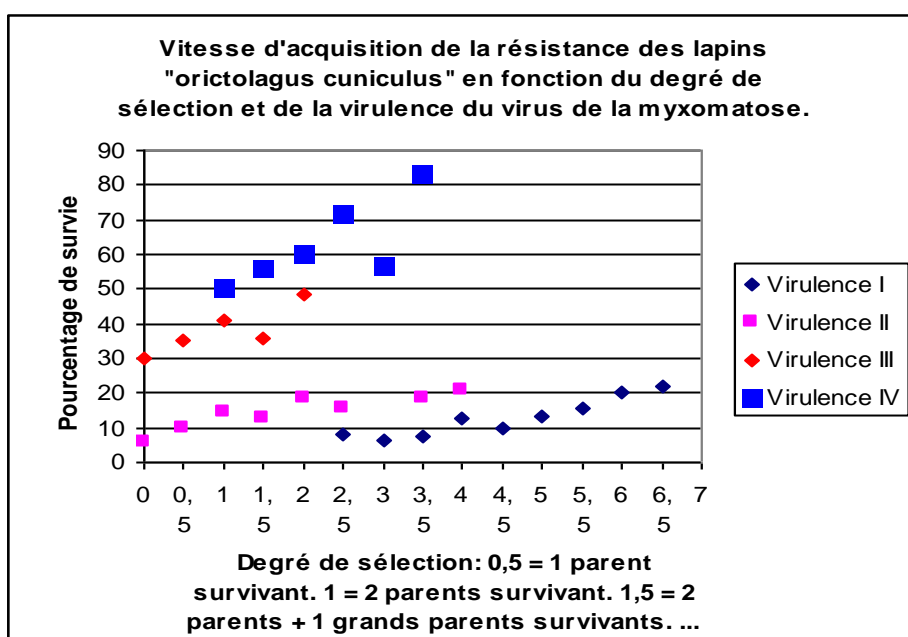




Schéma 1 : Vitesse d'acquisition de la résistance des lapins *orictolagus cuniculus* en fonction du degré de sélection et de la virulence des virus de la myxomatose.

Fenner[25] a poursuivie cette étude en analysant le comportement d'une population de **lapins sauvages** soumise de façon répétée à une souche sauvage de myxomatose. Le tableau 2 montre l'évolution de ce comportement. Après les épizooties successives auxquelles ont été soumises ces populations, un échantillon de jeunes lapins séronégatifs a été soumis à un virus d'épreuve de virulence III inoculé à la concentration d'environ 500 PFU. L'épreuve par une souche de virulence III est parfaitement logique et justifiée par le fait que cette souche virale est la plus fréquemment présente à l'équilibre viral naturel (schéma 1). Le tableau 3 résume les résultats obtenus.

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

Tableau 2 : évolution du comportement d'une population de lapins sauvages soumise de façon répétée au virus de la myxomatose.

Outre que cette expérience conforte les observations antérieures[26, 27] ces résultats montrent que lorsqu'une population de lapins est soumise à la pression de la myxomatose le taux de mortalité de 90% (lors de la première épizootie) passe à 30% (après la 6eme épizootie), et se stabilise ensuite en même temps que se réduisent les symptômes cliniques. Ce phénomène défini comme la résistance génétique à la myxomatose acquise par une population de lapins soumise à une pression régulière de cette maladie a en conséquence été confirmé.

L'acquisition de la résistance génétique (schéma 2) est une courbe ascendante suivie d'un palier. La stabilité du palier est maintenue tant que dure la pression myxomateuse sur la population de lapins étudiée. La rupture de pente entre l'acquisition et le palier se situe entre la quatrième et la cinquième génération. La résistance ne croit plus au-delà de la sixième génération (W.R. SOBEY- Communication personnelle) et Fenner [28]. L'existence de ce palier est confirmée par FENNER et ROSS [25].

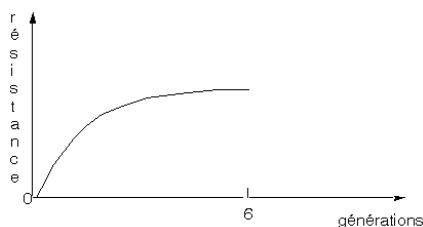


Schéma 2 : Accroissement de la résistance en fonction des générations.

C'est à la suite de ces résultats que R. Seymour[22] a modélisé l'épidémiologie de la myxomatose et tiré les conclusions suivantes sur lesquelles nous nous sommes déjà appuyé :

- **Si la résistance génétique est très forte, la maladie ne se déclenche pas.**
- **Si, au contraire, la résistance génétique est trop faible la maladie se déclenche quel que soit le niveau d'exposition.**

La question qui se pose alors est de savoir si le niveau du palier de résistance obtenu (c'est-à-dire la résistance maximale) varie ou non avec la virulence des virus utilisés.

