

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION	1
A.	Introduction générale	1
B.	Généralités	3
1.	Généralités sur la Peste.....	3
1.1.	Définition.....	3
1.2.	Historique et distribution géographique	3
1.2.1.	La peste sur le plan mondial.....	3
1.2.2.	La Peste à Madagascar	5
1.3.	Le cycle de transmission de la peste.....	9
1.3.1.	La peste zoonotique.....	10
1.3.2.	La peste humaine.....	10
1.4.	L'écologie et les foyers naturels de peste	12
2.	Généralités sur les puces	13
2.1.	Biologie	13
2.2.	Systématique	15
2.3.	Morphologie générale.....	16
2.4.	Les puces vectrices ou potentiellement vectrices de la peste	17
2.4.1.	Rôle de la puce dans la transmission de la peste	17
2.4.2.	Diversité des puces vectrices impliquées	19
II.	MATERIELS ET METHODES	21
1.	Collecte des puces sur le terrain	21
1.2.	Présentation des sites d'études	21
1.3.	Piégeage des hôtes micromammifères.....	22
1.4.	Epouillage des micromammifères	23
2.	Elevage des puces en insectarium	24
3.	Les techniques d'extraction d'ADN.....	24
3.1.	Technique d'extraction d'ADN avec broyage.....	24
3.1.1.	3.1.1. Réactifs.....	25
3.1.2.	3.2.2. Mode opératoire	25
3.2.	Mise au point de la technique d'extraction non destructive	26
3.2.1.	Principe	26
3.2.2.	Comparaison des méthodes d'extraction.....	27
4.	Travaux moléculaires	30

4.1.	La technique de la Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
4.1.1.	Principe	30
4.1.2.	Le mélange réactionnel ou «mix»	30
4.1.3.	Les cycles de température	30
4.2.	Mise au point de la PCR avec COI pour valider les méthodes d'extractions.....	31
4.2.1.	Les «mix» des réactions PCR avec les amorces COI.....	32
4.2.2.	Mises au point des conditions PCR.....	33
4.3.	Mise au point de la PCR avec ITS2 pour l'amplification de l'ADN des puces de forêts.....	33
4.3.1.	Composition de la réaction PCR	33
4.3.2.	Mises au point des conditions PCR.....	34
4.4.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	34
5.	Gorgement artificiel	34
5.1.	Mise point d'un dispositif de gorgement artificiel	34
5.2.	Description des dispositifs essayés.....	34
5.3.	Les conditions et paramètres des expériences de gorgement artificiel.....	37
6.	Infection artificielle de puces avec des bactéries (<i>Yersinia pestis</i>) inactivées.....	38
6.1.	Mise en place de l'infection artificielle	38
6.2.	Détection par PCR de l'ADN de la bactérie <i>Y. pestis</i>	38
6.2.1.	Extraction d'ADN non destructive et détection de l'ADN de la bactérie <i>Y. pestis</i> dans les puces gorgées	38
6.2.2.	Mélange réactionnel et conditions PCR pour la détection de l'ADN de la bactérie <i>Y. pestis</i>	38
6.2.3.	Extraction et détection d'ADN de la bactérie <i>Y. pestis</i> dans le sang.....	39
6.3.	Vérification de la présence d'ADN dans les extraits.....	40
7.	Détermination morphologique.....	40
III.	RESULTATS.....	41
1.	Résultats des captures sur micromammifères.....	41
2.	Résultat de l'amplification par PCR des ADN extraits par la méthode non destructive avec les amorces COI.....	41
2.1.	Résultats de la mise au point de l'extraction non destructive avec les puces d'élevage.	41
2.2.	Résultats de l'amplification des ADN de puces de forêt avec les amorces COI.....	42
3.	Résultats des amplifications avec les amorces ITS2 chez les puces de forêts.....	44
4.	Résultats des mises au point des gorgements artificiels	45
5.	Résultats de l'infection expérimentale des puces avec <i>Y. pestis</i> inactivée	46
5.1.	Résultats des détections par PCR de l'ADN de <i>Y. pestis</i>	46
5.1.1.	Détection de l'ADN de <i>Y. Pestis</i> dans le sang et dans l'aliquot de bactérie inactivée.	46

5.1.2. Détection d'ADN de la bactérie <i>Y. Pestis</i> dans les puces gorgées	47
5.2. Vérification de la présence d'ADN dans les extraits par amplification avec les amorces COI	47
IV. DISCUSSION.....	48
V. CONCLUSION	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Distribution mondiale de la peste (source: WHO, CDC)	5
Figure 2 : Chronologie de la diffusion de la peste	6
Figure 3: Evolution de la morbidité pesteuse à Madagascar.....	6
Figure 4 : Peste à Madagascar de 2007 à 2011. Zones en verts : districts sanitaires	7
Figure 5 : Le cycle de la peste (Andrianaivoarimanana 2013).....	9
Figure 6 : Morphologie externe d'une puce adulte (<i>Paractenopsyllus juliamarinus</i> femelle)	14
Figure 7 Les différentes stades biologiques de la puce.	14
Figure 8: Infection expérimentale	18
Figure 9 : Carte représentative des sites d'étude.....	21
Figure 10 : Piège BTS (photo: auteur)	22
Figure 11 : Piège Sherman (photo: auteur)	22
Figure 12 : Ligne de trou piège (Photo : Randriamaherijsaona S.)	23
Figure 13 : Brossage du pelage d'un rat et.....	23
Figure 14 : Vue d'ensemble sur le dispositif de gorgement artificiel (prototype 1)	35
Figure 15 : Schéma avec légende du gorgoir en verre (auteur).....	36
Figure 16: Détail du prototype n°2 (photo : auteur).....	37
Figure 17 : Répartition des genres dans les trois localités de capture.....	41
Figure 18 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification avec COI (1à 6 : numéros du puits du gel)	42
Figure 19 : Proportion des genres dans les extraits d'ADN amplifiés avec COI.....	43
Figure 20 : Gel d'électrophorèse après amplification avec les amorces COI selon la condition 243	
Figure 21 : Proportion de résultats de PCR positifs par genre selon deux conditions différentes avec COI.....	44
Figure 22 : Résultat d'électrophorèse après amplification avec ITS2	44
Figure 23 : Rendement de PCR positifs par genre avec les amorces ITS2.....	45
Figure 24 : Pourcentage de puces gorgées selon les variables testées	45
Figure 25 : Résultat d'électrophorèse après PCR diagnostic	46

Figure 26 : Résultat d'électrophorèse après PCR diagnostic de *Y. pestis* dans les puces gorgées du sang mélangé de bactéries inactivées.47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Systématique des Siphonaptères	16
Tableau II : Réactifs du kit DNeasy	27
Tableau III : Mix pour l'amplification de COI	32
Tableau IV : Conditions PCR pour l'amplification avec COI	33
Tableau V : Composition du mix pour ITS2	33
Tableau VI : Conditions PCR pour l'amplification des amorces ITS2	34
Tableau VII : Mix pour l'amplification par PCR de l'ADN de la bactérie <i>Y. pestis</i>	39
Tableau VIII : Conditions PCR pour l'amplification de l'ADN de la bactérie <i>Y. pestis</i>	39
Tableau IX : Extraction et PCR pour la détection de l'ADN de la bactérie <i>Y. pestis</i> dans le sang	39
Tableau X : Récapitulatif des résultats PCR avec COI sur les mises au point de l'extraction non destructive	42
Tableau XI : Résumé des principaux avantages et inconvénients des techniques d'extraction	50

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Systématique de l'Ordre des Siphonaptères	i
Annexe 2: Liste non exhaustive des espèces de puces de Madagascar	ii
Annexe 3: Photos de quelques espèces de puces trouvées à Madagascar	iv
Annexe 4: Clé d'identification des espèces de puce de Madagascar	v
Annexe 5: Protocole d'extraction d'ADN non destructive	vi

LISTE DES ACRONYMES

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADNases	: Desoxyribonuclease
ARNases	: Ribonuclease
BET	: Bromure d'éthidium
BHI	: Brain Heart Infusion
BTS	: Besançon Technical Services
CDC	: Center of Disease Control
COI	: Cytochrome oxydase I
DNA	: Desoxyribonucleic Acid
dNTP	: désoxyriboNucléoside TriPhosphate
EDTA	: acide Ethylène-Diamine Tétracétique
HCO	: Heavy Cytochrome Oxydase
HTC	: Hautes Terres Centrales
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
ITS2	: Internal Transcribed Spacer 2
LCO	: Light Cytochrome oxydase
PBS	: Phosphate Buffer Saline
pla	: plasminogen activator
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	: Tampon Tris Borate
Tm	: Température de fusion
WHO	: World Health Organisation

I. INTRODUCTION

A. Introduction générale

Des investigations multidisciplinaires ont été menées sur la population des micromammifères terrestres forestiers de Madagascar et leurs ectoparasites (IPM 2009, 2010, 2011). Ces études doivent permettre d'identifier le rôle joué par ces animaux en tant que réservoirs de maladie ainsi que le rôle des ectoparasites, notamment les Siphonaptères, associés à la faune sauvage, dans la transmission et la diffusion de maladies. L'importance des puces en santé publique humaine est surtout liée à la capacité de la transmission d'agents de maladie infectieuses, dont la peste est la plus redoutée (Duchemin *et al.* 2006). Des puces récoltées sur des micromammifères sauvages sont ainsi conservées en alcool à l'Unité d'Entomologie Médicale de l'Institut Pasteur de Madagascar, en attente de leur identification au niveau spécifique. Avec l'avancée des techniques moléculaires de détection de pathogène dans les arthropodes, l'existence de cette collection pourrait permettre de contribuer à une meilleure connaissance des rôles joués par chaque espèce dans la circulation des pathogènes en milieu sauvage. En parallèle elle offre l'occasion d'enrichir les connaissances sur la systématique des puces de Madagascar.

Les procédures de préparation des arthropodes en vue d'une identification morphologique ne permettent pas l'extraction et l'analyse de l'ADN du spécimen en question. Inversement, les méthodes d'extraction d'ADN impliquent une destruction totale ou partielle du corps du spécimen, empêchant une identification morphologique (Castalanelli *et al.* 2010). Dans le cas des puces potentiellement vectrices de la peste, l'identification au niveau spécifique nécessite un traitement chimique au préalable qui vise à éclaircir la cuticule des spécimens pour rendre visible certaines parties anatomiques utiles à l'identification morphologique, suivi d'un montage permanent entre lame et lamelle (Lumaret 1962). A l'issue de ces procédés, il est impossible de diagnostiquer la présence du bacille de la peste dans les puces identifiées morphologiquement. En plus, jusqu'à présent, la présence de *Yersinia. pestis* chez les puces est détectée à partir du broyat d'un lot de puce, soit par culture bactérienne, soit par la méthode PCR.

Le principal objectif de cette étude est d'identifier les espèces de puces selvatiques porteuses de la bactérie de la peste. Cela implique le développement et la maîtrise d'une technique

d'extraction d'ADN non destructive et la détection de l'ADN de la bactérie de la peste dans les extraits d'ADN de puce.

Ce travail consiste à :

- Individualiser et identifier au niveau genre les puces de forêt récoltées dans les trois sites d'étude
- Mettre en place la technique d'extraction d'ADN non destructive avec des puces d'élevage
- Extraire l'ADN des puces de forêt avec la technique d'extraction non destructive
- Extraire avec cette technique et amplifier par PCR l'ADN de la bactérie de la peste dans des puces d'élevage infectées artificiellement
- Amplifier par PCR l'ADN des puces de forêt avec deux types d'amorces
- Séquencer puis analyser les produits d'amplification
- Monter puis identifier au niveau spécifique les puces de forêt.

Après quelques considérations générales sur la puce et la peste, nous allons voir successivement la méthodologie utilisée, les résultats obtenus, la discussion et enfin la conclusion.

B. Généralités

1. Généralités sur la Peste

1.1. Définition

La peste est une maladie infectieuse des rongeurs qui peut être transmise à l'homme par la piqûre de puces infectées. Elle est due à une entérobactérie très virulente: *Yersinia pestis*. (Mollaret 1999) Le bacille de la peste est à l'origine d'une infection sérieuse et à évolution rapide et mortelle en l'absence de traitement antibiotique précoce (Stenseth *et al.* 2006). La bactérie *Yersinia pestis* a été décrite en détail pour la première fois par Alexandre Yersin en 1894, comme un «*bacille court, trapu, à bouts arrondis, assez faciles à colorer par les couleurs d'aniline, et ne se teignant pas par la méthode Gram. Les extrémités de ce bacille se colorent plus fortement que le centre, de sorte qu'il présente souvent un espace clair en son milieu. Quelquefois, les bacilles paraissent entourés d'une capsule* » (Yersin 1894). Elle appartient à la famille des Enterobacteriaceae, et le genre *Yersinia* regroupe deux autres espèces pathogènes pour l'homme, à savoir, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* (Duchemin 2007). La croissance de la bactérie de la peste est possible de 4 à 40°C mais la température optimale se situe entre 28 et 30°C (Chanteau 2006). Du point de vue génétique, le génome de *Y. pestis* consiste en un chromosome et trois plasmides: *pYV* (ou *pCD*), *pFra* (ou *pMTI*) et *pPla* (ou *pCPI*) (Duchemin 2007). Ces trois plasmides interviennent dans la virulence de la bactérie: *pYV* est retrouvé chez tous les *Yersinia* pathogènes et les deux derniers seulement chez *Y. pestis*, soupçonnés d'être impliqués dans la transmission par les puces.

1.2. Historique et distribution géographique

1.2.1. La peste sur le plan mondial

La peste est restée dans la mémoire collective comme un fléau dévastateur qui a fait des centaines de millions de victimes. L'histoire de la peste est retracée succinctement par trois pandémies majeures. La première pandémie, nommée peste de Justinien, a ravagé l'Asie, l'Afrique et l'Europe, entre les années 542 à 546. La maladie aurait infligé 100 millions de victime. La deuxième pandémie, dite « peste noire », apparut entre 1347 et 1350 et fut suivie de nombreuses autres épidémies du XIVe au XVIIIe siècle en Europe, en Asie et en Afrique. Elle a décimé un tiers de la population européenne et serait responsable de 50 millions de morts (Carniel 2002). La troisième pandémie a débuté dans la province chinoise du Yunnan

en 1855 et atteint Canton puis Hong-Kong en 1894, et Bombay en 1898 (Guis 2003). L'Inde est le pays le plus sévèrement touché depuis l'épidémie de 1898, mais beaucoup de nouveaux foyers sont apparus dans les villes portuaires du monde entier grâce au développement du trafic et transit maritimes. C'est au début de cette pandémie que furent découverts l'agent étiologique, les modes de transmission et les moyens de contrôle. En effet, l'agent étiologique de la peste fut découvert grâce aux travaux d'Alexandre Yersin en 1894, à Hong-Kong. En 1898, Paul-Louis Simond met en évidence en Inde le rôle des puces des rats dans la transmission de la peste (Mollaret 1999) Cette découverte fut capitale dans la compréhension de l'épidémiologie et elle permit d'instaurer un programme de lutte plus efficace.

Actuellement, la troisième pandémie sévit encore. Si les progrès concernant les traitements antibiotiques et surtout l'assainissement des conditions de vie en général ont fait régresser la maladie (Tikhomirov 1999), plusieurs pays sont encore concernés par des épidémies de peste (Figure 1). Chaque année, de nombreux foyers naturels de la maladie provoquent chez l'homme des cas sporadiques et des épidémies. Les périodes dites silencieuses, au cours desquelles peu ou pas de cas sont enregistrés chez l'homme, peuvent faire croire que la peste a été éradiquée jusqu'à ce qu'une nouvelle épidémie survienne. Sur le continent américain, les USA, le Brésil, la Bolivie, l'Equateur et le Pérou sont touchés mais dans des proportions très différentes. En Asie, le Kazakhstan, la Mongolie, la Chine et l'Inde déclarent régulièrement des cas de peste. Le continent africain reste le plus grand foyer mondial. Plus de 90% de tous les cas y sont notifiés. Les pays africains qui notifient le plus de cas annuellement sont Madagascar, la République Démocratique du Congo, le Mozambique, l'Ouganda, et la Tanzanie. Madagascar est le pays où l'endémie est la plus forte (WHO 2006).

La peste est une des trois maladies de quarantaine à déclaration obligatoire, avec le choléra et la fièvre jaune. Elle est soumise au Règlement Sanitaire International et les cas humains doivent être notifiés à l'OMS (WHO 2006).

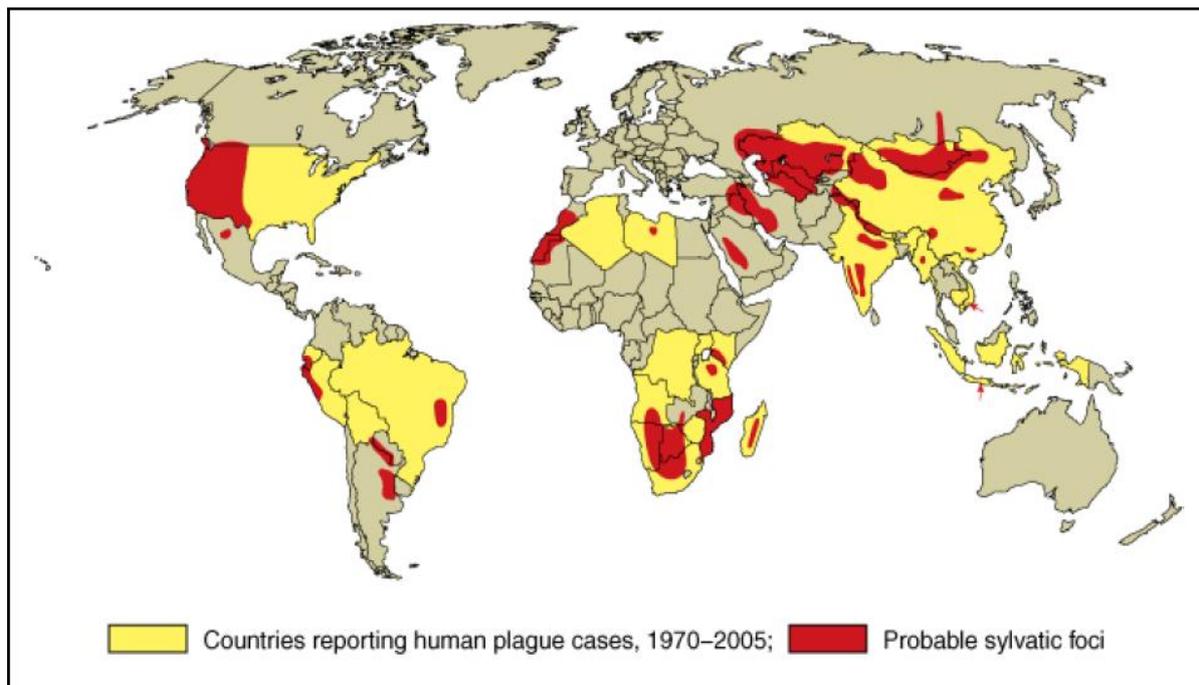


Figure 1 Distribution mondiale de la peste (source: WHO, CDC)

1.2.2. La Peste à Madagascar

a. Historique et origine de la peste à Madagascar

Actuellement, on admet que la peste a été introduite à Madagascar au cours de la troisième pandémie mondiale. Même si une origine ancienne, autochtone et indépendante de la pandémie mondiale a été discutée (Brygoo 1966). Des travaux de phylogéographie et phylogénie de *Y. pestis* ont confirmé l'hypothèse première d'une peste importée. Les souches de bactérie isolées à Madagascar sont du même «biovar» ou souche Orientalis qui a circulé pendant la troisième pandémie, débutant à Hong-Kong (Guiyoule *et al.* 1997; Duplantier *et al.* 2005). La peste a été décrite pour la première fois à Antananarivo en 1921 provenant du foyer de la côte Est (Brygoo 1966; Blanchy 1995). La peste a circulé dans plusieurs villes côtières dont Toamasina, ville portuaire, où le premier cas fut signalé en 1898. D'autres ports répartis dans toute l'île ont été touchés entre 1849 et 1947 mais les cas les plus importants ont été signalés dans le port d'Antseranana en 1899-1927 et Mahajanga entre 1901 et 1907 (Brygoo 1966). Depuis la capitale, la maladie s'est rapidement propagée sur l'ensemble des Hautes Terres Centrales (Figure 2). Elle est déclarée dans la région de Fianarantsoa à partir de 1932 et s'est propagée dans les principaux foyers endémiques actuels vers le Nord et le Sud (Brygoo 1966). De 1932 à 1935, la peste tuait, chaque année sur les Hauts-Plateaux plus de 3000 personnes (Andrianaivo 1982; Blanchy 1995).

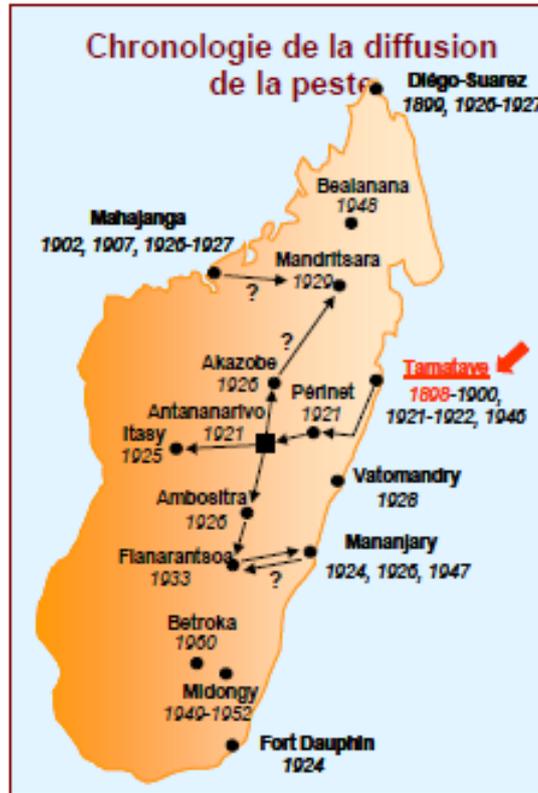


Figure 2 : Chronologie de la diffusion de la peste (Chanteau 2006)

Les efforts d'assainissement de l'environnement, le traitement antibiotique des malades et de leurs proches, les campagnes de vaccination et de lutte insecticide contre les puces ont permis de réduire considérablement l'incidence de la peste dans les zones touchées (Brygoo 1966; Blanchy 1995) (Figure 3).

