

ANDRIANONY Sitraka Arilalaina

MISE AU POINT DE LA PCR POUR DETECTER LE PALUDISME
ET LA FILARIOSE CHEZ LES LEMURIENS

Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT D'ENSEIGNEMENT DES SCIENCES
ET DE MEDECINE VETERINAIRES

ANNÉE : 2012

N°: 095

MISE AU POINT DE LA PCR POUR DETECTER LE PALUDISME
ET LA FILARIOSE CHEZ LES LEMURIENS

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 29 octobre 2012
à Antananarivo

Par

Mademoiselle ANDRIANONY Sitraka Arilalaina
Née le 25 mars 1987 à Mahajanga

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN MÉDECINE VETERINAIRE
(Diplôme d'État)

Directeur de thèse : Professeur RAKOTOZANDRINDRAINNY Raphaël

MEMBRES DU JURY :

Président : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry
Juges : Professeur RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA Nantenaina Soa
Professeur RAKOTO ALSON Aimée Olivat
Rapporteur : Professeur RAKOTOZANDRINDRAINNY Raphaël



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DE MEDECINE

☎/Fax : 22 277 04 - ✉ : BP. 375 Antananarivo

E-mail : fmedtana@wanadoo.mg

I. CONSEIL DE DIRECTION

A. DOYEN

M. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

B. CHARGE DE MISSION

M. RAJAONARIVELO Paul

C. VICE-DOYENS

- Appui à la Pédagogie et Recherche
- Relations Internationales
- Scolarité
 - * 1^{er} et 2nd Cycles
 - * 3^{ème} Cycle court:
 - . Stage interné. examen de clinique et thèses

M. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

M. SAMISON Luc Hervé

M. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrana

M. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck
M. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA
Nantenaina Soa

- TéléEnseignement. Communication. LMD.
Ecole Doctorale et Formation Continue

M. RAKOTO RATSIMBA Hery Nirina

- Troisième Cycle Long:
 - . Agrégation. Clinicat. Internat Qualifiant
 - . Diplôme Universitaire Diplôme Interuniversitaire

M. SAMISON Luc Hervé

Mme. ROBINSON Annick Lalaina

D. SECRETAIRE PRINCIPAL

- Responsable de l'Administration. Finances et Sécurité au travail

Mme. RASOARIMANALINARIVO Sahondra H.

II. CONSEIL D'ETABLISSEMENT

PRESIDENT

Mme RAVELOMANANA RAZAFIARIVAO
Noëline

III. CHEFS DE DEPARTEMENT

- Biologie
- Chirurgie
- Médecine
- Mère et Enfant
- Pharmacie

- Santé Publique
- Sciences Fondamentales et Mixtes
- Tête et Cou
- Vétérinaire

Pr. RAKOTO ALSON Aimée olivat

Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès

Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu

Pr. RAOBIJAONA Solofoniaina Honoré

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA
Nantenaina Soa

Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

Pr. AHMAD Ahmad

Pr. ANDRIAMAMONJY Clément

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA
RAHANTALALAO Henriette

IV. CONSEIL SCIENTIFIQUE

PRESIDENT

Pr. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

V. COLLEGE DES ENSEIGNANTS

A. PRESIDENT

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA
Nantenaina Soa

B. ENSEIGNANTS PERMANENTS

B.1. PROFESSEURS TITULAIRES D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE

DEPARTEMENT BIOLOGIE

- Immunologie Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andry

DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

- Dermatologie Pr. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa
- Endocrinologie et Métabolisme Pr. RAMAHANDRIDONA Georges
- Néphrologie Pr. RAJAONARIVELO Paul
Pr. RABENATOANDRO Rakotomanantsoa
- Neurologie Pr. TEHINDRAZANARIVELO Djacoba Alain
- Pneumologie Phtisiologie Pr. ANDRIANARISOA Ange

DEPARTEMENT MERE ET ENFANT

- Pédiatrie néonatale Pr. RANDRIANASOLO Olivier
- Pédiatrie Pr. RAVELOMANANA RAZAFIARIVAO Noëline

DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE

- Administration et Gestion Sanitaire Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO
Henriette
- Education pour la santé Pr. ANDRIAMANALINA Nirina Razafindrakoto
- Santé Communautaire Pr. RANDRIANARIMANANA Dieudonné
- Santé Familiale Pr. RANJALAHY RASOLOFOMANANA Justin
- Statistiques et Epidémiologie Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Anatomie Pathologique Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA
Nantenaina Soa
- Anesthésie-Réanimation Pr. RANDRIAMIARANA Mialimanana Joël

DEPARTEMENT TETE ET COU

- Ophtalmologie Pr. ANDRIANTSOA RASOAVELONORO Violette
Pr. BERNARDIN Prisca
- Stomatologie Pr. RAKOTOVAO Joseph Dieudonné

B.2. PROFESSEURS D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE

DEPARTEMENT BIOLOGIE

- Biochimie Pr. RANAIVO HARISOA Lala
- Hématologie Biologie Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat
- Parasitologie Pr. RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy Soa

DEPARTEMENT CHIRURGIE

- Chirurgie Cardio-Vasculaire Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès
- Chirurgie Générale Pr. RAKOTO - RATSIMBA Hery Nirina
- Chirurgie Pédiatrique Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana
- Chirurgie Thoracique Pr. RAKOTOVAO Hanitrana Jean Louis
- Chirurgie Viscérale Pr. SAMISON Luc Hervé
Pr. RAKOTOARIJAONA Armand
- Orthopédie Traumatologie Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude
Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval
- Urologie Andrologie Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora

DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

- Cardiologie Pr. RABEARIVONY Nirina
Pr. RAKOTOARIMANANA Solofonirina
- Hépatogastro-entérologie Pr. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrana
- Maladies Infectieuses Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu
- Néphrologie Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck
- Psychiatrie Pr. RAHARIVELO Adéline
Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense
- Radiothérapie-Oncologie Médicale Pr. RAFARAMINO RAZAKANDRAINA Florine

DEPARTEMENT MERE ET ENFANT

- Gynécologie Obstétrique Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotovao
- Pédiatrie Pr. RAOBIJAONA Solofoniaina Honoré
Pr. ROBINSON Annick Lalaina

DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE

- Nutrition et Alimentation Pr. ANDRIANASOLO Roger

DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Radiodiagnostic et Imagerie Médicale Pr. AHMAD Ahmad
- Physiologie Pr. RAKOTOAMBININA Andriamahery Benjamin

DEPARTEMENT TETE ET COU

- Neuro-chirurgie Pr. ANDRIAMAMONJY Clément
Pr. RABARIJAONA Mamiarisoa
- Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam

DEPARTEMENT VETERINAIRE

- Pharmacologie Pr. RAFATRO Henintsoa

B.3. MAITRES DE CONFERENCES

DEPARTEMENT MERE ET ENFANT

- Obstétrique Dr. RAZAKAMANIRAKA Joseph

DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE

- Santé Publique Dr. RANDRIAMANJAKA Jean Rémi

DEPARTEMENT VETERINAIRE

- Bactériologie, Virologie, Maladies Infectieuses Dr. RAJAONARISON Jean Joseph
- Sciences Ecologiques, Vétérinaires Agronomiques et Bioingenieries Dr. RAHARISON Fidiniaina Sahondra

DEPARTEMENT PHARMACIE

- Pharmacologie Générale Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David
- Pharmacognosie Dr. RAOELISON Emmanuel Guy
- Biochimie Toxicologie Dr. RAJEMIARIMOELISOA Clara
- Chimie Organique et Analytique Dr. RAKOTONDRAMANANA Andriamahavola
Dina Louisino

DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Biophysique Dr. RASATA Ravelo Andriamparany

B.4. ASSISTANTS

DEPARTEMENT VETERINAIRE

- Virologie Dr. KOKO
- Technologie Dr. RAHARIMALALA Edwige Marie Julie

DEPARTEMENT PHARMACIE

- Procédés de Production. Contrôle et Qualité des Produits de Santé Dr. RAVELOJAONA RATSIMBAZAFIMAHEFA
Hanitra Myriam

C. ENSEIGNANTS NON PERMANENTS

C.1. PROFESSEURS EMERITES

- Pr. ANDRIAMBAO Damasy
- Pr. ANDRIANANDRASANA Athur
- Pr. ANDRIANJATOVO Joseph
- Pr. AUBRY Pierre
- Pr. FIDISON Augustin
- Pr. GIZY Ratiambahoaka Daniel
- Pr. KAPISY Jules Flaubert
- Pr. RABARIOELINA Lala
- Pr. RABENATOANDRO Casimir
- Pr. RABETALIANA Désiré
- Pr. RADESA François de Sales
- Pr. RAHARIJAONA Vincent Marie
- Pr. RAJAONA Hyacinthe
- Pr. RAKOTOMANGA Robert
- Pr. RAKOTOMANGA Samuel
- Pr. RAKOTO-RATSIMAMANGA S.U
- Pr. RAKOTOZAFY Georges
- Pr. RAMAKAVELO Maurice Philippe
- Pr. RAMONJA Jean Marie
- Pr. RANDRIAMAMPANDRY
- Pr. RANDRIARIMANGA Ratsiatery Honoré Blaise
- Pr. RASOLOFONDRAIBE Aimé
- Pr. RATOVO Fortunat
- Pr. RATSIVALAKA Razafy
- Pr. RAZANAMPARANY Marcel
- Pr. ZAFY Albert

C.2. CHARGE D'ENSEIGNEMENT

DEPARTEMENT CHIRURGIE

- Chirurgie Générale Dr. RAVELOSON Jean Roger

DEPARTEMENT TETE ET COU

- ORL et Chirurgie Cervico-Faciale Pr. RAKOTO Fanomezantsoa Andriamparany

VI. SERVICES ADMINISTRATIFS

SECRETAIRE PRINCIPAL

Mme. RASOARIMANALINARIVO Sahondra H.

CHEFS DE SERVICES

AFFAIRES GENERALES

M. RANDRIANJAFIARIMANANA Charles Bruno

ET RESSOURCES HUMAINES

LABORATOIRE D'APPUI A LA RECHERCHE

M. RAZAFINDRAKOTO Willy Robin

ET TECHNOLOGIE DE L'INFORMATION

ET DE LA COMMUNICATION (LARTIC)

SCOLARITE

Mme. SOLOFOSAONA R. Sahondranirina

TROISIEME CYCLE LONG

Mme. RANIRISOA Voahangy

VII. IN MEMORIAM

Pr. RAMAHANDRIARIVELO Johnson
Pr. RAJAONERA Frédéric
Pr. ANDRIAMASOMANANA Veloson
Pr. RAKOTOSON Lucette
Pr. ANDRIANJATOVO RARISOA Jeannette
Dr. RAMAROKOTO Razafindramboa
Pr. RAKOTOBÉ Alfred
Pr. ANDRIAMIANDRA Aristide
Dr. RAKOTONANAHARY
Pr. ANDRIANTSEHENO Raphaël
Pr. RANDRIAMBOLOLONA Robin
Pr. RAMANANIRINA Clarisse
Pr. RALANTOARITSIMBA Zhouder
Pr. RANIVOALISON Denys
Pr. RAKOTOVAO Rivo Andriamiadana
Pr. RAVELOJAONA Hubert
Pr. ANDRIAMAMPIHANTONA Emmanuel
Pr. RANDRIANONIMANDIMBY Jérôme
Pr. RAKOTONIAINA Patrice

Pr. RAKOTO-RATSIMAMANGA Albert
Pr. RANDRIANARISOLO Raymond
Dr. RABEDASY Henri
Pr. MAHAZOASY Ernest
Pr. RATSIFANDRIHAMANANA Bernard
Pr. RAZAFINTSALAMANA Charles
Pr. RANAIVOARISON Milson Jérôme
Pr. RASOLONJATOVO Andriananja Pierre
Pr. MANAMBELONA Justin
Pr. RAZAKASOA Armand Emile
Pr. RAMIALIHARISOA Angéline
Pr. RAKOTOBÉ Pascal
Pr. RANAIVOZANANY Andrianady
Pr. RANDRIANARIVO
Pr. RAKOTOARIMANANA Denis Roland
Pr. ANDRIAMANANTSARA Lambosoa
Pr. RAHAROLAHY Dhels
Pr. ANDRIANJATOVO Jean José
Pr. ANDRIANAIVO Paul Armand
Pr. RANDRIAMBOLOLONA RASOAZANANY Aimée

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

À **DIEU**, notre Père Céleste, *Gloire à Toi !*

Aux Docteurs **RAKOTOMALALA Sabine** et **RAKOTOARIVONY A. Emmanuel**

Maman et papa, ça y est j'ai enfin fini même si ça a été un peu long !

Merci de m'avoir soutenue et encouragée, merci de votre amour inconditionnel.

A **ANDRIANONY Fy ny Aina**

Ma petite sœur adorée, pour ta gentillesse.

Mes plus tendres pensées.

A Docteur **ANDO RAVELOMANANTSOA Miharifetra**

Mon Doudou, à ces années passées ensemble et à celles à venir.

Infinie tendresse.

A **RAKOTOMALALA Andriamampianina**

J'espère que tu sois fier de nous là où tu es.

Meilleurs souvenirs.

A toute ma **FAMILLE**

Respect et reconnaissance infinis.

A tous mes **AMIS**

Aimables salutations.

A la promotion **MIARO** et à notre marraine **Docteur RAVAOMANARIVO Berthine**

J'espère qu'il y aura encore de nombreux voyages à faire ensemble.

A toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Mes sincères appréciations.

A NOTRE MAITRE DIRECTEUR ET RAPPORTEUR DE THÈSE

Monsieur Le Docteur **RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël**

- Professeur Spécialiste en Microbiologie et Parasitologie à l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques
- Enseignant à la Faculté de Médecine et au Département d'Enseignement des Sciences et de Médecine Vétérinaires

Qui nous a guidé avec beaucoup de gentillesse et de disponibilité.

Avec toute notre reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur Le Docteur **RASAMINDRAKOTROKA Andry**

- Professeur Titulaire d’Enseignement Supérieur et de Recherche en Immunologie
à la Faculté de Médecine d’Antananarivo

Vous nous faites le grand honneur de présider cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

A NOS MAITRES ET HONORABLES JUGES DE THESE

Monsieur Le Docteur **RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA Nantenaina Soa**

- Professeur Titulaire d’Enseignement Supérieur et de Recherche en Anatomie et Cytologie pathologique, Histologie- Embryologie à la Faculté de Médecine d’Antananarivo
- Chef de Département en Pharmacie
- Chef de Service en Anatomie Pathologique au Centre Hospitalier Universitaire Joseph Ravoahangy Andrianavalona

Madame Le Docteur **RAKOTO ALSON Aimée Olivat**

- Professeur d’Enseignement Supérieur et de Recherche en Hématologie Biologie à la Faculté de Médecine d’Antananarivo
- Chef de Service en Hématologie au Centre Hospitalier Universitaire Joseph Ravoahangy Andrianavalona

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Recevez ici toute notre gratitude et notre grande considération.

**A NOTRE MAITRE ET DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE
D'ANTANANARIVO**

Monsieur le Professeur **RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa**

Veillez recevoir l'expression de notre haute considération.

**A TOUS NOS MAITRES ET PROFESSEURS DE LA FACULTE DE
MEDECINE-DEPARTEMENT D'ENSEIGNEMENT DES SCIENCES ET DE LA
MEDECINE VETERINAIRE**

Reconnaissance éternelle.

A NOS ENCADREURS DE THESE

Monsieur le Professeur **RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona**

Pour m'avoir accueilli en stage dans son Unité de Recherche sur le Paludisme.

Votre sens du partage et de la pédagogie m'ont énormément touché.

Toute ma gratitude et mes respectueux remerciements.

Madame le Docteur **MAEDER Muriel Nirina**

Qui nous a encadré de près et guidé avec rigueur.

Sincères remerciements et profonde gratitude.

A l'Equipe de l'Unité de Recherche sur le Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar, spécialement Madame **RAVAOARISOA Elisabeth**, Mademoiselle **ANDRIANARANJAKA Voahangy**, Madame **RAZANATSIORIMALALA Sehen**, Monsieur **JAHEVITRA Martial**, Monsieur **RAHERINJAFY Rogelin**

Profonde reconnaissance.

A Monsieur **AMOURIC Laurent** et à l'ensemble du personnel de **LEMURS' PARK**

Pour nous avoir gentiment permis d'avoir des prélèvements.

**A TOUT LE PERSONNEL ADMINISTRATIF ET TECHNIQUE DE LA
FACULTE DE MEDECINE D'ANTANANARIVO**

Vifs remerciements.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
I. GENERALITES	2
I.1. Lémuriens.....	2
I.1.1. Spécificité des lémuriens.....	2
I.1.2. Espèces de lémuriens étudiées	3
I.2. Paludisme	5
I.2.1. Epidémiologie du paludisme.....	5
I.2.2. Infection.....	6
I.2.3. Paludisme des primates non-humains	9
I.3. Filariose.....	12
I.3.1. Filariose lymphatique	12
I.3.2. Filariose lymphatique chez les animaux	17
I.3.3. Filariose lymphatique chez les primates	17
I.4. Co-infection	18
I.5. Zoonoses	19
I.6. Conservation	20
I.7. PCR.....	21
I.7.1. Principe.....	21
I.7.2. Réaction.....	21
I.7.3. Exigences de la PCR	23
I.7.4. Types de PCR.....	23
II. MATERIELS ET METHODES	26
II.1. Méthodes.....	26
II.1.1. Cadre et type d'étude	26
II.1.2. Durée d'étude.....	26
II.1.3. Objectifs de l'étude	26
II.1.4. Critères d'inclusion et d'exclusion	26
II.1.5. Prélèvements sanguins des lémuriens	26
II.1.6. Transport des échantillons	27
II.1.7. Stockage des prélèvements	27

II.1.8. Traçabilité des prélèvements.....	27
II.1.9. Microscopie optique.....	28
II.1.9.1. Confection de la goutte épaisse et du frottis mince.....	28
II.1.9.2. Séchage et fixation.....	28
II.1.9.3. Coloration.....	28
II.1.10. Test de diagnostic rapide.....	29
II.1.10.1. Dépistage de <i>Plasmodium spp</i> par TDR.....	29
II.1.10.2. Dépistage de <i>Wuchereria bancrofti</i> par TDR.....	29
II.1.11. Extraction d'ADN.....	30
II.1.11.1. Extraction à partir du sang total.....	30
II.1.11.2. Extraction d'ADN à partir des lames souches de l'OMS positives en <i>Wuchereria bancrofti</i>	32
II.1.12. PCR.....	33
II.1.13. Electrophorèse.....	34
II.1.14. Purification d'ADN.....	36
II.1.15. Optimisation des conditions de PCR.....	38
II.1.16. Recherche des hémoparasites chez les lémuriens.....	45
II.2. Matériels.....	47
II.2.1. Prélèvement.....	47
II.2.2. Microscopie.....	47
II.2.3. Test sérologique ou test de diagnostic rapide (TDR).....	47
II.2.4. Extraction d'ADN.....	47
II.2.5. PCR conventionnelle et PCR en temps réel.....	48
II.2.6. Matériels biologiques.....	51
III. RESULTATS.....	52
III.1. Résultats de la microscopie et du TDR.....	52
III.2. Résultat global de la PCR.....	52
III.3. Résultats des mises au point des PCR conventionnelles simplex.....	52
III.3.1. Résultats de la mise au point de la recherche de <i>Plasmodium</i>	52
III.3.2. Résultats de la mise au point de la recherche des microfilaires.....	54
III.4. Résultats des mises au point des PCR conventionnelles duplex.....	56
III.5. Résultats des mises au point des PCR en temps réel.....	57