Des éléments de réponse à cette question fondamentale pour la compréhension de la myxomatose sont donnés par les travaux de SOBEY et al [29], et de PARER et al [30]. Ces auteurs ont isolé et purifié deux virus de virulence I et IV. Ils ont ensuite soumis entre 1978 et 1981, deux populations de lapins sauvages à la pression de ces deux virus. Ils ont observé que la population initiale soumise au virus de force IV subissait une augmentation de 8 à 12 fois, alors qu'au contraire la population soumise au virus de virulence I était maintenue ou légèrement diminuée.

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

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



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

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

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

Dans le cas où cette seconde explication est la bonne on doit s'interroger sur le niveau de résistance génétique obtenu lorsque l'on soumet une population de lapins à la pression d'un virus très atténué tel que le vaccin SG33.

A l'issue de cette analyse les questions posées sont les suivantes :

- 1/ La résistance génétique est-elle réversible, et si oui dans quelles conditions ?
- 2/ Quel est le rôle des insectes hématophages dans la transmission de la myxomatose et dans l'émergence de la résistance génétique ?
- 3/ Quel est le mécanisme d'acquisition de la résistance génétique ?



E/ Réversibilité de la résistance génétique.

À notre connaissance, aucune publication scientifique ne parle de cette question. On peut néanmoins faire état de nombreuses observations faites par BioEspace concernant des élevages de lapins dont les géniteurs étaient à l'origine sauvages et réputés résistants. Après 3 ans d'élevage et vaccination de tous les jeunes animaux au SG33, les produits de la quatrième génération se sont comportés comme des animaux d'élevage naïfs (40% de survie à l'épreuve d'un virus de virulence IV).

Sur la base de ces observations on **pourrait** conclure que la "résistance génétique" qui s'acquiert en 6 générations, sous la pression de virus de force I, II, III ou IV, **pourrait se perdre** en environ 3 générations en l'absence de pression myxomateuse, ou même sous la pression d'un virus très atténué tel que le vaccin SG33.

Cette conclusion serait cohérente avec le fait que les populations de lapins soumises au SG33 (virus de la myxomatose artificiellement atténué, utilisé comme vaccin) depuis plus de 10 générations, ne **présenteraient** aucune résistance génétique.

Nous avons en effet, maintes fois observé que lorsqu'on soumet des lapins d'élevage (séronégatifs) issus de parents vaccinés avec le SG33 depuis plus de 10 générations à un virus de virulence IV ils ne présentent qu'un taux de survie pas plus élevé que des animaux naïfs dont la résistance est qualifiée de nulle.

Dans ce paragraphe si nous avons utilisé le conditionnel c'est pour signifier que des expérimentations doivent être conduites pour valider les observations préliminaires.

Pour le détail de ces expérimentations voir H/ partie expérimentale.



F/ Rôle des insectes hématophages.

Keer et al ont inoculé à des lapins, des virus de la myxomatose de différentes virulences à des doses de 1000 PFU à la seringue par voie sous cutanée. En étudiant la multiplication de ces virus dans différents organes ils ont émis l'hypothèse selon laquelle les cellules de la peau pourraient être impliquées dans le mécanisme d'acquisition de la résistance génétique [31]. Ces conclusions sont importantes. Elles attirent en effet l'attention sur le rôle particulier de la peau, alors que cette barrière n'a quasiment pas été sollicitée dans cette expérimentation puisque l'inoculation a été sous cutanée.

On peut en conséquence légitimement se demander ce qu'il adviendrait si le virus était inoculé à très faible dose via des arthropodes hématophages tels que les puces, et strictement dans l'épiderme. Notre interrogation rejoindrait ainsi celle déjà ancienne de W. Sobey[23].

En fait l'intérêt de la vaccination intra épidermique est né et a grandi ces dernières années dans le monde parallèle de la médecine humaine[32-35]. Les travaux réalisés dans ce domaine montrent que la peau est un tissu particulièrement immunoréactif. Un vaccin délivré dans l'épiderme, induit en effet une réponse immunitaire 2 800 fois supérieure à celle induite par une injection intra dermique témoin. Les moyens pour délivrer strictement des antigènes (vaccins) dans l'épiderme se sont sophistiqués. Des micros aiguilles de quelques dizaines de micromètres de longueur et autant de diamètre ont été produites et associées les unes aux autres en nappes comme indiqué figure 2 et 3 [36]. La compétition est grande pour produire le meilleur outils de vaccination du futur[34].