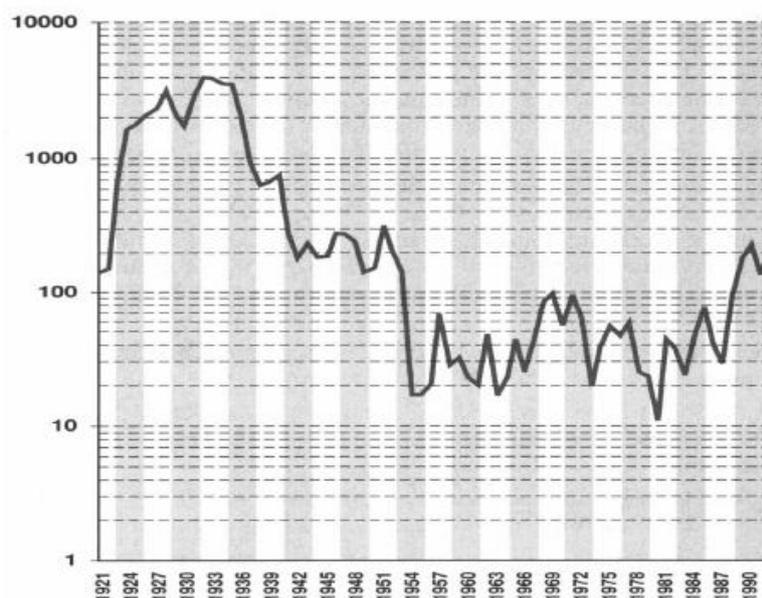


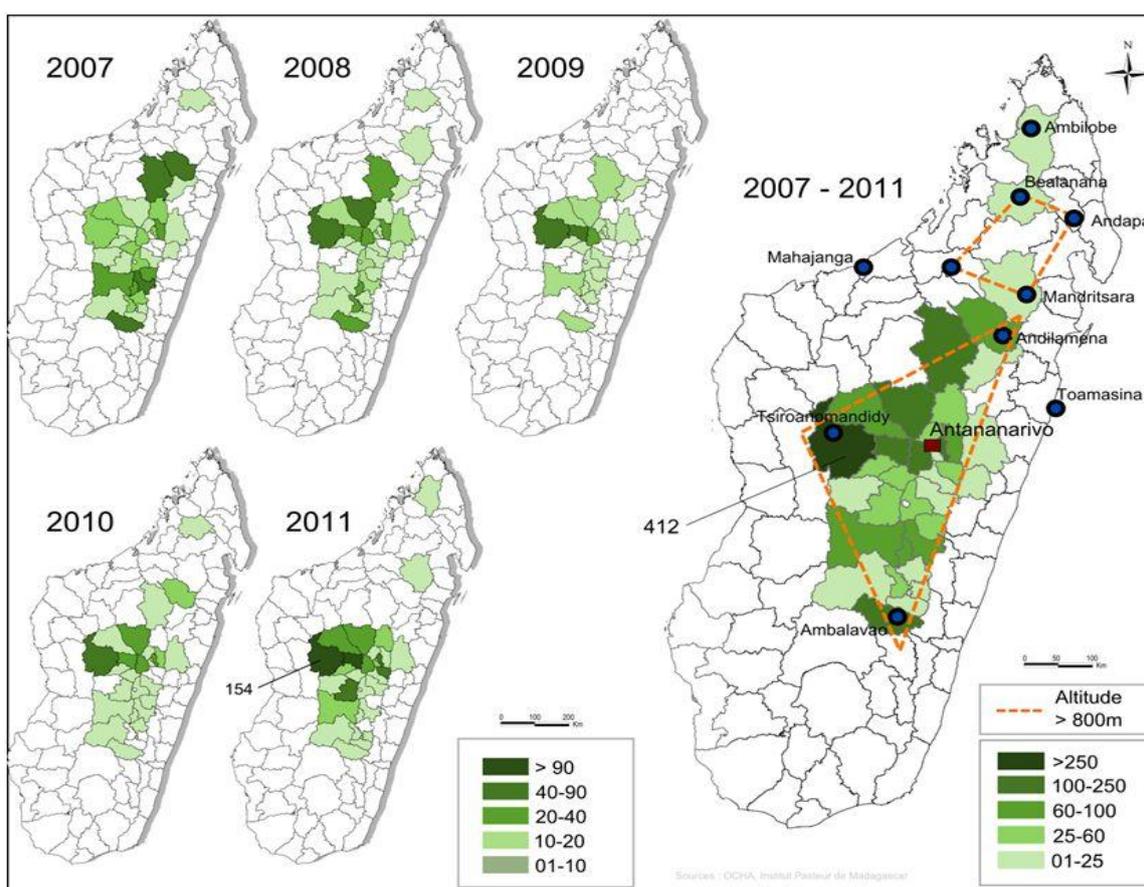
Figure 3: Evolution de la morbidité pesteuse à Madagascar

de 1929 à 1992 (Blanchy 1995)

A la fin des années 1970 et au début des années 90, une réémergence de la peste s'est manifestée par une augmentation du nombre de cas pesteux déclarés et une réapparition brusque dans des foyers longtemps inactifs à l'instar des cas de peste urbaine d'Antananarivo et de Mahajanga qui sont réapparus après 28 et 63 ans de silence (S. Laventure and G. Eppel 1998). L'incidence de la peste humaine a baissé depuis 2001. En 2009, le pays a signalé le nombre de cas le plus bas depuis 15 ans. Cette baisse a atténué considérablement l'augmentation générale de l'incidence en Afrique (Figure 4) (WHO 2010)

b. Répartition géographique actuelle de la peste à Madagascar

Excepté le foyer historique du port de Mahajanga, la limite altitudinale supérieure à 800m des zones d'endémies pesteuses des Hautes Terres est encore admise. Cependant, de récents cas ont été signalés dans des zones inférieures à cette limite (Migliani *et al.* 2001; Ratsitorahina *et al.* 2002; Institut de Veille Sanitaire 2011). La répartition des zones d'endémie comprend un grand triangle central englobant Antananarivo et Fianarantsoa et ayant comme angles le lac Alaotra au nord, le lac Itasy à l'ouest, et Ambalavao au sud et un losange au nord, dans le massif du Tsaratanana (Figure 7) (Guis 2003).



La peste urbaine

La peste urbaine concerne principalement Antananarivo, la capitale au centre des HTC, et Mahajanga, ville portuaire de la côte Ouest. Depuis son introduction en 1921, l'épidémie de peste se manifeste de manière sporadique dans la capitale. Ce n'est qu'à partir de 1979 qu'elle a resurgi dans les quartiers les plus défavorisés après 25 ans d'absence (Ratsifasoamanana *et al.* 1998) A Mahajanga, la peste est réapparue en 1990 après 63 ans (Laventure *et al.* 1998; S. Laventure and G. Eppel 1998). Le point commun des deux foyers est la réapparition de la peste dans des lieux insalubres et populaires de la ville, aux alentours des grands marchés. La forme bubonique est toujours majoritaire dans les manifestations cliniques (Boisier *et al.* 2002; P. Boisier 2002). Les rongeurs concernés dans les villes sont surtout *Rattus rattus*. Le bacille de la peste peut demeurer à bas bruit au niveau de cette population sans pour autant provoquer une épidémie, comme l'ont montré les surveillances murines dans la capitale en 1998 (Ratsifasoamanana *et al.* 1998). Dans la capitale, *R. rattus* tend à être supplanté par *R. norvegicus*, qui a des comportements qui ne favorisent pas le contact avec l'homme par rapport à *R. rattus*. Dans le foyer de Mahajanga, un autre micromammifère insectivore, *Sincus murinus*, trouvé porteur du bacille de la peste, jouerait un rôle dans la pérennisation de la maladie (Laventure *et al.* 1998; Duplantier *et al.* 2005) Des captures de rats réalisés en juin 1995 montraient la présence de *R. rattus* et *R. norvegicus* en faible nombre et de *S. murinus* en grand nombre et également porteur de *X. cheopis*. Ce résultat suppose le rôle joué par *S. murinus* en tant que réservoir de maladie après une épizootie qui aurait pu décimer une population de *Rattus*. (Laventure *et al.* 1998; S. Laventure and G. Eppel 1998). La majorité des puces capturées sur micromammifères dans les foyers urbains appartient à l'espèce *X. cheopis* (Brygoo 1966). Cette espèce est jusqu'à présent la seule puce impliquée dans les épidémies urbaines à Madagascar. Son spectre d'hôte est très étendu. L'abondance de *X. cheopis* sur les rats varie selon la saison. Elle est deux fois plus abondante en saison chaude (Brygoo 1966). Cette saison correspond également à la saison de transmission de la peste sur les Hautes Terres

La peste rurale

La peste rurale est typique des Hautes Terres Centrales dans la limite altitudinale de 800m dans des villages ou hameaux (Figure 4). La période de transmission pesteuse coïncide avec la saison chaude et pluvieuse, du mois d'octobre au mois de mars (Duchemin 2007). Le seul rongeur impliqué dans le cycle est *Rattus rattus*, il est à la fois un hôte et un réservoir de la

peste. Ses capacités de reproduction et de recolonisation très élevées ainsi qu'une sélection de rats moins sensibles sont les principaux facteurs faisant de ce rongeur un bon réservoir. (Brygoo 1966). La survenue d'une nouvelle épizootie se fait par contact avec une autre population murine infectée ou bien avec des puces infectées qui pourraient ainsi avoir un rôle de réservoir. Les vecteurs concernés dans le cycle rural sont *X. cheopis* et la puce endémique *S. fonquerniei*. Leur répartition est différente: *X. cheopis* qui ne se retrouve généralement qu'à l'intérieur des maisons est impliquée dans la transmission de la peste du rat à l'homme tandis que *S. fonquerniei*, capturée sur des rats à l'extérieur, serait le vecteur responsable de la transmission de la peste chez les rats. (Duchemin 2007).

1.3. Le cycle de transmission de la peste

Le cycle épidémiologique de la peste humaine fait intervenir l'agent pathogène, des puces vectrices, des rongeurs réservoirs de la maladie et enfin l'homme qui est un hôte intermédiaire (Figure 5).

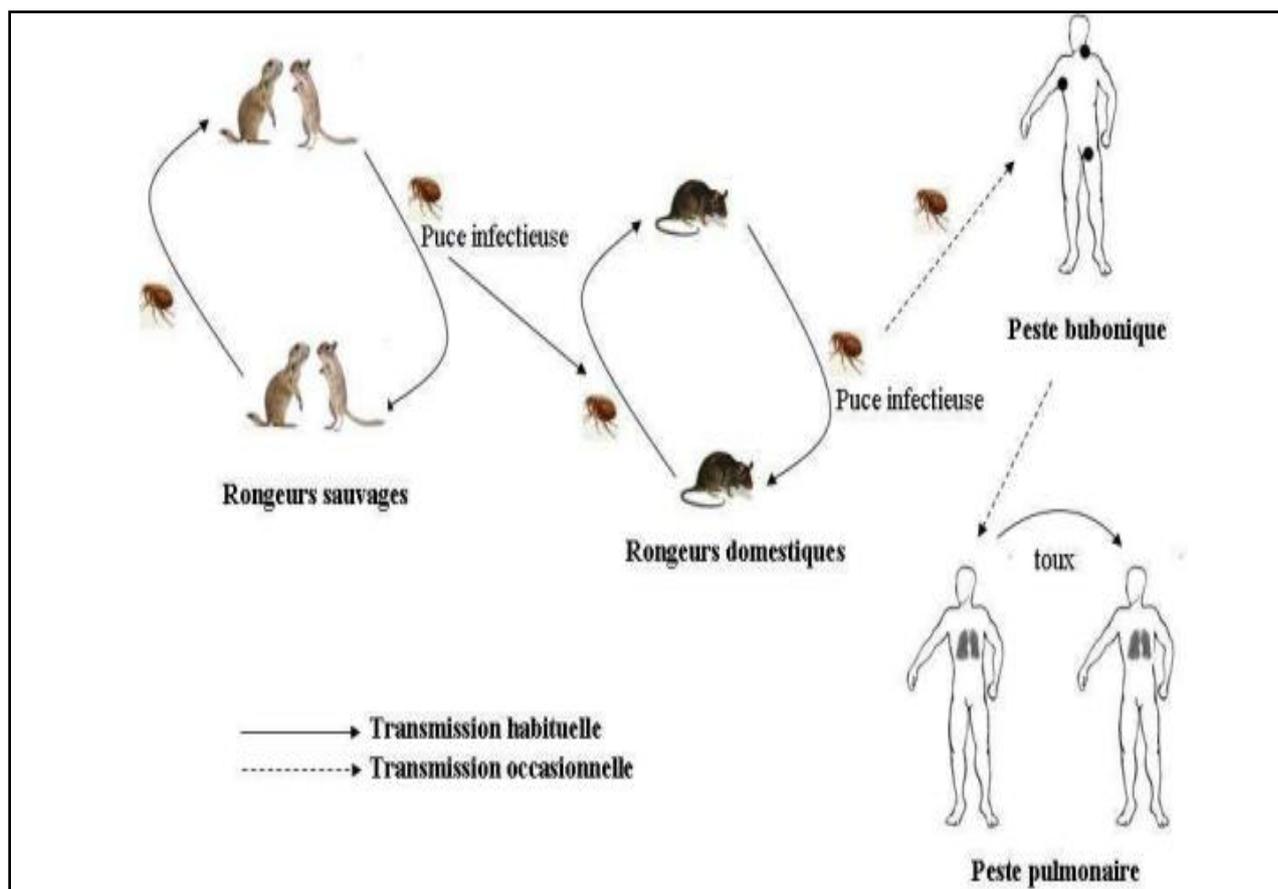


Figure 5 : Le cycle de la peste (Andrianainvoarimanana 2013)

1.3.1. La peste zoonotique

La peste est avant tout une maladie de rongeurs, l'homme étant plutôt un hôte accidentel. La transmission se fait surtout par le biais de puces infectées (Gratz 1999) (Figure 5). Plus de 200 espèces de rongeurs ont été répertoriées comme naturellement infectées mais à des degrés de sensibilité très différents (Gage and Kosoy 2005). Ainsi, une très faible proportion est qualifiée comme réservoirs, les autres n'étant que des hôtes accidentels. *Rattus rattus* est le principal réservoir impliqué dans la majorité des foyers à cause de son mode de vie qui le met en contact étroit avec l'homme et sa capacité à coloniser divers biotopes. De plus, il s'avère que le rat développe une peste bubonique avec une importante phase septicémique, indispensable pour l'infection de la puce (Brygoo 1974). Pourtant, il existe des foyers de peste sans *Rattus*, où d'autres micromammifères jouent le rôle de réservoirs.

Plusieurs hypothèses sont avancées quant à la pérennisation de la peste selon les foyers et les espèces. L'hétérogénéité de sensibilité au sein d'une même espèce permet la survie d'individus plus résistants en dépit d'une forte mortalité, appelée épizootie, chez les individus sensibles (Gratz 1999). Ces individus constituent la part la plus importante des réservoirs qui peuvent transmettre à d'autres populations de la même espèce ou non. Certaines espèces appelées enzootiques sont plus résistantes que d'autres et peuvent servir de relais aux puces infectées qui ont quitté son hôte principal en cas d'épizootie, et maintenir l'infection (Gratz 1999), comme c'est le cas des insectivores particulièrement résistants.

1.3.2. La peste humaine

Habituellement la peste est connue chez l'homme sous trois formes. Premièrement, la forme bubonique est la plus répandue et concerne 90% des cas de peste (WHO 2006). Elle est provoquée par la piqûre d'une puce infectée (Pollitzer 1953) (Figure 5). Elle se manifeste par un malaise général accompagné de vertige, de fièvre et par l'apparition d'un bubon, qui est une inflammation d'un ganglion satellite de la région du corps piquée par la puce. Elle peut être mortelle au bout de 48 heures (Yersin 1894). 40% des cas de peste bubonique peuvent évoluer en peste pulmonaire secondaire, lorsque les bactéries arrivent dans les voies respiratoires (WHO 2006). Cependant, la peste pulmonaire dite primaire est acquise par inhalation d'aérosol infecté d'une personne malade par une personne saine (Figure 5). Cette deuxième forme de la peste est moins répandue que la première mais elle reste la plus grave et la plus contagieuse avec un taux de mortalité de 100%, sans traitement antibiotique. Elle est transmissible de proche en proche et à l'origine des épidémies dites familiales. La peste

pulmonaire se manifeste en général par des difficultés respiratoires accompagnées de toux et de crachats sanguinolents. La peste septicémique primaire est une infection progressive du système sanguin par *Y. pestis* en l'absence apparente d'une lymphadénite primaire (Poland and Dennis 1999). Elle est rare et souvent non diagnostiquée dans les pays concernés, à cause de l'absence caractéristique de bubon (Poland and Dennis 1999; Duchemin *et al.* 2007). La septicémie primaire survient en général sous la forme de fièvre, nausées, vomissements et diarrhées et plus tard peut s'associer une coagulation intravasculaire et une nécrose des extrémités (Duchemin 2007).

Diagnostic et traitements de la peste chez l'homme.

Aujourd'hui, le mauvais diagnostic des cas de peste est l'un des éléments clefs dans l'importance des nombres de cas et du retard dans la mise en œuvre des mesures de lutte (Chanteau 2006). En effet les cas de peste sont souvent diagnostiqués comme seulement de simples infections respiratoires aiguës. Le diagnostic de confirmation de la peste s'effectue en laboratoire. Il est réalisé soit par des tests immunodiagnostiques par détection de l'antigène F1 ou de l'anticorps anti F1, soit par des examens bactériologiques (Chanteau 2006). Les tests sont effectués sur des ponctions de bubon, pour la peste bubonique, sur les expectorations pour la forme pulmonaire, et enfin des tests sérologiques sont effectués sur des prélèvements sanguins ou du sang total déposé sur du papier buvard. Le diagnostic post-mortem est effectué sur des ponctions du poumon et de la rate du cadavre (Chanteau 2006). Actuellement, l'Institut Pasteur de Madagascar a développé et validé sur terrain un test de diagnostic rapide basé sur les principes des tests immunodiagnostiques (Chanteau *et al.* 2003; S. Chanteau 2003). Ce test est efficace sur terrain et permet une détection de l'antigène F1, de l'ordre de 0.5 ng/ml en seulement 15 minutes, chez les malades de peste bubonique et pulmonaire, ainsi que chez les rongeurs en cas d'épizootie murine (Ratsitorahina *et al.* 2000; Chanteau *et al.* 2003). Les traitements antibiotiques restent les mesures de traitements et de prévention les plus efficaces (Ratsitorahina *et al.* 2000). Le traitement précoce reste essentiel. Les indications d'une chimioprophylaxie sont les suivantes: être en contact étroit avec un malade atteint de peste pulmonaire, être exposé à des puces infectées ou être en contact direct avec *Yersinia pestis*. Les traitements et les préventions font appel à la streptomycine, les tétracyclines, les sulfamides et le chloramphénicol. (WHO 2006).

1.4. L'écologie et les foyers naturels de peste

Les foyers naturels de la peste, sont des régions du monde où la peste circule parmi les populations de rongeurs, sans provoquer d'épidémies chez l'homme (Figure 1). L'augmentation de la densité de population humaine et la conquête de la plupart des terres habitables ont rendu possible des manifestations épidémiques de la maladie (Brygoo 1974). Les foyers naturels de la peste sont situés sur une large ceinture à des latitudes tropicales et subtropicales ainsi que dans les zones les plus chaudes des latitudes tempérées du globe, entre les parallèles 55° N et 40° S (Tikhomirov 1999). Ils peuvent couvrir une surface plus ou moins large selon les conditions éco-climatiques et la dynamique des populations des micromammifères (Duplantier *et al.* 2005).

Il est admis que la peste a pénétré dans les colonies de rats commensaux, comme c'est encore souvent le cas aujourd'hui, à partir de ces foyers sauvages. En conséquence, les foyers de peste sauvage impliquant des rongeurs sylvatiques sont considérés comme des foyers primaires, et les foyers de la peste urbaine et rurale sont secondaires ou temporaires (Tikhomirov 1999). Cependant, il faut prendre en compte l'introduction du bacille par les échanges maritimes, via le rat noir dans certaines régions. Pour que la peste se pérennise dans un environnement, il faut que le rat sinanthrope soit remplacé par d'autres micromammifères, et que *X. cheopis* cède son rôle vecteur à des puces locales endémiques, liées aux hôtes locaux (Beaucournu; Duchemin 2007). La plupart des forêts de Madagascar sont situées à une altitude supérieure à 800 mètres. Elles sont caractérisées par une saison sèche et froide marquée, une forte diversité en micromammifères et en puces (Duchemin 2007). Elles sont sujettes à de fortes pressions anthropiques, comme l'abattage d'arbre et les cultures sur brûlis, et le rat noir y est souvent capturé. Des épidémies se déclarent souvent à proximité des forêts, chez des populations de défricheurs (Ratsitorahina *et al.* 2000; Duplantier *et al.* 2001; Migliani *et al.* 2001). Des captures de micromammifères dans une forêt primaire d'altitude a permis de trouver une circulation du bacille pesteux dans un biotope naturel selvatique, avec *R. rattus* mais aussi un insectivore endémique, *Hemicentetes nigriceps* porteurs de germes (Duchemin *et al.* 1999). De plus, aucune puce classiquement impliquée n'a été retrouvée dans ce milieu, elles sont remplacées par d'autres espèces jusqu'alors non impliquées (Duchemin *et al.* 1999; Duchemin *et al.* 2007). L'hypothèse de l'occurrence d'une peste selvatique, est renforcée par le spectre d'hôte très large des puces de forêt. Ainsi, il reste à identifier les principales espèces impliquées et leur véritable rôle dans le cycle de la peste.

2. Généralités sur les puces

2.1. Biologie

Les puces sont des insectes aptères, holométaboles, c'est-à-dire dont la larve issue de l'œuf a une forme et un mode de vie très différent de ceux de l'adulte, mais tous les stades évoluent dans le même biotope. Les adultes sont caractérisés par une paire de patte postérieure adaptée au saut (Figure 6).

Ce sont des insectes parasites obligatoires qui vivent en contact étroit avec leur hôte, même si leur fixation est intermittente à part quelques exceptions où les stades adultes vivent fixés (Rhodain and Perez 1985). Les adultes mâles et femelles sont hématophages. Ils font leur repas de sang lors de piqûres pluriquotidiennes sur des vertébrés à sang chaud: oiseaux et surtout mammifères. Les puces sont fondamentalement associées à des hôtes qui vivent dans des abris dans lesquels ils reviennent plus ou moins périodiquement (Rhodain and Perez 1985). Les micromammifères sont les hôtes de choix pour les puces qui trouvent au sein des terriers des conditions microclimatiques adaptés à leur développement larvaire (Duchemin 2003). Selon le temps de contact entre la puce adulte et son hôte, on distingue :

- ◆ les puces pilicoles qui passent la vie adulte dans le pelage de l'hôte et sont très mobiles.
- ◆ les puces nidicoles dont le contact avec l'hôte lors du repas de sang se fait au moment du passage de celui-ci dans le nid ou le terrier (ou chez l'homme, une pièce d'habitation). Les stades immatures sont retrouvés dans la litière.
- ◆ les puces fixées où le contact est très étroit avec l'hôte puisqu'elles restent fixées par les pièces buccales, comme les tiques dures (mode de vie est plus rare). (Duchemin 2003).

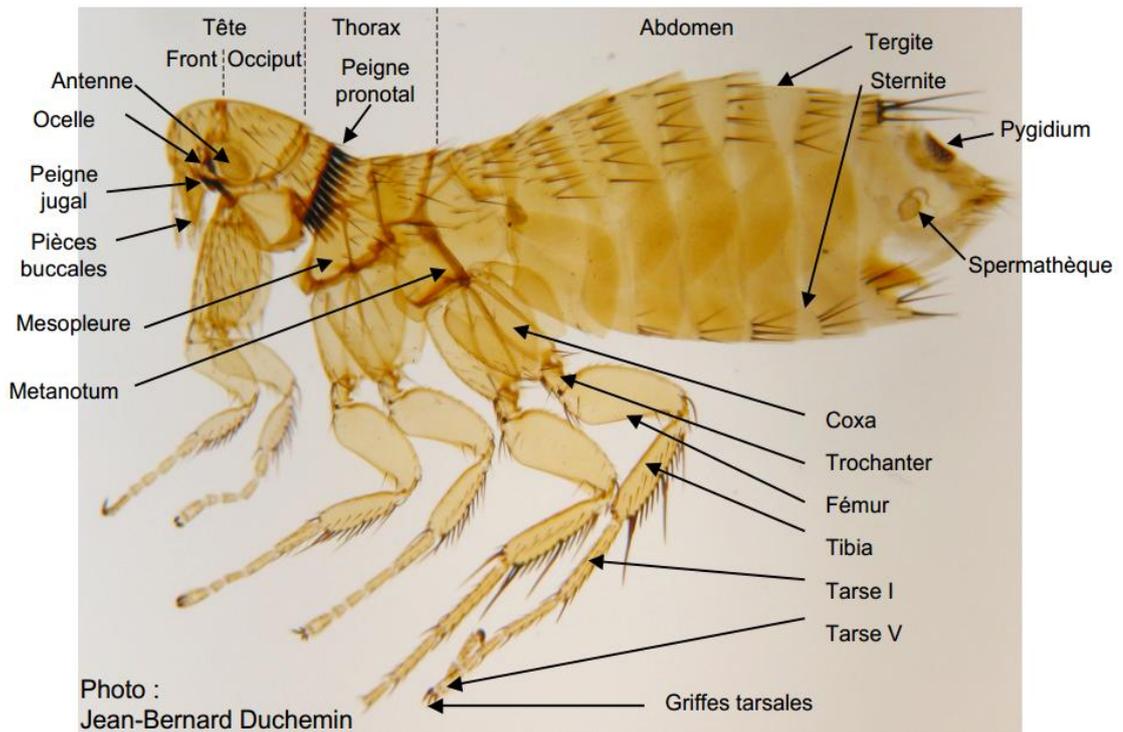


Figure 6 : Morphologie externe d'une puce adulte (*Paractenopsyllus juliamarinus* femelle)

(Robert 2010)

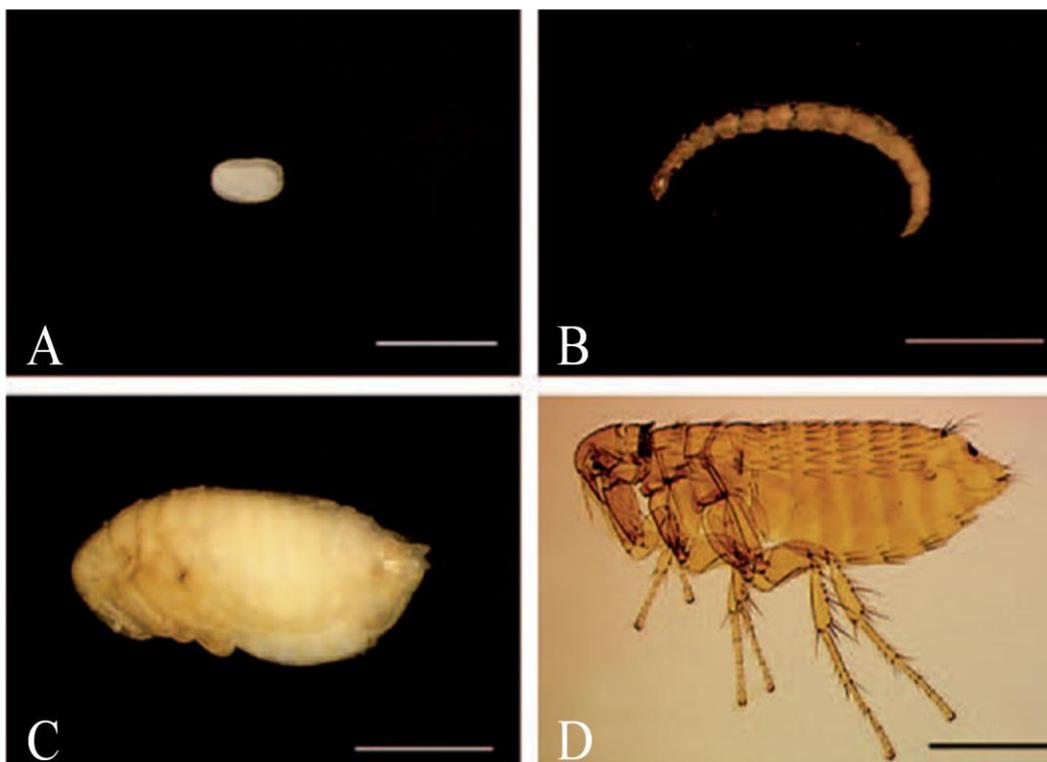


Figure 7 Les différents stades biologiques de la puce.