III.5.1. Résultat de la mise au point de la RT-PCR servant à la recherche de <i>Plasmodium</i>	57
III.5.2. Résultat de la mise au point de la RT-PCR pour la recherche de <i>Wuchereria bancrofti</i>	58
III.6. Résultats des PCR des prélèvements de lémuriers	59
III.6.1. Résultats des PCR standards simplex	59
III.6.2. Résultat de la PCR standard duplex	61
III.6.3. Résultats de la PCR en temps réel simplex	62
IV. DISCUSSION	67
IV.1. Méthodes	67
IV.1.1. Microscopie et TDR	67
IV.1.2. Extraction de l'ADN génomique.....	67
IV.1.3. PCR classique et PCR en temps réel	68
IV.1.4. Optimisation de la PCR.....	69
IV.2. Résultats des PCR	71
V. SUGGESTIONS.....	73
CONCLUSION.....	75
BIBLIOGRAPHIE	76

LISTE DES PHOTOS

	Pages
Photo 1 : Localisation non-exclusive de <i>Propithecus verreauxi coronatus</i> , de <i>Lemur catta</i> et de <i>Varecia variegata variegata</i> à Madagascar.....	4
Photo 2 : Frottis mince et goutte épaisse sur lames.....	28
Photo 3 : Résultats des PCR présentant les effets de la variation du nombre de cycle et de la concentration de l'ADN matriciel.....	53
Photo 4 : Résultats des PCR avec les amorces <i>NV1/NV2</i> et <i>LDR1/LDR2</i>	54
Photo 5 : Résultat de la PCR avec les amorces <i>LDR1/LDR2</i> (amplicons migrés sur gel polyacrylamide).....	55
Photo 6 : Résultat de la PCR des produits de co-infection artificielle amplifiés avec différentes concentrations en amorces.....	56
Photo 7 : Résultat de la PCR pour la détection de <i>Plasmodium</i> chez les lémuriens....	59
Photo 8 : Résultat de la PCR pour la détection de microfilaire dans les produits d'extraction de sang total des cinq lémuriens.....	60
Photo 9 : Résultat de la PCR de détection de co-infection chez les lémuriens avec le amorces <i>rPlu5/rPlu6</i> et <i>LDR1/LDR2</i>	61
Photo 10 : Résultat de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR en temps réel pour la détection de microfilaires chez les lémuriens.....	64
Photo 11 : Résultat de la PCR avec la variation en concentration de $MgCl_2$	65
Photo 12 : Résultat de la PCR avec la variation de concentration en ADN.....	65
Photo 13 : Résultat de la PCR des produits ré-amplifiés à différentes dilutions, avec les amorces <i>LDR1/LDR2</i>	66

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Endémicité du paludisme dans le monde.....	6
Figure 2 : Répartition mondiale des filarioses lymphatiques.....	14
Figure 3 : Déroulement d'un cycle de PCR.....	22
Figure 4 : Principe de marquage avec le SYBR Green I.....	25
Figure 5 : Description schématique d'un TDR.....	29
Figure 6 : Protocole d'extraction d'ADN à partir du sang total avec le « <i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i> ».....	30
Figure 7 : Protocole d'extraction d'ADN à partir des lames colorées au Giemsa avec une solution de Na ₂ HPO ₄	32
Figure 8 : Emplacement schématique des amorces <i>NV1/NV2</i> et <i>LDR1/LDR2</i> sur le gène de <i>Wuchereria bancrofti</i>	33
Figure 9 : Régions amplifiées du génome de <i>Wuchereria bancrofti</i> avec les amorces <i>NV1/NV2</i> et <i>LDR1/LDR2</i>	34
Figure 10 : Protocole de purification d'ADN à partir du gel d'agarose avec le « <i>QIA quick Gel Extraction Kit</i> ».....	37
Figure 11 : Courbe de fusion de quatre espèces plasmodiales.....	57
Figure 12 : Courbe de fusion des témoins de différents volumes d'ADN des contrôles positifs en <i>Wuchereria bancrofti</i>	58
Figure 13 : Courbe de fusion des témoins des 4 espèces de <i>Plasmodium</i> et de tous les échantillons de lémuriens.....	62
Figure 14 : Courbe de fusion des témoins en <i>Wuchereria bancrofti</i> et de tous les échantillons de lémuriens.....	63

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Composition du mélange réactionnel pour la RT-PCR simplex.....	41
Tableau II : Programme modifié de la RT-PCR pour détecter <i>Plasmodium</i>	42
Tableau III : Différentes compositions du mélange réactionnel pour la RT-PCR simplex.....	43
Tableau IV : Programme de la RT-PCR pour détecter les témoins positifs en <i>Wuchereria bancrofti</i>	44
Tableau V : Programme de la PCR pour détecter <i>Plasmodium</i> spp chez les lémuriens.....	45
Tableau VI : Séquence des amorces utilisées.....	48
Tableau VII : Comparaison de la PCR classique à la PCR en temps réel utilisant le SYBR Green I.....	68

LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS

A.	<i>Anopheles</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNase	DésoxyriboNucléase
BEt	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Degré Celsius
CTK	Composite Test Kit
DLAA	DermatoLymphAngioAdénites
DAOM	Déchets Assimilés aux Ordures Ménagères
dNTPs	Désoxy Nucléotides Triphosphates
EDS	Eau distillée stérile
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HRP2	Histidin Rich Protein 2
kb	Kilobase
LDR	Long DNA Repeat
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
IgG/IgM	Immunoglobuline G/ Immunoglobuline M
IPM	Institut Pasteur de Madagascar
MgCl ₂	Dichlorure de magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
m/v	Masse par volume
Na ₂ HPO ₄	Di-sodium hydrogénophosphate
pLDH	Parasite <i>Lactate Dehydrogenase</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPCT	Objets Piquants, Coupants et Tranchants
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNH	Primate Non-Humain

<i>Pl.</i>	<i>Plasmodium</i>
RT-PCR	Real Time-PCR
s	Seconde
<i>sp.</i>	Species “singular”
<i>spp.</i>	Species “plural”
TAE	Tris Acétate EDTA
TBE	Tris Borate EDTA
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TEMED	TEtraMethylEthyleneDiamine
Tm	Melting Temperature
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
UV	Ultra Violet
μl	Microlitre
μM	Micromole
VIH/SIDA	Virus de l’Immunodéficience Humaine / Syndrome d’Immuno - Déficience Acquise

GLOSSAIRE

Acrylamide : Molécule servant à fabriquer le gel de polyacrylamide, matériel de base de l'électrophorèse.

Agent intercalant : Molécule capable de s'insérer entre les plateaux formés par les bases appariées d'un acide nucléique.

Amorce : Courte séquence nucléotidique qui, appariée à un acide nucléique simple brin, permet l'initiation de la synthèse d'une chaîne désoxyribonucléique par l'ADN polymérase.

Amorces-dimères : Artéfacts en compétition avec les produits cibles de PCR.

Amplicon/amplifiat : Fragment d'ADN amplifié au cours d'une analyse PCR compris entre les zones d'appariement des amorces.

Anophèle: Type de moustique dont la femelle est le vecteur du paludisme et de la filariose.

Aliquote : Se dit d'une quantité contenue un nombre exact de fois dans le tout.

Asymptomatique : Se dit d'une maladie qui ne s'accompagne pas de symptôme

Bandelettes réactives: Etroits morceaux de matière imprégnés ou recouverts d'une substance utilisée pour produire une réaction chimique.

Endémique : Désigne une maladie qui sévit en permanence dans une région ou une communauté donnée. Limitation qui revêt une signification au regard de la biogéographie et de l'histoire des espèces.

Extraction : Phase de la manipulation consistant à isoler les acides nucléiques de la prise d'analyse.

Hématozoaire : Parasite unicellulaire vivant dans le sang.

Hôte définitif : Hôte au sein duquel se déroule la reproduction sexuée du parasite.

Infection périodique : La numération des microfilaries présente un clocher très marqué pour une certaine tranche dans chaque période de 24 heures, alors que les microfilaries sont absentes ou très rares pendant une grande partie de la période. Le clocher peut être nocturne (*Wuchereria bancrofti*) ou diurne.

Infection subpériodique : Un clocher de la numération des microfilaries s'observe régulièrement toutes les 24 heures mais il est beaucoup moins marqué. Les microfilaries sont presque constamment présentes. Le clocher peut être aussi nocturne ou diurne (*Wuchereria bancrofti*).

Inquirenda : Terme latin signifiant une espèce identifiée avec doute, nécessitant des recherches supplémentaires.

Marquage : Introduction de nucléotides modifiés, ou modification chimique de certains nucléotides d'un acide nucléique afin de pouvoir le repérer.

Matrice : Brin d'acide nucléique copié lors de la réplication ou de la transcription par les polymérases adéquates

Mésappariement : Non-appariement d'une zone à l'intérieur d'un fragment d'acide nucléique double brin.

Microfilarémie : Présence de parasites au stade de microfilaires dans le sang

Neuropaludisme : Forme mortelle de la malaria due à *P. falciparum*.

Périodicité ou fièvre tierce : Alternance de fièvres liées au cycle sanguin du parasite en 48 heures.

Périodicité ou fièvre quarte : Recrudescences fébriles tous les 72 heures.

Plasmodie : Synonyme de *Plasmodium*.

Primate : Ordre de mammifères placentaires aux mains préhensiles, aux ongles plats, possédant une denture complète et un cerveau très développé, tels que les lémuriers, les singes et l'homme.

Prosimien : Taxon regroupant les espèces de primates dont les lémuriers, les tarsiers, les galagos, les pottos et les lorises

Semi-diurne (moustique) : Qui pique du lever au coucher du soleil

Séquençage : Procédé utilisé pour déterminer l'ordre (la séquence) des acides aminés d'une protéine ou des bases dans les acides nucléiques (ADN et ARN).

Simien : L'adjectif simien se rapporte aux singes. Les singes sont phylogénétiquement liés aux hominidés ; ils constituent ensemble le clade des Anthrozoidea.

TEMED : le tétraméthyléthylènediamine est utilisé pour catalyser la polymérisation de l'acrylamide dans la fabrication de gels polyacrylamides.

Température de fusion : température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin et l'autre moitié sous forme simple brin.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies hémoparasitaires, dues à des parasites circulant dans le sang, sont nombreuses chez l'homme et chez les animaux. Ces maladies s'étendent des affections bénignes peu handicapantes aux affections graves. Le paludisme et la filariose sont parmi les maladies hémoparasitaires responsables d'importants problèmes de santé publique. Le paludisme est dû aux protozoaires du genre *Plasmodium* spp. transmis par la piqûre de l'anophèle femelle. Il est l'une des plus importantes maladies qui frappent l'espèce humaine. Près de la moitié de la population mondiale est exposée à cette maladie (1). Les filarioses sont engendrées par différentes espèces de vers connus sous le nom de filaires. Trois espèces de filaires peuvent être responsables de la filariose lymphatique dont la plus fréquente est *Wuchereria bancrofti* (2). Le paludisme et la filariose lymphatique peuvent être concomitants en partageant les vecteurs communs qui sont les moustiques du genre *Anopheles* (3).

Les animaux domestiques et sauvages sont également des hôtes de plasmodies et de microfilaires. Les infections à *Plasmodium* touchent les mammifères, les oiseaux et les reptiles (4). Les microfilaires ont été découvertes chez les singes, les carnivores domestiques et les chauves-souris (5). Des microfilaires ayant une ressemblance morphologique à *Wuchereria bancrofti* var *vauceli* ont été décrites chez les lémuriens (6). En conséquence, l'objectif principal de cette étude est de mettre au point des techniques d'amplification génique (PCR) pour détecter ces hémoparasites chez les lémuriens dans le but de suivre et de contrôler la circulation des parasites pouvant potentiellement infecter l'homme.

Dans le cadre de ce travail, il est indispensable de connaître, en premier lieu, les généralités sur les lémuriens, le paludisme, la filariose lymphatique, les zoonoses, la conservation et la PCR. La deuxième partie se rapportera essentiellement sur les mises au point de la PCR conventionnelle et de la PCR en temps réel pour détecter le paludisme et la filariose lymphatique chez les lémuriens. Les résultats du diagnostic microscopique, des tests de diagnostic rapide et des méthodes PCR pour la recherche de ces hémoparasitoses seront ensuite développés. Avant de conclure, la discussion sera complétée avec des suggestions dont la création d'un centre de référence vétérinaire.

I. GENERALITES

I.1. Lémuriens

Prosimiens endémiques de Madagascar, 5 familles et 15 genres de lémuriens diurnes et nocturnes sont répertoriés, soit les Cheirogaleidae (*Allocebus*, *Cheirogaleus*, *Microcebus*, *Mirza*, *Phaner*), les Lepilemuridae (*Lepilemur*), les Lemuridae (*Eulemur*, *Hapalemur*, *Lemur*, *Prolemur*, *Varecia*), les Indridae (*Avahi*, *Indri*, *Propithecus*) et les Daubentoniidae (*Daubentonia*).

Sur les 101 espèces et sous-espèces de lémuriens décrites, 26 sont considérées comme menacées d'extinction selon la dernière évaluation de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) et figurent sur la Liste Rouge (7). En effet, de nombreuses menaces indirectes pèsent sur ces animaux avec la destruction de leur environnement, notamment la déforestation et l'exploitation forestière (production de charbon, défrichage et feu de brousse augmentant les surfaces de pâturage pendant la saison sèche) mais également des menaces directes avec le braconnage et la capture, les destinant à devenir des animaux de compagnie (7).

I.1.1. Spécificité des lémuriens

La diversité morphologique et comportementale des lémuriens, leur origine unique dans l'évolution et leur distribution biogéographique restreinte se combinent pour faire d'eux des primates remarquables à l'échelle mondiale.

Les Cheirogaleidae comprennent ainsi les plus petits primates vivants, pesant entre 30 et 87 grammes, appartenant au genre *Microcebus*. Nocturnes et principalement frugivores, ils sont également les seuls primates connus pour hiberner durant une grande partie de la saison sèche.

Le plus grand lémurien actuel, *Indri indri*, ne possédant qu'un appendice caudal, pèse jusqu'à 9,5 kg et mesure jusqu'à 90 cm. Diurne, folivore et sauteur spectaculaire, il est le seul représentant vivant de la famille des Indridae (8).

La dernière espèce vivante appartenant aux Daubentoniidae, appelée Aye-aye (*Daubentonia madagascariensis*) est le plus particulier des lémuriens avec des incisives en croissance continue, de larges oreilles, une queue ressemblant à celle des écureuils et le troisième doigt de la main, squelettique et extrêmement allongé, servant à fouiller les orifices dans lesquels pourraient se trouver ses proies (8).

I.1.2. Espèces de lémuriens étudiées

I.1.2.1. Propithecus verreauxi coronatus

Comme les autres membres de la famille des Indridae, *Propithecus* a un complexe postural et locomoteur inhabituel caractérisé par la tenue verticale du corps sur des supports verticaux (8). Les sous-espèces de *Propithecus verreauxi* ont des aires de répartition différentes. *Propithecus verreauxi coronatus* a un pelage presque entièrement de couleur blanc crème. La tête, le cou et la gorge ont une coloration chocolat à brun noir. La face est nue, de couleur grise sombre à noire et de forme plus carrée. Les oreilles présentent des poils blancs. *Propithecus verreauxi coronatus* se rencontre dans des forêts sèches d'arbres à feuilles caduques. Il peut parfois être observé en train de se nourrir au sol. Le régime alimentaire est principalement constitué de bourgeons et de fruits non mûrs, avec une proportion significative de feuilles. Il vit en groupes de deux à huit individus (8). Cette sous-espèce figure sur la Liste Rouge de l'UICN dans la catégorie « *en danger critique d'extinction* » (7).

I.1.2.2. Lemur catta

Le genre *Lemur* ne contient qu'une unique espèce appelée *Lemur catta*. Le dos présente généralement une coloration grise à gris-brun. Le ventre est blanc cassé ou crème. La face ainsi que la gorge sont plutôt blanchâtres. La queue est longue et présente des anneaux alternativement noirs et blancs. C'est un animal diurne et semi-terrestre. Il se rencontre dans les forêts d'épineux, les buissons secs, les forêts d'arbres à feuilles caduques et les couloirs forestiers. Son régime alimentaire comprend des fruits, des feuilles, des fleurs, des écorces, des jus de plantes et occasionnellement des invertébrés. Les groupes de *Lemur catta* peuvent comporter jusqu'à 24 individus sous dominance des femelles. Les marquages olfactifs sont très importants surtout pour la délimitation du territoire (8). Cette espèce figure sur la liste de l'UICN dans la catégorie « *quasi menacée* » (7).

I.1.2.3. Varecia variegata variegata

Ce sont les plus grands des *Lemuridae* vivants. La sous-espèce *Varecia variegata variegata* a un pelage long et dense. La queue, les pattes, les surfaces intérieures des membres, les épaules, la face, le museau et le sommet de la tête sont noirs. Le dos, les flancs et la majeure partie de la surface extérieure des membres sont blancs. Les oreilles

sont blanches avec de longs poils formant une collerette blanche autour des joues et sous le menton. *Varecia variegata variegata* se rencontre dans les forêts tropicales humides de moyenne altitude. Les fruits et le nectar constituent l'essentiel de son régime alimentaire, complétés par des feuilles et des graines. Ses vocalisations sont puissantes. Il est classé « *en danger critique d'extinction* » selon l'UICN (7).

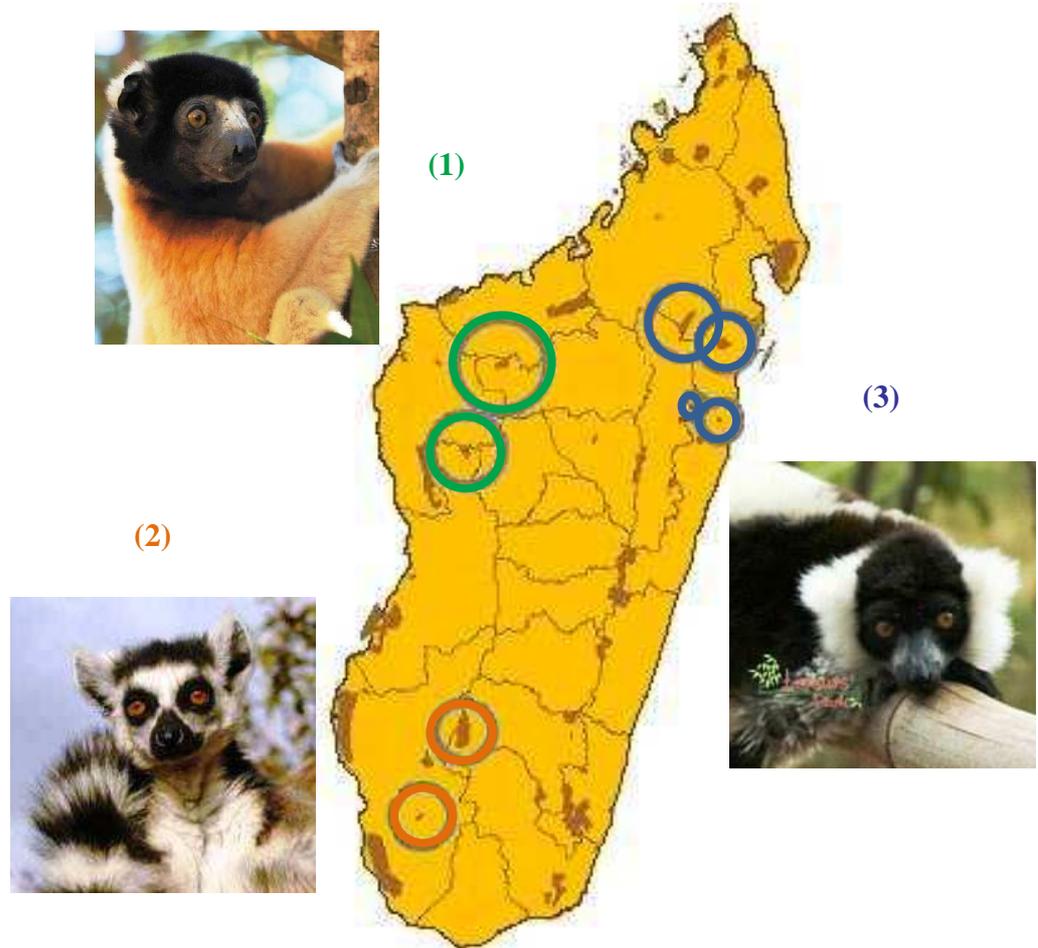


Photo 1: Localisation non-exclusive de *Propithecus verreauxi coronatus*, de *Lemur catta* et de *Varecia variegata variegata* à Madagascar (7, 9)

(1) *Propithecus verreauxi coronatus* est présent dans les réserves spéciales d'Ambohijanahary et de Kasijy. (2) *Lemur catta* se trouve dans six parcs nationaux dont l'Isalo et trois réserves spéciales dont Bezaha Mahafaly. (3) *Varecia variegata variegata* est présente dans le parc national de Zahamena, la réserve naturelle de Betampona, les réserves spéciales d'Ambatovaky et de Marotandrano.