L'immunoréactivité particulière de l'épiderme, est expliquée par la présence d'un grand nombre de cellules dendritiques (ou cellules de Langerhans) dans cette couche supérieure de la peau.

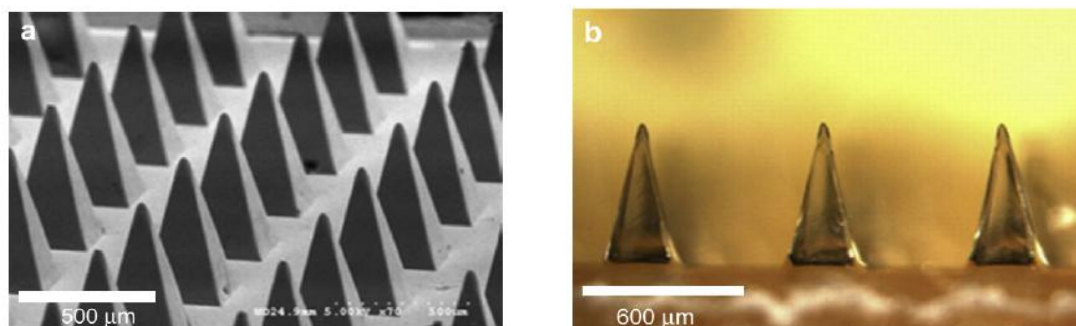
La peau est en fait constituée de trois couches superposées, l'épiderme, le derme, l'hypoderme. L'épiderme a une épaisseur comprise entre 0,05 à 0,1 mm (50 à 100 micromètres). La partie supérieure de l'épiderme (quelques micromètres) n'est pas vascularisée. Elle est constituée de cellules sans noyaux dans lesquelles la reproduction virale n'est pas possible. La partie inférieure de l'épiderme, dite épiderme viable ou stratum spinosum n'est par non plus vascularisée. Les premières vascularisations se trouvent dans le derme bien plus épais (2-3 mm).



La puce arthropode hémaphage, avec un rostre (fig 1) d'une longueur totale de 0,5 mm (500 micromètre), doit donc traverser l'épiderme du lapin pour aller prélever son repas sanguin dans le derme. De façon évidente cela ne peut être que lors de ce transfert que le rostre essuie (perd) dans les cellules de l'épiderme les quelques particules virales localisées dans la partie externe du rostre, c'est-à-dire les écailles visibles sur la figure 4. Ces virus proviennent d'un repas sanguin infectant antérieur. Les virus infectants sont ainsi directement libérés dans l'épiderme viable d'un lapin sain, non résistant, ou résistant. Ces quelques particules virales, se trouvent alors au cœur même de la première barrière (la couche supérieure de la peau) que l'évolution a créée pour lutter contre les agressions de l'environnement sur les organismes.



Fig 1 : photographie de la tête et du rostre d'une puce *Spilopsyllus cuniculi* (Microscope à balayage BioEspace).



Fig

2 : Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. (a) Microneedle master-structure (600 µm in height and 300 µm wide at base) used to mold dissolving microneedles made of (b) CMC, (c) amylopectin and (d) BSA. The master-structure was imaged by scanning electron microscopy and the molded microneedles were imaged by brightfield microscopy.