A. œuf, B. larve, C. nymphe, D. adulte. (Hastriter *et al.* 2009)

Le cycle de développement de la puce comprend les quatre stades biologiques observés chez les holométaboles : stade œuf, stade larvaire, stade nymphale et stade adulte (Figure 7). Les femelles pondent les œufs isolément ou par petites séries généralement sur l'hôte (Rhodain and Perez 1985). Les œufs de couleur blanc nacré, arrondis, ovoïdes et non adhérents tombent au sol. Ils mesurent environ 0.5 mm de long (Bitam *et al.* 2010). Le nombre total d'œufs pondus par une femelle varie selon les espèces, sans rythme par rapport aux repas sanguins (Duchemin *et al.* 2006). L'embryogenèse dure en moyenne une semaine (Rhodain and Perez 1985). Les larves sont vermiformes et apodes, mais pourvues de pièces buccales broyeuses. Elles sont détritiphages, se nourrissant de divers débris organiques. Elles peuvent se nourrir des fèces des adultes qui contiennent une grande proportion de sang non digéré. Les trois stades larvaires durent chacun de 2 à 6 jours selon les conditions d'humidité et de température du milieu. Les stades larvaires sont les stades les plus sensibles aux variations des conditions extérieures (Dryden 1999). Les larves de stades 3 tissent un cocon de soie dans lequel sont incorporés différents matériaux disponibles dans le milieu. Elles subissent une mue nymphale et se transforment en nymphes qui ne se nourrissent pas et restent immobiles, enfermées dans le cocon. Ce stade constitue la forme la plus résistante, qui peut durer plusieurs mois avant que les adultes n'émergent, selon les conditions extérieures (Dryden 1999). Les émergences des adultes sont fonction de plusieurs paramètres dont les plus connus sont la température, l'humidité relative et la présence d'hôte (Silverman and Rust 1985). Après l'émergence, les adultes mâles et femelles copulent et recherchent un hôte pour leur premier repas (Rhodain and Perez 1985). Les durées de développement des puces ont un optimum de température et d'humidité très étroit selon les espèces, mais en général aux alentours de 25°C et plus de 80% d'humidité relative. Ces exigences sont surmontées par le comportement parasite et la possibilité de quiescence à tous les stades jusqu'au retour des conditions favorables (Rhodain and Perez 1985).

2.2. Systématique

L'ordre des Siphonaptères comprend actuellement 2574 espèces décrites appartenant à 244 genres, regroupées en 15 ou 16 familles réparties dans le monde entier (Durden *et al.* 2002; Hastriter *et al.* 2009; Bitam *et al.* 2010) (cf. Annexe 1). Concernant les puces de Madagascar, elles sont réparties en 4 familles incluant des genres endémiques tels que *Tsaractenus*, *Paractenopsyllus* (Ceratophyllidae, Leptopsyllinae) et *Synopsyllus* (Pulicidae, pulicinae) (cf. Annexe 2). On compte actuellement 41 espèces décrites dont 31 sont endémiques (Duchemin 2003) (cf. Annexes 2 et 3).

Tableau I: Systématique des Siphonaptères

Règne	: Animal
Super-embranchement	: Invertébrés
Embranchement	: Arthropodes
Sous-embranchement	: Antennates et Mandibulates
Classe	: Insectes
Sous-classe	: Ptérygotes
Infra classe	: Néoptères
Super ordre	: Mécoptéroïdes
Ordre	: Siphonaptères

2.3. Morphologie générale

Une puce adulte a une forme aplatie latéralement. C'est un insecte de petite taille allant de 2 à 10 mm (Bitam *et al.* 2010). Le corps est très chitinisé, d'apparence massive du fait des séparations peu nettes entre la tête, le thorax et l'abdomen (Rhodain and Perez 1985).

La tête

La tête, arrondie ou anguleuse, est étroitement liée au thorax et donc peu mobile (Figure 6). Elle peut être séparée en deux parties, le front (antérieur) et l'occiput (postérieur), par la suture inter antennaire qui relie la base des deux antennes (Lumaret 1962). Elle porte une paire d'antennes constituées habituellement de trois articles. L'œil est un ocelle situé en avant de l'antenne. La partie inférieure porte chez certaines espèces des épines disposées en peigne (ou cténidie). L'existence ou non de ce peigne céphalique constitue un critère d'identification. Les trois stylets formant la trompe piqueuse sont le labre et la partie fine des deux maxilles (ou lacinia), à bord denticulé à la partie inférieure chez de nombreuses espèces. Les maxilles sont creusées en leur face interne d'un sillon qui constitue le canal salivaire lorsqu'elles sont appliquées l'une contre l'autre. L'épipharynx comporte également sur sa face interne un sillon qui, appliqué sur les maxilles, forme un second canal servant à l'aspiration du sang de l'hôte. Ces stylets piqueurs sont maintenus en place par les palpes labiaux qui sont constitués de cinq segments.

Le thorax

Le thorax est formé de trois segments. D'avant en arrière, on distingue respectivement le prothorax, le mésothorax et le métathorax, subdivisés eux-mêmes en plusieurs parties indépendants. Chacun des trois segments sont pourvus d'une paire de stigmates et de pattes. La forme des plaques pleurales est très variable et constitue un critère de diagnose. Un peigne thoracique est situé sur le pronotum de certaines espèces constituant aussi un critère de diagnose. Les pattes, dont la morphologie est utilisée dans la diagnose, sont constituées de cinq segments dont le dernier, le tarse, comporte cinq articles. Le segment le plus distal porte des soies et deux griffes (Figure 6).

L'abdomen

L'abdomen est constitué de dix segments formés respectivement d'un tergite et d'un sternite. Le chevauchement des différentes plaques permet la distension de l'abdomen lorsque la puce effectue son repas. Les sexes peuvent également être différenciés par l'examen de l'appareil génital résultant de la transformation de deux ou trois segments. Chez le mâle, les tergites IX forment de chaque côté un manubrium interne et un clasper externe mobile, les sternites IX modifiés en organe de fixation lors de l'accouplement ont une forme en L avec une partie proximale et une partie distale. La forme et la chaetotaxie de la partie proximale sont utilisées en systématique. L'appareil génital mâle comporte également un appareil intrometteur complexe dont la forme des éléments constitutants est utilisée pour discriminer les espèces. Chez la femelle, la formation à retenir d'un point de vue systématique est celle de la forme de la spermathèque (Figure 6). Le dixième segment abdominal porte l'anus et dorsalement un organe sensoriel, le sensillum.

2.4. Les puces vectrices ou potentiellement vectrices de la peste

2.4.1. Rôle de la puce dans la transmission de la peste

Les observations et expériences faites par Paul Louis Simond en 1897 ont permis de mettre en évidence le rôle joué par les puces lors de la transmission de la peste (Mollaret 1991). A cette époque, il était déjà admis que les cas de peste humaine étaient associés au contact avec des rats morts (Yersin 1894; Brygoo 1974). Mais les vrais mécanismes de transmission restaient obscurs. Ses expériences sur la transmission de la peste de rongeur à rongeur lui permettaient de conclure une «*difficulté, sinon l'impossibilité de la transmission alimentaire dans la nature de la peste chez le rat et la souris*». Parallèlement, il remarqua la présence de traces de piqûre d'insecte sur les membres des pestiférés qu'il nomma «*phlyctène précoce*». Il associa aussitôt ces lésions à des piqûres de puce. Son hypothèse fut vérifiée par la présence du bacille de

Yersin dans le tube digestif des puces récoltées sur des cadavres de rats pesteux. Mais le véritable rôle vecteur de la puce fut confirmé par une expérience d'infection expérimentale entre un rat malade infesté de puce mis en contact avec un rat sain (Figure 8) (Mollaret 1991).

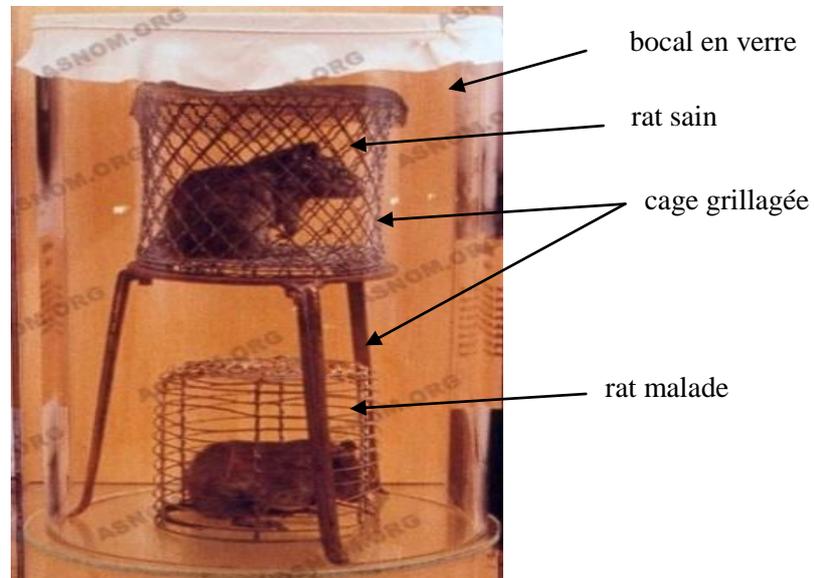


Figure 8: Infection expérimentale du rat (photo:www.asnom.org)

Chez la puce, l'infection reste consignée au niveau du tube digestif. (Hinnebusch 2005). La transmission de la bactérie de la peste semble être assurée par le phénomène du blocage proventriculaire, décrit pour la première fois par Bacot et Martin en 1914. Lorsqu'une puce se gorge de sang d'un rongeur infecté ou d'un autre hôte, certaines bactéries s'installent dans le proventricule de la puce (Bacot and .Martin 1914). Cette structure à spicules ferme l'estomac lorsque la puce est en train de sucer mais s'ouvre pour laisser le sang ingéré entrer dans l'estomac (Gratz 1999; Marquardt 2004; Hinnebusch). Après une durée approximative de cinq jours à deux semaines, les bactéries de la peste qui sont hébergées sur les spicules du proventricule se multiplient et bloquent finalement le passage du sang dans l'estomac (Eisen *et al.* 2007; Eisen and Gage 2012). Bien que la puce continue à se nourrir avec une avidité accrue à mesure que le temps passe (Gratz 1999), le sang ne peut plus continuer à entrer dans l'estomac et reste dans l'œsophage. La puce infectée essaie alors de multiplier la fréquence de ses repas sanguins, augmentant les chances de propagation de la bactérie (Hinnebusch 2005; Eisen and Gage 2012). Lorsque la puce cesse de sucer, l'œsophage se rétracte et le sang accumulé est conduit dans la blessure faite par la piqûre, y introduisant *Y. pestis* (Gratz 1999). Pendant près d'un siècle, ce phénomène était considéré comme la seule voie majeure de transmission de la peste par les puces, concluant ainsi que les espèces de puces aptes à se

bloquer sont les vecteurs les plus efficaces (Gratz 1999; Eisen *et al.* 2007; Eisen and Gage 2012). Cependant, une puce bloquée meurt au bout de 5 jours après la formation du blocage, ce qui diminue le temps nécessaire à la transmission (Eisen *et al.* 2007). De plus, il fut démontré que des puces partiellement bloquées sont plus efficaces en tant que vecteurs car elles peuvent survivre plus longtemps (Eisen and Gage 2012). Des expériences d'infection expérimentale de souris avec des puces infectées ont permis de démontrer qu'une puce infectée peut transmettre la bactérie seulement au bout d'une journée d'incubation, ce qui veut dire que le phénomène de blocage n'est pas une condition *nécessaire* pour la transmission vectorielle de la peste (Eisen *et al.* 2007).

2.4.2. Diversité des puces vectrices impliquées

Actuellement 250 espèces de puces ont été trouvées naturellement infectées par la peste, mais seule une petite proportion est considérée comme ayant une bonne capacité vectorielle. (Gage and Kosoy 2005; Eisen and Gage 2012). Pour jouer un rôle efficace de vecteur de la peste, premièrement, la puce doit pouvoir ingérer l'organisme responsable de la peste avec son repas sanguin. Deuxièmement, elle doit vivre assez longtemps pour que le pathogène se multiplie suffisamment. Troisièmement, elle doit être capable de transférer le pathogène à un hôte animal ou humain dans des concentrations suffisantes pour provoquer l'infection. Enfin, elle doit être présente en nombre suffisamment élevé pour maintenir l'infection localement (Gratz 1999; Eisen and Gage 2012).

Le rôle incontesté de *Xenopsylla cheopis* comme principal puce vectrice de la peste a été démontré surtout par sa capacité de former un biofilm microbien dans le proventricule pour transmettre très tôt la bactérie après ingestion de sang infecté (Brygoo 1974; Beaucournu 1999; Gratz 1999). La notoriété de *X. cheopis* peut aussi venir du fait que la majorité des introductions de peste dans un pays s'est fait par le biais des rats infestant les bateaux (*Rattus rattus*), hôtes naturels de *X. cheopis*, provenant des échanges maritimes (Brygoo 1966; Gratz 1999). C'est aussi une espèce avec une grande diversité d'hôte et de biotope: elle est présente sur les rongeurs commensaux et peut aussi infester des rongeurs sauvages (Eisen and Gage 2012). Elle joue un rôle dans la transmission enzootique ainsi que dans la transmission aux humains. Cependant, l'existence de foyers sans *X. cheopis* (Beaucournu) permet d'ouvrir un champ de vision plus large, et de rechercher d'autres espèces vectrices. Dans les foyers de peste de Madagascar, *X. cheopis* est considéré comme le principal vecteur.

En 1932, Wagner et Roubaud ont mentionné l'existence dans les foyers de peste de Madagascar l'existence d'une nouvelle espèce de puce, *Synopsyllus fonquerniei* (Girard

1942). Elle est répandue dans toute la région des Hautes Terres. Cette puce est capturée sur les rats à l'extérieur des habitations et rarement à l'intérieur, où son nombre dépasse celui de *X. cheopis* pendant la saison froide et sèche (Girard 1942). Elle est abondante surtout dans les terriers de rats péri-domestiques et dans les champs en fin de saison sèche (Klein 1966). Des infections et des essais de transmissions expérimentales positives avec la bactérie de la peste ainsi que des données écologiques ont permis de conclure que *S. fonquerniei* joue un rôle dans le maintien de la peste surtout chez les rats (Klein 1966).

Pulex irritans, la puce de l'homme possède une grande variété d'hôtes. Outre l'homme on la trouve sur le renard, le blaireau, l'écureuil fouisseur, le cobaye et le rat, ainsi que sur les animaux domestiques tels que le cochon, la chèvre, le chien, le chat (Gratz 1999). On la trouve souvent en forte densité dans les habitations. *P. irritans* a été considéré comme un vecteur possible ou probable de la peste dans les pays en voie de développement (Hinnebusch 2005). Son rôle serait plutôt mécanique que vectoriel. Dans ce cas, l'infection du vecteur n'est pas nécessaire, mais une septicémie élevée de l'hôte ainsi que la survie de la bactérie sur les pièces buccales du vecteur, permettraient la transmission après des piqûres successives (Hinnebusch 2005).

Ctenocephalides felis, la puce du chat, est cosmopolite et a une distribution plus large que celle de *X. cheopis*. Elle se retrouve non seulement sur les chats mais aussi sur un large spectre d'hôtes, notamment le chien, l'homme et d'autres mammifères et les oiseaux (Gratz 1999). Elle est également trouvée abondante dans les habitations humaines dans les foyers de peste. Cependant, son implication dans le cycle de la peste n'est pas encore démontré (Gratz 1999; Marquardt 2004; Eisen and Gage 2012).

II. MATERIELS ET METHODES

1. Collecte des puces sur le terrain

1.2. Présentation des sites d'études

Trois sites forestiers ont été investigués au cours des captures de micromammifères sur lesquels ont été récoltées les puces utilisées comme matériel biologique dans cette étude. Ces captures ont été effectuées dans le cadre du projet Faune Sauvage et du projet Rift-OI (IPM 2009, 2010, 2011). Les trois sites sont respectivement du nord au sud : Anorana ($18^{\circ}18'44''S$ $048^{\circ}00'98$ E) dans le district d'Anjozorobe, Lakato ($19^{\circ}12'1.63''S$ $48^{\circ}26'21.22''E$) dans le district de Moramanga et Ankazomivady ($20^{\circ}46'49,4''S$ $047^{\circ}09'44,4''E$) dans le district d'Ambositra (Figure 9).



Figure 9 : Carte représentative des sites d'étude

Ces trois sites se trouvent tous dans la zone de forêt humide et sempervirente d'altitude des Hautes Terres Centrales (Gauthier and Goodman 2008). L'altitude se trouve dans une fourchette de 800 à 1800m. La couverture forestière qui subsiste sur les H T C est formée par quelques zones isolées et extrêmement fragmentées (Goodman *et al.* 1998, S. M. Goodman, 2007 #70; Goodman *et al.* 2007). Elle est aussi caractérisée par une forte pression anthropique de dégradation (Goodman *et al.* 2007).

1.3. Piégeage des hôtes micromammifères

Les puces ectoparasites des micromammifères sont capturées vivantes sur leur hôte micromammifère. Les micromammifères sont capturés à l'aide de pièges à capture unique du type Sherman (H.B. Sherman Trap. Inc, Tallahassee, Florida) et BTS (Besançon Technical Service, Besançon, France). Le piège BTS (Figure10) est idéal pour la capture des rats. C'est un piège grillagé dont la fermeture de la porte est actionnée par la manipulation par le rongeur d'un crochet sur lequel est accroché l'appât. Le piège Sherman (Figure 11) est une cage formée par des plaques d'aluminium avec des appâts placés au fond de la cage. La fermeture de la porte est déclenchée par le poids de l'animal sur une palette située au milieu de la cage. Les pièges Sherman sont plus efficaces avec les animaux de petite taille comme les souris et les musaraignes.



Figure 10 : Piège BTS (photo: auteur)



Figure 11 : Piège Sherman (photo: auteur)

Pour les investigations en forêt, l'usage de trou-piège ou «pitfall» permet de récolter plusieurs individus en une nuit. Ce type de piège consiste en une série de seaux enterrés, reliés par une bande de plastique infranchissable, qui canalise les petits animaux non sauteurs. En cherchant une voie de sortie, les animaux tombent dans les seaux et sont alors prisonniers (Figure.12). La capture de spécimens vivants est primordiale pour pouvoir récupérer les ectoparasites.

Chaque animal capturé est soit anesthésié ou euthanasié avant d'être épucé, pesé, mesuré et sexé. Selon le besoin, l'animal peut être autopsié et des prélèvements d'organe (rate, rein...) et de tissu (pattes, oreilles) peuvent être effectués.



Figure 12 : Ligne de trou piège (Photo : Randriamaherijaona S.)

1.4. Epouillage des micromammifères

Chaque micromammifère est placé dans une grande bassine de couleur claire, assez profonde pour éviter la fuite des puces (figure 13). A l'aide d'une brosse à poils durs, le pelage est systématiquement brossé. Les puces qui s'échappent sont récupérées à l'aide d'une pompe à poire manuel. Les puces sont ensuite soit transférées directement dans l'alcool 70° pour être conservées, soit maintenues vivantes dans des récipients (tubes à essai de 18 cm de long ou bocal d'élevage) contenant de la litière et recouverts de voile ou de coton pour être élevées en insectarium.



Figure 13 : Brossage du pelage d'un rat et récupération des puces (photo: auteur)

2. Elevage des puces en insectarium

Les puces vivantes récupérées sur le terrain sont ensuite élevées en insectarium. Ces souches constituent du matériel biologique à l'usage du laboratoire pour les tests de sensibilité aux insecticides. Aussi, dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé ces puces pour la mise en place d'une technique d'extraction d'ADN non destructive et pour des tests d'infection expérimentale.

Conditions d'élevage

Les puces sont identifiées morphologiquement sous loupe binoculaire et sur tablette réfrigérée. La tablette réfrigérée permet d'observer les individus sans les tuer car le froid paralyse les puces. Les individus de la même espèce et de la même provenance sont regroupés. Chaque population est élevée dans un bocal de 2 litres recouvert par un voile à maille fine maintenu par un élastique. Tous les stades sont maintenus ensemble dans un même bocal. Le bocal d'élevage contient une litière composée de son, de riz et d'une cuillerée de nourriture pour les larves (environ grammes). Cette nourriture pour les larves est élaborée avec 65 grammes de sang de bœuf séché, 5,5 grammes de levure et 200 grammes de poudre de biscuit pour rat. L'épaisseur de la litière est au dixième de la hauteur du bocal. Cette litière est changée une fois par an lors du dénombrement des individus par bocal: une souche surpeuplée est alors divisée. Il faut noter que la division des souches permet un accroissement plus rapide de la population. Cependant, la population d'une souche peut décroître d'une année à l'autre si elle est trop importante (nombre de population supérieur à 400). Le nombre moyen d'une population par bocal est maintenu à 150 à 200 puces. Les puces adultes sont gorgées une fois par semaine avec une souris âgée d'une semaine. La souris est retirée après trois jours. Les puces sont brossées du corps de la souris avec un goupillon. Les conditions de températures (23 à 27°C) et d'humidité relatives (70 à 80 %) sont maintenues dans le local de l'insectarium grâce à un radiateur et un humidificateur.

3. Les techniques d'extraction d'ADN

Pour les mises au point des techniques d'extraction d'ADN, des puces d'élevage, *X. cheopis* et *S. fonquerniei* ont été utilisées.

3.1. Technique d'extraction d'ADN avec broyage

Cette technique a été adaptée à l'extraction de l'ADN des puces d'après un protocole d'extraction d'ADN à partir de pattes de moustique décrit par Cornel AJ et Collins FH en 1996 (Cornel *et al.* 1996).