I.2. Paludisme

Le paludisme est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmise par des moustiques du genre *Anopheles*. Cette maladie concerne principalement les populations vivant en zone intertropicale.

I.2.1. Épidémiologie du paludisme

I.2.1.1. Importance du paludisme à l'échelle mondiale

Fléau mondial et quatrième cause de mortalité liée à une maladie infectieuse, le paludisme se classe derrière les maladies respiratoires aiguës, le VIH/SIDA et les maladies diarrhéiques (10).

Selon le « Rapport sur le paludisme dans le monde 2011 », 216 millions de cas de paludisme causant 655'000 décès ont été enregistrés en 2010 pour la plupart en Afrique, où selon les statistiques, un enfant meurt chaque minute du paludisme (11).

L'endémie est élevée dans les zones tropicales défavorisées d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine et les cas de paludisme enregistrés en Europe sont dits d'importation et concernent les personnes n'ayant pas suivi de prophylaxie lors de leur séjour à l'étranger (10).

I.2.1.2. Importances relatives des espèces plasmodiales humaines

Quatre espèces de parasites du genre *Plasmodium* sont responsables de la maladie chez l'homme.

- La première espèce *Plasmodium falciparum* provoque la majorité des cas mortels. Retrouvée dans les zones tropicales d'Amérique Latine et d'Asie, *P. falciparum* est aussi l'espèce dominante en Afrique (12).

- *Plasmodium vivax* coexiste avec *P. falciparum* partout dans le monde ainsi que dans certaines régions tempérées (12).

- *Plasmodium ovale*, trouvé principalement en Afrique de l'Ouest, entraîne des rechutes 4 à 5 ans après la primo infection (12).

- *Plasmodium malariae*, rare avec une distribution mondiale inégale, entraîne des rechutes jusqu'à 20 ans après la primo infection (12).

Plasmodium knowlesi, principalement retrouvé dans les pays d'Asie du Sud- Est, est le cinquième agent étiologique potentiel du paludisme humain (13).

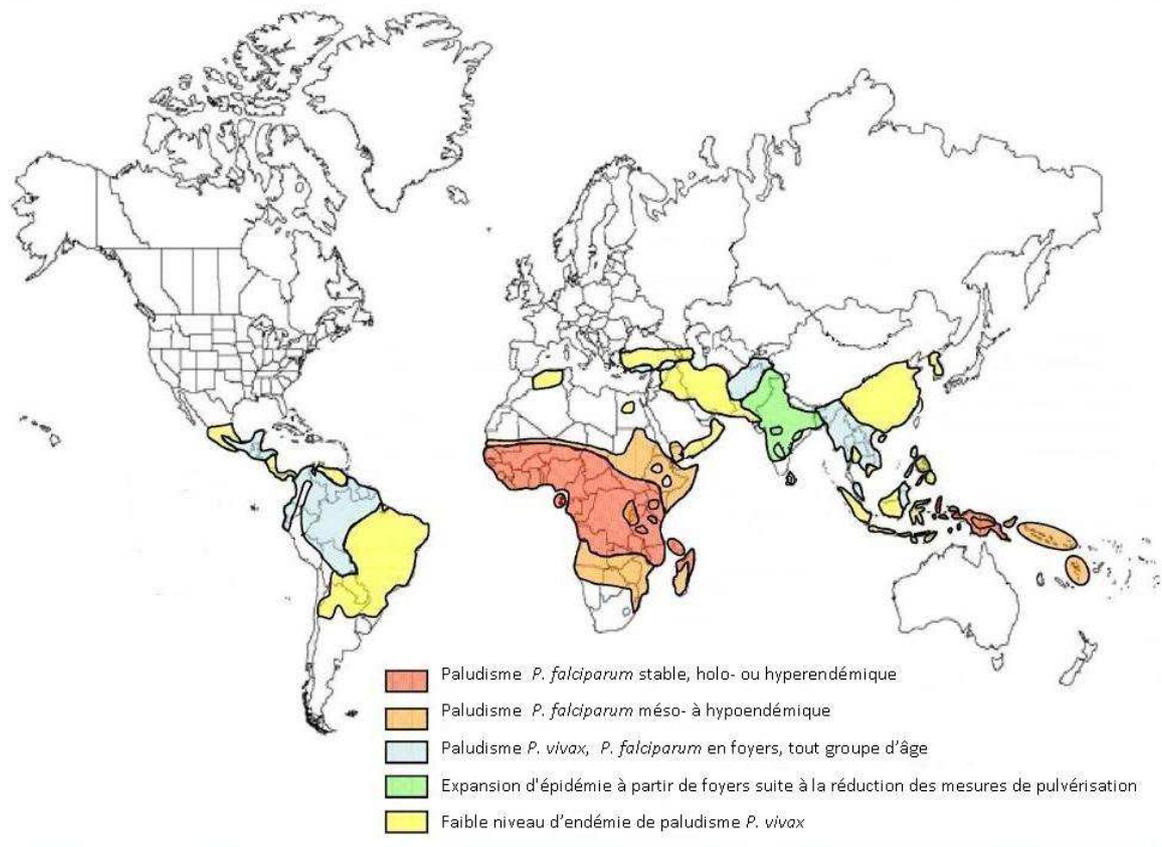


Figure 1: Endémicité du paludisme dans le monde (14)

I.2.1.3. Paludisme à Madagascar

Des variations bioclimatiques conditionnent la durée et l'intensité de la transmission du paludisme. Le paludisme est à forte transmission toute l'année au niveau de la côte Est. Il est stable avec une forte transmission en saison des pluies au niveau de la côte Ouest et au Nord. Le paludisme est instable et saisonnier au niveau des hautes terres centrales. Au Sud, il est instable à transmission liée aux précipitations. Les altitudes supérieures à 1 500 m et les grandes agglomérations urbaines sont des zones « sans transmission ». *Plasmodium falciparum* est en cause dans près de 90% des accès palustres (15).

I.2.2. Infection

Les *Plasmodium* spp. font partie du groupe des hémospories, parasites intracellulaires obligatoires, nécessitant un hôte intermédiaire vertébré et un hôte définitif qui est généralement un insecte piqueur responsable de la transmission.

1.2.2.1. Cycle de *Plasmodium falciparum*

Le cycle de *Plasmodium* comporte une phase sexuée qui se déroule chez l'insecte vecteur, et une phase asexuée observée chez l'hôte intermédiaire vertébré.

L'homme est infecté lors d'une piqûre d'anophèle femelle - injection du parasite dans la circulation sanguine sous la forme de sporozoïte. Migration ensuite vers le foie où les sporozoïtes pénètrent dans les hépatocytes donnant naissance à des dizaines de milliers de mérozoïtes après multiplication.

L'éclatement des cellules du foie libère les parasites dans le sang leur permettant de pénétrer dans les érythrocytes et de s'y multiplier. Le cycle se poursuit avec l'éclatement des globules rouges et la libération des mérozoïtes capables d'infecter de nouveaux globules rouges.

Des gamétocytes, cellules sexuées mâles et femelles, peuvent parallèlement se former dans le sang du sujet infecté et se faire ingérer lors d'un repas sanguin du vecteur. Maturation et transformation ensuite des gamétocytes en gamètes puis fécondation qui engendre un zygote capable de migrer vers les glandes salivaires du moustique pour se différencier en sporozoïtes. Un nouveau cycle peut alors commencer.

1.2.2.2. Epidémiologie de la transmission

Les modes de transmission du paludisme sont multiples à savoir la transmission par la piqûre de l'anophèle femelle infectée, par la transmission mère-enfant au cours de la grossesse, par injection lors des transfusions sanguines ou encore transmission lors des greffes (16).

La présence d'eau stagnante est nécessaire pour la pullulation des vecteurs (gîtes larvaires). Les repas sanguins et une température minimale constante sont également requis pour la multiplication sexuée de *Plasmodium* chez le moustique maintenant la transmission de la maladie.

Les vecteurs responsables de la transmission du paludisme sont des moustiques femelles hématophages du genre *Anopheles* présentant un pic d'activité entre 23 heures et 6 heures du matin. La reproduction de ces vecteurs exige « sang, eau et chaleur ». En effet, les anophèles se développent entre 20 et 30°C et vivent jusqu'à 30 jours. En Afrique, les principaux vecteurs pour l'homme sont : *Anopheles gambiae sensu stricto*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus*, *Anopheles nili* et *Anopheles moucheti*.

I.2.2.3. Manifestations cliniques

Après une piqûre infectante, une période prépatente asymptomatique de 6 à 15 jours est observée. L'accès palustre est généralement précédé de céphalée, de fatigue, de vomissements et de diarrhées. Une première phase de sensation de froid intense est suivie d'une montée de température au-dessus de 40°C, accompagnée de vomissements, de convulsions et de chutes de tension artérielle. Le malade entre ensuite dans une phase de sudation. Le cycle des fièvres dépend de l'espèce de parasite impliquée, les fièvres « tierces » sont observées toutes les 48 heures pour *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* alors que *Plasmodium malariae* provoque des fièvres « quartes » dont la périodicité est de 72 heures. L'accès palustre simple ne possède aucune manifestation clinique spécifique mais présente un tableau clinique grippal, d'où parfois la difficulté d'établir le diagnostic du paludisme. L'accès palustre grave (avec complications), toujours associé à *Plasmodium falciparum*, est un accès pernicieux du paludisme comprenant au moins un des critères majeurs suivants : neuropaludisme, insuffisance rénale aiguë, œdème pulmonaire lésionnel ou syndrome de détresse respiratoire aiguë, état de choc, syndrome hémorragique clinique ou coagulation intra-vasculaire disséminée, convulsion généralisée répétée, anémie grave, hypoglycémie ou hémoglobinurie macroscopique.

1.2.2.4. Diagnostic biologique du paludisme

I.2.2.4.1. Diagnostic direct

Le diagnostic direct qui met en évidence les parasites, leurs composants ou leurs produits peut être réalisé par plusieurs techniques.

Le diagnostic par *microscopie* (goutte épaisse et frottis mince) est le même quelle que soit l'espèce plasmodiale. La coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange appelée QBC (Quantitative Buffy Coat) est un test rapide mais ne permet pas le diagnostic d'espèce. Les techniques immunologiques comme l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ou l'IFI (immunofluorescence indirecte) recherchent les antigènes de *Plasmodium* circulants grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Les outils de biologie moléculaire permettent d'établir un diagnostic direct très sensible, complexe et cher par la PCR (Polymerase Chain Reaction) (voir page 21).

I.2.2.4.2. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect consiste en la recherche des anticorps sériques. Plusieurs techniques complexes et onéreuses existent en raison du délai d'apparition, de la persistance des anticorps et des réactions croisées potentielles. Le diagnostic indirect n'est donc pas idéal pour une démarche purement diagnostique mais reste utile lors de parasitémie nulle ou de fièvre d'origine inconnue, une prise d'antipaludique préalable à la démarche diagnostique ou encore lors d'enquêtes épidémiologiques.

I.2.2.5. Thérapie et prophylaxie du paludisme

La prise en charge rapide d'un cas de paludisme prévient l'apparition de complications et permet d'éviter la majorité des décès. Deux types de traitement existent actuellement et dépendent de la gravité de la maladie, soit les schizonticides avec les amino-4-quinoléines, les combinaisons sulfadoxine-pyriméthamine, l'artémisinine, la méfloquine et la doxycycline, soit les gamétocytocides comme l'artémisinine et les amino-8-quinoléines. Les meilleurs traitements actuellement disponibles sont les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine, notamment pour le traitement du paludisme à *P. falciparum*.

Pour un sujet non-immunisé, le paludisme reste une maladie potentiellement mortelle pour laquelle aucun vaccin n'est commercialisé. L'OMS recommande le traitement rapide de tous les épisodes cliniques, l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée, le traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes avec la sulfadoxine-pyriméthamine dans les zones à forte transmission, ainsi que les pulvérisations d'insecticide à effet rémanent à l'intérieur des habitations.

I.2.3. Paludisme des primates non-humains

Le genre *Plasmodium* présente un degré de spécificité d'hôte assez peu élevé et de degrés différents de pathogénicité. Le paludisme est considérablement fréquent dans le règne animal et à plus forte raison chez les primates non-humains (PNH) (17).

Les espèces plasmodiales affectant les animaux peuvent être responsables ou non de maladies chez leurs hôtes. L'inventaire des espèces est encore à compléter, en particulier dans certains groupes d'animaux comme les lémuriers (18).

I.2.3.1. Cycle du *Plasmodium* chez les primates

Le cycle évolutif de plasmodies qui infectent les PNH est le même que celui des plasmodies humaines : passage de sporozoïtes de l'anophèle à l'hôte, développement dans le foie, invasion du sang par les mérozoïtes, transformation en gamétocytes et ingestion de ces derniers par le moustique.

P. ovale, *P. cynomolgi*, *P. simiovale* et *P. fieldi* produisent des stades hépatiques latents, appelés hypnozoïtes, responsables de rechutes. Les parasites des primates présentent généralement une périodicité tierce (19) comme toutes les espèces de *Plasmodium* africaines à l'exception de *P. rhodaini* qui, comme *P. malariae*, présente une périodicité quarte. En Amérique par contre, les cycles sont plutôt quarts (*P. brasilianum*) et parfois tierces (*P. simium*). En Asie, toutes les formes co-existent avec un cycle quotidien pour *P. knowlesi*, quarte pour *P. inui* alors que les autres espèces présentent une périodicité tierce.

Mise à part leur description morphologique, les travaux sur le *Plasmodium* des lémuriens sont encore limités. *Plasmodium girardi* et *Plasmodium lemuris* présentent une morphologie distincte pour chacun des stades de développement dans le sang de l'animal infecté (20).

I.2.3.2. Manifestation clinique chez les primates

Contrairement aux manifestations cliniques humaines, les infections rencontrées chez les simiens sont inapparentes ou se manifestent par de très légers troubles. La parasitémie reste faible chez les hôtes naturels avec une pathologie généralement atténuée spontanément résolutive. La maladie est de courte durée avec une guérison spontanée et de rares rechutes. *Plasmodium schwetzi* ne provoque par exemple, qu'une légère infection chez le chimpanzé, avec quelquefois un peu de fièvre (19). Une exception toutefois a été observée pour *P. brasilianum*, l'agent le plus commun du paludisme chez le saïmiri, qui se manifeste par une anémie hémolytique bénigne, de l'apathie et une splénomégalie (21).

Les symptômes peuvent être plus marqués lorsque l'animal est immunodéprimé ou splénectomisé (22) ou lorsque le *Plasmodium* est inoculé expérimentalement chez un primate qui n'est pas l'hôte naturel (21). *Plasmodium knowlesi* peut provoquer une infection mortelle chez le singe rhésus et le babouin alors qu'il est asymptomatique chez le macaque crabier (23).

Dans ces cas-là, l'autopsie révèle comme principales lésions une couleur grisâtre des poumons, du foie et de la rate, une anémie, une hémosidérose, des thromboses fréquentes avec une coagulation intravasculaire et une accumulation d'érythrocytes infectés, la présence de macrophages remplis de pigment plasmodial dans les tissus, un œdème pulmonaire et/ou cérébral (24).

Aucune documentation n'est disponible à ce jour concernant l'étude clinique du paludisme chez les prosimiens, y compris donc les lémurien.

I.2.3.3. Diagnostic du paludisme chez les primates

Le diagnostic est essentiellement direct par microscopie. La différenciation des espèces de plasmodies qui infectent les PNH est fondée sur les caractéristiques morphologiques des parasites aux divers stades de développement. Le diagnostic d'espèce plasmodiale de PNH reste délicat en raison de la faible parasitémie des infections naturelles et des caractéristiques d'espèce peu marquées comme *P. brasilianum* et *P. simium* qui présentent des morphologies similaires respectivement à *P. malariae* et *P. vivax* (23).

La sérologie trouve ici toute sa place pour confirmer l'infection palustre. Elle s'applique particulièrement aux chimpanzés mais comporte les mêmes inconvénients que chez les humains avec un long délai d'apparition des anticorps (23). Les tests de recherche d'antigènes spécifiques utilisés pour les tests humains peuvent également être positifs pour *P. cynomolgi*, *P. coatneyi* et *P. knowlesi* (24).

L'écologie de la plupart des primates présente toutes les conditions favorables au maintien du paludisme. En effet, la vie en groupe dans la forêt et la latence de la maladie chez les primates constituent des facteurs attractifs pour les moustiques et permet aux petites populations de PNH de maintenir le *Plasmodium*. Avec une densité de population qui n'est que de deux individus par km², l'orang-outan abrite pourtant deux espèces plasmodiales (25).

Pour définir le rôle exact des PNH dans le maintien du paludisme, deux éléments sont encore à déployer : les données concernant leur statut sanitaire et le développement d'outils permettant un diagnostic d'espèces plasmodiales plus sensible et plus spécifique. L'utilisation de la PCR représente ainsi un élément décisif dans l'étude des interactions entre les parasites des PNH et humains.

I.2.3.4. Thérapie du paludisme chez les primates

La plupart des paludismes de PNH peuvent être traités à la chloroquine. Le goût très amer des amino-4-quinolines réduit leur usage aux voies intramusculaires ou aux gavages par sonde. La chloroquine agit sur les stades asexués sanguins mais ne présente aucun effet sur les stades hépatiques ni sur les gamétocytes. La méfloquine est utilisable en cas de résistance à la chloroquine (20).

Les stades hépatiques sont traités à la primaquine. Ceci est particulièrement important lors d'infection naturelle ou d'inoculation expérimentale par des sporozoïtes de *P. cynomolgi*, *P. simiovale* ou de *P. fieldi* qui possèdent des hypnozoïtes. En raison de leur toxicité lorsqu'elles sont administrées ensemble, la chloroquine et la primaquine doivent être administrées séparément (20).

L'association sulfadoxine-pyriméthamine est pratique et permet d'obtenir une bonne clairance sanguine avec une seule injection.

I.3. Filariose

Les filarioses sont des maladies parasitaires tropicales pouvant être lymphatiques (appelées aussi éléphantiasis) ou cutanéomuqueuses (onchocercose, dracunculose et loase) en fonction du tropisme des nématodes vivipares appelés filaires qui les provoquent.

La symptomatologie, l'hôte intermédiaire et la distribution géographique sont spécifiques à chacun des types de filariose (26).

I.3.1. Filariose lymphatique

Le risque d'infection à la filariose lymphatique concerne la population de 72 pays soit environ 1,3 milliards de personnes parmi lesquelles 120 millions sont infectées et 40 millions handicapées. La majorité des personnes infectées se trouvent en Asie (65%), particulièrement en Inde, en Afrique (30%) et les cas restants sont répartis dans le Pacifique, en Amérique et en Méditerranée orientale (2).

L'archipel des Comores dans l'océan Indien héberge un foyer présentant des taux de prévalence parmi les plus forts enregistrés. A Madagascar, la filariose lymphatique est également présente bien que distribuée de manière hétérogène. Une forte prévalence est retrouvée sur la côte Est entre Tolagnaro et Fénérive et au Nord, alors que la prévalence est nulle sur les Hautes Terres (27).

Chez l'homme, 3 espèces de filaires sont responsables de la filariose lymphatique dont la plus fréquente est *Wuchereria bancrofti* rencontrée dans toute la zone intertropicale. Les deux autres espèces sont *Brugia malayi*, exclusivement asiatique, et *Brugia timori* qui se retrouve dans les îles du Sud- Est de l'Indonésie en particulier dans le Timor (Figure 2).