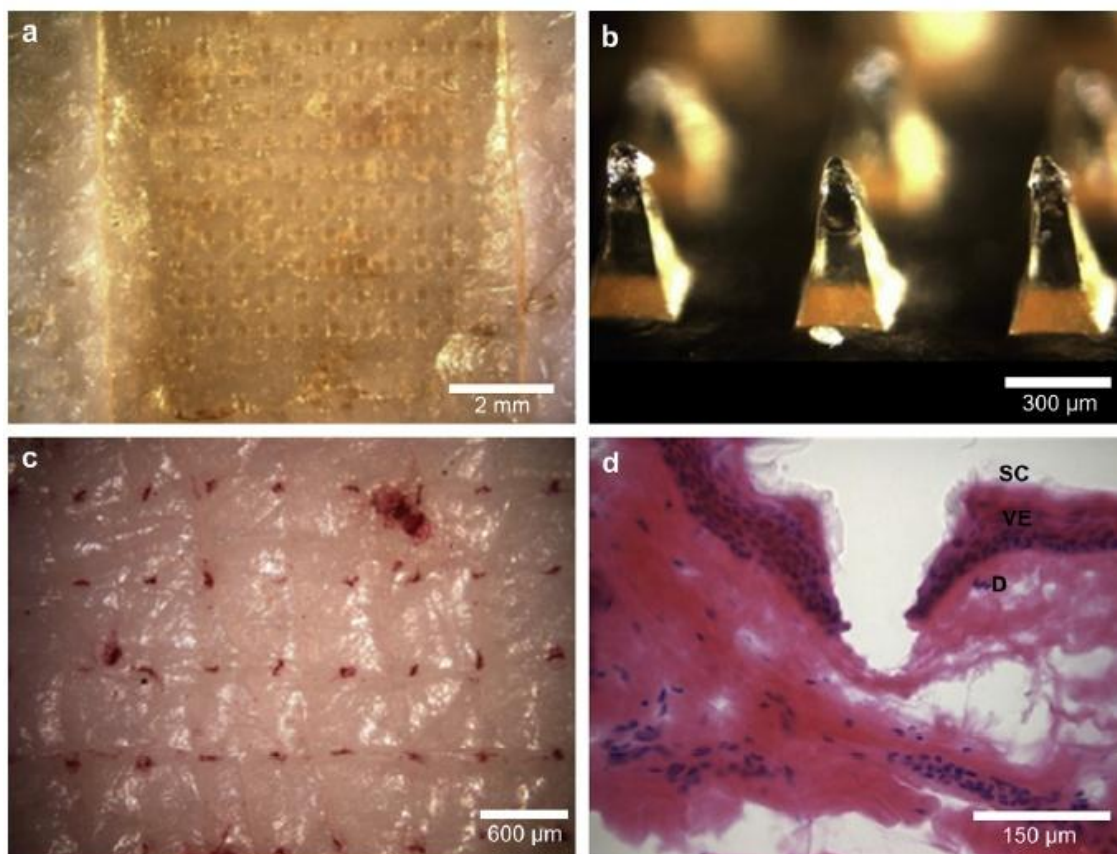


Fig 3 : Imaging microneedle insertion into pig cadaver skin. (a) View of the backside of a CMC microneedle patch applied onto the surface of the skin. (b) CMC pyramidal microneedles after insertion into the skin for 3 s. (c) Skin stained with red tissue-marking dye to identify the sites of needle penetration after insertion of CMC pyramidal microneedles. (d) Cross-sectional image of H&E-stained skin at a site of microneedle penetration (SC: stratum corneum, VE: viable epidermis, and D: dermis). All images viewed by brightfield microscopy.



G/ Mécanisme d'acquisition de la résistance génétique.

L'épiderme viable est constitué de 90 % de kératinocytes et de 3 à 8 % de cellules dendritiques (ou cellules de Langerhans). Ces dernières du fait de leur structure protubérantes couvrent plus de 30 % de la surface totale de l'épiderme. Dès leur activation les cellules dendritiques capturent les virus (antigènes) et les présentent à leur surface. Les kératinocytes également activés en plus de produire les cellules de la peau synthétisent un grand nombre de cytokines [37] et autres molécules d'adhésion intracellulaires, impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire[38]. Les cellules de Langerhans et leur antigène migrent vers les ganglions lymphatiques et présentent l'antigène aux lymphocytes T qui produisent des anticorps.

Ainsi les puces apportent probablement les particules infectantes seulement et en petit nombre, au cœur même de la meilleure ligne de défense de l'organisme. La réplication du virus myxomateux serait ainsi certainement ralentie par cette défense, ce qui pourrait expliquer que la formation des premiers myxomes est initialement limitée au point d'inoculation avant de diffuser dans l'organisme. Ce ralentissement pourrait en fait donner un temps précieux au système immunitaire pour réagir, organiser une résistance, et la traduire génétiquement.

La victoire, ou la défaite, du lapin pourrait alors être vue comme la résultante cinétique de deux réactions compétitives : - production suffisante d'anticorps et élimination du virus, ou au contraire -multiplication virales et envahissement de l'organisme jusqu'à sa mort.

La puce pourrait ainsi être considérée comme le moyen d'infection le moins tragique pour le lapin, en ce qu'elle laisserait à ce dernier le plus de temps possible pour réagir et développer sa propre défense, c'est-à-dire produire des anticorps pour sa sauvegarde immédiate, et accroître sa résistance génétique pour sécuriser son propre avenir et celui de sa descendance.



H/ Partie expérimentale.

H-1 réversibilité de la résistance génétique

Seront étudiés, des lots représentatifs de lapins de différentes provenances, soit spf, soit issus d'un élevage régulièrement vacciné au SG33, soit d'un élevage dont les géniteurs initiaux ont été des animaux repris sur des territoires régulièrement soumis à la myxomatose sauvage depuis au moins six générations et par la suite vaccinés au SG33, soit des animaux repris sur un territoire sous la pression régulière de la myxomatose sauvage.

Ces animaux recevront des doses de 500 PFU injectées à la seringue ou au dermojet.

Les virus utilisés seront le virus de Virulence IV (BE4) ainsi que le SG33. Le virus d'épreuve sera un virus de virulence III.