3.1.1. 3.1.1. Réactifs

- BHI (Brain Heart Infusion): milieu de culture pour *Yersinia pestis*. L'utilisation du BHI est facultatif et seulement dans le cas où l'on projette de faire une culture microbienne à partir de broyat de puce.
- **Protéinase K**: c'est une endopeptidase qui permet de dénaturer les protéines. Elle inactive les ADNases et ARNases et peut modifier les protéines de surface des cellules.
- **Tampon de lyse** (Na Cl 0.08M, sucrose 0.16M, Trizmabaze 0.10M, EDTA 0.06M, SDS 0.05M): il est surtout composé d'agents tensioactifs, chélateurs et dénaturants pour les protéines. Il participe à la lyse de la membrane par dénaturation des lipoprotéines membranaires, inactive les ions métalliques et ainsi bloquer certaines enzymes.
- **Ethanol 100% et 70%**: l'éthanol absolu permet de précipiter les acides nucléiques. Les alcools mobilisent l'eau du milieu, ce qui diminue la solubilité de l'ADN.
- **Eau distillée stérile.**
- **Acétate de potassium**: permet de précipiter le SDS avec les protéines.

3.1.2. 3.2.2. Mode opératoire

a) Broyage des tissus

La puce entière est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Une bille en acier (Qiagen) de 3 mm de diamètre est placée dans chaque tube. 100 µl de BHI est ajouté à chaque tube. Le BHI peut être directement remplacé par un mélange de tampon de lyse et de protéinase K, à raison de 7,6µl de protéinase K dans 1 ml de tampon de lyse. Ce mélange est broyé avec TyssueLyser® (Qiagen), pendant 1 min. 30 sec, à 30 vibrations par seconde.

b) Lyse cellulaire et dénaturation des DNases

On procède à une fragilisation chimique des membranes cellulaires par l'action combinée des composantes du tampon de lyse et de la protéinase K, qui reste activée jusqu'à 65°C.

Le broyat est incubé à 65°C dans un bain marie pendant 30 minutes pour précipiter les protéines et la cuticule.

c) Précipitation des protéines

Après la lyse cellulaire, on procède à l'élimination des protéines par précipitation. 13 µl d'acétate de potassium 8M sont ajoutés au broyat après l'incubation. L'addition d'acétate de potassium neutralise le milieu, précipite le SDS ainsi que certaines protéines, sous forme de complexes associés aux molécules de SDS et de potassium. Ces agrégats sont éliminés par centrifugation. Le mélange est passé au vortex, puis laissé dans la glace pilée pendant au

moins 30 minutes. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 14000 tours par minute pendant 20 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube propre et le culot est jeté.

d) Lavage et précipitation de l'ADN

200 µl d'éthanol pur sont mélangés au surnageant et laissé à température ambiante pendant au moins 5 minutes pour précipiter les ADN. Ensuite, le mélange est centrifugé à 14000 tours par minute pendant 20 minutes pour obtenir un culot d'ADN. L'alcool est ensuite drainé soigneusement jusqu'à élimination, en conservant intact le culot d'ADN. Un autre cycle de lavage délicat, par rinçage du culot est effectué avec 200 µl d'éthanol à 70%. L'éthanol est versé délicatement en prenant soin de ne pas jeter le culot. Le tube contenant le culot est ensuite laissé sécher à température ambiante pendant au moins une heure.

e) Reconstitution de l'ADN en solution

Le culot d'ADN est reconstitué dans 100 µl d'eau distillée stérile. L'extrait d'ADN est conservé à -20°C.

3.2. Mise au point de la technique d'extraction non destructive

3.2.1. Principe

La méthode d'extraction d'ADN dite « non destructive » consiste à extraire l'ADN de la puce sans endommager les caractères morphologiques permettant l'identification morphologique (<http://fleasoftheworld.byu.edu>). L'extrait d'ADN obtenu doit aussi permettre la détection de l'ADN de la bactérie de la peste, au cas où la puce serait infectée. Enfin, à l'issue de la manipulation, la cuticule de la puce doit être intacte, en vue d'un montage suivi de la détermination morphologique de l'espèce.

Cette méthode est basée sur le fait que l'incubation de la puce non broyée dans un tampon d'extraction d'ADN pendant une nuit, suivi d'étapes de purification, permet d'extraire son ADN et de conserver l'intégrité de son exosquelette. Une petite perforation ou incision dans le corps de la puce permet d'accéder au contenu du corps et éventuellement à l'ADN de la bactérie de la peste contenue dans le tube digestif.

3.2.2. Comparaison des méthodes d'extraction

3.2.2.1. Protocole d'extraction de l'ADN total avec le kit DNeasy blood and tissue® (Qiagen)

Principe

Le kit *DNeasy blood and tissue* est un kit d'extraction de l'ADN total, provenant de différents types de cellule et de tissu, allant des bactéries aux cellules de mammifère en passant par les insectes. Ce kit contient des réactifs prêts à l'emploi, des colonnes de purification, *DNeasy Mini Spin column*, ainsi que des tubes collecteurs. Dans ce protocole, le broyat de tissu préalablement lysé par les solutions de lyse est déposé sur la membrane de la colonne. L'ADN qui adhère alors à la membrane est purifié par les tampons de lavage. Enfin, l'ADN est élué avec le tampon d'élué.

Des modifications ont été apportées au protocole de base pour mettre en place la technique d'extraction d'ADN non destructive. La modification concerne surtout la durée d'incubation dans le tampon de lyse et le volume d'éluant final.

Tableau II: Réactifs du kit DNeasy

Désignation	Attribution
Protéinase k	Enzyme protéolytique qui digère les protéines liés à l'ADN
Tampon ATL	(Animal Tissue Lysis,) Solution de lyse
Tampon AL	Solution de lyse
Tampon AW1	Solution de lavage
Tampon AW	Solution de lavage
Tampon AE	Tampon d'élué

Mode opératoire

↶ Préparation du spécimen.

Chaque spécimen est mis individuellement sur une lame de verre et les manipulations sont faites sous loupe binoculaire. A l'aide d'une aiguille montée bien tranchante, une incision est effectuée au niveau de l'abdomen entre le 2^e et le 3^e segment abdominal. Les puces incisées ainsi sont mises individuellement dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.

↶ Lyse cellulaire

A chaque spécimen sont ajoutés 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K. Le mélange est homogénéisé au vortex. L'étape de broyage est remplacée par une incubation d'une nuit à 56°C. Cette période permet à la protéinase K et aux tampons de lyse d'optimiser le rendement

de la lyse cellulaire, pour suppléer l'action de la lyse mécanique assurée par le broyage. Cela permet d'extraire une quantité optimale d'ADN.

↶ Lavage de l'ADN

➤ *Premier lavage*

Les spécimens sont enlevés à l'aide d'une pince fine et conservés dans l'alcool (Ethanol 70%). Ces puces pourront à nouveau être utilisées pour l'identification. 200 µl d'éthanol 100% et 200 µl de tampon AL sont ajoutés dans le mélange restant. Le mélange est transféré sur la membrane du *DNeasy Mini Spin column* placé dans un tube collecteur de 2 ml. L'ensemble est centrifugé à 8000 tours/minute pendant 1 minute. L'éluât et le tube collecteur sont jetés. La colonne est placée dans un nouveau tube collecteur et 500 µl de Tampon AW1 sont ajoutés. La centrifugation à 8000 tours/minute pendant 1 minute est répétée. L'éluât et le tube collecteur sont jetés.

➤ *Deuxième lavage*

La colonne est placée dans un nouveau tube collecteur et 500 µl de Tampon AW1 sont ajoutés. Le tout est centrifugé à 14000 tours/minute pendant 3 minutes pour sécher la membrane. L'éluât et le tube collecteur sont jetés. Il faut veiller à ce que la colonne ne soit pas en contact avec l'éluât. Pour sécher la colonne, elle est placée dans un nouveau tube collecteur puis centrifugée à vide pendant 5mn à 14000 tours/minute.

↶ Récupération de l'extrait d'ADN

La colonne est placée dans un nouveau tube Eppendorf propre de 1,5 ml. 15 à 40 µl de tampon AE sont déposés au centre de la colonne, sans la toucher. Elle est laissée à température ambiante pendant 1 min, puis centrifugée pendant 1 minute à 8000 tours/minute pour éluer. On peut recommencer cette dernière étape dans un nouveau tube Eppendorf afin de collecter une quantité maximale d'ADN mais il est préférable de ne pas mélanger les deux extraits afin de prévenir une dilution du premier extrait. Les extraits d'ADN sont conservés à -20°C.

3.2.2.2. Protocole d'extraction non destructive d'ADN avec InstaGene Matrix™

Principe

La technique d'extraction est basée sur la propriété du chelex qui est une résine échangeuse d'ion. La matrice en chelex absorbe les produits de lyse cellulaire qui risquent d'inhiber la réaction PCR. Des modifications ont été apportées au protocole initial (protocole du fabricant) pour la mise en place de la technique d'extraction d'ADN non destructive.

Réactif

InstaGene Matrix (BIORAD) est une suspension à base de billes de chelex à 6%. Le protocole d'extraction est basé sur la propriété chelatrice du chelex et la lyse cellulaire à très haute température. Le chelex va chelater les ions positifs, ce qui va permettre d'éviter la dégradation de l'ADN lors de l'étape à 100°C. C'est cette étape de chauffage qui va dissocier les protéines de l'ADN, détruire les parois cellulaires et dénaturer les protéines. Chelater les ions métalliques va aussi inhiber les DNases, qui ont besoin d'ions comme le magnésium pour s'activer.

Mode opératoire

↶ Préparation de la puce.

Chaque individu conservé dans l'alcool est préalablement séché sur du papier filtre. Sous loupe binoculaire, une petite incision est effectuée à l'aide d'une aiguille de perfusion au niveau de l'abdomen dans 10µl de PBS 1X sur une lame de verre. L'aiguille et tous les instruments utilisés doivent être changés pour chaque spécimen ou stérilisés avec la flamme d'un brûleur à alcool pour éviter toute contamination d'ADN.

↶ Lyse cellulaire

Chaque spécimen est transféré dans un tube PCR individuel. Le PBS est récupéré et mis avec le spécimen pour récupérer le maximum de matériel biologique. Le flacon d'InstaGene Matrix est fourni avec un barreau magnétique. Pour obtenir une solution homogène, le flacon est posé sur un agitateur magnétique pendant la distribution de 100 µl de ce réactif dans chaque tube contenant un spécimen. Une incubation d'une nuit à 56°C est nécessaire pour remplacer l'étape de broyage. Chaque spécimen doit couler au fond du tube au cours de l'incubation pour être en contact avec les billes de chelex. C'est une étape délicate de la manipulation, car certains spécimens de très petite taille ont tendance à surnager sur le liquide à cause de la tension superficielle. Il faut immerger délicatement la puce à l'aide d'une pointe stérile ou secouer vigoureusement le tube, si nécessaire.

Après l'incubation, la solution est mélangée vigoureusement au vortex pendant 10 secondes, puis incubée dans un thermocycleur réglé à 100°C, pendant 8 minutes. Ensuite elle est repassée au vortex pendant 10 secondes.

↶ Récupération de l'ADN

L'étape finale de l'extraction est la centrifugation à 12000 tours par minute pendant 3 minutes. Le culot est surtout constitué de billes de chelex, de débris cellulaires et du corps de la puce. Le surnageant constitue l'extrait d'ADN directement utilisable pour la réaction PCR. Il

est transféré dans un tube propre sans décrocher le culot et conservé à -20°C, tandis que le tube est jeté avec le culot. La puce est récupérée et conservée dans de l'alcool 70°.

4. Travaux moléculaires

4.1. La technique de la Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1.1. Principe

Cette technique développée en 1985 par Kary Mullis permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement (Mullis and Erlich 1988). Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (20 à 30 nucléotides en général). L'ADN polymérase les utilisera comme amorces. L'ADN extrait à partir d'un organisme ou d'un échantillon contenant des ADN d'origines diverses n'est pas directement analysable. Il contient une masse trop importante de séquences nucléotidiques. Il convient donc d'isoler, la ou les séquences qui présentent un intérêt : la PCR peut donc sélectionner une ou plusieurs séquences déterminées et les amplifier par réplication à des dizaines de milliards de copies. La réaction terminée, la quantité d'ADN matriciel contenue dans l'échantillon PCR n'aura pas varié. En revanche, la quantité de la ou des séquences amplifiées (l'ADN d'intérêt) sera très importante.

4.1.2. Le mélange réactionnel ou «mix»

La réaction PCR est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase (DNA polymerase thermostable provenant de *Thermobius aquaticus*, microorganisme des sources chaudes), les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Dans le commerce, l'ADN polymérase est vendu sous forme de kit, comportant en même temps un tampon de concentration 5 X ou 10 X, contenant ou non du magnésium, et une solution de chlorure de magnésium (MgCl₂), permettant d'optimiser la réaction PCR. Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres tels que la concentration en MgCl₂, la concentration en amorces, la spécificité des amorces, *etc.*

4.1.3. Les cycles de température

Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à

100°C). L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. On entend par condition PCR les programmations du thermocycleur utilisées dans le cadre de l'étape d'amplification. Une programmation basique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases:

- Une phase de dénaturation par la chaleur (92-95°C) pour séparer les deux brins d'ADN. La durée dépend de la taille et de la séquence d'ADN. Cette étape comprend un cycle.
- Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55-60°C. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute). Cette étape comprend en général 25 à 40 cycles.
- Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces comprenant un cycle à 70-72°C (1-2 minutes)

Le choix de la durée et du nombre des cycles et des températures dépend de la taille de la séquence d'intérêt ainsi que de la taille et de la complémentarité des amorces. Il convient de réduire les durées pour prévenir le risque d'amplification non spécifique. Enfin, la température d'hybridation varie aussi selon la nature des amorces. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective et spécifique. Les températures de dénaturation et de polymérisation varient peu, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces. Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au T_m qui est la température de demi-dénaturation. Pour calculer le T_m d'une amorce inférieure à 30 nucléotides, on utilise la formule suivante :

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

(où A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide).

4.2. Mise au point de la PCR avec COI pour valider les méthodes d'extractions.

Pour l'amplification par PCR des extraits d'ADN des puces d'élevage (*X. cheopis* et *S. fonquerniei*), une paire d'amorce encadrant un fragment de gène de 710 paires de base, codant pour un gène mitochondrial, le Cytochrome Oxydase *c* sous-unité 1 (COI) commun à divers espèces d'invertébrés est utilisé pour détecter la présence d'ADN (Folmer *et al.* 1994). Le but est de détecter de l'ADN amplifiable dans les extraits d'ADN obtenus par la méthode d'extraction non destructive. Ensuite après l'extraction, les ADN des puces de forêt seront amplifiés avec les amorces COI pour servir de base à la recherche de séquence spécifique

permettant de différencier les espèces. Les séquences de la paire d'amorce COI sont les suivants:

LCO 1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' et HCO 2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (Folmer *et al.* 1994).

4.2.1. Les «mix» des réactions PCR avec les amorces COI

Plusieurs types de «mix» sont testés, selon la marque de la Taq utilisée, en faisant varier les volumes et les concentrations de chaque composant du mix. La quantité d'ADN dans chaque réaction peut aussi varier. Le protocole pour le mix 1 est inspiré de celui d'O. Folmer, avec quelques modifications : la quantité d'ADN est de 1µl et 5µl, pour un mix de 25µl, le volume de l'eau est ajusté selon le volume d'ADN utilisé (Folmer *et al.* 1994). Le mix 2 est inspiré du mix 1, sauf que la concentration et le volume de certains composants du mix ont été modifiés, en parallèle avec la Taq polymérase. Pour l'utilisation de la Taq FirePol® DNA Polymerase (mix 3, Tableau 3), plusieurs mises au point ont été effectuées jusqu'à obtenir un résultat optimal. Les modifications concernent surtout les volumes et concentrations des tampons, du MgCl₂, et des amorces.

Tableau III: Mix pour l'amplification de COI

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	mix 1	mix 2	mix 3
			Volume final (µl)		
Eau distillée	–	–	14,3	14,3	14,3
Tampon*	10X	1X	5	2,5	3
MgCl ₂	25mM	1mM	2	0,5	0,6
dNTP	10mM	200µm	0.5	0.5	0.6
forward	100µM	0.2µM	1	1	3
reverse	100µM	10µM	1	1	3
Taq**	5 U/µl	0.04 U/µl	0.2µl	0.2µl	0.3µl
ADN	–	–	1µl	5µl	5µl

*Mix 3: Tampon 5X

**Mix 1: Taq= GoTaq® Flexi DNA polymerase (PROMEGA), Mix 2: Taq= R Taq® DNA polymerase (AMERSHAM), Mix 3: Taq= FirePol® DNA polymerase (Solis Biodyne)

Lors de l'amplification des extraits d'ADN de puces de forêts, le mix 3 est retenu. Les mises au point sont faites en parallèle avec des ajustements de températures du programme PCR. Enfin, le volume total de chaque réaction est augmenté à 30µl en perspective d'envoi au séquençage des amplicons obtenus.

4.2.2. Mises au point des conditions PCR

Pour détecter la présence d'ADN dans les échantillons de puce d'élevage avec les amorces COI, les conditions n°1 ont été suivies (Tableau IV). Suite aux résultats, des modifications ont été apportées au programme initial (conditions n°2, Tableau IV). La température d'hybridation a été abaissée à 40°C pour pouvoir vérifier la présence d'ADN, les durées sont aussi augmentées pour optimiser les réactions.

Tableau IV : Conditions PCR pour l'amplification avec COI

Nombre de cycle	Étapes	Conditions n°1		Conditions n° 2	
		Température (°C)	Durée	Température (°C)	Durée
1	Dénaturation initiale	94	5 minutes	94	2 minutes
35	dénaturation	94	30 secondes	95	1 minute
	hybridation	55	45 secondes	40	1 minute
	élongation	72	45 secondes	72	1 minute et 30 secondes
1	Elongation finale	72	10 minutes	72	10 minutes

4.3. Mise au point de la PCR avec ITS2 pour l'amplification de l'ADN des puces de forêts.

Après la mise au point avec COI, un autre amorce est utilisé. Il s'agit d'une portion de gène nucléaire ITS II (Internal Transcribed Spacer II) qui amplifie 470 à 510 paires de base. Ce marqueur a été utilisé pour une étude sur la variabilité génétique et la caractérisation moléculaire de deux espèces de puces (Lucheti *et al.* 2005b; Lucheti *et al.* 2005a; Luchetti *et al.* 2006)

4.3.1. Composition de la réaction PCR

Tableau V : Composition du mix pour ITS2

réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume final (µl)
Eau distillée	–	–	12,7
Tampon 10X (BD)	10X	1X	3
MgCl ₂	25mM	1mM	2,4
dNTP	10mM	200µm	0.6
ITS 2	100mM	10mM	1
ITS 2b	100mM	10mM	1
FirePol® DNA Polymerase (Solis Biodyne)	5 U/µl	0.04 U/µl	0.3µl
ADN	–	–	5µl

4.3.2. Mises au point des conditions PCR

Tableau VI : Conditions PCR pour l'amplification des amorces ITS2

Nombre de cycle	Etapas	Condition n°1		Condition n° 2	
		Température (°C)	Durée	Température (°C)	Durée
1	dénaturation initiale	94	5 minutes	94	5 minutes
35	dénaturation	94	30 secondes	95	30 secondes
	hybridation	55	45 secondes	40	30 secondes
	élongation	72	45 secondes	72	40 secondes
1	élongation finale	72	10 minutes	72	10 minutes

4.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Après les extractions et amplification par PCR, la présence d'ADN amplifiable est détectée par une migration par électrophorèse, sur gel d'agarose à 1,5 %. Pour les amorces COI et ITS2, les tailles attendues sont respectivement 710pb et 475-510pb.

5. Gorgement artificiel

5.1. Mise point d'un dispositif de gorgement artificiel

Ce système permet de faire prendre un repas de sang à des puces, sans avoir recours à un être vivant, grâce à un support artificiel. A terme, cette méthode devrait permettre des expériences d'infection artificielle avec du sang infecté par *Yersinia pestis*. Nous pouvons envisager également d'utiliser ce système pour nourrir les puces d'élevage en insectarium.

5.2. Description des dispositifs essayés

Un dispositif de gorgement artificiel comprend en principe :

- du sang frais hépariné,
- une membrane pour contenir le sang,
- un dispositif de chauffage qui permet de maintenir le sang à une température constante et homogène,
- un compartiment étanche de confinement, contenant les puces à gorger relié au compartiment contenant le sang: les parois doivent permettre aux puces d'atteindre la membrane et se gorger ou leur permettre de sauter pour s'accrocher à la membrane.

a. Prototype n°1

Nous avons utilisé un dispositif de gorgement en verre («gorgoir» Cnapmad, Madagascar) relié à un bain marie (Thermo Fisher Scientific) thermorégulable. Le sang est retenu en dessous du récipient en verre par une membrane fine (de nature variable) et maintenu à température constante par la circulation d'eau provenant du bain marie. Un compartiment de confinement des puces est ajusté à ce dispositif. Il comprend une seringue de 50 centimètres cube dont le bout supportant l'aiguille est coupé et relié à un cylindre de 3 à 4 cm de hauteur, dont les parois sont en voile très fine (Figure 14). Un fin accordéon de papier est fixé au bout du piston de la seringue pour permettre aux puces d'atteindre la membrane.

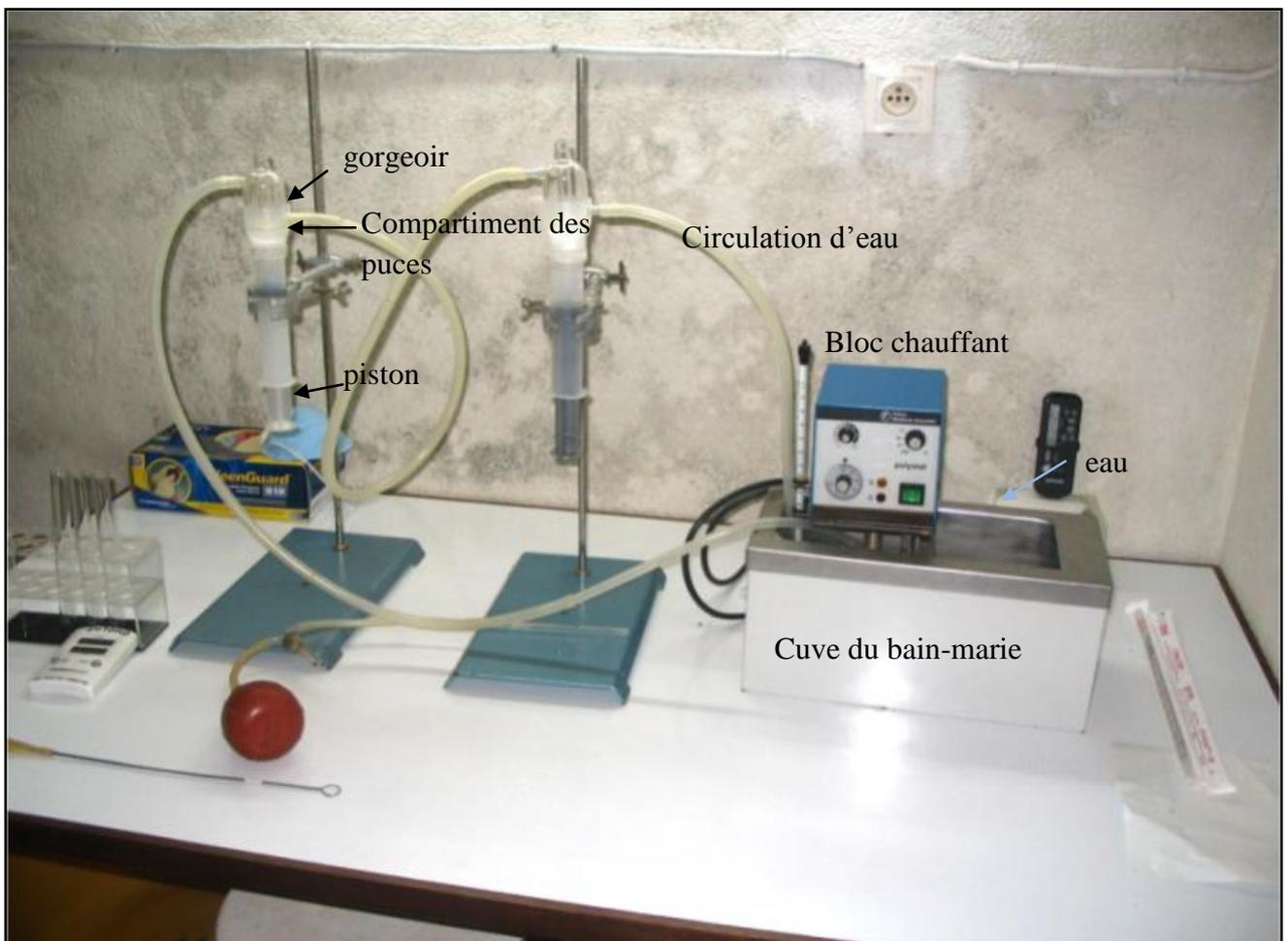


Figure 14 : Vue d'ensemble sur le dispositif de gorgement artificiel (prototype 1)
(Photo : Unité Entomologie Médicale, IPM)

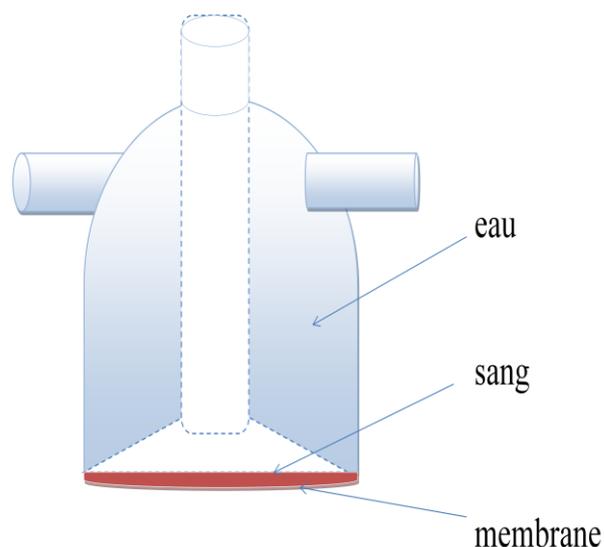


Figure 15 : Schéma avec légende du gorgéoir en verre (auteur)

La membrane est fixée au récipient en verre («gorgéoir») à l'aide d'élastiques puis le sang est introduit (Figure 15). Les puces sont collectées à l'aide de l'aspirateur à poire et transférées dans la seringue, dont le piston est tiré vers l'extérieur pour avoir une bonne profondeur et éviter la fuite des puces. Le compartiment de confinement est fixé à la seringue et le tout est emboîté avec le «gorgéoir» en verre (Figure 14). Le piston est ensuite poussé vers l'intérieur pour permettre aux puces d'arriver dans le compartiment de confinement. La pression de l'air induit par le piston est évacuée par la paroi en voile. Chaque élément raccordé du dispositif est consolidé avec des rubans de parafilm.

b. Prototype n°2

C'est le même principe que le dispositif précédent, un «gorgéoir» en verre dont la face inférieure contenant le sang est recouverte par une membrane et relié à un bain marie pour maintenir la température du sang. Ici, le compartiment de confinement des puces est plus simple: il est formé par une boîte de Pétri recouverte de voile fine, sur lequel est posée la face inférieure du «gorgéoir» (Figure 16). Les puces à gorger sont préalablement paralysées par le froid et mises dans la boîte de Pétri. Elles sont réanimées par la chaleur du sang et piquent la membrane à travers la voile.