Une étude menée à Madagascar a mis en évidence *Wuchereria bancrofti* var. *vauceli* chez l'homme bien que les adultes n'ont encore jamais été observés (28).

Les parasites responsables de la filariose lymphatique n'ont pas tous les mêmes hôtes intermédiaires. Bien que les trois espèces se retrouvent chez l'homme, *B. malayi* et *B. timori* peuvent également se retrouver chez les animaux domestiques.

La transmission de la filariose lymphatique se fait par la piqûre infestante de moustiques femelles du genre *Culex sp*, *Aedes sp*, *Mansonia sp*, *Anopheles sp*.

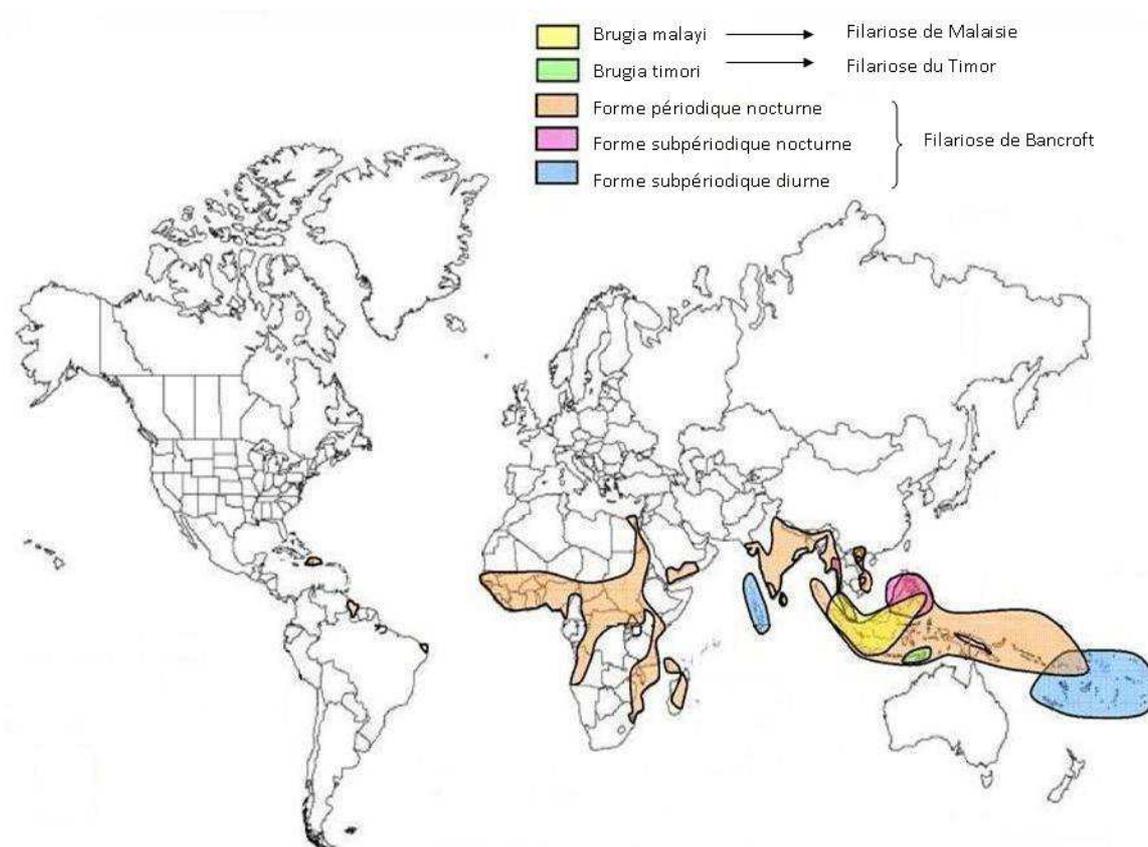


Figure 2: Répartition mondiale des filarioses lymphatiques (29)

I.3.1.1. Cycle des filaires responsables de la filariose lymphatique

Le cycle de vie de chaque filaire passe par deux stades de développement distincts appelés macrofilarie pour le stade adulte et microfilarie pour le stade larvaire. Un hôte intermédiaire est nécessaire pour assurer la maturation de la larve L1 jusqu'au stade de larve infestante L3.

Les filaires mâles et femelles obstruent les gros troncs chylifères profonds et les ganglions lymphatiques en formant des amas de couples pelotonnés. Les femelles vivipares fécondées émettent dans la circulation sanguine les microfilaries (stade L1) qui rejoignent les vaisseaux superficiels. Aspirées lors du repas sanguin du vecteur, les microfilaries atteignent l'estomac du moustique, traversent la paroi intestinale et rejoignent la cavité du corps. Une fois dans les muscles thoraciques, les microfilaries

muent 2 fois pour atteindre le stade L3. Les larves infectantes L3 migrent alors vers la trompe du vecteur et pénètrent dans le corps humain lors de la piqûre du repas de sang du moustique. Le cycle recommence avec la migration des microfilaries vers le système lymphatique, deviennent adultes et produisent à leur tour de nouvelles microfilaries.

I.3.1.2. Tableau clinique de la filariose lymphatique

Le tableau clinique de la filariose lymphatique est dû aux filaires et aux infections bactériennes secondaires. Certaines personnes porteuses de filaires ne déclarent aucun symptôme pendant plusieurs années et sont appelées porteurs sains. La seule preuve de l'infection pour ces cas asymptomatiques est la détection de microfilaries dans le sang.

Pour la forme symptomatique, la phase d'invasion, due à la migration des microfilaries, se manifeste par de la fièvre, des arthralgies et des manifestations respiratoires asthmatiformes. La phase d'état liée aux formes adultes comprend deux stades de manifestations cliniques bien distinctes, les manifestations aiguës et les manifestations chroniques ou tardives.

Les manifestations aiguës correspondent à diverses inflammations : lymphangites aiguës des membres inférieurs, inflammations génitales aiguës (orchépididymite, lymphangite du sein), adénites aiguës de siège inguinal ou lymphangites aiguës profondes.

Les manifestations chroniques ou tardives se manifestent 10 à 15 ans après la première crise qui passe souvent inaperçue et sont dues à l'obstruction des vaisseaux lymphatiques par les macrofilaries. Les signes chroniques se manifestent par une hydrocèle, un lymphœdème avec ruptures externes (racine des membres, scrotum, grandes lèvres) et internes (chylolymphurie) ou l'éléphantiasis. Les infections microbiennes secondaires causent des dermatolymphangioadénites (DLAA) dont dépend l'évolution péjorative de la maladie.

I.3.1.3. Diagnostic biologique de la filariose lymphatique

L'hyperéosinophilie sanguine liée à la filariose lymphatique conduit à un diagnostic d'orientation. Le diagnostic direct réalisé entre 22h et 4h pour les espèces à périodicité nocturne et vers 13 h pour les espèces sub-périodiques diurnes met en évidence les microfilaries par examen direct des frottis sanguins. Les microfilaries

peuvent également être recherchées dans les liquides d'épanchement, l'urine chyleuse, le liquide d'hydrocèle ou de ponction ganglionnaire.

La non-détection de microfilaries par microscopie chez de nombreux filariens a conduit à la mise au point de tests immunologiques (IFI ou ELISA) servant le diagnostic sérologique. Le diagnostic moléculaire permet de détecter les parasites dans les échantillons de sang, d'hydrocèle et d'urine grâce à la PCR (voir page 21).

I.3.1.4. Traitement et prise en charge des incapacités liées à la filariose

Le traitement de la filariose lymphatique repose sur 3 microfilaricides (pas de destruction des macrofilaires) que sont l'ivermectine, l'albendazole et la diéthylcarbamazine mais qui provoque régulièrement des réactions allergiques.

Le seul traitement disponible pour éliminer les macrofilaires est la suramine, administrée par injection intraveineuse, particulièrement toxique nécessitant un suivi médical strict.

L'utilisation de la doxycycline permet également d'agir sur les macrofilaires. La prescription d'antibiotique repose sur l'existence d'une bactérie endosymbiotique *Wolbachia* présente chez *W. bancrofti* jouant un rôle dans le développement du nématode, dans sa vitalité et sa fertilité.

Une numération des microfilaries doit systématiquement être effectuée avant toute thérapie. En cas de forte microfilarémie ou de manifestations allergiques, le traitement peut être administré en association avec des corticoïdes et des antihistaminiques.

La prise en charge du lymphœdème consiste en un dépistage précoce, des soins cutanés, la prévention de lésions et des exercices simples pour favoriser le drainage lymphatique. Un traitement à base d'antibiotique (pénicilline V, érythromycine) et l'observation de quelques règles d'hygiène pour assurer le bon état cutané des jambes et des pieds des filariens permettent d'éviter les DLAA. La chirurgie de l'hydrocèle, le traitement de l'éléphantiasis et des complications urinaires sont couramment effectués.

I.3.1.5. Prévention et élimination

La protection contre les piqûres de moustique doit être encouragée par l'emploi des moustiquaires imprégnées d'insecticide de longue durée et de répulsifs. De plus, la mise en œuvre de la lutte anti-vectorielle (pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide, suppression des eaux stagnantes et élimination des gîtes larvaires potentiels) permet de

réduire les contacts homme-vecteur, l'incidence de la maladie, et de minimiser les coûts induits par la filariose lymphatique sur le plan économique.

Pour interrompre la transmission, la distribution médicamenteuse de masse consistant en l'administration annuelle d'une dose unique d'albendazole combinée avec de la diéthylcarbamazine ou de l'ivermectine permet de traiter toutes les populations exposées pendant 4 à 6 ans.

I.3.2. Filariose lymphatique chez les animaux

Brugia malayi, filaire parasitaire, a été retrouvée chez plusieurs animaux domestiques et sauvages en Malaisie (30). Bien que le chat soit l'hôte naturel dans le Sud-Est de l'Asie, *Brugia malayi* parasite également les ganglions et les vaisseaux lymphatiques des chiens et des primates. L'infestation chez les carnivores domestiques est probablement sous-diagnostiquée.

Le cycle des filaires lymphatiques chez les animaux n'a pas encore précisément été décrit mais une lymphangite avec une lymphadénopathie peut se développer en cas de maladie chez le chien (31). Les infections du chat à *Brugia pahangi* pouvant être facilement reproduites dans les conditions de laboratoire en font un modèle pour les filarioses lymphatiques humaines (32). Les manifestations cliniques observées sur les animaux infestés au laboratoire sont une perturbation de la circulation lymphatique avec œdème des pattes postérieures (23).

I.3.3. Filariose lymphatique chez les primates

Peu d'études ont été menées sur les microfilaires de primates mais une microfilarie voisine de *W. bancrofti* a été décrite chez un potto au Congo (33).

A Madagascar, une étude menée sur les hémoparasites des lémuriens a mis en évidence une identité entre les microfilaires retrouvées chez les lémuriens et les microfilaires retrouvées chez l'homme. Les résultats ont été obtenus après examen microscopique, technique de référence de cette époque, se basant sur la description et la comparaison morphologique des microfilaires observées (6).

Une telle hypothèse mérite d'être validée par des techniques modernes de biologie moléculaire pour confirmer les résultats obtenus par examen microscopique. Aucune étude n'a cependant approfondi cette recherche même si des filaires ont récemment été mises en évidence chez les lémuriens (34).

La caractérisation des nématodes retrouvés chez les lémuriens devient nécessaire pour annoncer la présence d'une nouvelle espèce de filaires chez les lémuriens ou pour confirmer la présence de *W. bancrofti* chez les lémuriens, ouvrant la réflexion autour du maintien de la population de filaires responsables de la filariose lymphatique à Madagascar.

I.4. Co-infection

Plusieurs espèces de *Plasmodium* peuvent se retrouver simultanément chez un même individu. L'infection palustre mixte par plus d'une espèce de *Plasmodium* semble pouvoir moduler la réponse immunitaire de l'hôte. Dans les situations où *P. vivax* et *P. falciparum* sont co-endémiques, la gravité du paludisme à *P. falciparum* peut être réduite. De même, les individus infectés par *P. malariae* et *P. falciparum* semblent moins souffrir des effets de cette infection que les individus infectés par *P. falciparum* seul (35).

La répartition géographique des agents pathogènes de la filariose lymphatique favorise la co-infection dans certaines régions et chez un même sujet. Des cas de coexistence de *Brugia malayi* et *Wuchereria bancrofti* ont été rapportés (36, 37).

Des études épidémiologiques dans le Sud-Est asiatique et en Papouasie-Nouvelle Guinée ont mis en évidence un parasitisme concomitant entre le paludisme et la filariose lymphatique dans les communautés humaines (38). Les distributions géographiques de la filariose lymphatique et du paludisme se superposent d'ailleurs dans de vastes territoires d'Asie, d'Amérique et d'Afrique comme à Madagascar (3). De plus, la répartition des anophèles à travers le monde dépasse largement celle du paludisme.

I.5. Zoonoses

Les dix premières épidémies humaines de tous les temps sont la grippe, la variole, la peste, le choléra, la tuberculose, le paludisme, le sida, la fièvre jaune, la polio et la rougeole (39). Plusieurs de ces maladies peuvent infecter et être hébergées par les PNH mais seules la peste et la tuberculose sont généralement considérées comme des zoonoses au sens strict du terme, bien que le débat soit ouvert autour de la grippe. Les lémuriens en captivité s'avèrent réceptifs à la tuberculose, aussi bien au bacille humain que bovin (40), même si cette maladie n'est qu'exceptionnellement retrouvée chez les lémuriens en liberté.

Une étude épidémiologique couplée chez l'homme et les PNH a montré le possible passage des *Plasmodium* de l'un à l'autre (41) et certains scientifiques avancent que les PNH pourraient jouer le rôle de réservoirs pour le paludisme (42). Sept espèces de *Plasmodium* ont été transmises expérimentalement des PNH à l'homme : *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. brasilianum*, *P. simium*, *P. eylesi*, *P. schwetzi* et *P. inui*. Certaines espèces comme *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* et *P. simium* ont été identifiées chez l'homme, bien que rarement, dans des infections naturelles ou accidentelles. Les PNH peuvent eux aussi être infectés par des souches plasmodiales humaines, naturelles ou adaptées : les singes *Aotus* et *Saimiri* par *P. falciparum* ou *P. vivax* et les chimpanzés par *P. ovale* (23).

La souche subpériodique de *Brugia malayi* est la principale responsable des filarioses lymphatiques zoonotiques. Cette forme subpériodique a un nombre maximal de microfilaires pendant la nuit, qui persistent dans la journée. Les réservoirs de la brugiose subpériodique sont les singes, les chiens, les chats et les carnivores sauvages. Cette filariose de Malaisie est endémique dans le sud de la Thaïlande où le chat domestique est le principal hôte réservoir. L'importance relative des animaux domestiques et sauvages en tant que réservoirs du parasite n'est pas connue, mais il est probable que les animaux domestiques soient plus souvent une source d'infestation pour l'homme (23). Une étude a souligné le rôle possible des chiens dans la transmission de la filariose humaine en raison de la forte prévalence de *Brugia malayi* chez les chiens (43). Les conséquences des infections zoonotiques et de leur impact sur le programme de lutte contre la filariose lymphatique seraient alors à discuter.

Une autre étude malaise présente 5 patients référés dans un centre médical avec des manifestations cliniques et un diagnostic sérologique positif à la filariose lymphatique. Le diagnostic moléculaire par PCR des échantillons sanguins révèle l'infection de 2 des patients par *Brugia pahangi*, filaire animal encore jamais reconnue pour provoquer une maladie humaine en milieu naturel. La présence de *Brugia pahangi* sur les chats domestiques, capturés dans la banlieue de résidence de l'un des patients, a également été confirmée (44).

Les données recueillies pour *Wuchereria bancrofti*, concernant les animaux et les zoonoses sont très limitées. *Species inquirenda* jusqu'à ce jour, aucune preuve scientifique ne confirme que la filariose de Bancroft soit une zoonose.

I.6. Conservation

La conservation de la nature consiste en la protection des populations d'espèces animales et végétales, ainsi que la conservation de l'intégrité écologique de leurs habitats naturels ou de substitution.

La protection d'une espèce rare ou d'une population d'individus menacés implique la protection ou la restauration de leurs conditions de vie ou de survie. Cette protection peut également être appliquée à la conservation de la diversité génétique grâce à une protection dans le milieu naturel. Certains zoos participent à des programmes de protection d'espèces animales avec une éventuelle réintroduction dans le milieu naturel d'origine à l'échelle d'un territoire, d'une réserve naturelle, d'un parc naturel régional, d'un parc national ou transnational avec des conditions.

La délocalisation est un cas particulier de conservation avec le mouvement intentionnel ou non-intentionnel des organismes vivants en liberté d'une région à une autre, au sein et en-dehors de leur aire de répartition naturelle comprenant l'introduction, la réintroduction et le repeuplement (45). La délocalisation est ainsi un outil de conservation d'espèces (46). Des impacts sur la santé sont potentiellement associés à la délocalisation des animaux sauvages. Une évaluation formelle de ces risques devrait systématiquement être effectuée avant chaque transfert et être intégrée dans les décisions de validation/non-validation du transfert avec modification du protocole de transfert si nécessaire afin de réduire les risques de santé inhérents à la délocalisation (47).

I.7. PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) est une méthode découverte en 1983 et mise au point par Mullis en 1985 basée sur une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en très grande quantité un fragment d'ADN particulier, sous représenté au départ, parmi des millions d'autres fragments (48).

I.7.1. Principe

La technique de PCR met à profit la connaissance fondamentale sur la structure de l'ADN. Les deux propriétés principales exploitées sont la thermolabilité des liaisons entre les bases de chaque brin, et la complémentarité dans l'enchaînement orienté des bases. Lorsque les liaisons entre les bases sont rompues par la chaleur, chacun des deux brins est capable de se réassocier en reproduisant l'appariement de départ ou avec toute autre structure présentant une séquence complémentaire. La technique repose sur l'action d'une enzyme naturelle, l'ADN polymérase, capable de synthétiser le brin d'une séquence à partir d'une amorce.

I.7.2. Réaction

La PCR est une technique entièrement automatisée dans un thermocycleur où la température peut varier très rapidement et très précisément de 0°C à 100°C. Suite de cycles qui se répètent en boucle, compris entre 20 et 40, la PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN non-déTECTABLE jusqu'à un seuil détectable. La réaction consiste à réutiliser le produit de chaque cycle comme matrice pour les cycles suivants. La séquence cible est donc doublée à chaque cycle donnant un taux d'amplification théorique de 2^n , n étant le nombre de cycles.

Un cycle de PCR est composé de trois étapes : une séparation des brins d'ADN appelée dénaturation, une hybridation des amorces et une élongation par une ADN polymérase (Figure 3).

Au cours de la dénaturation, la température dans le tube est élevée à 94-95°C contraignant l'ADN à perdre sa structure en double hélice. Les liaisons hydrogènes reliant les bases de chaque brin deviennent instables et l'ADN double brin se divise en ADN simple brin.

La température est ensuite abaissée à la température d'hybridation. L'hybridation comprend la reconnaissance et la fixation des amorces sur leurs séquences complémentaires au brin d'ADN matriciel en reformant des liaisons hydrogènes. Cette étape dure entre 2 à 60 secondes, le temps aux amorces de s'hybrider correctement.

Pendant la dernière étape qui est l'élongation, la température est fixée à 72°C correspondant à la température idéale d'activité de la *Taq polymérase*, extraite de *Thermophilus aquaticus*. Des nucléotides libres sont ajoutés aux amorces hybridées dans le sens 5'-3'. La durée de cette étape est calculée selon la longueur du segment à amplifier.