A l'issue de ces expériences, les réponses obtenues conduiront à une publication dans une revue scientifique spécialisée. Ces réponses apporteront un éclaircissement sur la réversibilité de la résistance génétique à la myxomatose.

H-2 Rôle comparé de l'inoculation à la seringue et via les puces.

Seront étudiés des lots de lapins de même provenance que lors de l'étude précédente.

Ces animaux recevront des doses de virus injectés par 10, 5, 1, puces *xenopsylla cunicularis*.

Les virus utilisés seront le virus de Virulence IV (BE4) et le SG33. Le virus d'épreuve sera un virus de virulence III également inoculé par des puces.

La charge virale véhiculée par les puces sera déterminée.

L'évolution de la concentration en anticorps sera mesurée en fonction du temps et du nombre de puces infectantes.

Les détails mécaniques de l'infection seront définis (taille du rostre, taille de la partie infectante, visualisation des particules virales.)



A l'issue de ces expériences, des publications seront proposées à des revues scientifiques de rang A.

H-3 Définition d'un standard de résistance génétique contre la myxomatose.

Un tel standard est en effet nécessaire pour les études présentes et futures. Ce standard devra être considéré comme une référence optimale de résistance génétique. L'objectif pour sa définition pourrait être « niveau suffisant de résistance génétique conduisant à 100 % de survie dans une population de lapins ayant reçu un virus de la myxomatose de virulence IV via des puces, et résistant à un virus d'épreuve de virulence III également inoculé par les puces »

L'émergence d'un tel standard apparaîtra au fil des expérimentations précédentes H-1 et H-2.

H-4 Contrôle de la résistance génétique de la composante myxomatose des recombinants Myxo-VHD.

Il va sans dire que le recombinant idéal devra posséder une virulence myxomateuse suffisante pour induire ou maintenir la résistance génétique aux populations vaccinées.

Cette virulence sera bien évidemment issue de celle du virus porteur.

La virulence nécessaire et suffisante du virus porteur sera définie lors des études expérimentales H-1 et H-2.

La partie H-4 de cette étude expérimentale devra vérifier que cette virulence est conservée dans le recombinant. A défaut il faudra revenir, itérativement, sur le point d'insertion du gène VP60 dans le génome du virus porteur. Nous avons vu précédemment que dans les travaux de BioEspace nous avons positionné le gène VP-60 dans une région intergénique du porteur de virulence IV réputée pour ne pas intervenir dans la virulence du virus considéré.

Bien évidemment les travaux ci-dessus permettant de qualifier le recombinant idéal seront appliqués au recombinant de BioEspace. Il serait évidemment opportun de pouvoir les étendre aux recombinants construits par l'EVT et les Espagnols. Une demande sera faite dans ce sens en temps voulu.



I/ Conclusions.

Si les observations préliminaires obtenues pendant des années par le laboratoire BioEspace et par les chasseurs des ANCLATRA sont confirmés par les expériences programmées dans ce programme de recherche, les conclusions suivantes pourront être écrites.

- 1/ une population de lapins européens soumise à la pression de la myxomatose acquiert une résistance génétique quelle que soit la virulence I, II, III, ou IV des virus à laquelle elle est soumise.
- 2/ La résistance génétique augmente pendant 6 générations pour atteindre un palier à condition que la myxomatose soit maintenue à l'état endémique dans cette population.
- 3/ Si la myxomatose disparaît de cette population, la résistance génétique acquise disparaît en 3 générations, et cette population redevient sensible à une attaque de myxomatose.
- 4/ Les lapins qui ont une « résistance génétique » acquise en 6 générations peuvent être considérés comme des animaux particuliers, en ce qu'ils résistent à xx % (ce % sera celui déterminé expérimentalement) à une attaque de myxomatose de virulence IV pourvu que cette maladie leur soit transmise par un insecte vecteur tel qu'une de leur puce spécifique comme par exemple la puce *Xenopsylla cunicularis*.

Conséquences :

1/ On peut protéger de la myxomatose des lapins sauvages génétiquement résistants, sans avoir à les capturer et sans leur faire perdre leur résistance génétique, en leur transmettant le virus de la myxomatose de virulence IV via une de leurs puces spécifique telle que *Xenopsylla cunicularis*.

2/ A contrario l'inoculation d'un virus de virulence plus faible, fait perdre la résistance génétique à ces populations et les met en danger lors d'une attaque subséquente de myxomatose sauvage.