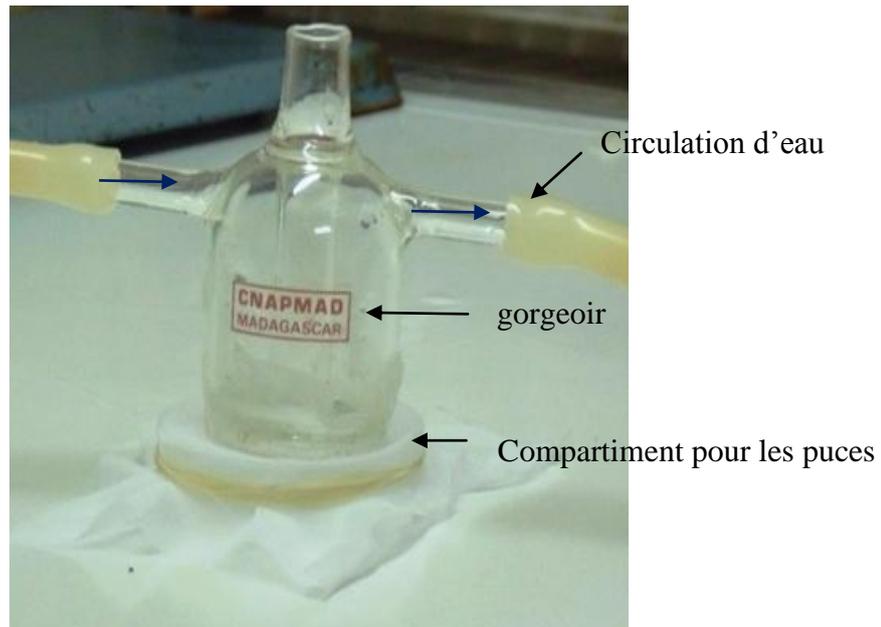


Figure 16: Détail du prototype n°2 (photo : auteur)

5.3. Les conditions et paramètres des expériences de gorgement artificiel

Les expériences se déroulent soit à température et humidité ambiante (condition 1) soit dans les conditions de température et d'humidité relative de l'insectarium (condition 2). Elles durent en moyenne 1 heure et 30 minutes. Cette marge de temps est obtenue par des expériences d'infestation de puces sur souris vivantes où plus de la moitié des puces ont du sang frais dans l'estomac au bout d'environ 1 heure. La température de l'eau circulante dans le dispositif est maintenue à 37°C. Concernant le repas de sang, environ 3 ml de sang sont nécessaires à chaque manipulation pour remplir le «gorgeoir» c'est-à-dire avoir une surface de la membrane bien remplie de sang sans bulle d'air. Deux types de sang ont été utilisés: du sang de rat fourni par l'animalerie de l'Unité Peste (IPM) par ponction de la veine linguale et du sang de mouton obtenu par ponction de la veine jugulaire. Dans chaque cas, le sang est directement collecté dans des tubes héparinés et conservés à +4°C. Pour la membrane, elle doit être assez fine pour permettre aux puces de piquer à travers mais suffisamment solide pour supporter la température du sang. Trois types de membrane sont testés: de la peau de souris, de la vessie de porc et du parafilm. Les puces utilisées pour la manipulation sont des souches élevées en insectarium. Ces spécimens doivent être non gorgées ou à jeun et leur état vérifié à la loupe binoculaire avant et après chaque manipulation. Les puces utilisées dans les manipulations sont de jeunes puces récemment émergées de leur cocon, qui n'ont jamais pris de repas de sang. Ces puces sont collectées à partir de nymphes regroupés dans un bocal ou à partir d'une colonie. Elles sont facilement reconnaissables par une cuticule de couleur jaunâtre. Trois catégories de puces ont été utilisées selon qu'elles soient mises à se gorgées

immédiatement après leur récolte, soient laissées à jeun pendant 5 ou 20 jours après la collecte, avant de les gorger.

6. Infection artificielle de puces avec des bactéries (*Yersinia pestis*) inactivées.

Le but de la manipulation est la détection de l'ADN de la bactérie de la peste dans des puces nourries artificiellement avec du sang contenant la bactérie sous sa forme inactive. Des préparations de bactéries inactivées (*Yersinia pestis*) sont fournies par l'Unité Peste. Quatre aliquots d'environ 1.5 ml ont été utilisés. La concentration de bactérie pour chaque aliquot est en moyenne 3.10^4 bactéries/ml. Pour avoir une concentration de 3.10^4 bactéries/ml de sang, les quatre aliquots sont rassemblés et centrifugés à 6000 tours pendant 10 minutes. Le culot est conservé et mélangé avec 3ml de sang de rat.

6.1. Mise en place de l'infection artificielle

Le prototype n°2 décrit plus en haut est utilisé pour cette manipulation. La membrane utilisée est le parafilm. Le sang utilisé, qui est du sang de rat est maintenu à une température de 37°C. Trois lots de 20 puces chacun sont gorgées pendant trois heures. Les puces utilisées sont des puces fraîchement émergées et laissées à jeun pendant 5 jours.

6.2. Détection par PCR de l'ADN de la bactérie *Y. pestis*

6.2.1. Extraction d'ADN non destructive et détection de l'ADN de la bactérie *Y. pestis* dans les puces gorgées

L'extraction d'ADN est faite par la méthode non destructive. L'extrait d'ADN obtenu est utilisé pour la détection par PCR de l'ADN de *Y. pestis* selon le mix représenté dans le tableau VII et les conditions PCR du tableau VIII.

6.2.2. Mélange réactionnel et conditions PCR pour la détection de l'ADN de la bactérie *Y. pestis*

Les amorces utilisés amplifient un fragment du gène *plasminogen activator (pla)* de *Y. pestis* (Hinnebusch and Schwan 1993). La taille attendue est de 475 paires de base. Les séquences des amorces sont : Yp1 (5'-ATC TTA CTT TCC GTG AGA AG-3') et Yp2 (5'-CTT GGA TGT TGA GCT TCC TA-3').

Tableau VII : Mix pour l'amplification par PCR de l'ADN de la bactérie *Y. pestis*

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume final (µl)
Eau distillée	–	–	12,9
Tampon	10 X	1X	2,5
MgCl ₂	25 mM	1mM	0,5
dNTP	10 mM	200µm	1
Yp1	100 µM	0.2µM	1,5
YP2	100 µM	10µM	1,5
Taq(R-taq)	5U/µl	0.04 U/µl	0,1
ADN	–	–	5

Tableau VIII : Conditions PCR pour l'amplification de l'ADN de la bactérie *Y. pestis*

Nombre de cycle	Etapas	Condition n°1	
		Température (°C)	Durée
1	dénaturation initiale	94	5 minutes
35	dénaturation	94	30 secondes
	hybridation	55	30 secondes
	élongation	72	30 secondes
1	Elongation finale	72	10 minutes

6.2.3. Extraction et détection d'ADN de la bactérie *Y. pestis* dans le sang.

Une détection par PCR de l'ADN de la bactérie de la peste a été faite sur le sang mélangé à des bactéries inactivées qui a servi pour gorger les lots de puces. Trois volumes de sang ont été testés pour une étude quantitative, des détections sur du papier buvard (confettis de sérobuvard) et une détection avec l'aliquot de bactérie inactivé et une détection dans le surnageant obtenu après centrifugation de l'aliquot de bactérie inactivé (Tableau IX). L'extraction est faite avec InstaGene matrix selon le protocole du fabricant: «*DNA preparation from whole blood*».

Tableau IX : Extraction et PCR pour la détection de l'ADN de la bactérie *Y. pestis* dans le sang

Numéro de tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lot de puce	Lot n°1				Surnageant	Lot n°2				aliquot
Volume (µl)	6	10	1*	6*	40	1*	6*	6	10	20µl

*sang déposé sur du papier buvard

6.3. Vérification de la présence d'ADN dans les extraits

Le rendement de l'extraction d'ADN non destructive sur les puces gorgés est vérifié par PCR avec les amorces Cytochrome Oxydase I. Le mix 1 du tableau III (page 32) et les conditions PCR du tableau IV (page 33) sont utilisés.

7. Détermination morphologique

La détermination morphologique a été faite sur des spécimens montés, sous loupe binoculaire ou microscope photonique à différents grossissements. L'identification au niveau spécifique est obtenue par observation des caractères morphologiques discriminants, avec l'aide d'une clé d'identification (Duchemin 2003) (cf. Annexe 4).

III. RESULTATS

1. Résultats des captures sur micromammifères

Dans les trois sites de capture, 934 puces reparties en 6 genres sont disponibles pour les manipulations (Figure 17). Les genres *Synopsyllus sp.* et *Paractenopsyllus sp.* sont les plus abondants et retrouvés dans tous les sites. 46,5% des puces ont été récoltés dans le site d'Anorana, avec 3 genres différents, dont 57,5% appartiennent au genre *Synopsyllus sp.* C'est le seul site où des puces du genre *Tsaractenus sp.*, qui ne représente que 4,3% des puces collectées dans cette localité, ont été trouvées. 44,9% des puces étudiées ont été trouvés dans le site d'Ankazomivady, comprenant 4 genres où le genre *Paractenopsyllus sp.* est majoritaire (53%). Les puces du genre *Dinopsyllus sp.* n'ont été récoltés que dans ce site. Les puces récoltées dans le site de Lakato représentent 8,5% de tous les spécimens. C'est le seul site où on a trouvé le genre *Lagaropsylla sp.*, constituant 31,6% des puces récoltées dans ce site.

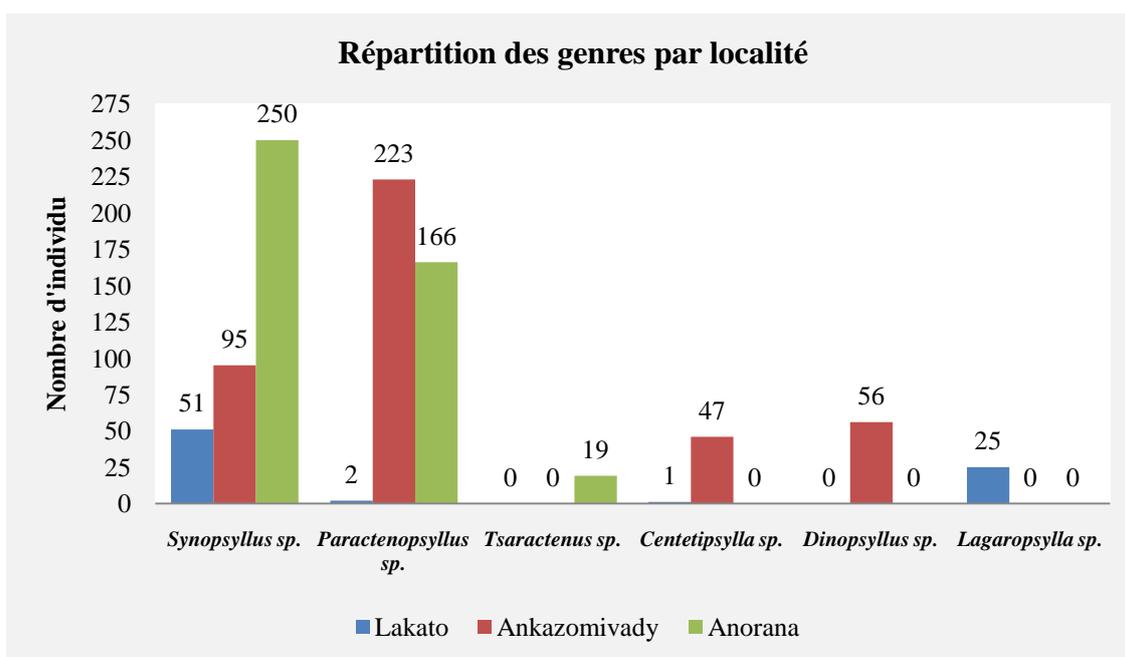


Figure 17 : Répartition des genres dans les trois localités de capture.

2. Résultat de l'amplification par PCR des ADN extraits par la méthode non destructive avec les amorces COI.

2.1. Résultats de la mise au point de l'extraction non destructive avec les puces d'élevage.

Dans toutes les mises au point de l'extraction non destructive sur les puces d'élevage, une même condition PCR a été utilisée. Les bandes obtenues après électrophorèse ont la taille

attendue théorique (710pb). On constate souvent la présence de bandes non spécifiques de plus petite taille au dessous de celles de la taille attendue (Figure 18).

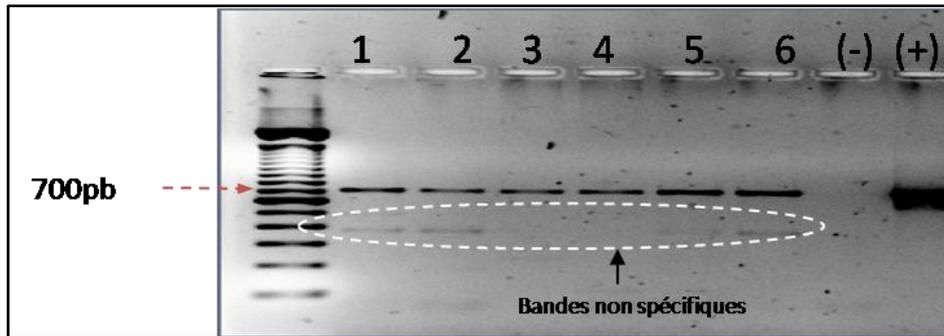


Figure 18 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification avec COI (1à 6 : numéros du puits du gel)

Les pourcentages de résultats positifs sont variables en fonction de paramètres comme le kit d'extraction utilisé, la durée d'incubation et la Taq polymérase (Tableau X). Un résultat avec 100% d'échantillon positif est obtenu selon une extraction avec InstaGene matrix comprenant une durée d'incubation d'une nuit et une amplification avec la Go-Taq polymérase.

Tableau X : Récapitulatif des résultats PCR avec COI sur les mises au point de l'extraction non destructive.

Nombre d'échantillon	Kit	Durée d'incubation à 56°C	TAQ polymérase	Pourcentage de positifs
6	Qiagen	une nuit (16h)	Go -Taq	33,3%
20			R-Taq	55%
7	InstaGene matrix	30 minutes	Go -Taq	71,42%
23			FirePol	56,52%
15		3 heures	FirePol	0%
4		une nuit (16h)	FirePol	75%
19			Go-Taq	100%

2.2. Résultats de l'amplification des ADN de puces de forêt avec les amorces COI

Au total, 313 extraits d'ADN de puces de forêt ont été amplifiés avec les amorces COI. Ces puces sont réparties en 5 genres : *Centetipsylla sp.*, *Paractenopsyllus sp.*, *Synopsyllus sp.*, *Dinopsyllus sp.* et *Tsaractenus sp.* (Figure 19). La proportion des individus par genre est différente selon leur abondance.

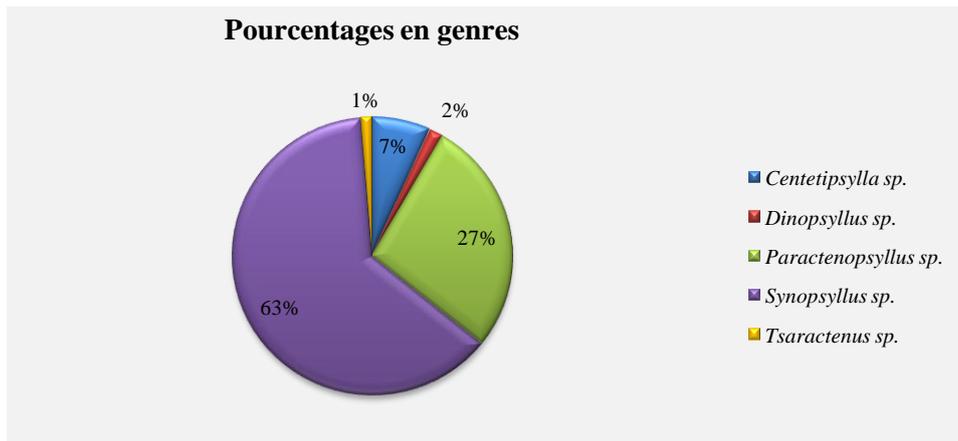


Figure 19 : Proportion des genres dans les extraits d'ADN amplifiés avec COI

Sur une première série d'amplification avec les mix 1 et 2 (Tableau III, page 32) et la même condition PCR (condition 1, Tableau IV, page 33), 12,4 % des échantillons ont donné des résultats positifs. Certains échantillons qui ont donné des résultats négatifs ont été réamplifiés avec une modification des conditions PCR (condition 2, Tableau VI) et du mix (mix3, Tableau III). Ces améliorations ont permis d'augmenter la proportion de résultats PCR positifs à 21,4 % mais on constate l'existence de plusieurs rangés de bandes non spécifiques, de taille inférieure à 710pb (Figure 20).

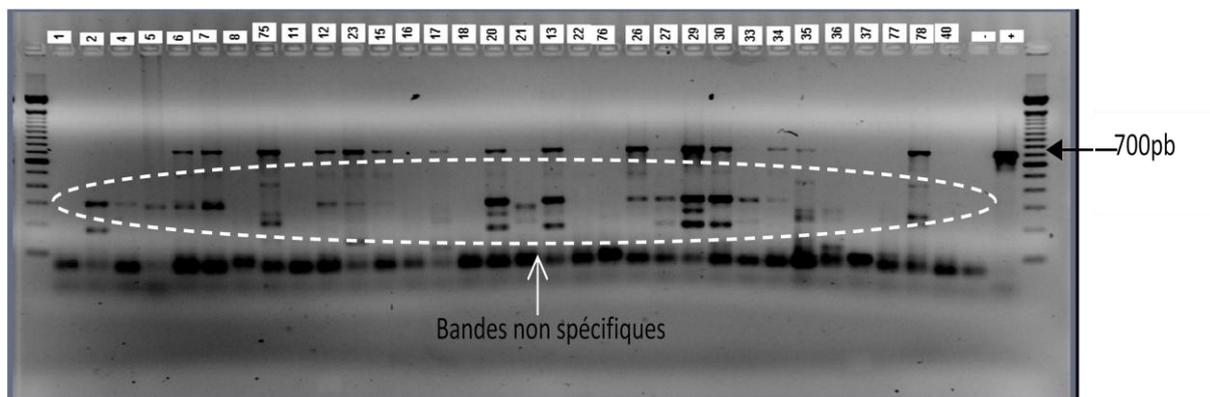


Figure 20 : Gel d'électrophorèse après amplification avec les amorces COI selon la condition 2

La deuxième condition a permis de doubler la proportion d'échantillons positifs surtout chez les genres *Paractenopsyllus sp.* et *Synopsyllus sp.* Néanmoins ces changements n'ont pas entraîné d'améliorations chez les autres genres (Figure 21).

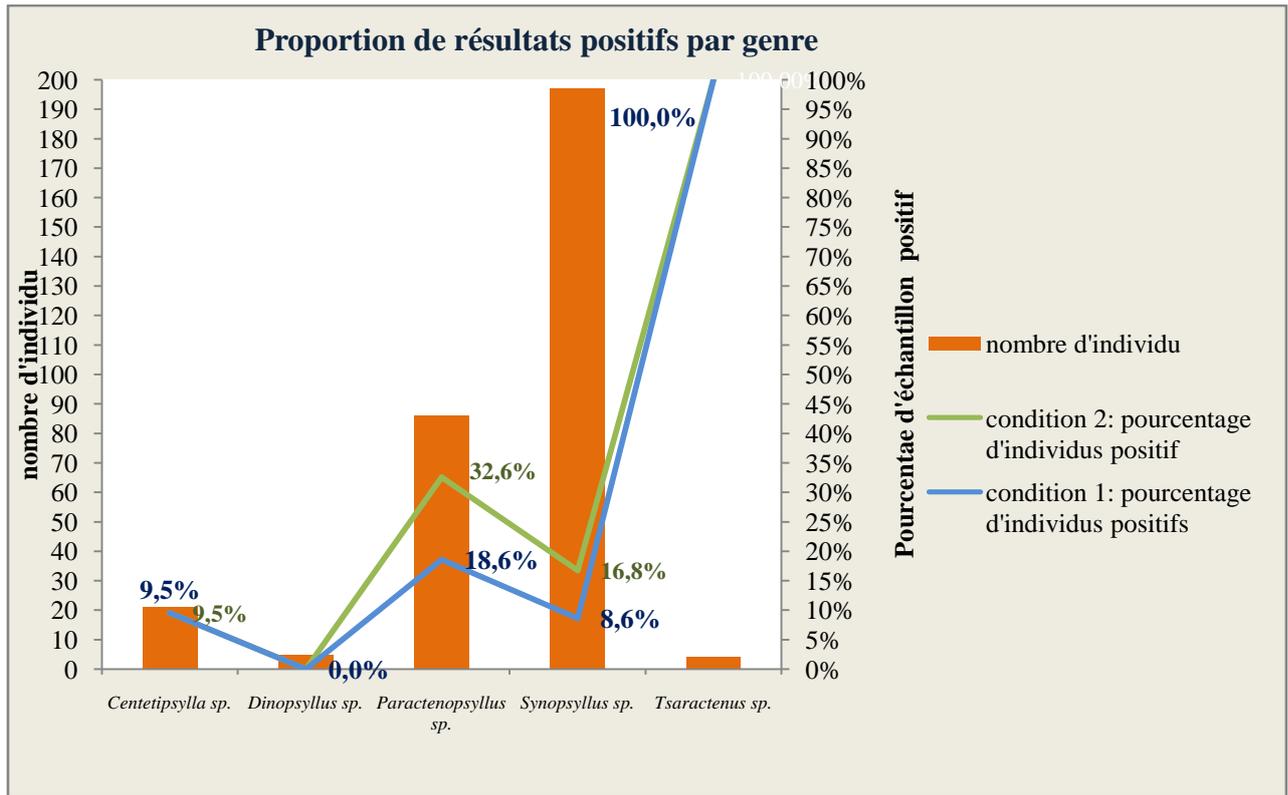


Figure 21 : Proportion de résultats de PCR positifs par genre selon deux conditions différentes avec COI

3. Résultats des amplifications avec les amorces ITS2 chez les puces de forêts

La totalité des extraits d'ADN des puces de forêts ont été amplifiée avec les amorces ITS2, c'est-à-dire 934 échantillons. Les amplifications avec ITS2 donnent des bandes variables entre 475 et 510 paires de base selon les genres (Figure 22).