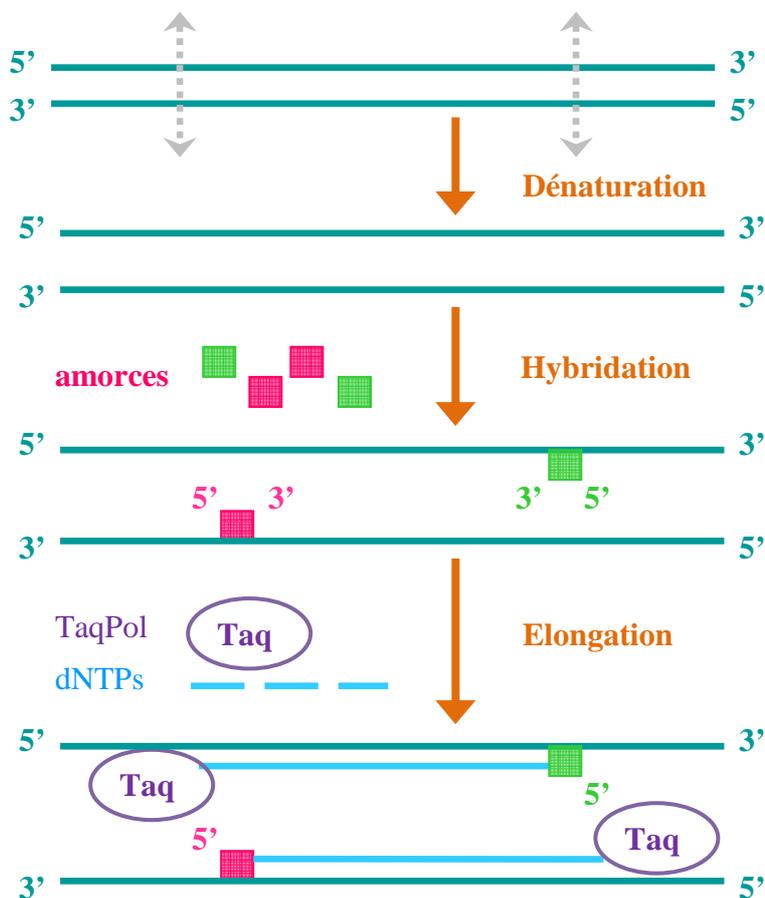


Figure 3: Déroulement d'un cycle PCR (48)

I.7.3. Exigences de la PCR

La technique de la PCR est contraignante, nécessitant un aménagement particulier de l'espace et du personnel technique formé permettant de limiter au maximum les risques de contamination des prélèvements et de manipulation des produits dangereux.

I.7.3.1. Aménagement de l'espace

La compartimentation de l'espace est primordiale pour la bonne exécution de la technique PCR permettant de contrôler le flux du matériel. La première étape se déroule en salle de préparation du mélange réactionnel ou mix. Une autre salle est utilisée pour extraire les prélèvements et les répartir dans le mix. La PCR et la révélation se déroulent dans une salle distincte.

I.7.3.2. Amorces

La sélection des amorces doit également être méticuleuse puisque la réussite de la technique PCR, sa spécificité et sa sensibilité dépendent de ce choix. Communément, les séquences des amorces utilisées proviennent des publications référencées.

I.7.4. Types de PCR

La technique PCR a considérablement évolué depuis sa découverte. Plusieurs types ont été développés permettant un plus large éventail d'applications principalement dans le domaine du diagnostic moléculaire.

La PCR « nichée » consiste en une succession de deux PCR avec deux lots d'amorces différents. Les échantillons d'ADN sont d'abord amplifiés afin d'augmenter le nombre de copies du fragment d'ADN cible. Puis, une seconde amplification est réalisée avec deux amorces positionnées de manière interne par rapport aux amorces utilisées au cours de la première amplification.

La PCR quantitative ou « PCR en temps réel » permet d'estimer le nombre de copies présentes de la séquence-cible d'ADN ou d'ARN.

Quant à la PCR dite « multiplex », elle désigne une mise au point autorisant, en une seule réaction, l'amplification de plusieurs segments d'ADN distincts.

I.7.4.1. PCR en temps réel

La PCR en temps réel (RT-PCR) est une technique d'amplification, développée en 1992, utilisant un fluorochrome intercalant comme le SYBR Green I (49). Basée sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent, l'émission mesurée est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant l'amplification.

La visualisation de l'amplification se fait ainsi en temps réel à chaque cycle de réaction.

I.7.4.2. SYBR Green I

Le SYBR Green I est une molécule pouvant s'intercaler au niveau des chaînes double brin d'ADN. Il sert de méthode alternative au bromure d'éthidium (BET) pour la détection d'ADN/ARN sur gel de polyacrylamide ou gel d'agarose. Il est également le principal marqueur utilisé pour l'amplification aspécifique de séquences en RT-PCR. La mesure de la fluorescence permet de suivre l'augmentation des produits amplifiés lors de l'étape d'hybridation et d'élongation.

La fluorescence émise augmente ainsi proportionnellement avec la quantité de produits amplifiés. La fluorescence devient nulle lors de la dénaturation de l'ADN, puis est à nouveau enregistrée et mesurée à la fin de chaque étape d'élongation par un système de lecture intégré à l'appareil (Figure 4).

La vérification de l'amplification se fait par comparaison de la courbe de fusion correspondant à la variation de la fluorescence en fonction de la température, mais la fluorescence pouvant provenir d'un produit non spécifique ; seul le séquençage après migration des amplicons sur gel permet la confirmation.

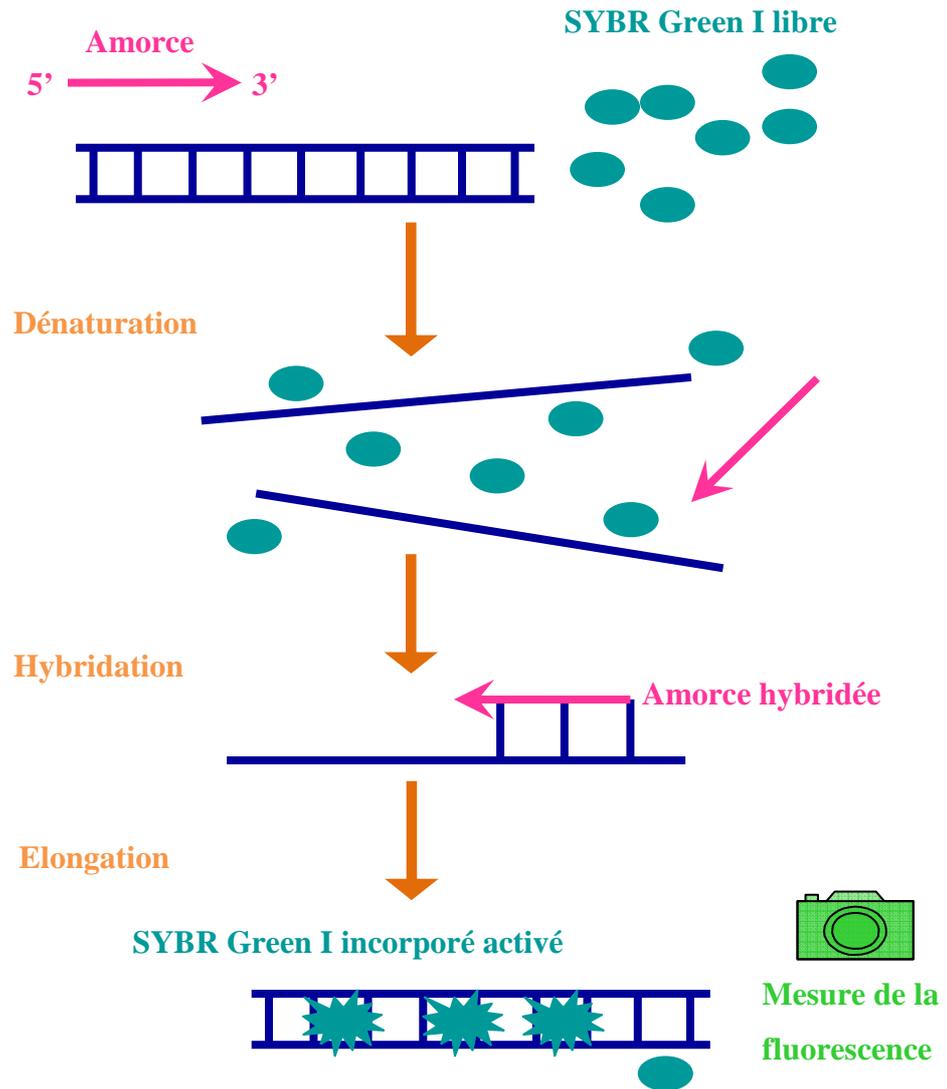


Figure 4: Principe de marquage avec le SYBR Green I (50, 51)

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Méthodes

II.1.1. Cadre et type d'étude

L'étude expérimentale prospective a été réalisée dans le laboratoire de l'Unité de Recherche sur le Paludisme (URP) de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Les échantillons de sang ont été prélevés sur 5 lémurien (2 *Propithecus conoratus*, 2 *Lemur catta*, 1 *Varecia variegata*) élevés en semi-liberté au Lemurs' Park, une réserve privée de lémurien située à 25 km de la ville d'Antananarivo dans la Commune d'Ambatomirahavavy - District d'Imerintsiasika.

II.1.2. Durée d'étude

Les mises au point de PCR au laboratoire se sont déroulées du mois de mars 2010 au mois d'août 2010.

II.1.3. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette étude est de mettre au point les méthodes de diagnostic par biologie moléculaire pour le dépistage de l'infection du paludisme et de la filariose lymphatique chez les lémurien. Aussi, ce travail évalue la performance de la PCR par rapport aux résultats obtenus par la microscopie (goutte épaisse / frottis mince) et par le test de diagnostic rapide pour détecter les hémoparasitaires responsables de ces maladies chez les prosimiens de Madagascar.

II.1.4. Critères d'inclusion et d'exclusion

Le nombre de 5 lémurien était fixé par l'arrivée de ces 5 lémurien au Lemurs'Park en provenance de région endémique à la filariose lymphatique à Madagascar n'ayant encore subi aucun traitement d'aucune sorte ni vermifugés. Le critère d'exclusion était donc le traitement de ces animaux contre les helminthes.

II.1.5. Prélèvements sanguins des lémurien

La capture au filet et la contention de l'animal sont assurées par les soigneurs.

Le sang total a été prélevé dans des tubes collecteurs avec EDTA (anticoagulant) au niveau de l'aîne, au hasard de la veine ou de l'artère fémorale, et collecté en soirée (17 heures) avec une quantité minimale de 2 ml.

Les prélèvements ont été réalisés avec du matériel stérile, neuf et à usage unique et après désinfection de la zone de ponction. Chaque prélèvement a été identifié.

II.1.6. Transport des échantillons

Le transport des échantillons sanguins vers le laboratoire a été effectué rapidement (moins de 24 h) au cours duquel la température des échantillons a été constante à 4°C à l'aide d'une glacière contenant des plaques eutectiques.

A la réception, les informations concernant l'hémolyse et le volume recueilli sont notifiées.

II.1.7. Stockage des prélèvements

Les prélèvements stockés de façon rationnelle dans des boîtes étiquetées et étanches ont été conservés et rangés dans des réfrigérateurs et des congélateurs. Ainsi, 1ml de sang total est récupéré dans des cryotubes de 2 ml, le solde centrifugé afin que le culot et le sérum puissent être conservés séparément. Tous les aliquots ont été conservés à -20°C.

II.1.8. Traçabilité des prélèvements

La traçabilité est une procédure qui consiste à garder une trace écrite ou informatique des différentes étapes de manipulation des prélèvements. C'est une preuve d'un bon déroulement des opérations depuis la prise des prélèvements jusqu'à l'analyse des résultats assurée par l'étiquetage des prélèvements et la constitution d'un dossier de traçabilité des étapes de manipulation. La traçabilité est assurée par l'archivage des données rassemblées.

II.1.9. Microscopie optique

Le diagnostic des hémoparasites comme le paludisme ou la filariose lymphatique repose sur l'examen d'une goutte de sang – goutte épaisse et frottis mince. Les lames de références de l'OMS ont servi de support d'entraînement pour l'identification des 4 espèces de *Plasmodium* selon leur stade de développement, la reconnaissance et l'observation des microfilaires de *Wuchereria bancrofti*, et le calcul de la charge parasitaire. La recherche des parasites se fait à la magnitude 40 pour la filariose lymphatique et à magnitude 100, en immersion à l'huile pour les parasites responsables du paludisme.

II.1.9.1. Confection de la goutte épaisse et du frottis mince

Une quantité de sang définie, soit 10 µl, est déposée sur une lame puis régulièrement étalée en mouvement circulaire pour obtenir la goutte épaisse (Photo 2).

Une autre quantité de sang est déposée sur une lame d'étalement. Le frottis mince est réalisé par le glissement régulier d'une autre lame dont le bord a touché la goutte de sang puis l'a répartie (Photo 2).



Photo 2 : Goutte épaisse et frottis mince sur lames (Source : URP)

II.1.9.2. Séchage et fixation

Les lames ont été séchées à température ambiante en position horizontale pendant plusieurs heures en évitant les rayons solaires, les insectes et les poussières. Seuls les frottis minces ont été fixés au méthanol.

II.1.9.3. Coloration

Les étapes de coloration se sont déroulées au laboratoire avec une solution de Giemsa prête à l'emploi. Les lames ont été incubées dans la coloration pendant 10 min, à température ambiante, avant d'être délicatement rincées à l'eau courante, en filet fin. Le séchage des lames colorées s'est également fait à température ambiante.

II.1.10. Test de diagnostic rapide

Le test de diagnostic rapide ou TDR permet en quelques minutes de confirmer la suspicion d'une maladie. Constitué d'une cassette contenant une bandelette de nitrocellulose traitée, le TDR est basé sur la spécificité des anticorps monoclonaux pour les antigènes-cibles fixés à des endroits définis où les complexes antigènes-anticorps vont migrer par capillarité.

Le principe du test repose sur l'immunochromatographie.

L'échantillon à tester est déposé à l'extrémité de la membrane de nitrocellulose avec du tampon de lyse déposé dans le puits, facilitant la lyse des globules rouges et la migration de l'échantillon sur la bandelette réactive. Si l'antigène recherché est présent, il sera capturé en sandwich par l'anticorps marqué et fixé sur la membrane. Cette capture se traduit par l'apparition d'une ligne visible. Le TDR est validé lorsque la migration de l'excès de conjugué est immobilisé par un anticorps anti-lapin ou anti-souris entraînant l'apparition d'une ligne contrôle visible, après 15 minutes.

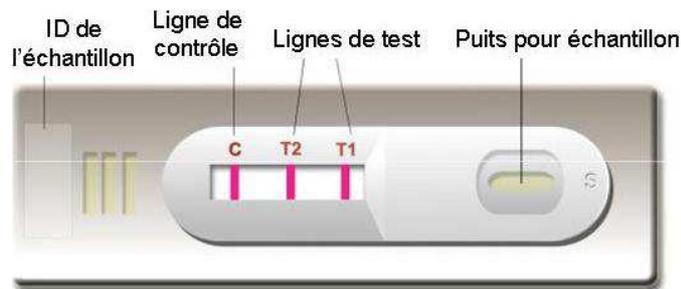


Figure 5 : Description schématique d'un TDR (52)

II.1.10.1. Dépistage de *Plasmodium spp* par TDR

Des tests prêts à l'emploi sur bandelette sont disponibles pour chacune des parasitoses. Le test *CareStart*TM (Access Bio, New Jersey) met en évidence la protéine *Histidin Rich Protein 2 (HRP2)* spécifique de *Plasmodium falciparum* et l'enzyme pan *pLDH (parasite Lactate Dehydrogenase)* commune à toutes les espèces plasmodiales.

II.1.10.2. Dépistage de *Wuchereria bancrofti* par TDR

Le TDR *Filariasis IgG/IgM Combo* (CTK Biotech, San Diego) utilise des antigènes recombinants pour la détection simultanée des IgG et des IgM à *Wuchereria bancrofti* et à *Brugia malayi*.

II.1.11. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN varie en fonction de la nature de l'échantillon, libérant l'ADN parasite des prélèvements sanguins (sang total, frottis) ou des gels d'agarose.

II.1.11.1. Extraction à partir du sang total

L'extraction d'ADN à partir du sang total a été réalisée avec le kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN) (Figure 6).

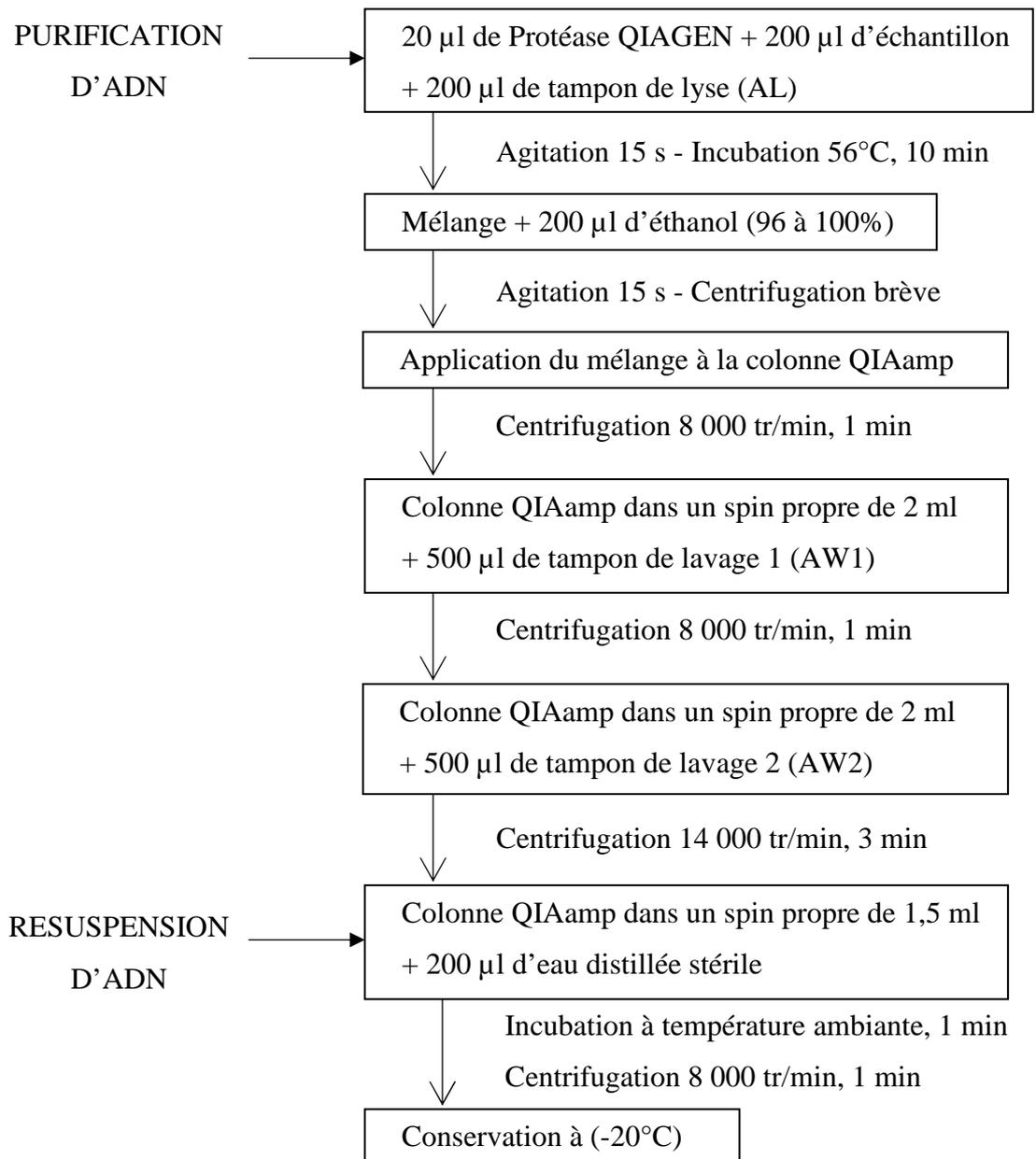


Figure 6 : Protocole d'extraction d'ADN à partir du sang total avec le « QIAamp DNA Blood Mini Kit »

Vingt microlitres de protéase (protéinase K), 200 µl de sang total et 200 µl de tampon de lyse (AL) sont mélangés dans un microtube, agités au vortex pendant 15 secondes puis incubés à 56°C pendant 10 minutes. Le microtube a été brièvement centrifugé pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle, avant d'ajouter 200 µl d'éthanol pur. Le mélange a encore été agité au vortex pendant 15 secondes et centrifugé brièvement de nouveau.