BIO ESPACE

LABORATOIRE DE RECHERCHES
FAUNE SAUVAGE / ENVIRONNEMENT

Site internet : <http://www.bioespace.fr>



3/ L'exécution de ce programme de recherche confirmera le niveau de virulence que doit avoir le virus porteur lors de la construction du recombinant Myxo-VHD. Vu les résultats préliminaires, la virulence IV sera certainement celle obtenue. Ce niveau correspond à celui choisie par BioEspace pour la construction de son recombinant Myxo-VHD (cf § C)

4/ Si comme les résultats préliminaires le suggèrent le virus de virulence IV est nécessaire pour maintenir à un haut niveau la résistance génétique ce résultat montrera que les virus recombinants, de l'EVT ou des Espagnols dont les porteurs sont respectivement le SG33 et Girona-6918 de virulence V ne peut que dégrader la résistance génétique des populations ainsi vaccinées, et mettre ces populations en danger lors des épizooties subséquentes de myxomatoses.

5/ Dans le cas où, comme en Australie par exemple, il deviendrait nécessaire de minimiser les dégâts occasionnés par une trop forte population de lapins sauvages, la procédure à suivre pourrait être la suivante : - vacciner cette population par un virus très atténué, tel que le SG33 pendant au moins 3 générations consécutives, pour faire perdre la résistance génétique à cette population. -laisser ensuite la myxomatose sauvage faire son œuvre. Cette approche serait certainement bien plus efficace que celle expérimentée précédemment et sans succès par les Australiens [15, 16, 39].

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr



K/ Références bibliographiques.

1. Joubert, L. and E. Leftheriotis, *Les maladies animales à virus: la myxomatose*. Paris, Expansion Scientifique Française, 1973.
2. Morisse, J.-P. and G. Le Gall, *Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses*. Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties, 1991. 10: p. 283-295.
3. Delibes-Mateos, M. and P. Ferreras, *European rabbit population trends and associated factors: a review of the situation in the Iberian Peninsula*. Mammal Review 2009. 39: p. 124-140.
4. Devillard, S. and J. Aubineau, *Home range of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) in three contrasting French populations*. Mammalian Biology, 2008. 73: p. 128-137.
5. Beaucournu, J.C. and H. Launay *Présence en France d'une Xenopsylla selvatique X. cunicularis Smit 1957 (Siphonaptera: Pulicidae), parasite du lapin de garenne*. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 70, 1977: p. 299-301.
6. Launay, H., *Approche d'une prophylaxie de la myxomatose: écologie des puces du lapin de garenne*. Bulletin mensuel de l'Office National de la Chasse n°sp. Sciences et Techniques, 1980: p. 213-241.
7. Launay, H., *Données préliminaires sur l'écologie de Xenopsylla cunicularis (Siphonaptera: Pulicidae), parasite du lapin de garenne*. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 1982. 57: p. 145-163.
8. Cooke, B.D., *Notes on the comparative reproductive biology and the laboratory breeding of the rabbit flea Xenopsylla cunicularis Smit (Siphonaptera: Pulicidae)*. Australian Journal of Zoology, 1990. 38: p. 527-534.
9. Vallier, A., *Bio-écologie de 2 espèces de puces, Spilopsyllus cuniculi Dale 1878 et Xenopsylla cunicularis Smit 1957 ectoparasites spécifiques d'Oryctolagus cuniculus L. 1758 - Applications à la mise au point de leur élevage et d'une méthode de lâcher sur le terrain.*, in Ecology. 1997, Université d'Aix-Marseille I. : Marseille.
10. Osácar, J.J. and J. Lucientes, *Seasonal abundance of fleas (Siphonaptera: Pulicidae, Ceratophyllidae) on wild rabbits in a semiarid area of northeastern Spain*. Journal of Medical Entomology, 2001. 38((3)): p. 405-410.
11. Shenbrot, G., *Geographical range size and host specificity in ectoparasites: a case study with Amphipsylla fleas and rodent hosts*. Journal of Biogeography, 2007. 34(10): p. 1679-1690.
12. Beaucournu, J.C. and H. Launay, *Les puces (Siphonaptera) de France et du Bassin Méditerranéen Occidental*. Paris, Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles., 1990.
13. Darries-Vallier, A., *Projet de vaccination du lapin de garenne à l'aide d'un insecte vecteur, la puce Xenopsylla cunicularis (Siphonaptera: Pulicidae). Répartition et essais d'implantation en-dehors de son aire de distribution.*, Rapport d'études, 67 pp., 2010.