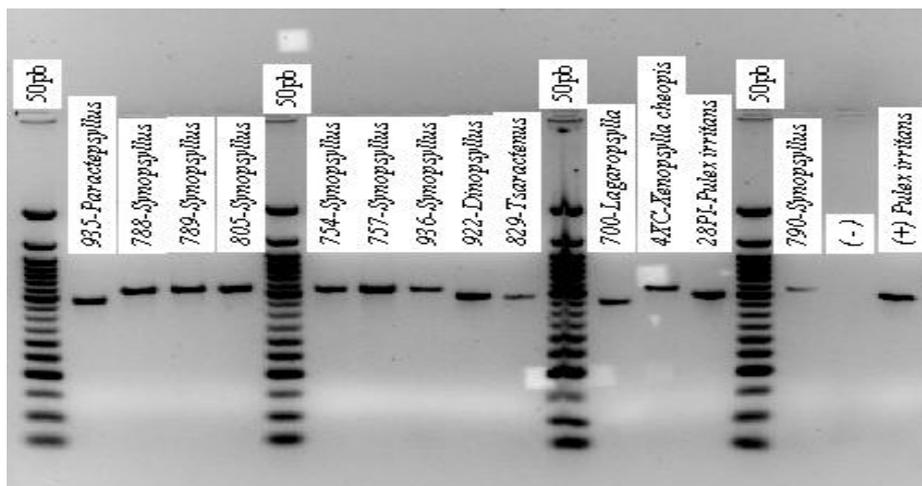


Figure 22 : Résultat d'électrophorèse après amplification avec ITS2

Au total, le pourcentage de résultats PCR positifs est de 71,2% (665/934). Le rendement est différent pour chaque genre (Figure 23). La proportion de résultat positif pour les genres

Tsaractenus sp., *Dinopsyllus sp.*, *Paractenopsyllus sp.* et *Lagaropsylla sp.* est supérieure à 80%. Un résultat à 100% est observé pour le genre *Dinopsyllus sp.* *Synopsyllus sp.* a donné 61,1% de résultat positif. Par rapport aux autres genres, seul *Centetipsylla sp.* a montré un rendement très faible avec 10,6% d'échantillons positifs.

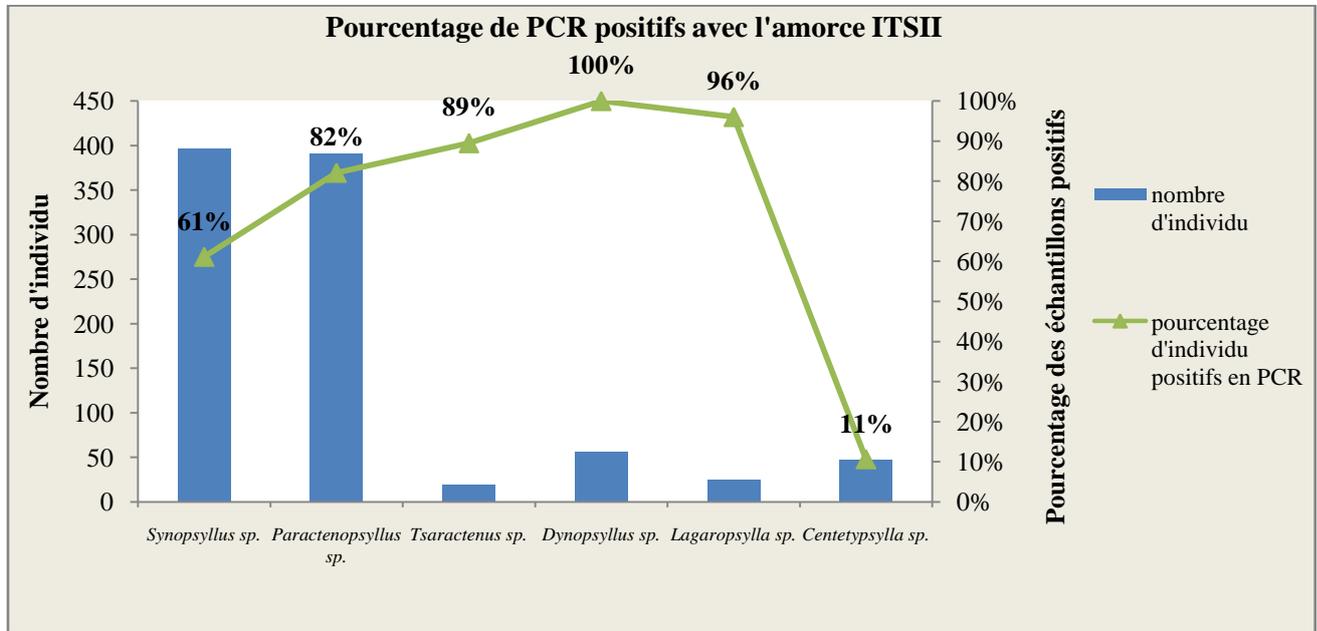


Figure 23 : Rendement de PCR positifs par genre avec les amorces ITS2

4. Résultats des mises au point des gorgements artificiels

En moyenne 15,8 % des puces sont gorgées au cours de toutes les mises au point. La figure 24 montre une comparaison globale de pourcentage de puces gorgées selon les différentes variables testées de chaque élément du dispositif.

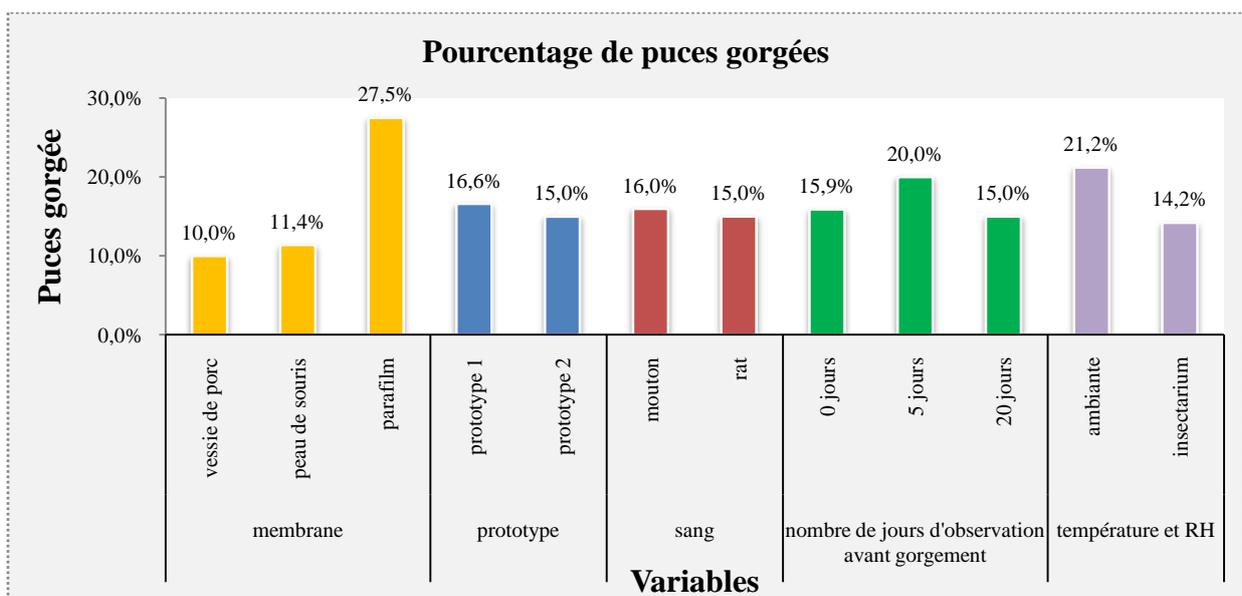


Figure 24 : Pourcentage de puces gorgées selon les variables testées

Pour les conditions de température et d'humidité relative, des manipulations effectuées à température ambiante donnent un résultat moyen de 21,2%, contre 14,2% pour celles effectuées dans les conditions d'insectarium. Les deux prototypes utilisés, ainsi que la nature du sang (rat ou mouton) donnent à peu près les mêmes résultats. Concernant la nature de la membrane, on constate un plus grand pourcentage de puce gorgée avec le parafilm. Le pourcentage est très proche pour la vessie de porc et la peau de souris. 20% des puces nouvellement émergées à jeun depuis 5 jours sont gorgées, contre 15,9% pour les puces directement mises à se nourrir aussitôt émergées et 15% pour celles laissées à jeun pendant 20 jours.

5. Résultats de l'infection expérimentale des puces avec *Y. pestis* inactivée

Sur les trois expériences faites dans les mêmes conditions (prototype n°2, sang de rat, parafilm), le nombre de puce gorgé est respectivement de 15%, 5% et 10%. En moyenne, 10% des puces se sont nourries de sang.

5.1. Résultats des détections par PCR de l'ADN de *Y. pestis*

5.1.1. Détection de l'ADN de *Y. Pestis* dans le sang et dans l'aliquot de bactérie inactivée.

La détection par PCR de l'ADN de *Y. pestis* dans du sang mélangé avec des bactéries inactivées a donné un résultat positif pour un extrait d'ADN à partir de 10µl de sang (échantillon 9, Figure 19). Cependant, les résultats sont négatifs pour les extractions à partir de 1µl et 6µl de sang, ainsi qu'avec les extractions sur papier buvard pour les mêmes volumes. Un résultat positif est obtenu avec l'extraction d'ADN à partir d'aliquot de bactéries inactivées (échantillon 10, figure 19), mais l'extraction à partir du surnageant a donné un résultat négatif (échantillon n°5, Figure 25).

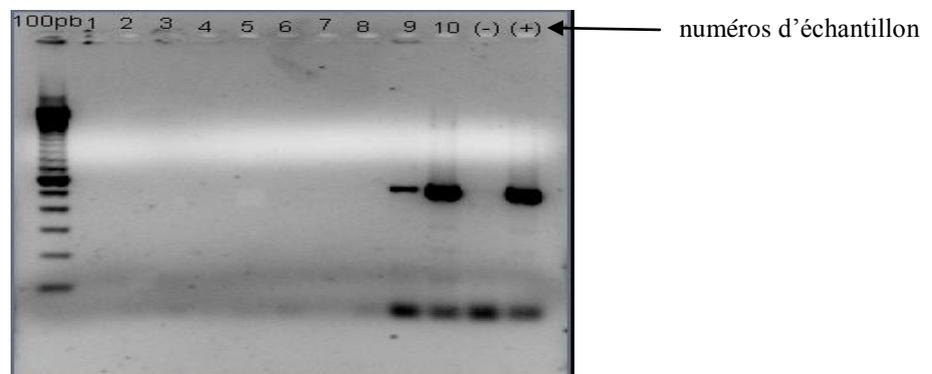


Figure 25 : Résultat d'électrophorèse après PCR diagnostic de *Y. pestis* dans le sang et l'aliquot de bactérie inactivé

5.1.2. Détection d'ADN de la bactérie *Y. Pestis* dans les puces gorgées

Après extraction d'ADN par la méthode non destructive et PCR diagnostic de *Y. pestis* des puces gorgées avec du sang mélangé avec des bactéries non activées, aucun résultat positif n'a été trouvé (Figure 26).

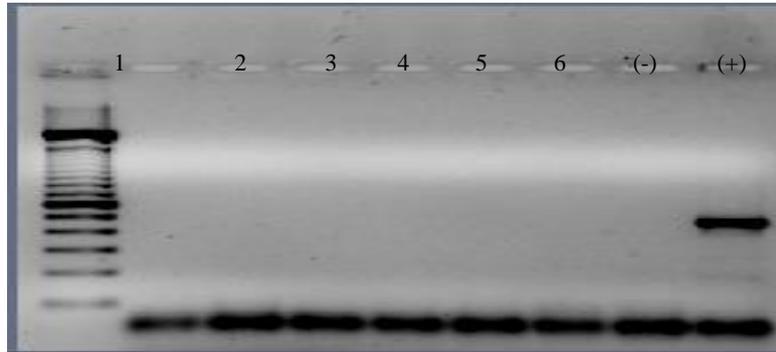


Figure 26 : Résultat d'électrophorèse après PCR diagnostic de *Y. pestis* dans les puces gorgées du sang mélangé de bactéries inactivées.

5.2. Vérification de la présence d'ADN dans les extraits par amplification avec les amorces COI

Tous les extraits d'ADN de puces gorgées avec du sang mélangé à des bactéries inactivés ont donné un résultat positif après amplification par PCR avec les amorces COI (Figure 18, page 42).

IV. DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus vont nous permettre d'avoir au moins 3 axes de discussion. Une partie de la discussion portera sur l'écologie même des puces selvatiques, la seconde partie et la plus importante discutera les méthodes d'extraction et l'amplification des extraits d'ADN par PCR. La troisième partie reprendra les prémices des résultats de gorgement artificiel et de l'infection expérimentale.

Initiation à l'écologie.

La puce du genre *Synopsyllus sp.* est la plus abondante dans les trois sites. Le plus grand nombre de puces du genre *Synopsyllus sp.* a été récolté dans la forêt d'Anorana. Cette abondance pourrait s'expliquer par le fait que ce genre est décrit comme pouvant coloniser un large spectre d'hôtes (Beaucournu and Fontenille 1993). En effet, *Synopsyllus sp.* a été retrouvé sur 8 genres d'hôtes micromammifère dans cette forêt. C'est d'ailleurs le site où la diversité en genre de micromammifère a été la plus importante. Il est à noter que sur les 246 individus de ce genre capturés à Anorana, 200 ont été récoltés sur *Rattus rattus*. Les auteurs affirment que *Synopsyllus sp.* est aussi un parasite qui s'est très bien adapté à *R. rattus*, mais essentiellement dans les biotopes ouverts (Beaucournu and Fontenille 1993; Duchemin 2003). Mais dans le cas des trois sites, où le biotope forestier est très fragmenté et soumis à une pression d'exploitation importante, l'intrusion de *R. rattus* entraînerait le remplacement d'autres rongeurs hôtes, partageant les mêmes ressources alimentaires, par exclusion compétitive (Goodman *et al.* 1998). L'ouverture du biotope forestier offrirait une bonne condition pour une prolifération de *R. rattus* dont le nombre et la répartition dépasseraient les autres hôtes potentiels pour les puces du genre *Synopsyllus sp.* .Ainsi, cette puce se retrouverait plus sur *R. rattus* car il est l'hôte le plus disponible dans le biotope.

La puce du genre *Paractenopsyllus sp.* a été décrite comme parasitant aussi bien les insectivores que les rongeurs endémiques, et ayant comme hôte secondaire le rongeur introduit *R. rattus* (Duchemin 2003). Dans les sites d'Anorana et Ankazomivady où les puces de ce genre ont été les plus capturées, les principaux hôtes sont respectivement l'insectivore endémique du genre *Microgale sp.*, le rongeur endémique *Eliurus sp.* et *R. rattus*. Le nombre de puce du genre *Paractenopsyllus sp.* parasitant *Microgale sp.* est comparable dans les deux sites, mais la différence en nombre de cette puce capturée dans les deux sites concerne surtout le nombre de puce, retrouvée sur *Eliurus sp.* et *R. rattus*. En effet, à Ankazomivady où les puces du genre *Paractenopsyllus sp.* sont les plus abondantes, 58 puces ont été retrouvées sur

Eliurus sp. contre 32 sur *R. rattus*, et à Anorana, respectivement 8 et 42 puces. Alors si on peut vérifier l'hypothèse selon lequel l'hôte retrouvé avec le plus de parasite dans une localité serait le plus abondant en nombre, l'abondance de *R. rattus* pourrait influencer celle du rongeur endémique *Eliurus sp.*, hôte primaire de la puce du genre *Paractenopsyllus sp.*, et aussi en parallèle l'abondance des puces de ce genre.

Le genre *Tsaractenus sp.* représente un genre endémique, dont la répartition actuelle concerne le massif de Tsaratanana, à 1500m d'altitude et dans la partie moyenne des Hautes Terres (Amabatolampy) jusqu'au massif méridional de l'Andringitra, entre 1400 et 1625m d'altitude (Duchemin 2003). Pourtant, lors de nos captures, des puces du genre *Tsaractenus sp.* ont été capturées à Anorana sur *Microgale sp.*, à une altitude plus basse, entre 1150 et 1345 m, très au nord Est d'Ambatolampy. En effet plusieurs zones forestières de Madagascar, dont la forêt d'Anorana, n'ont pas encore été concernées par des études sur la répartition des puces selvatiques de Madagascar.

La puce du genre *Lagaropsylla sp.* appartient à la famille des Ischnopsyllidae, puces actuellement décrites comme strictement liées aux chauves-souris (Beaucournu and Fontenille 1993; Duchemin 2003). Ce genre est seulement retrouvé dans le site de Lakato. Effectivement cette puce ne serait capturée que pendant des missions d'investigations sur les ectoparasites de chauves-souris. C'est au cours de cette étude seulement que la puce du genre *Lagaropsylla sp.* est trouvée parasitant le microchiroptère Molossidae de l'espèce *Chaerophon atsinanana*. Les données sur la distribution des ectoparasites de chauves-souris sont importantes, car ces animaux constituent des réservoirs pour certains arbovirus (Drexler *et al.*; Calisher *et al.* 2006)

L'inventaire des puces nous a permis d'effectuer un travail exploratoire sur l'écologie des puces. Cependant, cette discussion sur l'écologie des puces reste approximative. En effet, lorsque les espèces auront été totalement déterminées, nous discuterons plus précisément de la richesse spécifique, de la diversité taxonomique, de la présence de vecteurs potentiels et des relations espèce biotope et espèce hôte.

Extractions et PCR

Des études récentes ont proposé l'extraction d'ADN non destructive pour palier aux problématiques posés par une identification morphologique difficile de certains taxons qui requiert obligatoirement un montage (Gilbert *et al.* 2007; Tixier *et al.* 2010; Böhm *et al.* 2011; Gavarāne *et al.* 2011). Cette méthode d'extraction devra nous permettre d'établir une collection de spécimens de référence montée sur lame couplée à des données moléculaires qui serviront également à l'identification des espèces. Dans cette étude, deux protocoles

d'extractions non destructives ont été comparés à un protocole standard d'extraction d'ADN avec broyage pour l'extraction d'ADN de puce (Cornel *et al.* 1996) (Tableau XI).

Lors des mises au point de l'extraction d'ADN non destructive sur les puces d'élevage, des amplifications par PCR avec les amorces COI ont été effectuées sur les extraits d'ADN pour apprécier la qualité d'ADN obtenue. Pour les deux protocoles d'extraction d'ADN non destructive, 46/94 échantillons ont donné des ADN amplifiables. Le paramètre qui semble le plus jouer pour le protocole avec le kit Qiagen est le volume d'éluant final (Gavarāne *et al.* 2011).

Tableau XI : Résumé des principaux avantages et inconvénients des techniques d'extraction

	Technique d'extraction avec broyage	Technique d'extraction non destructive
Avantages	Importante quantité d'ADN Aucune préparation particulière de la puce	Possibilité d'identification morphologique après extraction d'ADN ADN de bonne qualité
Points faibles	Impossibilité de l'identification morphologique après extraction d'ADN	Requiert une dextérité au niveau la perforation Temps d'incubation plus longue

Une réduction du volume par rapport au protocole standard nous a permis d'optimiser les résultats, par concentration de l'ADN contenu dans l'extrait. En effet il est indiqué sur le protocole du fabricant que la quantité de tissu pour une extraction d'ADN optimale est de 10 à 15 mg, avec un volume d'éluant final de 200µl (DNeasy Blood and Tissue handbook, Qiagen2006). Le volume est réduit à 30µl pour une puce qui pèserait en moyenne 1 à 1.5 mg. Pour les deux protocoles la durée d'incubation est aussi importante. Chaque durée d'incubation testée permet d'obtenir des bandes après électrophorèse attestant la présence d'ADN, mais la qualité de l'ADN n'est pas identique selon la durée d'incubation. Certaines concentrations en ADN obtenues avec un temps d'incubation de 30 minutes sont trop faibles pour être exploitées pour des études plus approfondies comme le séquençage. La durée d'incubation qui permet d'avoir un résultat optimal est d'environ 16 heures (une nuit), ce qui correspondrait à un temps de lyse cellulaire plus long (Tixier *et al.* 2010; Gavarāne *et al.* 2011). L'état physique des puces n'est pas endommagé par l'incubation dans le tampon de lyse et elles donneraient un résultat montage plus net par rapport aux puces montées directement car les tissus internes sont déjà lysés par le tampon d'incubation (<http://fleasoftheworld.byu.edu>). Les résultats obtenus avec les deux kits sont sensiblement les

mêmes, mais un protocole plus simplifié et moins long (InstaGene Matrix) nous a permis d'opter pour son utilisation pour l'extraction de l'ADN des puces de forêt. Enfin, les rendements obtenus avec les premières séries d'extractions sont les moins exploitables et ceux-ci se sont améliorés au cours du temps, suggérant une maîtrise progressive de la technique d'extraction qui nécessite un certain savoir-faire et des compétences de dissection.

313 extraits d'ADN de puces de forêt ont été amplifiés avec les amorces COI (ADN mitochondrial), et 934 extraits ont été amplifiés avec les amorces ITS2 (ADN nucléaire). Nos résultats ont montré des rendements d'amplifications différents pour les deux amorces soit 21,4% pour COI et 71,2% pour ITS2. Tout d'abord, le faible rendement obtenu avec COI aurait pu suggérer un problème au niveau de la qualité de l'extraction d'ADN. Une première série d'extraction a donné un faible rendement (12,4%) après amplification avec les amorces COI. Pourtant, les amplifications sont refaites avec une augmentation de la concentration en amorces avec une réduction de la température d'hybridation, entraînant une amplification peu spécifique de certains échantillons mais attestant la présence d'ADN. La proportion d'échantillons qui n'a pas pu être amplifiée reste encore importante après ces mises au point. D'après ces résultats, le problème se situerait donc au niveau de l'hybridation de ces amorces. Certains auteurs remettent en cause «l'universalité» des amorces COI utilisé dans cette étude, pour amplifier l'ADN de 11 groupes d'invertébrés à cause d'un grand polymorphisme de séquence observée sur les dix premiers nucléotides sur le site d'accrochage de les amorces *forward* (LCO) (Folmer *et al.* 1994; Siddall *et al.* 2009). Cette hypothèse doit être confirmée par l'analyse des séquences d'ADN des puces de forêt. L'hypothèse d'une défaillance avec l'extraction est donc peu probable car plus de 65,8% des extraits d'ADN qui ont montré un résultat négatif avec les amorces COI ont montré un résultat positif avec les amorces ITS2.

La plus grande proportion d'échantillons positifs amplifiée avec ITS2 peut s'expliquer du fait que cette amorce a été désigné pour différencier des espèces de puce (Lucheti *et al.* 2005b; Lucheti *et al.* 2005a). La taille de bande obtenue après électrophorèse pour les échantillons amplifiés avec les amorces ITS2 est différente pour chaque genre. Ce résultat est directement observable sur les gels après électrophorèse. Cette différence de taille pourrait s'expliquer par une différence au niveau des séquences (insertions ou délétions de nucléotide) spécifique pour chaque genre. Cette hypothèse a besoin des résultats de séquençage pour être confirmée. La proportion d'échantillons positifs par PCR est différente pour chaque genre. Des manipulations sont en cours pour optimiser les résultats pour la totalité des genres qui ont montré des rendements négatifs. En effet, les amplifications ont été refaites chez quelques individus pour les genres qui ont un faible rendement (*Synopsyllus sp.* et *Centetipsylla sp.*).

Une diminution de la température d'hybridation et une augmentation de la quantité en amorce a donné de bons résultats, surtout pour la puce du genre *Synopsyllus sp.* Après ces mises au point sur la température, un rendement supérieur à 65,8% est attendu pour l'ensemble des extraits d'ADN des puces de forêt. Enfin tous nos résultats suggèrent l'importance d'une température d'hybridation adaptée à chaque amorce, en fonction aussi de la séquence à amplifier.

Gorgements artificiels.