La colonne QIAamp comprenant une membrane de silice posée sur un tube collecteur de 2 ml, a été précautionneusement remplie avec le mélange puis centrifugée à 8000 tr/min pendant 1 minute. La colonne a été enlevée et placée dans un nouveau tube collecteur et le filtrat jeté. La colonne a été ouverte délicatement et 500 µl de tampon de lavage 1 (AW1) y sont ajoutés. Le bouchon a été refermé et la colonne re-centrifugée à 8 000 tr/min pendant 1 minute. La colonne a été placée dans un nouveau tube, le filtrat jeté avant d'ajouter 500 µl de tampon de lavage 2 (AW2) dans la colonne. Le bouchon a été refermé, la colonne centrifugée à 14 000 tr/min pendant 3 minutes. Le filtrat a été alors vidé et la centrifugation répétée afin d'éliminer toute trace de tampon AW2.

La colonne a finalement été placée dans un dernier microtube avant d'ajouter 200 µl d'eau distillée et de l'incuber à température ambiante pendant 1 minute. La dernière centrifugation à 8000 tr/min pendant 1 minute a permis de récupérer l'ADN extrait avant de le conserver à -20°C (Figure 6).

II.1.11.2. Extraction d'ADN à partir des lames souches de l'OMS positives en *Wuchereria bancrofti*

La technique d'extraction d'ADN à partir de lames est une méthode mise au point par l'Unité de Recherche sur le Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar sur la base d'un article (53) (Figure 7). L'ADN de microfilaires a été extrait des lames de référence de l'OMS.

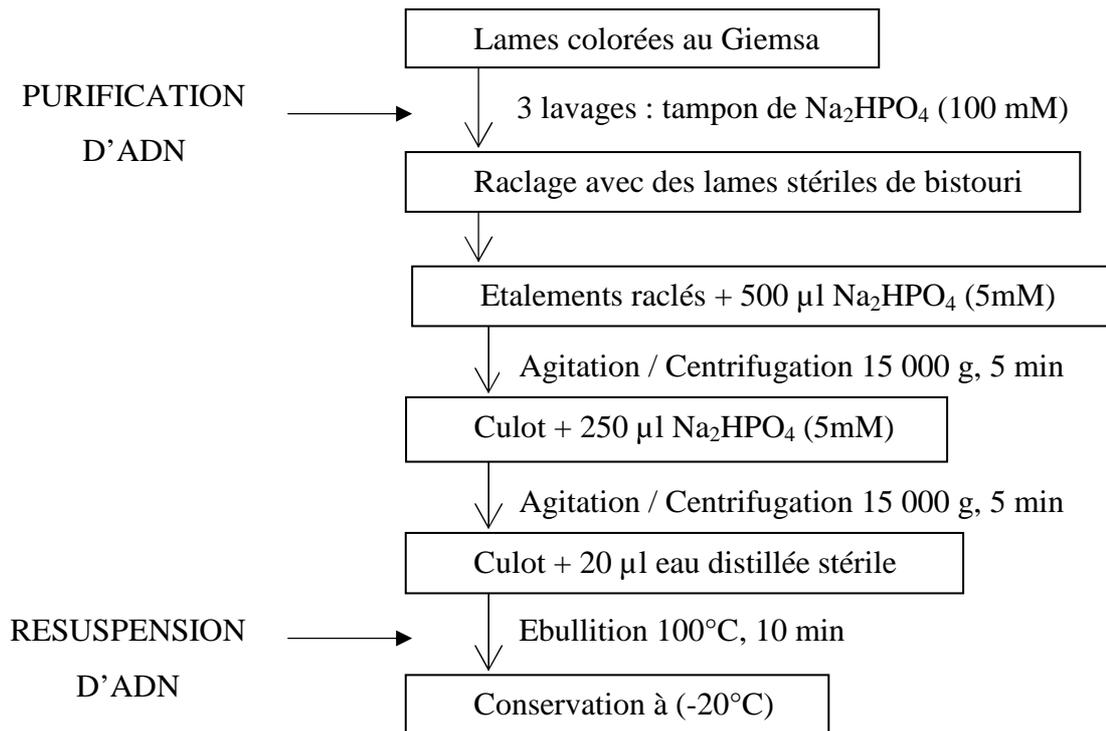


Figure 7 : Protocole d'extraction d'ADN à partir des lames colorées au Giemsa avec une solution de Na_2HPO_4

Les lames ont été lavées avec une solution de di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4 , 100mM) trois fois de suite. Puis ces lames ont été raclées, la poudre mise dans des microtubes à l'aide de lames de bistouri stériles avant l'ajout de 500 µl de tampon Na_2HPO_4 (5 mM). Le contenu des tubes a été mélangé au vortex puis centrifugé à 15 000 g pendant 5 minutes à température ambiante avant de jeter le surnageant.

Le lavage a été répété une deuxième fois avec 250 µl de tampon Na_2HPO_4 (5mM). Le culot obtenu a été remis en solution dans 20 µl d'eau distillée stérile. La suspension a ensuite été bouillie à 100°C pendant 10 minutes et le produit d'extraction conservé à -20°C (Figure 7).

II.1.12. PCR

Toutes les étapes de la PCR suivent un protocole strict. Le volume et la concentration finale de chaque réactif à utiliser sont déterminés en fonction de la concentration initiale de la solution utilisée. Tous les produits nécessaires à la PCR ont été dégelés sur glace. Tous les éléments en contact avec les réactifs sont à usage unique.

II.1.12.1. Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel appelé communément *mix* est calculé pour le nombre de prélèvements à tester. Il est préparé en ajoutant les réactifs les uns après les autres : dNTPs, le couple d'amorces sens/anti-sens, le tampon, l'eau distillée, et l'enzyme (*Taq polymérase*) qui est introduit en dernier dans le mix. Le mélange réactionnel est ensuite redistribué entre le témoin positif, les échantillons et le témoin négatif, toujours rempli en dernier. Le témoin négatif est effectivement essentiel pour chaque PCR puisqu'il permet de vérifier que le mix n'a pas été contaminé par de l'ADN pendant sa préparation. Après chaque manipulation, le plan de travail a été nettoyé avec de la désoxyribonucléase (ADNase).

L'ADN à amplifier est ajouté par la suite au mix dans une salle dédiée à cette action. Cet ajout se fait avec une micropipette et des cônes réservés à cet effet.

II.1.12.2. Amorces

La localisation des amorces *rPlu5/rPlu6* sur le génome de *Plasmodium* sp. est réalisée par alignement à l'aide du BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), mettant également en évidence l'existence de la séquence cible chez *P. yoelii*, *P. chabaudi*, *P. knowlesi* et *P. berghei*.

La position (Figure 8) des amorces servant à amplifier un fragment de génome chez *W. bancrofti* (numéro d'accès au GenBank : AY297458.1) se fait sur le même principe.



Figure 8 : Emplacement schématique des amorces *NV1/NV2* et *LDR1/LDR2* sur le gène de *Wuchereria bancrofti* (Source : BLAST)

Les détails des régions amplifiées du génome de *Wuchereria bancrofti* sont disponibles avec les amorces respectives *NV1/NV2* et *LDR1/LDR2* (Figure 9).

>**NV1/NV2** (195 bp) : CGT GAT GGC ATC AAA GTA GCG TAA GTG AAT TGT
 TTT TTA ATA TTT TCA AGT ATG AAT GGA ATT TTT AGC AAT TTT TTT
 GTT TAT ATT TTT ATT TGA ATT ATT TTT TTT TTT TGT TGG CTT GGT
 ATA ACC TTA TTT TTT AAT CTT TTT TAA TTT TTT TAG TTT TTT TGT
 TGT CTT ATG GTA AGT GAG CT

>**LDR1/LDR2** (117 bp) : ATT TTG ATC ATC TGG GAA CGT TAA TAT ATC
 TGC CCA TAG AAA TAA CTA CGG TGG ATC TCT GGT TAT CAC TCT GAA
 TGG ATT AGA CAG TCG

Figure 9 : Régions amplifiées du génome de *Wuchereria bancrofti* avec les amorces *NV1/NV2* et *LDR1/LDR2* (Source : BLAST)

II.1.12.3. Paramétrage du thermocycleur

Les différentes étapes d'amplification de l'ADN se déroulent par cycles successifs dans un thermocycleur, programmé par l'opérateur. Les paramètres variables sont le temps et la température des différents cycles de l'amplification ainsi que le nombre de ces cycles.

II.1.13. Electrophorèse

Le point terminal d'un diagnostic par PCR est de révéler les produits d'amplification par un moyen approprié et sensible, en les comparant avec des marqueurs de poids moléculaire. L'électrophorèse permet la migration et la visualisation par fluorescence des molécules de poids moléculaire différent. La fluorescence (par UV) est révélée grâce à l'intégration de bromure d'éthidium, intercalé dans les molécules d'ADN double brin dont la fluorescence augmente proportionnellement avec le nombre de copies présentes dans le milieu.

II.1.13.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN compris entre 0,1 et 2,0 kilobases (kb).

Le gel préparé est un gel d'agarose à 2,5% (m/v) soit 2,5 g d'agarose en poudre dissous dans 100 ml de solution de TAE, 1 fois concentrée. Le mélange est chauffé au four à micro-onde à 700 W pendant 5 minutes avant que 8 µl de BÉt à 10 mg/ml soient ajoutés. La solution obtenue est coulée dans un support sur lequel est fixé un peigne formant les puits nécessaires au dépôt des amplicons obtenus après la PCR. Après la polymérisation, le gel est placé dans la cuve à électrophorèse, contenant le tampon d'électrophorèse.

Le dépôt des échantillons est réalisé selon un plan ; chaque puits est chargé avec 15 µl d'amplicon et 3 µl de tampon de charge coloré au bleu de bromophénol. Un puits est également chargé avec 5 µl de marqueur de poids moléculaire d'ADN mélangé à du tampon de charge coloré au bleu de bromophénol, comportant plusieurs fragments d'ADN de taille connue (en paire de bases ou pb) et servant d'échelle de repères.

Un courant électrique de 120 V est appliqué à la cuve pendant 45 minutes. Il est nécessaire de vérifier régulièrement le déroulement de la migration pour éviter une migration trop importante, donc une sortie des fragments du gel. La vitesse de migration d'un fragment d'ADN dépend de sa masse moléculaire et de la densité du gel utilisé ainsi que de la tension électrique. Les fragments les plus petits migrent plus loin que les plus grands fragments dans un temps donné.

Après la migration, le gel et son support sont retirés de la cuve et placés sur la plaque du GelScan™ (Bio-Rad, Suède) pour la révélation. Les produits d'amplification sont visualisés à l'aide de lumière UV. La photo de gel est analysée avec le logiciel *Quantity One version – 4.6.2 de Bio-Rad*.

II.1.13.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide permet de séparer des molécules plus petites. Le protocole utilisé est celui disponible à l'Unité de Virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar. Le volume de BÉt utilisé pour la révélation a toutefois été augmenté de 4 à 8 µl.

La préparation de ce gel nécessite l'utilisation des gants en nitrile qui protègent des effets neurotoxiques de la polyacrylamide et se réalise en mélangeant dans l'ordre : 5,0 ml de bis-acrylamide 30% (29:1), 1,5 ml de tampon TAE (10x, pH 8,4), 8,5 ml d'eau distillée, 75,0 µl de persulfate d'ammonium 10% et 30,0 µl de TEMED (TEtraMethylEthyleneDiamine).

Le volume total de 15 ml est suffisant pour 2 mini-gels. Les gels sont coulés entre deux plaques de verre, se polymérisent pendant 45 min sur la paillasse puis sont transférés dans le système de migration dont la chambre intérieure est remplie de TAE jusqu'au niveau des puits. Dix microlitres de chaque produit de PCR sont déposés avec 1 μ l de marqueur. Le module de migration est ensuite placé dans la cuve remplie de TAE. Chaque gel est mis sous tension à 20 mA pendant 40 minutes jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne la limite inférieure.

Après migration, les gels sont immergés dans une solution comprenant 500 ml d'eau distillée et 50 μ l de BEt à 10 mg/ml puis incubés dans une chambre noire pendant 15 minutes. Puis les gels sont rincés avec de l'eau distillée pendant 2 min et pris en photo sur le GelScanTM.

Le reste des amplicons est conservé à +4°C pour permettre un nouveau dépôt si nécessaire.

II.1.14. Purification d'ADN

La purification d'ADN a été réalisée avec le kit QIAquick gel extraction (Qiagen) (Figure 10). Ce protocole a été conçu pour extraire et purifier l'ADN de 70b à 10 kb à partir de gel d'agarose préparé avec du tampon TBE ou TAE.

Toutes les étapes de centrifugation ont été effectuées à 17 900 g (13 000 tr/min) dans une centrifugeuse à température ambiante.

La bande contenant l'ADN cible a été découpée du gel d'agarose (par visualisation aux UV) avec un scalpel propre et tranchant. La protection vis-à-vis des UV s'est fait derrière des lunettes de protection avec une durée d'exposition réduite au minimum.

Le morceau de gel a été placé dans un microtube puis pesé. Trois volumes de tampon de dissolution QG (de couleur jaune) ont été ajoutés par volume de gel (100 mg pour 100 ml). Le microtube a été incubé à 50°C pendant au moins 10 minutes et mélangé au vortex toutes les 2-3 minutes jusqu'à dissolution complète du morceau de gel. Si la couleur du mélange vire au violet après solubilisation, 10 μ l d'acétate de sodium 3 M (pH 5,0) doivent être ajoutés pour revenir à la couleur jaune initiale. L'ajout d'un volume d'isopropanol pour un volume de gel n'a pas été effectué.

Une colonne *QIAquick* contenant une membrane de silice a été placée dans un tube collecteur. Le contenu du microtube a été déposé dans la colonne puis centrifugé pendant 1 minute. Le filtrat a été jeté. La colonne a été replacée dans le tube collecteur

puis lavée avec 750 μl de tampon de lavage (PE) et centrifugée pendant 1 minute. Le filtrat a été jeté et la colonne centrifugée à nouveau pendant 1 minute. Finalement, la colonne a été placée sur un nouveau microtube propre et l'ADN a été élué avec 50 μl d'eau distillée puis centrifugé pendant 1 minute. L'ADN ainsi purifié a été conservé à -20°C (Figure 10).

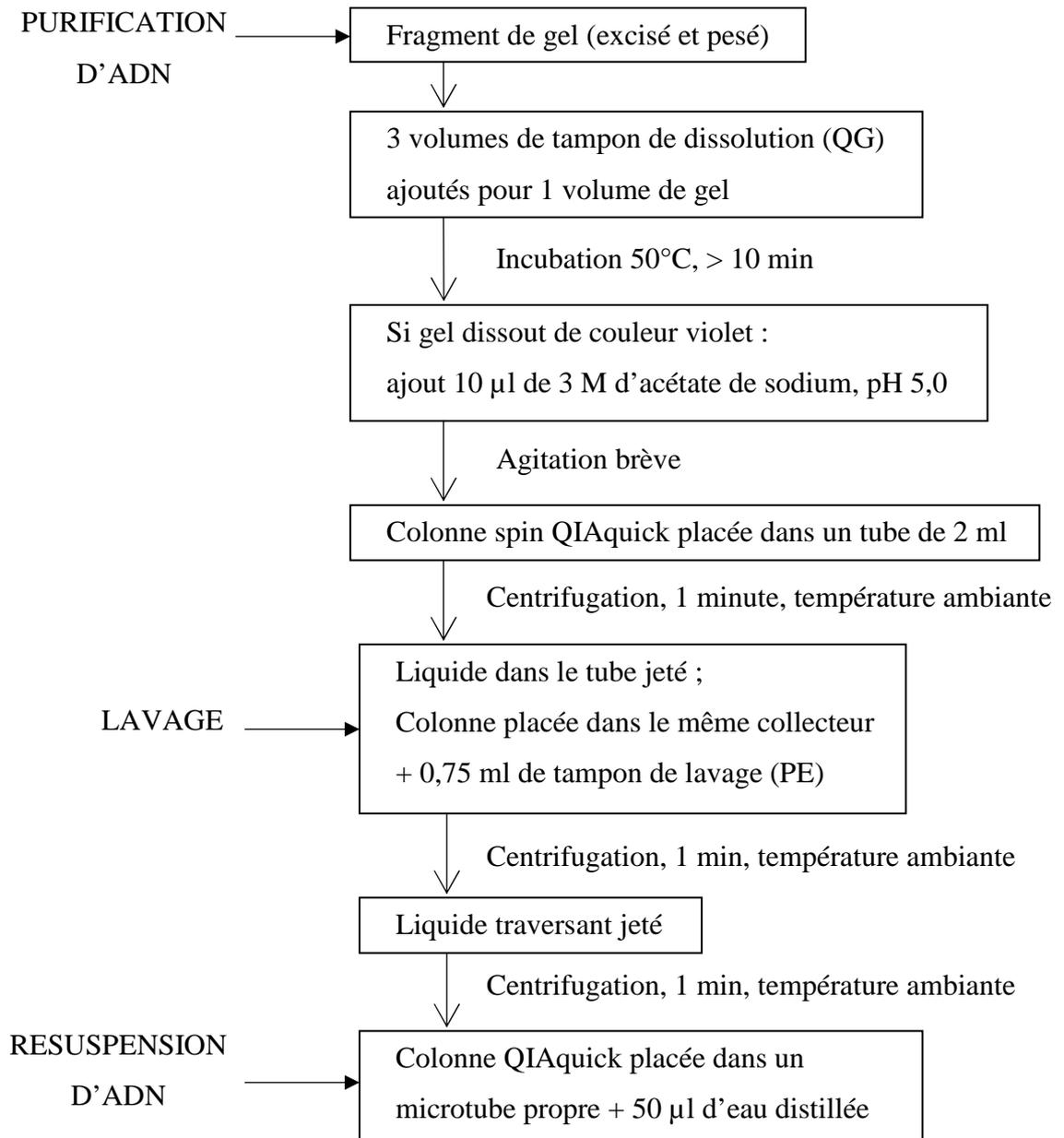


Figure 10 : Protocole de purification d'ADN à partir du gel d'agarose avec le « *QIA quick Gel Extraction Kit* »

II.1.15. Optimisation des conditions de PCR

Aucun protocole ne pourra convenir à toutes les applications possibles de la PCR. Une optimisation est ainsi nécessaire afin d'obtenir le protocole le plus adapté en ajustant les concentrations de chacun des réactifs. En effet, au fur et à mesure de l'avancée de la PCR, les copies d'ADN s'accumulent et modifient le milieu réactionnel, et la synthèse d'ADN est toujours accompagnée par la libération d'ions pyrophosphates qui, en concentration élevée, inhibent l'activité de la *Taq polymérase*.

II.1.15.1. Mise au point des PCR conventionnelles simples

Le protocole de diagnostic par PCR classique utilisé est celui communément appliqué à l'Unité de Recherche sur le Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar.

Chaque mix contenait 5 µl d'ADN et une concentration de 0,5 mM de chaque amorce dans un volume final de 25 µl. L'optimisation des conditions d'amplification a principalement porté sur la concentration d'ADN (1/5, 1/10) et la variation du nombre de cycles (30/35/40) avec chaque fois l'ADN de *Plasmodium falciparum* 3D7 et *Plasmodium ovale* servant de contrôles positifs.