14. Darries-Vallier, A. and A. Ausset, *Implantation de Xenopsylla cunicularis, Smit 1957 (Siphonaptera: Pulicidae), ectoparasite spécifique du lapin de garenne Oryctolagus cuniculus L. 1758 (Lagomorpha), en-dehors de son aire de répartition. Résultats préliminaires dans le nord de la France.* Journal of Vector Ecology., en prép.
15. L. Silvers, B. Inglis, A. Labudovic, P.A. Janssens, B.H. van Leeuwen, and P.J. Kerr, *Virulence and pathogenesis of the MSW and MSD strains of Californian myxoma virus in European rabbits with genetic resistance to myxomatosis compared to rabbits with no genetic resistance.* Virology 2006. 348 p. 72-83.
16. P.J. Kerr, H.D. Perkins, B. Inglis, R. Stagg, E. McLaughlin, S.V. Collins, and B.H. van Leeuwen, *Expression of rabbit IL-4 by recombinant myxoma viruses enhances virulence and overcomes genetic resistance to myxomatosis.* Virology 2004. 324 p. 117- 128.
17. Bertagnoli S, J. Gelfi, and G. Gall, *Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein.* . J. Virol., 1996. 70: p. 5061-5066.
18. Barcena J, Monica M, and Belen V, *Horizontal Transmissible Protection against Myxomatosis and Rabbit Hemorrhagic Disease by Using a Recombinant Myxoma Virus.* J.Virol., 2000: p. 1114-1123.
19. Guo Z, Qian Y, and Yuan. Wang. *Construction of Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) Vaccine using Myxoma Virus (MV) as a Vector.* . in 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering May 13-15. 2011. Wuhan, China,.
20. Saurat P, *Procède of wild rabbit vaccination (oryctolagus cuniculi) against myxomatosis using insects vectors carrying a virus vaccine not Pathogene,* in ANCLATRA . FR 2593397 A1 1987073. 1988: France.
21. Bárcena J, A., Pagès-Manté, and R. March, *Isolation of an attenuated myxoma virus field strain that can confer protection against myxomatosis on contacts of vaccinates.* Arch Virol., 2000. 146: p. 759-771.
22. Seymour, R.M., *A study of the interaction of virulence, resistance and resource limitation in a model of myxomatosis mediated by the European rabbit flea Spilopsyllus cuniculi (Dale).* . Ecological Modelling, 1992. 60: p. 281-308.
23. Sobey, W.R., *Selection for resistance to myxomatosis in domestic rabbits (Oryctolagus cuniculus).* J. Hyg., Camb., 1969. 67: p. 743.
24. Fenner, F. and I.D. Marshall, *A comparison of the virulence of European rabbits (Oryctolagus cuniculus) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America.* Journal of Hygiene., 1957. 55: p. 149-91.
25. Fenner, F. and J. Ross, *Myxomatosis.* In the European Rabbit, ed. H.V.T.a.G.M.K. eds. 1994: Oxford University Press.



26. Marshall, I.D. and F. Fenner, *Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits: V. Changes in the innate resistance of wild rabbits between 1951 and 1959.* . J. Hyg. (Camb.) 1958. 56 p. 288-302.
27. Fenner, F., *Biological control as exemplified by smallpox eradication and myxomatosis.* Proc. R. Soc. London, Ser. B 1983. 218: p. 259-285.
28. Fenner, F., *The Florey Lecture. Biological control, as exemplified by smallpox eradication and myxomatosis.* . Proceedings of the Royal Society of London,, 1983. B218: p. 259-85.
29. Sobey, W.R., D. Conolly, and N. Westwood, *Myxomatosis : a search for a strain of virus to immunize a wild population of rabbits, Oryctolagus cuniculus.* Australian Wildlife Research, 1983. 10: p. 287-295.
30. Parer, I., D. Conolly, and W.R. Sobey, *Myxomatosis : the effects of annual introductions of an immunizing strain and a highly virulent strain of myxoma virus into rabbit populations at Urana, N. S. W.* Australian Wildlife Research,, 1985. 12: p. 407-23.
31. Kerr, P.J. and G. McFadden, *Immune responses to myxoma virus.* Viral Immunol., 2002. 15: p. 229-246.
32. Mikstzta, J.A., Jason. B. Alarcon, John. M. Brittingham, Diane. E. Sutter, Ronald. J. Pettis, and Noel. G. Harvey, *Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery.* Nature Medecine 2002. 8 (NUMBER 4 APRIL 2002): p. 415-419.
33. Zhou. Qi, Fang Wang, Fu Yang, Yue Wang, Xiaoying Zhang, and Shuhan Sun, *Augmented humoral and cellular immune response of hepatitis B virus DNA vaccine by micro-needle vaccination using Flt3L as an adjuvant.* Vaccine 2010. 28 p. 1357-1362.
34. Bai Xu, *High-aspect-ratio microdevices and method for transdermal delivery and sampling of active substances.* 2009.
35. Babiuk, S., M. Baca-Estrada, L.A. Babiuk, C. Ewen, and M. Foldavi, *Cutaneous vaccination: The skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery.* J. Control. Release, 2000. 66: p. 199-214.
36. Jeong W. Lee, Jung-Hwan Park, and Mark R. Prausnitz., *Dissolving microneedles for transdermal drug delivery.* Biomaterials 2008. 29 p. 2113-2124.
37. T.A. Luger and T. Schwarz, *Therapeutic use of cytokines in dermatology.* J. Am. Acad. Dermatol. , 1991. 24 p. 915-926.
38. M. Cumberbatch, R.J. Dearman, and I. Kimber, *Adhesion molecule expression by epidermal Langerhans cells and lymph node dendritic cells: a comparison.* Arch. Dermatol.. Res. , 1996. 288: p. 739-744.
39. Jackson, R.J., D.F. Hall, and P.J. Kerr, *Construction of recombinant myxoma viruses expressing foreign genes from different intergenic sites without associated attenuation.* . J. Gen. Virol, 1996. 77: p. 1569-1575.