Les résultats obtenus par les dispositifs de gorgements artificiels sont différents en fonction de différents paramètres testés. Les facteurs comme le prototype utilisé et la nature du sang ne semblent pas influencer sur le nombre de puces gorgées alors que la nature de la membrane utilisée, la température, l'humidité relative et l'âge physiologique des puces ont montré des différences. Comme membrane, le parafilm a donné un meilleur rendement par rapport à la peau de souris, qui est le support naturel des puces, et la vessie de porc. Le parafilm offre aussi l'avantage d'être facilement accessible et étirable. Hélas au cours des manipulations, ce matériel s'est rompu régulièrement certainement sous l'effet de la chaleur, obligeant l'interruption de l'expérience. Nous estimons que des progrès peuvent être apportés à cette technique. Il semblerait que la température et l'humidité relative de l'insectarium, favorable au développement des puces d'élevage, soient peu propices aux gorgements artificiels. Effectivement, plus de puces gorgées ont été observées dans l'autre pièce de l'insectarium où la température et l'humidité ne sont pas contrôlées. En effet dans ce local, la température est plus basse (19-23°C) et l'humidité relative plus élevée (80-90%) par rapport aux conditions de l'insectarium. De plus, le dispositif qui sert à maintenir le sang à 37°C pourrait augmenter encore la température et diminuer l'humidité à l'intérieur du compartiment où se trouvent les puces. Ainsi, dans de telles conditions, un local plus frais et plus humide offrirait une meilleure condition pour le gorgement des puces. Avec un dispositif de box indépendants dans lesquels la température et l'humidité relative peut varier, des expériences peuvent être mises en places pour avoir une idée précise de l'influence de ces paramètres sur les puces. De plus, la température du sang étant maintenue par une circulation d'eau, nous n'avons pas pu vérifier qu'elle soit maintenue constamment à 37°C, à cause de la distance qui sépare le bain marie et le gorgoir.

Par ailleurs, une puce qui s'est nourrie au moins une fois possède un abdomen de couleur sombre, rendant difficile l'observation d'ingestion de sang frais dans l'abdomen, dans le cas où la puce s'est effectivement nourrie au cours de l'expérience de gorgement artificiel. Pourtant une faible proportion de puces gorgées est obtenue avec ces puces directement

nourries après leur émergence par rapport à celles laissées à jeun pendant au moins 5 jours, laissant supposer qu'elles ne se nourriraient qu'au bout d'un certain temps passé à jeun. Une présence de méconium (produit de métabolisme des insectes rejeté peu après la mue imaginale) a été observée à l'intérieur du tube digestif des puces nouvellement émergées et non nourries (Klein 1966). Une durée de survie plus longue de ces puces est aussi constatée par rapport à celles qui se sont nourries au moins une fois (Rhodain and Perez 1985). Cette forme de latence physiologique pourrait être attribué à une adaptation de la puce à la vie parasitaire, dans le cas où l'hôte ne serait pas encore disponible. Ces observations pourraient expliquer le fait qu'une puce qui vient de sortir de cocon n'aurait pas besoin de se nourrir dans les quelques jours qui suivent son émergence, jusqu'à ce que le méconium soit complètement digéré.

Infection expérimentale

L'objectif initial de l'expérience d'infection artificielle avec des bactéries était d'évaluer si l'extraction d'ADN par la méthode non destructive permettait la détection de la bactérie de la peste dans les extraits d'ADN de puce infectées. Mais au cours de cette étude les conditions de sécurité requises pour la manipulation de bactérie virulente comme *Y. pestis* (laboratoire de niveau de sécurité P2) ont fait défaut. Ainsi, les expériences d'infections artificielles et de détections ont été faites avec des bactéries inactivées. Sur les puces gorgées avec du sang contenant de la bactérie de la peste inactivée, aucune détection de l'ADN de la bactérie n'a été obtenue après extraction et amplification avec les amorces spécifiques. De plus, seule une détection de l'ADN de la bactérie a été positive avec un volume physiologiquement aberrant pour une puce (10 μ l). Or des bactéries inactivées ne peuvent plus proliférer dans le sang et leur répartition dans le volume sanguin total est hétérogène, limitant ainsi la probabilité d'ingestion par la puce de quantité détectable au moment de la prise de repas de sang. De plus, une bactérie qui n'est plus apte à proliférer est dégradée dans l'organisme de la puce. Pour finir, ces études sur l'infection expérimentale vont reprendre sur des bactéries vivantes lorsque le laboratoire P2 au sein de l'Unité d'Entomologie Médicale de l'IPM sera terminé.

V. CONCLUSION

Cette étude a permis d'avoir un aperçu de la diversité des puces parasites de micromammifères en milieu forestier. Des détections de la bactérie de la peste et des sérologies positives chez les micromammifères au sein de sites d'études situés en zones d'endémie pesteuse de Madagascar confirment l'occurrence d'une épizootie de peste laissant suspecter des puces vectrices dans le milieu forestier. L'identification des espèces qui seraient concernées est cruciale avant toutes études plus approfondies sur l'implication ou la compétence en tant que vecteur. Dans cette perspective, cette étude a permis de mettre en place la technique d'extraction non destructive, technique novatrice dans le domaine d'étude des puces, pour identifier les puces morphologiquement et moléculairement. Associée à la PCR, cela va permettre à terme la mise en place d'un outil moléculaire d'identification des espèces et de détection de pathogène, mais aussi d'explorer d'autres domaines comme la phylogénie des puces de Madagascar ou la phylogéographie. Enfin, l'acquisition des techniques d'élevage et d'infection expérimentale va ouvrir la voie à l'étude de des relations vectrices pathogène et vecteur hôte, dans la compréhension de la dynamique des maladies vectorielles liées aux Siphonaptères.

A travers cette étude, outre l'acquisition et la mise en place d'une technique d'extraction et la maîtrise des techniques d'études moléculaires comme la PCR ou l'analyse de séquences, de nouvelles compétences en systématique et identification morphologique des puces, l'écriture et le pilotage d'un projet de recherche a été un atout considérable pour le développement de l'esprit de recherche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andrianaivo P (1982) Note technique sur la peste à Madagascar. Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar Numéro spécial.
- Andrianaivoarimanana VM (2013) Réponse immunitaire de *Rattus rattus* contre *Yersinia pestis* : implication dans la stabilisation des foyers pesteux à Madagascar. Paris: Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines.
- Bacot AW, Martin CJ (1914) Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. *Journal of Hygiene* 13 (plague suppl.III): 423-439.
- Beaucournu JC (1999) Diversité des puces vectrices en fonction des foyers pesteux. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 92(5BIS): 419-421.
- Beaucournu JC, Fontenille F (1993) Contribution à l'étude des puces de Madagascar (*Insecta, Siphonaptera*). Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar Edition spéciale.
- Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D (2010) Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases* 14(8): 667-676.
- Blanchy S (1995) Contribution de l'histoire à la compréhension de l'épidémiologie de peste à Madagascar. *Histoire des Sciences Médicales* tome 29(4): 355-364.
- Böhm A, Bartel D, Szucsich NU, Pass G (2011) Confocal imaging of the exo-and endoskeleton of *Protura* after non-destructive DNA extraction. *Soil Organisms* 83(3): 335-345.
- Boisier P, Rahalison L, Rasolomaharo M, Ratsitorahina M, Mahafaly M et al. (2002) Epidemiologic Features of Four Successive Annual Outbreaks of Bubonic Plague in Mahajanga, Madagascar. *Emerging infectious diseases* 8(3): 311.
- Brygoo E-R (1974) La peste. *Etudes médicales*(2).
- Brygoo ER (1966) Epidémiologie de la peste à Madagascar. Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar 35.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006) Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical microbiology reviews* 19(3): 531-545.
- Carniel E (2002) La peste. *Comptes Rendus Biologies* 325(8): 851-853.
- Castalanelli MA, Severtson DL, Brumley CJ, Szito A, Footitt RG et al. (2010) A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 13 (3): 243-248.
- Chanteau S (2006) Atlas de la peste à Madagascar. Paris. 94 p.
- Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarison L, Foulon J, Ratsitorahina M et al. (2003) Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *The Lancet* 361: 211-216.
- Cornel AJ, Porter CH, Collins FH (1996) Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol* 33(1): 109-116.
- Drexler JF, Corman VM, Moller MA, Maganga GD, Vallo P et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nature communications* 3: 796.
- Dryden MW. Understanding Persistent and Recurrent Flea Problems; 1999 novembre 1999. Kansas State University, USA.
- Duchemin J-B (2003) Biogéographie des puces de Madagascar [Thèse de doctorat]. Paris: Université de Paris XII - Val de Marne.
- Duchemin J-B (2007) La peste à Madagascar: faune endémique et foyer selvatique; Michel Signoli DC, editor. Italie.
- Duchemin J-B, Duplantier J-M, Chanteau S (2007) Peste. In: Ripert C, editor. Arthropodes et affections qu'ils provoquent ou qu'ils transmettent. Editions Nationales Médicales ed. Cachan. pp. 279-302.
- Duchemin J-B, Ratovonjato J, Goodman SM, Rahalison L, Chanteau S et al. (1999) Répartition de la Peste à Madagascar: Relations avec Vecteurs et Réservoirs Nouveaux. Archives de l' Institut Pasteur de Madagascar 65(1): 18.
- Duchemin JB, E FP, P P (2006) Les puces et les maladies transmises à l'homme. *Medecine Tropicale* 66: 21-29.

- Duplantier J-M, Duchemin J-B, Chanteau S, Carniel E (2005) From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Veterinary Research* 36 437-453.
- Duplantier M, Duchemin JB, Ratsitorahina M, Rahalison L, Chanteau S (2001) Résurgence de la peste dans le district d'Ikongo à Madagascar en 1998. 2. Réservoirs et vecteurs impliqués. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 94(2): 119-122.
- Durden LA, Traub R, Gary M, Lance D (2002) Fleas (Siphonaptera). *Medical and Veterinary Entomology*. San Diego: Academic Press. pp. 103-125.
- Eisen RJ, Gage KL (2012) Transmission of Flea-Borne Zoonotic Agents. *Annual Review of Entomology* 57: 61-82.
- Eisen RJ, Wilder AP, Bearden SW, Monteneri JA, Gage KL (2007) Early-Phase Transmission of *Yersinia pestis* by Unblocked *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) Is as Efficient as Transmission by Blocked Fleas. *J Med Entomol* 44((4)): 678-682
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxydase subunit I from diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Gage KL, Kosoy MY (2005) Natural History of plague: Perspectives from More than a Century of Research. *Annual Review of Entomology* 50: 505-528.
- Gauthier L, Goodman SM (2008) Introduction à la flore. In: Betsch JM, editor. *Paysages naturels et biodiversité de Madagascar*. Paris. pp. 103-137.
- Gavarāne I, Kokina I, Aksjuta K, Barševskis A, Valainis U (2011) Optimization of dna extraction protocol for DNA Isolation from air-dried collection material for further phylogenetic analysis (Coleoptera: Carabidae). *Acta Biol Univ Daugavp* 11 ((2)): 141-147.
- Gilbert M, Thomas P, Moore W, Melchior L, Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS One* 2(3): e272.
- Girard G (1942) Le comportement de la puce *Synopsyllus fonquernii* et son rôle dans la transmission de la peste. *Bulletin de la Société Française de Pathologie Exotique* 35: 177-181.
- Goodman SM, Raselimanana AP, Wilmé L (2007) Inventaires de la faune et de la flore du couloir forestier d'Anjozorobe – Angavo. RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT Série Sciences Biologiques N ° 24.
- Goodman SM, Duplantier A, Rakotomalaza J-MA, Raselimanana PJA, Rasoloarison APA et al. (1998) Inventaire biologique de la forêt d'Ankazomivady, Ambositra. Akon'ny Ala : Bulletin du Département des Eaux et Forêts de l'ESSA 24.
- Gratz N (1999) Rongeurs réservoirs et puces vectrices des foyers naturels de peste. *Manuel de la Peste Epidémiologie, répartition, surveillance et lutte WHO/CDS/CSR/EDC/99.2(65): 43-51.*
- Guis HSL (2003) La Peste à Madagascar : Etat des connaissances et étude de la surveillance humaine, murine et entomologique à Antananarivo de 1998 à 2001. Toulouse, France: Université Paul Sabatier de Toulouse.
- Guiyoule A, Rasoamanana B, Buchrieser C, Michel P, Chanteau S et al. (1997) Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *Journal of Clinical Microbiology* 35(11): 2826-2833.
- Hastriter MW, Whiting MF, Vincent HR, Ring TC (2009) Chapter 236 - Siphonaptera: (Fleas). *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. pp. 924-928.
- Hinnebusch BJ (2005) The Evolution of Flea-borne Transmission in *Yersinia pestis* *Molecular Biology* 7: 197–212.
- Hinnebusch J, Schwan TG (1993) New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas. *Journal of Clinical Microbiology* 31(6): 1511-1514.
- Institut de Veille Sanitaire I (2011) Peste pulmonaire. *Bulletin Hebdomadaire International N°283*.
- IPM (1982) Note technique sur la peste à Madagascar. Madagascar.
- IPM (2009) Rapport d'Activité de L'institut Pasteur de Madagascar.
- IPM (2010) Rapport d'activité de l'Institut Pasteur de Madagascar.
- IPM (2011) Rapport d'Activité de l'Institut Pasteur de Madagascar.
- Klein JM (1966) Données écologiques et biologiques sur *Synopsyllus fonquerniei* Wagner et Roubaud, 1932 (Siphonaptera), puce du rat péri-domestique, dans la région de Tananarive. *Cahiers de l'ORSTOM, Série Entomologie Médicale* 4(8): 31-60.

- Laventure S, Rasoamanana B, Boisier P, Rasolomaharo M, Rahilison L et al. (1998) Épidémies de peste urbaine à Majunga, côte ouest de Madagascar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 91: 85-86.
- Lucheti A, Mantovani B, Trantini M (2005a) Rapid identification of non-neosomic *Tunga penetrans* and *Tunga trimamillata* (Insecta Siphonaptera) specimens through PCR-RFLP method. *Bulletin of Insectology* 58(1): 15-18.
- Lucheti A, Mantovani B, Pampiglione S, Trantini M (2005b) Molecular characterisation of *Tunga trimamillata* and *Tunga Penetrans* (Insecta, Siphonaptera, Tungidae): Taxonomy and genetic variability. *Parasite* 12: 123-129.
- Luchetti A, Trentini M, Pampiglione S, Fioravanti ML, Mantovani B (2006) Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) sand fleas across South America and Africa. *Parasitology research* 100: 593-598.
- Lumaret R (1962) *Insectes Siphonaptères*; Paulian MR, editor. Antananarivo: L'Institut de recherche scientifique Antananarivo - Tsimbazaza. 107 p.
- Marquardt WC (2004) *Biology of disease vectors*; Marquardt WC, editor. London: Dana Dreibelbis. 786 p.
- Migliani R, Ratsitorahina M, Rahalison L, Rakotoarivony I, Duchemin JB et al. (2001) Résurgence de la peste dans le district d'Ikongo à Madagascar en 1998. 1. Aspects épidémiologiques dans la population humaine. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 94(2): 115-118.
- Mollaret HH (1991) La découverte par Paul Louis Simond du rôle de la puce dans la transmission de la peste.
- Mollaret HH (1999) La découverte par Paul Louis Simond du rôle de la puce dans la transmission de la peste. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 92: 383-387.
- Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- P. Boisier LR, M. Rasolomaharo, M. Ratsitorahina, M. Mahafaly, M. Razafimahefa, J-M Duplantier, L. Ratsifasoamanana, S. Chanteau (2002) Epidemiologic Features of Four Successive Annual Outbreaks of Bubonic Plague in Mahajanga, Madagascar. *Emerging infectious diseases* 8(3): 311.
- Poland JD, Dennis DT (1999) Diagnostic et manifestations cliniques. *Manuel de la Peste Epidémiologie, répartition, surveillance et lutte* WHO/CDS/CSR/EDC/99.2.
- Pollitzer R (1953) Plague studies. *Bulletin of World Health Organisation* 9: 131-170.
- Ratsifasoamanana L, Rabeson D, Rasoamanana B, Randriambeloso J, Roux J et al. (1998) La peste : maladie réémergente à Madagascar. *Archives de l' Institut Pasteur Madagascar* 64(1 & 2): 12-14.
- Ratsitorahina M, Chanteau S, Rahalison L, Ratsifasoamanana L, Boisier P (2000) Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar. *The Lancet* 355(9198): 111-113.
- Ratsitorahina M, Chanteau S, Rosso ML, Randriambeloso J, Ratsifasoamanana L et al. (2002) Actualités épidémiologiques de la peste à Madagascar. *Archives de l' Institut Pasteur de Madagascar* 68 (1&2): 51-54.
- Rhodain F, Perez C (1985) *Précis d' entomologie médicale et vétérinaire*. Paris.
- Robert V (2010) Pucés pathogènes vectorisés et maladies associées. *Module d'Ecole Doctorale: Biologie et Contrôle des vecteurs*.
- S. Chanteau LR, L. Ralafiarison, J. Foulon, M. Ratsitorahina, L. Ratsifasoamanana, E. carniel, F. Nato (2003) Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *The Lancet* 361: 211-216.
- S. Laventure BR, P. Boisier, M. Rasolomaharo, L. Rahilison, J. Randriantsoa, Z. Andrianirina, S. Chanteau, J. M. Duplantier, L. Rakoto, G. Eppel BA, D. Randriantsimaniry, J. Roux (1998) Épidémies de peste urbaine à Majunga, côte ouest de Madagascar.
- Siddall ME, Fontanella FM, Watson SC, Kvist S, Erséus C (2009) Barcoding Bamboozled by Bacteria: Convergence to Metazoan Mitochondrial Primer Targets by Marine Microbes. *Systematic Biology*.

- Silverman J, Rust MK (1985) Extended Longevity of pre-emerged adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) and factors stimulating emergence from the pupal cocoon. *Annals of Entomological Society of America* 78: 763-768.
- Stenseth NC, Bakyt B, Begon M, Belmain SR, Bertherat E et al. (2006) La peste: passé, présent et futur. *PLoS Medicine* "Neglected Diseases".
- Tikhomirov E (1999) Epidémiologie et Répartition de la peste. Manuel de la Peste Epidémiologie, répartition, surveillance et lutte WHO/CDS/CSR/EDC/99.2.
- Tixier M-S, Okassa M, Liguori M, Poinso A, Salerno B et al. (2010) Voucher specimens for DNA sequences of Phytoseiid mites (Acari: Mesostigmata). *Acarologia* 50(4): 487-494.
- WHO (2006) Réunion internationale sur la lutte contre la peste: Cette calamité a encore de l'avenir. *Relevé épidémiologique hebdomadaire* N°28(81): 273-284.
- WHO (2010) Peste humaine: Examen de la morbidité et de la mortalité régionales, 2004-2009. *Relevé épidémiologique hebdomadaire* N°6(85): 40-45.
- Yersin A (1894) La peste bubonique à Hong-Kong. *Annales de l'Institut Pasteur* 8: 662-667.

ANNEXE 1

Systématique de l'Ordre des Siphonaptères (Medvedev 1994, 1998).

Ordre: SIPHONAPTERA (Latreille, 1825)

Infraordre: PULICOMORPHA (Medvedev, 1998)

Superfamille: PULICOIDEA (Billberg, 182)

Familles: Pulicidae (Billberg, 1820)

Tungidae (Taschenberg, 1880)

Superfamille: MALACOPSYLLOIDEA (Baker, 1905)

Familles: Malacopsyllidae (Baker, 1905)

Rhopalopsyllidae (Oudemans, 1909)

Superfamille: VERMIPSYLLOIDEA (Wagner, 1889)

Famille: Vermipsyllidae (Wagner, 1889)

Superfamille: COPTOPSYLLOIDEA (Wagner, 1928)

Famille: Coptopsyllidae (Wagner, 1928)

Superfamille: ANCISTROPSYLLOIDEA (Toumanoff et Fuller, 1947)

Famille: Ancistropsyllidae (Toumanoff et Fuller, 1947)

Infraordre: PYGIOPSYLLOMORPHA (Medvedev, 1998)

Superfamille: PYGIOSYLLOIDEA (Wagner, 1939)

Familles: Lycopsyllidae (Baker, 1905)

Pygiopsyllidae (Wagner, 1939)

Stivaliidae (Mardon, 1978)

Infraordre: HYSTRICHOPSYLLOMORPHA (Medvedev, 1998)

Superfamille: HYSTRICHOPSYLLOIDEA (Tiraboschi, 1904)

Familles: Hystrichopsyllidae (Tiraboschi, 1904)

Chimaeropsyllidae (Ewing et I.Fox, 1943)

Superfamille: MACROPSYLLOIDEA (Oudemans, 1909)

Famille: Macropsyllidae (Oudemans, 1909)

Superfamille: STEPHANOCIRCIDOIDEA (Wagner, 1928)

Famille: Stephanocircidae Wagner, 1928

Infraordo: CERATOPHYLLOMORPHA (Medvedev, 1998)

Superfamille: CERATOPHYLLOIDEA (Dampf, 1908)

Familles: Ceratophyllidae (Dampf, 1908)

Leptopsyllidae (Rothschild et Jordan, 1915)

Ischnopsyllidae (Wahlgren, 1907)

Xiphiopsyllidae (Wagner, 1939)

ANNEXE 2

Liste non exhaustive des puces de Madagascar (Duchemin 2003).