Le thermocycleur a été programmé comme suit :

<i>Dénaturation initiale</i>	95°C	5 minutes		
<i>Dénaturation</i>	95°C	1 minute	}	
<i>Hybridation</i>	59°C	1 minute	}	Δ cycles
<i>Elongation</i>	72°C	1 minute 30 secondes]	(30/35/40)
<i>Elongation finale</i>	72°C	10 minutes		

Pour la mise au point de la recherche de microfilaire, les produits d'amplification obtenus avec les amorces *NV1/NV2* et *LDR1/LDR2* ont été comparés. Se référant à trois articles (37, 54, 55), plusieurs programmes avec différentes dilutions d'ADN ont été réalisés. Les résultats ont été confrontés, en conséquence le programme adéquat était :

<i>Dénaturation initiale</i>	95°C	5 minutes		
<i>Dénaturation</i>	94°C	1 minute	}	
<i>Hybridation</i>	52°C	1 minute	}	40 cycles
<i>Elongation</i>	72°C	2 minutes]	
<i>Elongation finale</i>	72°C	10 minutes		

II.1.15.2. Mise au point de la PCR standard multiplex

Cette méthode réalise 2 amplifications au cours d'une même réaction PCR. L'ADN de chacun des 2 hémoparasites recherchés soit, *Plasmodium* spp et *W. bancrofti*, est détecté simultanément.

La co-infection a été obtenue artificiellement par l'addition des 2 contrôles positifs utilisés en PCR conventionnelle simplex.

Les deux couples d'amorces (*rPlu5/rPlu6* et *LDR1/LDR2*) ont été utilisés en même temps dans la réaction. Dans un volume final de 50 µl, chaque amorce a été testée en volume variable (1 µl /1,5 µl /2 µl) avec 2 µl d'ADN.

Le programme utilisé était :

<i>Dénaturation initiale</i>	95°C	5 minutes		
<i>Dénaturation</i>	94°C	1 minute	}	35 cycles
<i>Hybridation</i>	52°C	1 minute	}	
<i>Elongation</i>	72°C	2 minutes	}	
<i>Elongation finale</i>	72°C	10 minutes		

II.1.15.3. Mise au point de la PCR en temps réel simplex

Pour éviter toute contamination, les étapes de manipulation ont été effectuées en respectant la compartimentation du laboratoire : une première pièce ou **salle pré-mix** dans laquelle le mélange des réactifs a été préparé et une seconde pièce ou **salle d'extraction** servant à l'addition des ADN.

Tout au long de la manipulation, les échantillons ont été soigneusement protégés avec du papier aluminium et entreposés dans des bacs à glace afin d'éviter l'exposition à la lumière et les variations de température pouvant initier les réactions enzymatiques.

Les étapes de la RT-PCR sont identiques à celles d'une PCR classique. La phase de dénaturation initiale de l'ADN double brin est suivie d'une phase d'amplification qui est décomposée en une phase de dénaturation, une phase d'hybridation des amorces sur l'ADN cible et une phase d'élongation pour chaque cycle.

L'étape de l'élongation finale est facultative. L'analyse des produits d'amplification d'une réaction PCR en temps réel est réalisée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle par la mesure du signal fluorescent émis.

En pratique, la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR dépendent de plusieurs paramètres tels que le nombre de cycles d'amplification, la concentration en amorces et en tampon $MgCl_2$.

L'optimisation des conditions d'amplification porte sur 2 paramètres que sont la température d'hybridation des amorces et la température d'élongation.

La température d'hybridation est définie en fonction de la composition en bases des amorces. Des variations de $1^\circ C$ au-dessus ou au-dessous de la température de fusion ou *T_m* (*melting temperature*) optimale peuvent soit inhiber toute réaction, soit amener la formation de produit d'amplification aspécifique en compétition avec les séquences cibles.

L'élongation des brins complémentaires se déroule généralement à $72^\circ C$, température optimale pour l'enzyme polymérase, pendant une durée variable selon la taille du fragment à amplifier. Toutefois, une variation de cette température d'élongation est apportée pour améliorer un protocole de recherche.

II.1.15.3.1. Mise au point de la recherche de *Plasmodium*

La réaction PCR a été réalisée dans des microtubes de 0,1 ml, pour un volume réactionnel de 25 µl dont la composition est donnée dans le tableau I.

Tableau I: Composition du mélange réactionnel pour la RT-PCR simplex

Réactifs	Volume par tube
EDS	7 µl
Master mix	12,5 µl
Amorce sens	1,5 µl
Amorce anti-sens	1,5 µl
ADN	2,5 µl

Cette expérience comporte :

- deux blancs (EDS = eau distillée stérile)
- 4 ADN pour contrôles positifs représentant les quatre espèces plasmodiales : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*.

La programmation du thermocycleur est basée sur celle utilisée dans l'article de Mangold (56).

La mise au point porte sur des modifications des paramètres température et temps. Ainsi la température d'hybridation des amorces a été augmentée à 56°C. Quant à la température d'élongation, elle a été abaissée à 65°C. De plus, le temps d'élongation a été augmenté jusqu'à 90 secondes (Tableau II).

Tableau II: Programme modifié de la RT-PCR pour détecter *Plasmodium*

	Température en °C	Durée en secondes
Pré-incubation		
Hold 1	50	120
Hold 2	95	600
Amplification		
Dénaturation	95	30
Hybridation	56	30
Elongation	65	90
Melting*	65 à 90	60
Cooling	35	600

* La température soumise aux amplicons progresse de 65°C à 90°C par palier de 0,5°C.

Au fur et à mesure de l'amplification, grâce au logiciel spécial, différentes courbes peuvent être suivies dont la courbe de fusion qui permet de vérifier l'amplification d'un seul produit de PCR. En effet, la fluorescence émise par les amplicons tout au long de l'augmentation graduée de la température (passant de 65°C à 95°C par palier de 0,5°C) est mesurée en continu.

II.1.15.3.2. Mise au point de la recherche de *Wuchereria bancrofti*

Différentes concentrations d'ADN ont également été testées dans un volume final de 12,5 µl avec 1,5 µl de chacune des amorces *LDR1* et *LDR2* en utilisant le kit *qPCR Master mix Plus for SYBR Green I No ROX (Eurogentec)* (Tableau III).

Tableau III: Différentes compositions du mélange réactionnel pour la RT-PCR simplex

Réactifs	Volume par tube		
EDS	7 µl	9 µl	9,25 µl
Master mix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Amorce sens	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Amorce anti-sens	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
ADN	2,5 µl	0,5 µl	0,25 µl

Le thermocycleur a été programmé comme suit (Tableau VI):

Tableau IV: Programme de la RT-PCR pour détecter les témoins positifs en *Wuchereria bancrofti*

	Température en °C	Durée en secondes
Pré-incubation		
Hold 1	50	120
Hold 2	95	600
Amplification		
Dénaturation	95	30
Hybridation	54	20
Elongation	65	100
Melting*	65 à 90	60
Cooling	35	600

* La température soumise aux amplicons progresse de 65°C à 90°C par palier de 0,5°C.

II.1.15.4. Analyses des résultats des PCR en temps réel

Les analyses de résultats pour la PCR en temps réel ont été réalisées avec le logiciel *Rotor Gene version 6.0*. En effet, la fluorescence captée pendant le déroulement de la RT-PCR permet de tracer une courbe de fluorescence représentant la quantité de signal fluorescent émis par rapport au nombre de cycles. Toutefois, l'identification des espèces plasmodiales ou de microfilaires se fait par analyse de la courbe de fusion qui est la dérivée première de la courbe de fluorescence. Différentes valeurs de température de fusion (T_m) spécifiques, correspondant aux maxima de la courbe de fusion, ont ainsi pu être déterminées.

II.1.16. Recherche des hémoparasites chez les lémuriens

II.1.16.1. PCR conventionnelle simple

Les conditions de PCR pour la recherche des *Plasmodium* chez les lémuriens ont été les mêmes que celles de la mise au point de cette technique avec les souches références de *Plasmodium* : 5 µl d'ADN dans un volume réactionnel final de 25 µl, avec le programme détaillé dans le tableau V.

Tableau V: Programme de la PCR pour détecter *Plasmodium* chez les lémuriens

	Température en °C	Durée en secondes
Dénaturation initiale	95	300
Dénaturation	95	60
Hybridation	59	60
Elongation	72	90
Elongation finale	72	600

Pour le diagnostic de la filariose lymphatique dans les échantillons sanguins provenant des lémuriens, 5 µl d'ADN ont été testés dans un volume final de 25 µl dont la concentration finale en MgCl₂ est de 2 mM.

Le programme du thermocycleur a été modifié :

<i>Dénaturation initiale</i>	95°C	5 minutes	
<i>Dénaturation</i>	94°C	1 minute	} 40 cycles
<i>Hybridation</i>	56°C	1 minute	
<i>Elongation</i>	72°C	2 minutes	
<i>Elongation finale</i>	72°C	10 minutes	

II.1.16.2. PCR standard duplex

La détection simultanée des hémoparasites par les deux différents couples d'amorces (*rPlu5/rPlu6* et *LDR1/LDR2*) a été réalisée avec 5 µl d'ADN dans un volume final de 50 µl. Le thermocycleur a été programmé comme celui de la mise au point du protocole avec les échantillons humains.

II.1.16.3. PCR en temps réel simplex

Pour la recherche de *Plasmodium* chez les lémuriens, la réaction PCR en temps réel a été réalisée avec 1,5 µl de chaque amorce *F18/R18* dans un volume réactionnel total de 25 µl avec le programme mis au point.

La recherche des microfilaires chez les lémuriens par PCR en temps réel simplex a été effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 1,5 µl de chaque amorce *LDR1/LDR2* et 2 µl d'ADN (Figure 14). La visualisation de l'amplification par PCR en temps réel a été réalisée par migration des produits après électrophorèse sur gel d'agarose permettant d'examiner la taille des amplicons (Photo 10).

L'étape suivante a été l'extraction d'ADN à partir du gel d'agarose avec un autre kit, le *QIA quick Gel Extraction Kit*. Pour le diagnostic des échantillons extraits à partir du gel, différentes concentrations de MgCl₂ (2 mM/2,5 mM/3 mM) ont été utilisées, et 4 volumes distincts d'amplicons (1 µl/1,5 µl/2 µl/2,5 µl) ont été amplifiés par PCR conventionnelle avec l'adaptation des conditions expérimentales que la RT-PCR :

<i>Dénaturation initiale</i>	95°C	300 secondes	
<i>Dénaturation</i>	95°C	60 secondes	} 40 cycles
<i>Hybridation</i>	56°C	20 secondes	
<i>Elongation</i>	68°C	100 secondes	} 40 cycles
<i>Elongation finale</i>	68°C	600 secondes	

Pour la suite de ce travail, tous les amplicons des ADN de *W. bancrofti* ont été extraits du gel de nouveau, mélangés, dilués et ré-amplifiés par PCR conventionnelle dans les mêmes conditions que précédemment.

II.2. Matériels

II.2.1. Prélèvement

Le matériel utilisé pour la confection des prélèvements sanguins et leur transport est composé de seringues montées d'une aiguille, de coton stérile, de l'alcool, de tubes à EDTA, d'une boîte de rangement, d'une glacière, de plaques eutectiques.

II.2.2. Microscopie

Le matériel utilisé pour la microscopie comprenait :

- du méthanol (N° lot 20846361 Exp 08/2012)
- des colorants de Giemsa prêts à l'emploi (N° lot 11484101 Exp 01/2013)
- de l'eau de rinçage
- un chronomètre
- un microscope binoculaire
- un bloc de deux compteurs manuels de cellules
- de l'huile à immersion (N° lot 062079)

II.2.3. Test sérologique ou test de diagnostic rapide (TDR)

Les tests de diagnostic rapide ou TDR utilisés sont le kit *CareStart™ Malaria LDH/HRP2 Combo Pan/Pf* de Access Bio (New Jersey) pour le diagnostic du paludisme et le kit *Filariasis IgG/IgM Combo* de CTK Biotech (San Diego) pour diagnostiquer la filariose lymphatique. Chaque TDR est composé d'une cassette, d'une solution tampon, d'une pipette et d'une gaze imbibée d'alcool

II.2.4. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN de lémurien à partir du sang total a été réalisée avec le kit « QIAamp® DNA Blood Mini Kit » de QIAGEN, numéro de catégorie 51106 – numéro de lot 11238012, conditionné pour 250 réactions.

L'extraction d'ADN de *Wuchereria bancrofti* à partir des lames colorées au Giemsa a été effectuée avec une solution de di-sodium hydrogénophosphate (N° lot 99243J116) de PROLABO.

La purification d'ADN par extraction à partir du gel d'agarose a été réalisée avec le kit « *QIA quick gel extraction kit* » de QIAGEN, numéro de catégorie 28704 – numéro de lot 124123464.

II.2.5. PCR conventionnelle et PCR en temps réel

Le matériel nécessaire à la technique de la PCR a été assez complexe.

II.2.5.1. Amorces

Le diagnostic de genre de *Plasmodium* spp a été réalisé avec les amorces *rPlu5/rPlu6* en PCR classique et *F18/R18* en RT-PCR (56, 57).

La mise au point de la technique de détection des microfilaires de *Wuchereria bancrofti* a comparé les deux couples d'amorces *NV1/NV2* et *LDR1/LDR2* (54, 55) (Tableau VI).

Tableau VI : Séquence des amorces utilisées (54, 55, 56, 57)

Amorce	Séquence nucléotidique
RPLU 5	5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'
RPLU 6	5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAACG-3'
PL1679F18	5'-TAACGAACGAGATCTTAA-3'
PL1679R18	5'-GTTCTCTAAGAAGC-3'
WB-QPCR-LDR1	5'-ATTTTGATCATCTGGGAACGTTAATA-3'
WB-QPCR-LDR2	5'-CGACTGTCTAATCCATTCAGAGTGA-3'
WB-CPCR-NV1	5'-CGTGATGGCATCAAAGTAGCG-3'
WB-CPCR-NV2	5'-CCCTCACTTACCATAAGACAAC-3'

Toutes les amorces ont été commandées chez *Sigma Aldrich (France)* et conditionnées sous forme lyophilisée accompagnée d'une fiche technique mentionnant la méthode de mise en solution.

Pour chaque amorce, une solution mère de 100 µM de concentration a été préparée en ajoutant de l'eau ultra pure au lyophilisat. Des solutions filles de concentration 10 µM ont également été préparées à partir de la solution mère afin de limiter les phases de congélation/décongélation pouvant altérer la qualité des amorces. Toutes ces solutions ont été conservées à -20°C.

II.2.5.2. Réactifs

Différentes solutions ont été indispensables pour l'amplification par PCR :

- les désoxyribonucleotides triphosphates (dNTPs N° lot A-027K505664/ T-117K1287V/ C-016K7037/ G-011M0430), introduits en large excès dans le milieu réactionnel et en concentration équivalente pour les 4 nucléotides, afin de ne pas favoriser les mésappariements ;
- l'ADN polymérase (N° lot 383909 Exp 09/2011), enzyme extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, spécialement thermostables et capables de résister à des températures atteignant 100°C ;
- le tampon réactionnel (N° lot RB1710 Exp 11/2011) contenant des cations bivalents Mg^{2+} , cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation, qui maintiennent le pH du milieu et la concentration saline optimale au bon fonctionnement des amorces et de la Taq polymérase ;
- la solution de dichlorure de magnésium ($MgCl_2$ N° lot M1190) pour optimiser la réaction.

La solution obtenue après avoir mélangé ces différents réactifs est appelée « Master Mix ». Il a été préparé manuellement pour la PCR conventionnelle. Alors que celui utilisé pour la PCR en temps réel est distribué commercialement en une solution prête à l'emploi (qPCR Master Mix Plus for SYBR® green I/ No ROX/ [RT-SN2X-03+NR] Exp 10/2010) de EUROGENTEC.

Le contenu est identique, comprenant de l'ADN polymérase, des dNTPs, du $MgCl_2$ et des tampons de réaction à des concentrations optimales pour une amplification efficace des matrices d'ADN lors de la réaction PCR.

Ce Master Mix est conservé à l'abri de la lumière.

La désoxyribonucléase (ADNase) utilisé pour nettoyer le plan de travail après chaque manipulation est le produit DNA Away (N° lot 10045466 Exp 08/2012).

Les réactifs utilisés pour l'électrophorèse et la révélation des produits d'amplification ont été :

- la poudre d'agarose (N° lot D061808)
- le bis-acrylamide (N° lot 48F0710)
- le tampon TAE (N° lot 128K8412)

- le persulfate d'ammonium (N° lot 104H5705)
- le TEMED (N° lot 109F079215)
- le bromure d'éthidium (N° lot 266126)
- le marqueur de masse moléculaire (N° lot 377992 Exp 11/2010)
- le tampon de charge (prêt à l'emploi)
- le bleu de bromophénol (prêt à l'emploi)

II.2.5.3. Thermocycleurs

Les différents thermocycleurs utilisés pour la PCR conventionnelle ont été :

- Techne TC-S12 PCR Thermal Cycler (numéro de série 157296)
- Biometra T3000 Thermocycler (numéro de série 1205292)
- Eppendorf Mastercycler Gradient (numéro de série 53310267)

La PCR en temps réel a été réalisée avec le *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research, Australie). L'appareil comprend un thermocycleur dans lequel l'amplification des gènes se déroule, et un compartiment permettant de détecter la fluorescence grâce à un fluoromètre relié à un ordinateur. L'analyse des résultats de la PCR en temps réel a été réalisée avec le logiciel *Rotor-Gene version 6.0 (build 23)*.



Photo 8: Thermocycleurs Eppendorf et Corbett (58, 59)

II.2.5.4. Autres matériels pour la PCR

Dans la salle de préparation du mélange réactionnel, le matériel utilisé comprend un vortex, une mini-centrifugeuse, un jeu de pipettes, de la glace pilée, une petite hotte PCR munie de lampe UV, une boîte en plastique pour jeter les OPCT (objets piquants,

coupants et tranchants) et un carton étanche (poubelle) pour jeter les DAOM (déchets assimilés aux ordures ménagères).

Dans la salle d'extraction et de répartition des prélèvements, le matériel disponible consiste en une hôte à flux laminaire (filtration de l'air et présence d'UV), une centrifugeuse, un congélateur, un vortex, un bloc chauffant à sec ou/et à bain marie, un jeu de pipettes, une boîte pour jeter les OPCT et un carton étanche pour les DAOM.

Dans la salle PCR et de révélation, le matériel utilisé se compose d'un jeu de pipettes, un thermocycleur, de systèmes d'électrophorèse, une centrifugeuse, un vortex, un transilluminateur UV, du papier aluminium, un four à micro-ondes, une boîte pour jeter les OPCT, un carton étanche pour les DAOM et une poubelle étanche destinée aux déchets en contact avec le BÉt. Les réactifs utilisés dans cette salle ont été stockés dans un frigo-congélateur.

II.2.6. Matériels biologiques

Les souches de référence constituant les témoins positifs pour la recherche de *Plasmodium* par PCR étaient des souches de référence de l'OMS soit *Plasmodium falciparum* 3D7 et *Plasmodium ovale*.

Les contrôles positifs pour *Wuchereria bancrofti* provenaient également des lames positives de référence de l'OMS.

Le sang veineux ou artériel de lémuriens servant pour la validation de la technique provenait d'individus du *Lemurs'Park*.

III. RESULTATS

III.1. Résultats de la microscopie et du TDR

La recherche de plasmodie et microfilaire sur frottis minces et gouttes épaisses provenant des prélèvements des 5 lémuriens testés s'est avérée négative. Les tests de diagnostic rapide se sont également révélés négatifs pour tous les échantillons de lémuriens.

III.2. Résultat global de la PCR

Les techniques de PCR ont été mises au point avec les amorces *rPlu5/rPlu6* et *F18/R18* pour la recherche des plasmodies et les amorces *LDR1/LDR2* pour la recherche des microfilaires.

Les méthodes de PCR conventionnelle et en temps réel ont été appliquées sur les prélèvements de lémuriens. Elles ont révélé deux cas suspects positifs dans la recherche de microfilaires.

III.3. Résultats des mises au point des PCR conventionnelles simplex

III.3.1. Résultats de la mise au point de la recherche de *Plasmodium*

Les effets de la variation du nombre de cycles et de la concentration de l'ADN matriciel ont été mis en évidence lors de la mise au point de la PCR conventionnelle (Photo 3). Réalisée avec les amorces *rPlu5/rPlu6*, une différence d'amplification des souches de référence *P. falciparum 3D7* et *P. ovale* a été observée.