BIO ESPACE

LABORATOIRE DE RECHERCHES
FAUNE SAUVAGE / ENVIRONNEMENT

Site internet : <http://www.bioespace.fr>



J/ Budget.

AVERTISSEMENT : Le budget ci-après ne concerne pas tout le projet expérimental ci-avant développé, mais seulement les premiers travaux à réaliser au cours de l'exercice 2010 / 2011 et sur le premier semestre de l'exercice 2011 / 2012 (de Juillet à décembre 2011). S'agissant de la 2ème partie (expérimentations H-3 et H- 4) et de la 3ème partie (écriture, soumissions et corrections des publications scientifiques) elles feront l'objet de chiffrages ultérieurs. Les concernant, les données indiquées sur cette page sont, à ce jour, approximatives. Nous remercions les lecteurs de leur compréhension.

Pour des raisons sanitaires, de sécurité et de répartition de la charge de travail qui va en résulter, les expérimentations seront effectuées sur 5 sites éloignés les uns des autres et répartis sur l'ensemble du territoire national.

INSTALLATION et MISE EN PLACE des SITES EXPERIMENTAUX

Location des locaux et emplacements (200 € x 5)	1.000 €
Achat de clapiers (coûts de livraison et équipements compris: trémies d'alimentation et distribution d'eau) 1 100 € x 5	5 500 €

FONCTIONNEMENT TTC

Achat et transport et remplacement éventuel des animaux - En 2011, lapins SPF* : 700 €/u x 50 • Fournis par un laboratoire-élevage garantissant la « neutralité » des animaux et de leur exemption des tous germes virologiques ou microbiens	35 000 €
Achat, transport et remplacement éventuel de lapins issus du même élevage, régulièrement vaccinés au SG33 ou d'un élevage dont les géniteurs initiaux ont été des animaux repris sur des territoires régulièrement soumis à la myxomatose sauvage depuis au moins 6 générations 2 fois 50 lapins, soit : 100 u x 30 €	3 000 €
Déplacements du chercheur ou de son assistant agréé (1 000 x 5) x 2	10 000 €
Frais d'alimentation des animaux et d'entretien des cages (15 € x 150) + (5 x 75 €)	2 625 €

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr

BIO ESPACE

LABORATOIRE DE RECHERCHES
FAUNE SAUVAGE / ENVIRONNEMENT

Site internet : <http://www.bioespace.fr>



FRAIS de LABORATOIRE et d'ANALYSES SEROLOGIQUES

Un prélèvement sanguin sera effectué sur chaque animal, à son arrivée sur le site d'expérimentation et à sa sortie. (recherche d'anticorps de la myxomatose et de la VHD) – à l'exception des lapins SPF à leur arrivée. Soit : 250 analyses x 800 €	200 000 €
---	-----------

PERSONNEL

	Salaire net/mois	Charges patronales comprises / an
Embauche (sous contrat) d'un chercheur de niveau post-doc ou un ingénieur des recherches, pour assurer le suivi et la coordination des travaux	2 500 €	48 000 €

TOTAL GENERAL pour 2011 : 354.625 €.

Pour 2012 → les développements H-3 et H-4 nécessiteront encore beaucoup d'analyses, mais les investissements structurels ne seront pas à renouveler. En conséquence, le budget pour cette partie devrait se situer aux environs de 350 000 €.

Pour 2013 → Les expérimentations devraient être terminées. Il restera la charge des chercheurs pour le temps qu'ils consacreront aux écritures de leurs différentes publications (et frais annexes). Une estimation de l'ordre de 150 000 € paraît raisonnable.

Siège social : Bio Espace
Mas des 4 Pilas / Route de Bel-Air
34570 MURVIEL LES MONTPELLIER
Tel : 04 67 55 67 97 / bio.espace@aliceadsl.fr