Famille des Pulicidae

Tunginae

Tunga penetrans (Linné, 1758) tropicale

Pulicinae

Pulex irritans (Linné, 1758) cosmopolite

Echidnophaga gallinacea (Westwood, 1875) tropicale

Archeopsyllinae

Centetipsylla madagascariensis (Rothschild, 1900) endémique

Ctenocephalides felis strongylus (Jordan, 1925) africaine

Ctenocephalides brygooi (Beaucournu, 1975) endémique

Xenopsyllinae Xenopsylla cheopis (Rothschild, 1903) tropicale

Xenopsylla petteri (Lumaret 1962) endémique

Synopsyllus fonquerniei Wagner & Roubaud, 1932 endémique

Synopsyllus smiti (Lumaret 1962) endémique

Synopsyllus estradei (Klein, 1964) endémique

Synopsyllus girardi (Klein 1966) endémique

Synopsyllus robici (Klein 1966) endémique

Ctenophthalmidae

Dinopsyllinae

Dinopsyllus brachypecten (Smit, 1951) endémique

Dinopsyllus flacourti (Klein 1966) endémique

Dinopsyllus tsaratananae (Klein, 1968) endémique

Ceratophyllidae

Leptopsyllinae

Leptopsylla segnis (Schönherr, 1811) cosmopolite

Paractenopsyllus kerguisteli Wagner, 1938 endémique

Paractenopsyllus pauliani (Lumaret 1962) endémique

Paractenopsyllus grandidieri (Klein, 1965) endémique

Paractenopsyllus petiti (Klein, 1965) endémique
Paractenopsyllus viettei (Klein, 1965) endémique
Paractenopsyllus vauceli (Klein, 1965) endémique
Paractenopsyllus randrianasoloi (Klein, 1968) endémique
Paractenopsyllus albignaci (Klein, 1968) endémique
Paractenopsyllus duplantieri (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus juliamarinus (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus ratovonjatoi (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus goodmani (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus rouxi (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus gemelli (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus oconori (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus beaucournui (Duchemin, 2003) endémique
Paractenopsyllus raxworthy (Duchemin, 2003) endémique
Tsaractenus grenieri (Klein, 1968) endémique
Tsaractenus rhodani (Duchemin, 2003) endémique

Ischnopsyllidae

Ischnopsyllinae

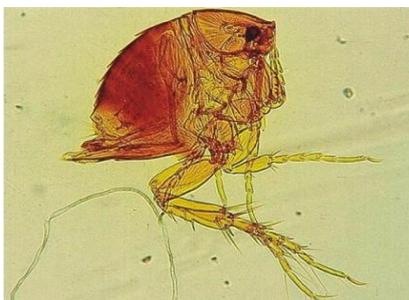
Araeopsylla martialis (Rothschild, 1903) sous-région
Lagaropsylla incerta (Rothschild, 1900) endémique
Lagaropsylla hoogstraali (Smit, 1957) africaine
Lagaropsylla consularis (Smit, 1957) africaine

ANNEXE 3

Photos de quelques espèces de puces trouvées à Madagascar
(*espèces endémiques, #vecteurs de la peste)



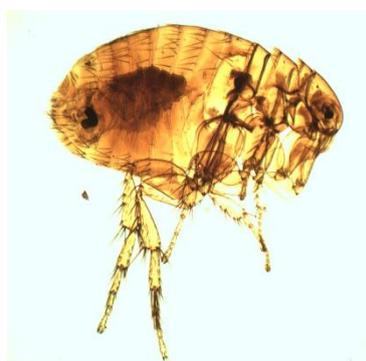
Echidnophaga galinaceae ♀



Tunga penetrans ♂



Pulex irritans ♂



Xenopsylla cheopis ♀ #



Synopsyllus fonquerniei * ♀ #



Synopsyllus estradei * ♀



Leptopsylla segnis ♂



Ctenocephalides felis ♂



Dinopsyllus brachiptecten * ♀



*Paractenopsyllus
goodmani* * ♂



Paractenopsyllus vauceli * ♂



Tsaractenus rhodaini * ♂

(Photos : Institut Pasteur de Madagascar)

ANNEXE 4

Clé des espèces de puces de Madagascar (Duchemin 2003)

Genre *Xenopsylla*

- 1- Suture entre metasternum et metepisternum bien marquée.....2
 - Suture présente mais vestigiale.....*Xenopsylla petteri* Lumaret 1962
- 2 - Mâles.....3
 - Femelles.....4
- 3 - Soie antepygidiale portée sur une saillie conique marginale Apophyse fixe du clasper allongée et armée de 7 - 8 soies bien développées dont l'une est coudée fortement vers le bas, et une autre se remarque par son épaisseur particulière. Apophyse mobile inclinée vers le haut.....*X. brasiliensis* Baker 1904
 - Soie antepygidiale non implantée sur une saillie conique et marginale. Aucune soie remarquable sur l'apophyse fixe du clasper. Apophyse fixe légèrement inclinée à son extrémité vers le bas.....*X. cheopis* Rothschild 1903
- 4 - Bulga de la spermathèque globuleuse, plus large que l'extrémité basale de la hilla.*X. brasiliensis* Baker 1904
 - Bulga de la spermathèque non globuleuse, de largeur sensiblement égale au diamètre basal de la hilla.*X. cheopis* Rothschild 1903

Genre *Synopsyllus*

- 1 - 2 soies antepygidiales et grande taille (>3mm pour le mâle et >3.5mm pour la femelle)*Synopsyllus girardi* Klein 1966
 - 1 seule soie antepygidiale et taille < à 2.5mm.....2
- 2 - Mâle3
 - Femelle6
- 3 - Bord supérieur plaque pénienne recourbé vers le haut à l'extrémité antérieure, apophyse mobile du clasper allongée grossièrement rectangulaire dont le bord antéro-supérieur est presque rectilign.....*S. estradei* Klein 1964
 - Bord supérieur plaque pénienne rectiligne, non recourbé à l'extrémité antérieure.4
- 4 - Fosse occipitale marquée, faux peigne dorsolatéral sur le sternite 8; 3 soies plantaires sur le segment distal du tarse de toutes les pattes.....*S. robici* Klein 1966

- Fosse occipitale absente ou peu marquée, si faux peigne sur le sternite 8, le nombre de soies spiniformes est limité à 4 ; 2 soies plantaires sur le segment distal du tarse de toutes les pattes.....5
- 5 - Apophyse mobile du clasper pyramidale à base postérosupérieure, rapport longueur sur plus grande largeur proche de 1.5 ; un rang de 4 (rarement 1 en plus en ou en moins) soies spiniformes fortes et longues sur le bord apical du sternite VIII...
.....*S. fonquerniei* Wagner et Roubaud 1932
- Apophyse mobile du clasper allongée et à bord antéro-supérieur convexe, rapport longueur sur plus grande largeur proche de 2.5 ; une touffe de 6 soies spiniformes longues et fortes avec deux soies en avant sur le bord apical du sternite VIII.....
.....*S. smiti* Lumaret 1962
- 6 - Bulga de la spermathèque presque sphérique, hilla dilatée et sclérifiée à la base.
.....7
- Bulga de la spermathèque sphérique ou ovalaire, hilla sans dilatation marquée à la base.....8
- 7 - 3 soies plantaires sur le segment distal du tarse de toutes les pattes (Fig. 3-6) ; extrémité de la hilla arrondie.....*S. robici* Klein 1966
- 2 soies plantaires sur le segment distal du tarse de toutes les pattes ; extrémité de la hilla en pointe mousse et dilatation de la base de la hilla remarquable
.....*S. estradei* Klein 1964
- 8 - Bulga sphérique, longueur de la hilla proche du diamètre de la bulga. (Fig. 3-8)
.....*S. fonquerniei* Wagner et Roubaud 1932
- Bulga ovalaire, longueur de la hilla supérieure au diamètre de la bulga.....
.....*S. smiti* Lumaret 1962

Genre *Lagaropsylla*

- 1 - Tubercule préoral court.....*Lagaropsylla incerta* Rothschild 1900
- Tubercule préoral non court habituellement2
- 2 - Hamulus avec une marge postérieure convexe d'allure sigmoïde. Bord apical du sternite VII de la femelle avec une encoche séparant 2 lobes d'égale hauteur.....
.....*L. hoogstraali* Smit 1957
- Crochet du phallosome avec une marge apicale oblique et arrondie. Bord apical du sternite VII de la femelle droit*L. consularis* Smit 1957

Genre *Tsaractenus*

- Apophyse génale très large, à peu près égale à la largeur des deux dents
général.....*Tsaractenus rodhaini*
- Apophyse génale étroite, nettement moins large que les deux dents du peigne général.
.....*T. grenieri*

Genre *Paractenopsyllus*

- Femelles1
- Males14
- 1 - 2 lobes sur le bord postérieur du sternite VII2
- 1 seul lobe sur le bord postérieur du sternite VII9
- 2 - peigne pronotal >28 dents (pour les deux côtés)
.....*Paractenopsyllus (Paractenopsyllus) kerguisteli*
- Peigne pronotal <= 28 dents (pour les deux côtés).....3
- 3 - Spermathèque nettement allongée (long =2x larg).....*P. (P.) vauceli*
- Spermathèque arrondie (long < 1.5 long).....4
- 4 - 5 soies longues en arrière de la série marginale frontale.....5
- 5 - 2 lobes postérieur du sternite VII, arrondis et réguliers.....*P. (P.) duplantieri*
- 2 lobes postérieur du sternite VII, recourbés en « bec ».....*P. (P.) juliamarinus*
- 6 - Au moins 3 soies frontales spiniformes.....7
- Au plus deux soies frontales nettement spiniformes8
- 7 - Ductus bursae dessinant un hémicadre rectangulaire, lobe inférieur du sternite VII allongé
.....*P. (P.) petiti*
- Ductus bursae avec 4 courbes, lobe inférieur du sternite VII court et triangulaire
.....*P. (P.) ratovonjatoi*
- 8 - Encoche supérieure du sternite VII nettement plus étroite que le lobe sus-jacent
.....*P. (P.) pauliani*
- Encoche supérieure du sternite VII nettement plus large que le lobe sus-jacent
.....*P. (P.) albignaci*
- 9 - Toutes les soies de la série frontale fines et non modifiées10
- Au moins une soie frontale épaissie.....12
- 10 - Perula très dilatée.....*P. (Consobrinopsyllus) goodmani*
- Perula de diamètre proche de celui des ducti (2 à 3 x).....11

11 - Lobe du sternite VII à extrémité arrondie et dépassant le bord inférieur des sternites	<i>P. (P.) rouxi</i>
- Lobe du sternite VII à extrémité anguleuse	<i>P. (P.) grandidieri</i>
12 - Lobe du sternite VII à extrémité fine et anguleuse.....	<i>P. (P.) viettei</i>
- Lobe du sternite VII à extrémité arrondie	13
13 - Bulga de la spermathèque plus large à l'insertion de la hilla qu'au dessus de l'area cribriformis	<i>P. (P.) randrianasoloi</i>
- Bulga de la spermathèque de même largeur à l'insertion de la hilla qu'au dessus de l'area cribriformis.....	<i>P. (P.) gemelli</i>
<u>Mâles :</u>	
14 - Bord postérieur du sternite VIII avec une concavité ou un lobe.....	15
- Bord postérieur du sternite VIII droit ou arrondi, sans concavité	20
15 - Dents Peigne pronotal < 29.....	16
- Dents Peigne pronotal > 30	17
16 - Hamulus large avec un apex acuminé et récurrent	<i>P. (P.) viettei</i>
- Hamulus différent	<i>P. (P.) albignaci</i>
17 - Apex lobe dorsal du phallosome arrondi	18
- Apex lobe dorsal du phallosome en crochet.....	<i>P. (P.) randrianasoloi</i> (pro parte)
18 - Lobe ventral du phallosome peu ou pas développé	<i>P. (P.) oconnori</i>
- Lobe ventral du phallosome développée	19
19 - Apex basimère large	<i>P. (P.) grandidieri</i>
- Apex basimère étroit	<i>P. (P.) rouxi</i>
20 - Bord postérieur sternite VIII nettement plus étroit que la largeur du sternite	21
- Bord postérieur à peu près aussi large que la largeur du sternite VIII (Fig. 5-40).....	22
21 - Manubrium du basimère nettement plus long que le corps du basimère	<i>P. (P.) duplantieri</i>
- Manubrium du basimère aussi long que le corps du basimère	<i>P. (P.) juliamarinus</i>
22 - Encoche pigmentée de la jonction du bras distal et proximal du sternite IX	<i>P. (C.) goodmani</i>
- Pas d'encoche à la jonction du bras distal et proximal du sternite IX	23
23 - Dents du peigne pronotal > 28	24
- Dents du peigne pronotal <ou = 28.....	26
24 - Apex lobe dorsal du phallosome en crochet	25
- Pas de crochet de l'apex du lobe dorsal du phallosome	<i>P. (P.) kerguisteli</i>

25 - Crochet court, inférieur à la moitié de la largeur de l'apex du phallosome	
.....	<i>P. (P.) gemelli</i>
- Crochet fin et long, supérieur ou égal à la largeur de l'apex du phallosome	
.....	<i>P. (P.) randrianasoloi</i> (pro parte)
26 - Au total, 2 à 4 épines dorsales sur les premiers segments abdominaux	27
- Plus de 6 épines dorsales sur plusieurs segments abdominaux	
.....	<i>P. (P.) beaucournui</i>
27 - Apex du lobe dorsal du phallosome en crochet	<i>P. (P.) raxworthyi</i>
- Apex du lobe dorsal différent	28
28 - Au moins 4 soies frontales modifiées spiniformes	29
- Moins de 4 soies frontales spiniformes	30
29 - Apex du lobe dorsal du phallosome en doigt de gant	<i>P. (P.) ratovonjatoi</i>
- Apex du lobe dorsal du phallosome différent	<i>P. (P.) petiti</i>
30 - Apex du lobe dorsal du phallosome large et arrondi	<i>P. (P.) pauliani</i>
- Apex du lobe dorsal du phallosome arrondi avec un lobe ventral prononcé	
.....	<i>P. (P.) vauceli</i>

Genre *Dinopsyllus*

1 - nombre de rangées de soies pronotales égal à 3.....	<i>D. flacourti</i>
- nombre de rangées de soies pronotales supérieur à 3	2
2 - Sinuosité postéro-dorsale du sternite VIII prononcée; sur la portion verticale du segment IX, la série de soies inférieures comprend 2 épines incurvées forte et moyenne et une série d'une douzaine d'épines courtes marginales; (rapport longueur/plus grande largeur de l'apophyse P1 du clasper égal à 3,2).....	<i>D. tsaratananae</i>
- Sinuosité posterodorsale du VIII sternite peu prononcée; série inférieure des épines marginales de la portion verticale du sternite IX comprend 4 à 9 épines dont seule la distale est forte et non incurvée; (rapport longueur/plus grande largeur de l'apophyse P1 du clasper compris entre 4,7 et 5,2).....	<i>D. brachypecten</i>

Genre *Ctenocephalides*

1 - Femelle.....	2
- Mâle.....	3

- 2 - Une zone dépigmentée en avant et au-dessus de l'insertion de l'antenne.....*C. brygooi*
- Pas de zone dépigmentée.....4
- 3 - Soies plantaires spiniformes au nombre de 3 à 5 sur le segment distal de la première patte
.....*C. brygooi*
- Soies plantaires spiniformes inférieures ou égales à 2 sur le segment distal de la
première patte.....4
- 4- Tibia postérieur avec 8 encoches portant des soies fortes.....*C. canis*
- Tibia postérieur avec 6 ou 7 encoches.....*C. felis strongylus*

ANNEXE 5

Protocole d'extraction de l'ADN des puces avec la méthode non destructive.

Réactifs: PBS X, InstaGene matrix (Biorad) (figure 1-i)

Matériels: agitateur magnétique (figure 1-a), tubes eppendorf et portoir pour tube (figure 1-b), pointes pour micropipette (figure 1-c), micropipettes (figure 1-d), bain-marie (figure 1-e) ou bloc chauffant (figure 1-f), aiguilles de perfusion (figure 1-g-h), centrifugeuse (figure 1-j), loupe binoculaire (figure 1-k), vortex (figure 1-l), lames porte objets (figure 1-m), pince entomologique.

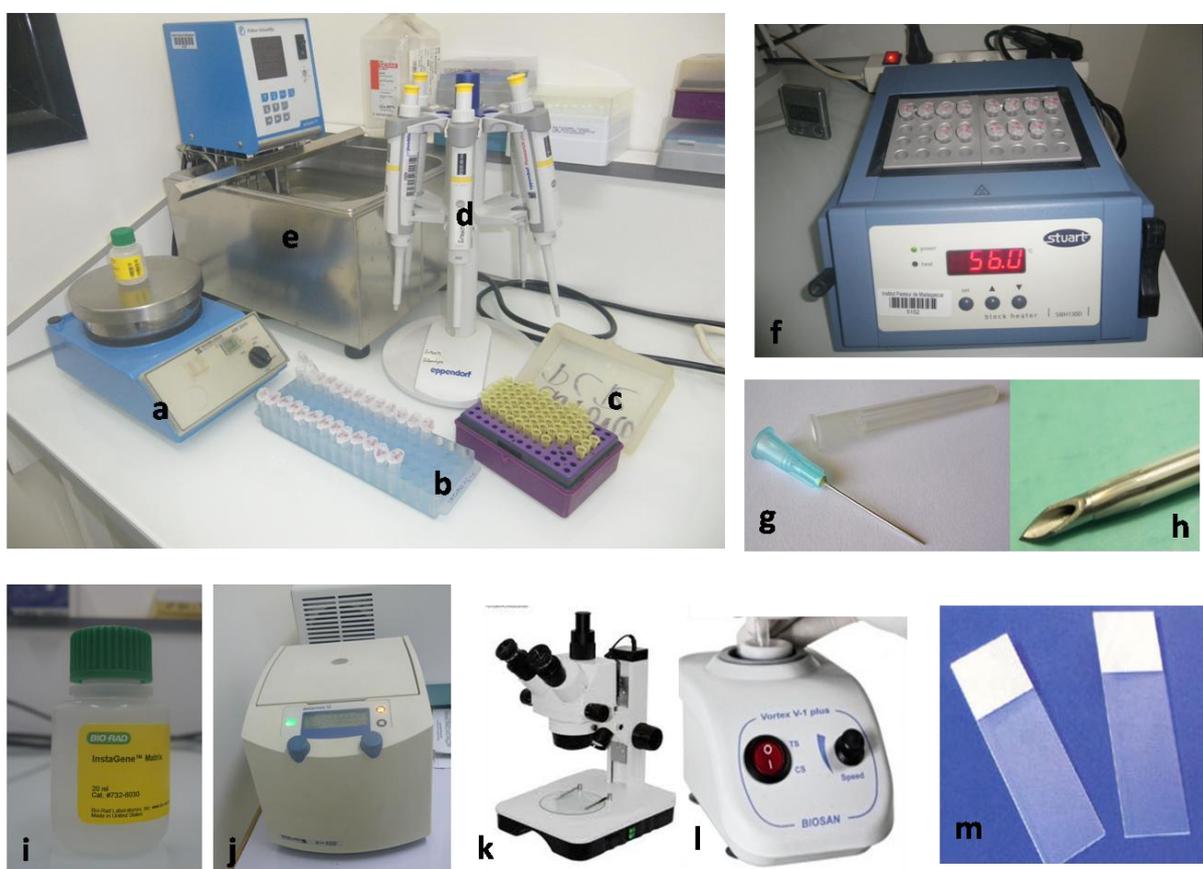
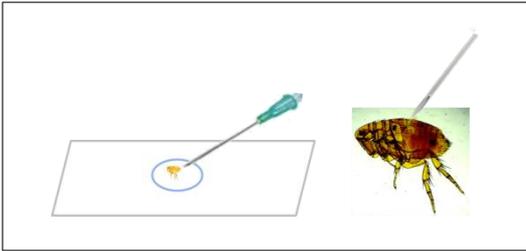


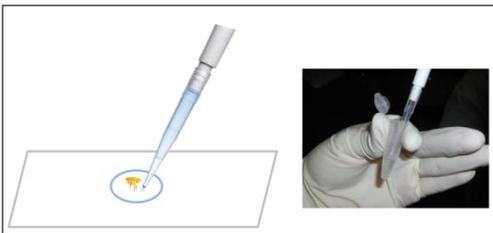
Figure 1 : matériels et réactifs pour l'extraction d'ADN des puces par la méthode non destructive

Mode opératoire :

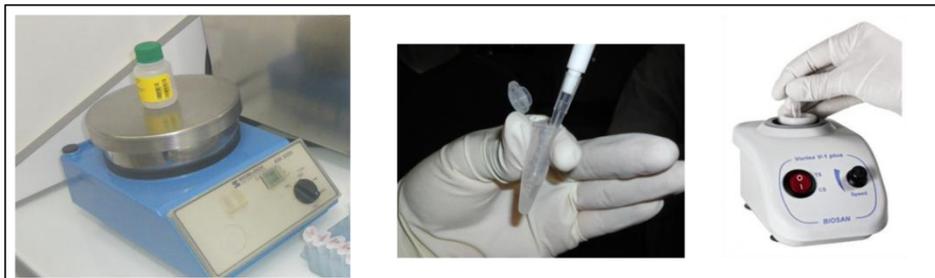
Etape 1 :



Etape 2 :



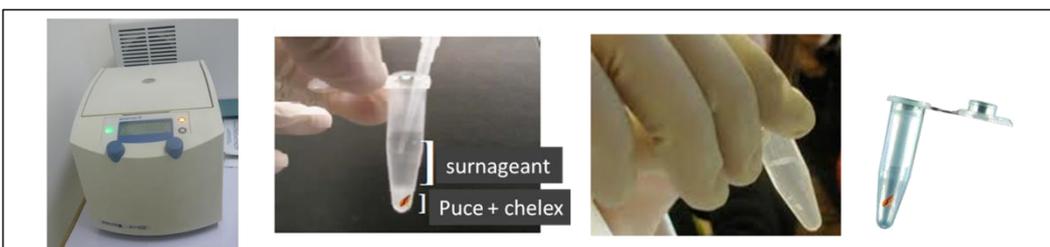
Etape 3 :



Etape 4 :



Etape 5



Enlever chaque puce du tube d'alcool où elle a été conservée puis passez-la sur du papier buvard. Préchauffer le bloc chauffant ou le bain-marie à 56°C

Etape 1 :

- ↯ Mettre 10 µl de PBS 1X sur une lame de verre propre, puis y mettre une puce.
- ↯ Manipuler sous loupe binoculaire : avec le biseau d'une aiguille de perfusion stérile (figure 1-h), faire une incision nette au niveau de la partie dorsale de la puce, environ entre le 2^e et le 3^e segment abdominale. Faire en sorte que l'incision arrive au plus à la moitié de la largeur de l'abdomen. Changer d'aiguille pour chaque puce.

Etape 2 :

- ↯ Avec une micropipette, aspirer le PBS puis transférer dans un tube eppendorf, ainsi que la puce incisée. La pince entomologique utilisée pour transférer la puce dans le tube doit être stérilisé avec la flamme d'un bruleur à alcool avant d'être réutilisée. La lame peut être réutilisée à condition de ne pas toucher aux surfaces déjà utilisées. Il est cependant préférable de changer de lame pour chaque puce.

Etape 3 :

- ↯ Ajouter 100µl d'InstaGene Matrix à chaque tube et maintenir le flacon d'InstaGene Matrix sur un agitateur magnétique pendant la distribution pour obtenir une solution homogène.
- ↯ Passer chaque tube 10 secondes au vortex pour homogénéiser.

Etape 4 :

- ↯ Mettre les tubes soigneusement numérotés, contenant le mélange InstaGene Matrix, puce et PBS dans le bain-marie ou le bloc chauffant préchauffé à 56°C et laisser incuber une nuit (environ 16 heures). Chaque puce doit couler au fond du tube.
- ↯ Préchauffer le bloc chauffant à 100°C.
- ↯ Après l'incubation, sortir les tubes et vortexer vigoureusement pendant 10 secondes.
- ↯ Mettre les tubes dans le bloc chauffant, chauffé à 100°C pendant 8 minutes. Après cette durée, sortir les tubes puis homogénéiser au vortex pendant 10 secondes.

Etape 5 :

- ↯ Centrifuger à 12000 tours par minute pendant 3 minutes.
- ↯ Récupérer le surnageant à l'aide d'une micropipette, en veillant à ne pas toucher le culot, et transférer dans un tube propre. Ce surnageant contient l'extrait d'ADN de la puce. Conserver à -20°C.
- ↯ La puce est enlevée du culot et conservée dans l'alcool 70° en attendant son montage.

**Mémoire de recherche pour l'obtention de Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA)
Option Entomologie Médicale**

Mise en place d'une technique d'extraction d'ADN non destructive pour l'identification moléculaire des puces selvatiques potentiellement vectrices de la peste

↯ **Résumé**

↯ D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, Madagascar est le pays qui déclare le plus de cas de peste. La peste sévit en milieu rural et urbain, mais la détection de la bactérie au sein de micromammifères forestiers nous a amené à effectuer des recherches sur la possible implication de certaines espèces de puces selvatiques dans le cycle de transmission de la peste. La faune de Siphonaptères de Madagascar est particulière par la richesse taxonomique et un taux d'endémisme très élevé. Actuellement l'identification morphologique des puces au niveau spécifique ne peut pas se faire en parallèle avec la détection de la bactérie pathogène car elle requiert un montage permanent sur lame. Nous avons mis en place un système d'extraction d'ADN non destructive qui permet à la fois d'extraire l'ADN et de conserver le corps de la puce pour le montage. 934 extraits d'ADN de puces de forêt ont été extraits par la méthode non destructive et plus de 80% ont été amplifiés par la technique de la PCR. Les analyses des séquences sont en cours. Ces séquences serviront à établir un outil moléculaire d'identification des espèces de puce et de détection de pathogène. Elles pourront aussi servir à alimenter les bases de données moléculaires sur les puces malgaches mais aussi d'explorer les domaines de la phylogénie et de la phylogéographie.

↯ **Mots clés** : puce, peste selvatique, extraction d'ADN, PCR, infection expérimentale.

↯

↯ **Abstract**

↯ According to the World Health Organization, Madagascar is the country reporting the most of plague cases worldwide. Plague is occurring in urban and rural areas. However a report of the circulation of plague bacteria within wild micro mammals' population has led us to undertake a research about the possible implications of some species of sylvatic flea, entertaining the plague cycle. Siphonaptera fauna of Madagascar is remarkable due to high level of endemism and high taxon diversity. Currently, morphological identification of Siphonaptera species requires a permanent slide mounting, thus pathogen detection within the flea is not more possible. The present study intended to develop a non destructive DNA isolation method which allows at once DNA isolation and slide mounting for morphological identification. DNA isolation was done from 934 sylvatic fleas and of about 80% of these DNA extracts were successfully amplified by PCR technique. At the present time, sequence analyses are ongoing. Further studies will be carried out with these DNA extracts, aiming to the development of molecular tool for flea's species identification, molecular detection of plague bacteria infecting the flea, phylogenetic and phylogeographic studies, as well as completing the molecular data on fleas of Madagascar.

↯ **Keywords**: fleas, sylvatic plague, DNA extraction, PCR, experimental infection

↯ Encadreur :

Co-encadreur :

Impétrante :

**Dr RANDRIANARISOA
Ernest**
Maître de conférences
Chef du département
d'Entomologie
Université d'Antananarivo

Dr Sebastien BOYER
PhD
Chef de l'Unité Entomologie
Médicale
Institut Pasteur de Madagascar

Miarinjara Adélaïde
Tel. : 0324038167
amiarinjara@gmail.com