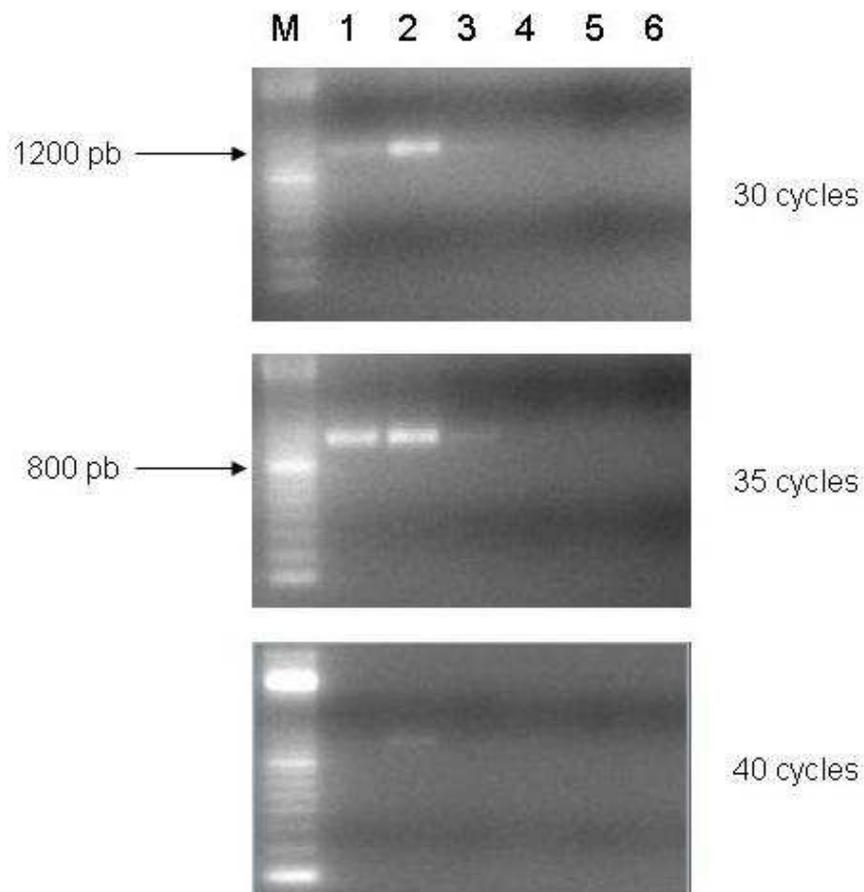


Photo 3 : Résultats des PCR présentant les effets de la variation du nombre de cycles et de la concentration de l'ADN matriciel (Source : URP)

Légende : *M* : marqueur de taille (100-bp)
 1 : ADN de *P. 3D7* (1/5)
 2 : ADN de *P. 3D7* (1/10)
 3 : ADN de *P. ovale* (1/5)
 4 : ADN de *P. ovale* (1/10)
 5 et 6 : blanc (H_2O)
 1200 bp : taille attendue de produit amplifié avec *rPlu5/rPlu6*

Le signal est plus important pour *P. falciparum* 3D7 dilué au dixième que celui dilué au cinquième et ce, peu importe le nombre de cycles. A 35 cycles, les bandes de *P. falciparum* 3D7 ont été visibles pour les échantillons dilués au cinquième ou au dixième. Pour *P. ovale*, aucun signal n'est nettement visible pour les 2 dilutions si ce n'est qu'un faible signal mis en évidence à 35 cycles. Le signal est perdu pour l'échantillon dilué au dixième ainsi qu'à 40 cycles pour la dilution au cinquième (Photo 3).

III.3.2. Résultats de la mise au point de la recherche des microfilaires

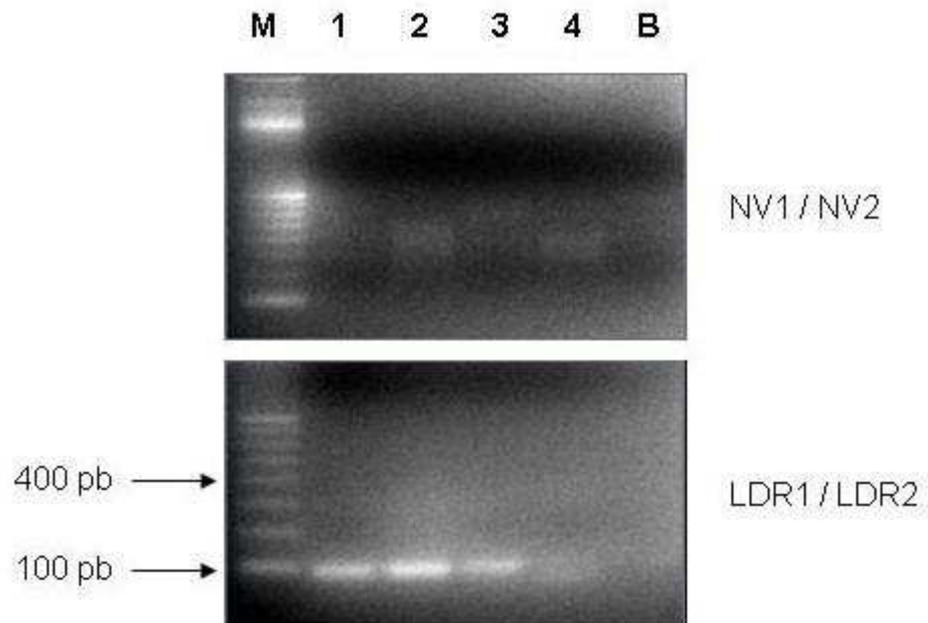


Photo 4 : Résultats des PCR avec les amorces *NV1/NV2* et *LDR1/LDR2*

(Source : URP)

Légende : *M* : marqueur de taille (100-bp)
 1 à 3 : ADN de microfilaires raclés des lames OMS
 4 : ADN de *Plasmodium 3D7* (contrôle négatif)
 B : blanc (H_2O)

L'amplification avec *NV1/NV2* a donné naissance à des bandes non spécifiques alors qu'avec *LDR1/LDR2*, des bandes notables à 100 bp ont été observées (Photo 4).

Ces bandes spécifiques correspondent aux fragments amplifiés d'ADN de *Wuchereria bancrofti*.

Les amplicons obtenus par PCR avec les amorces *LDRI/LDR2* ont ensuite été déposés sur gel polyacrylamide.

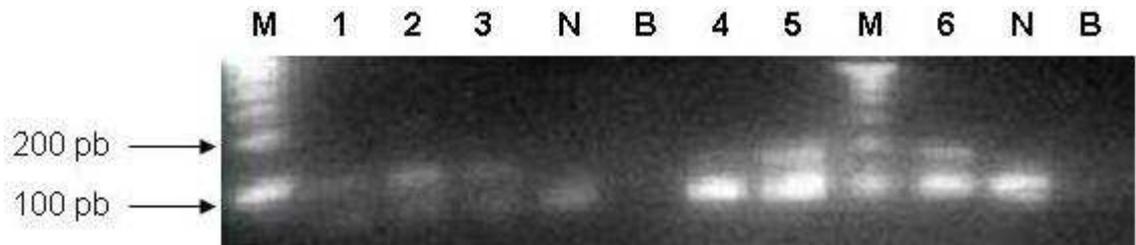


Photo 5 : Résultat de la PCR avec les amorces *LDRI/LDR2* (amplicons migrés sur gel polyacrylamide) (Source : URP)

Légende : *M* : marqueurs de taille (100-bp)
1 à 3 : ADN de microfilaires dilués (1/10)
4 à 6 : ADN de microfilaires dilués (1/5)
N : ADN de *Plasmodium 3D7* (contrôle négatif)
B : blanc (H_2O)

La bande à 100 pb est encore observée pour les 6 produits (Photo 5). Elle confirme la spécificité des ADN amplifiés des contrôles positifs de *Wuchereria bancrofti* par les amorces *LDRI/LDR2*.

L'intensité est plus marquée dans les échantillons dilués au cinquième (1/5).

Un défaut de polymérisation du gel a été remarqué après migration avec une légère courbure des bandes marqueurs et des bandes spécifiques.

III.4. Résultats des mises au point des PCR conventionnelles duplex

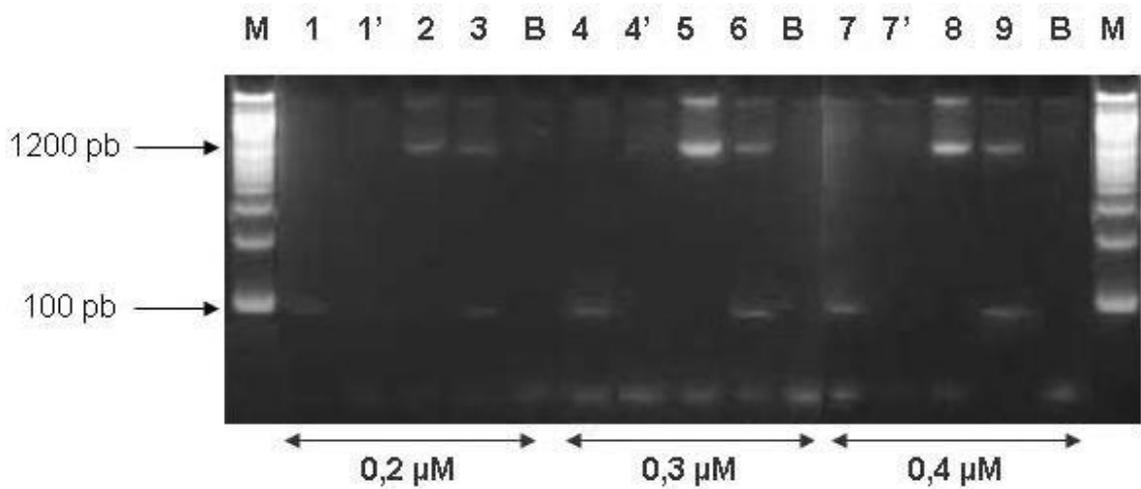


Photo 6 : Résultat de la PCR des produits de co-infection artificielle amplifiés avec différentes concentrations d'amorces (Source : URP)

Légende : *M* : marqueurs de taille (100-bp)
1 -1' - 4 - 4' - 7 -7' : ADN de microfilaire
2 - 5 - 8 : ADN de *Plasmodium*
3 - 6 - 9 : ADN de microfilaire + ADN de *Plasmodium*
B : blanc (H_2O)

Les amplicons de la co-infection artificielle ont été obtenus avec différentes concentrations d'amorces et migrés sur gel polyacrylamide (Photo 6). Les bandes de 100 bp et 1200 bp sont présentes aux 3 concentrations (0,2 μ M / 0,3 μ M / 0,4 μ M), marquées pour une concentration d'amorces à 0,3 μ M correspondant au volume d'amorces à 1,5 μ l.

La présence de la bande à 1200 bp témoigne de l'amplification des ADN de *Plasmodium* tandis que la bande à 100 bp est celle attendue pour la présence d'amplicon d'ADN de *Wuchereria bancrofti* de la PCR.

La réussite de la mise au point de la PCR duplex se traduit par la présence simultanée des bandes à 100 bp et à 1200 bp dans un même puits de gel d'électrophorèse (voir puits n° 3, 6 et 9).

III.5. Résultats des mises au point des PCR en temps réel

III.5.1. Résultat de la mise au point de la RT-PCR servant à la recherche de *Plasmodium*

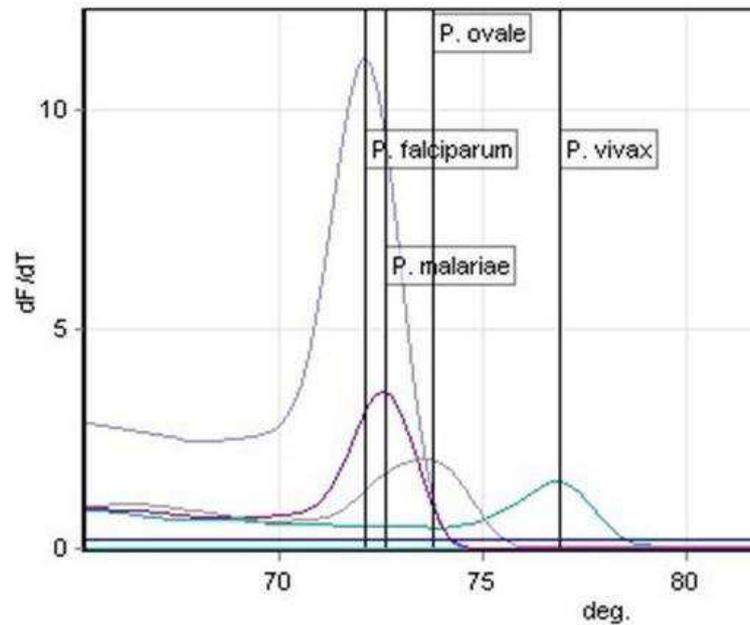


Figure 11 : Courbe de fusion de quatre espèces plasmodiales (Source : URP)

Légende :

Couleur	Nom	Pic
■	Blanc 1	-
■	Blanc 2	-
■	<i>Plasmodium falciparum</i>	72,1
■	<i>Plasmodium malariae</i>	72,6
■	<i>Plasmodium ovale</i>	73,6
■	<i>Plasmodium vivax</i>	76,8

La spécificité de la PCR en temps réel est donnée par la courbe de fusion.

La PCR en temps réel utilisant les amorces *PL1679F18/PL1679R18* présente les courbes de fusion optimisées de *P. falciparum*, de *P. malariae*, de *P. ovale* et de *P. vivax* (Figure 11).

La surface des maxima obtenus permet d'estimer la part de la fluorescence proportionnellement à la quantité de l'amplicon recherché en représentant dF/dT (où F est l'intensité de fluorescence et T la température).

Les pics de la courbe de fusion correspondent aux valeurs de température de fusion (T_m) spécifique de l'ADN. Ces pics représentent chaque espèce plasmodiale.

III.5.2. Résultat de la mise au point de la RT-PCR pour la recherche de *Wuchereria bancrofti*

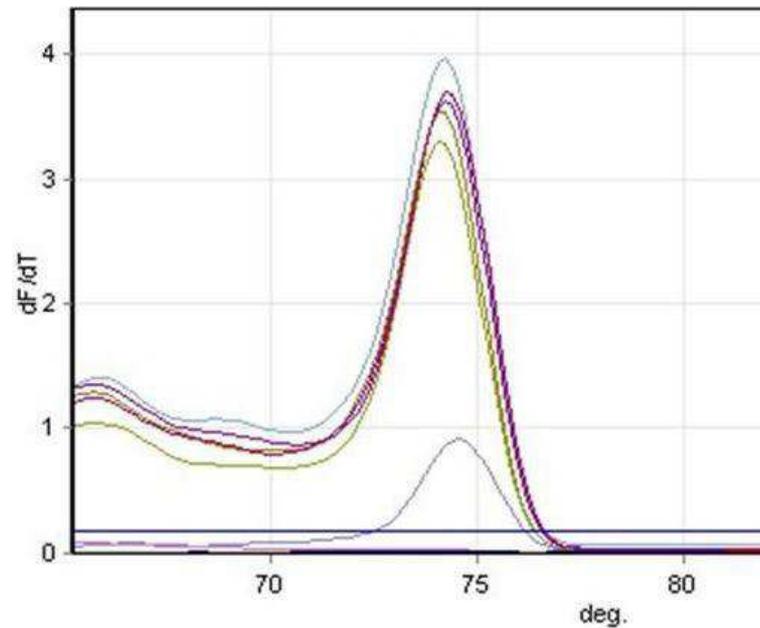


Figure 12 : Courbe de fusion des témoins de différents volumes d'ADN des contrôles positifs en *Wuchereria bancrofti* (Source : URP)

Légende :

Volume d'ADN	Couleur	Nom	Pic
-	■	Blanc 1	-
-	■	Blanc 2	-
-	■	Blanc 3	-
2,5 µl	}	OMS 1	74,2
		OMS 2	74,6
		Témoin négatif 1	-
0,5 µl	}	OMS 1	74,1
		OMS 2	74,1
		Témoin négatif 2	-
0,25 µl	}	OMS1	74,2
		OMS2	74,2
		Témoin négatif 3	-

En variant les volumes d'ADN des contrôles positifs *OMS 1* et *OMS 2* de *Wuchereria bancrofti*, les différentes courbes de fusion ont permis d'établir la température de fusion moyenne définie à 74,2°C témoignant de la mise au point de la recherche du contrôle positif en *Wuchereria bancrofti* de la RT-PCR (Figure 12).

III.6. Résultats des PCR des prélèvements de lémurien

III.6.1. Résultats des PCR standards simplex

III.6.1.1. Recherche de *Plasmodium* spp

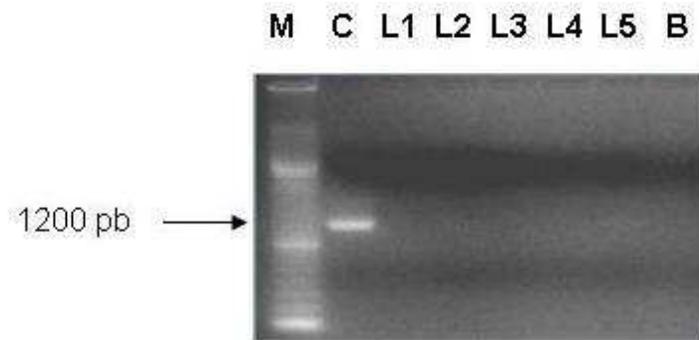


Photo 7 : Résultat de la PCR pour la détection de *Plasmodium* spp chez les lémurien (Source : URP)

Légende : M : marqueur de taille (100-bp)

C : ADN de *Plasmodium* 3D7 (contrôle positif)

L 1 à L 5 : ADN de lémurien

B : blanc (H₂O)

La recherche de *Plasmodium* spp dans les 5 extraits de sang s'avère négative. Aucune bande n'est décelable à 1200 bp (Photo 7) pour les échantillons de lémurien.

III.6.1.2. Recherche de *Wuchereria bancrofti*

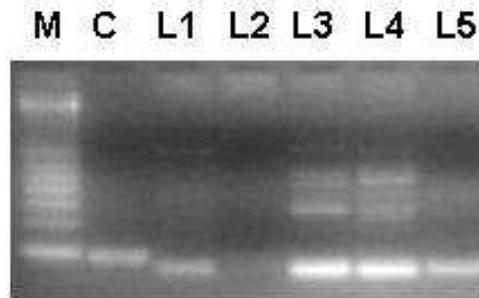


Photo 8 : Résultat de la PCR pour la détection de microfilaire dans les produits d'extraction de sang total des cinq lémuriens (Source : URP)

Légende : *M* : marqueur de taille (100-bp)
 C : ADN de microfilaire (contrôle positif)
 L 1 à L 5 : ADN de lémuriens

La détection des microfilaires chez les lémuriens par PCR conventionnelle met en évidence une bande spécifique pour le contrôle positif mais plusieurs bandes non-spécifiques pour les 5 échantillons (Photo 8).

III.6.2. Résultat de la PCR standard duplex



Photo 9 : Résultat de la PCR de détection de co-infection chez les lémuriens avec les amorces *rPlu5/rPlu6* et *LDR1/LDR2* (Source : URP)

Légende :

- M* : marqueur de taille (100-bp)
- C 1* : ADN de microfilaire + ADN de *Plasmodium 3D7*
- C 2* : ADN de *Plasmodium 3D7*
- C 3* : ADN de microfilaire
- B* : blanc (H_2O)
- L 1* à *L 5* : ADN de lémuriens

La co-infection filariose/paludisme chez les lémuriens est recherchée par PCR conventionnelle duplex (Photo 9).

L'amplification du contrôle positif *P. falciparum 3D7* seul et du contrôle positif des microfilaires seul donne une bande spécifique (voir C2 et C3) tandis que le signal d'amplification de la co-infection artificielle diminue (voir C1).

Aucune bande spécifique n'est nettement visible pour les amplicons provenant des lémuriens.

III.6.3. Résultats de la PCR en temps réel simple

III.6.3.1. Recherche de *Plasmodium*

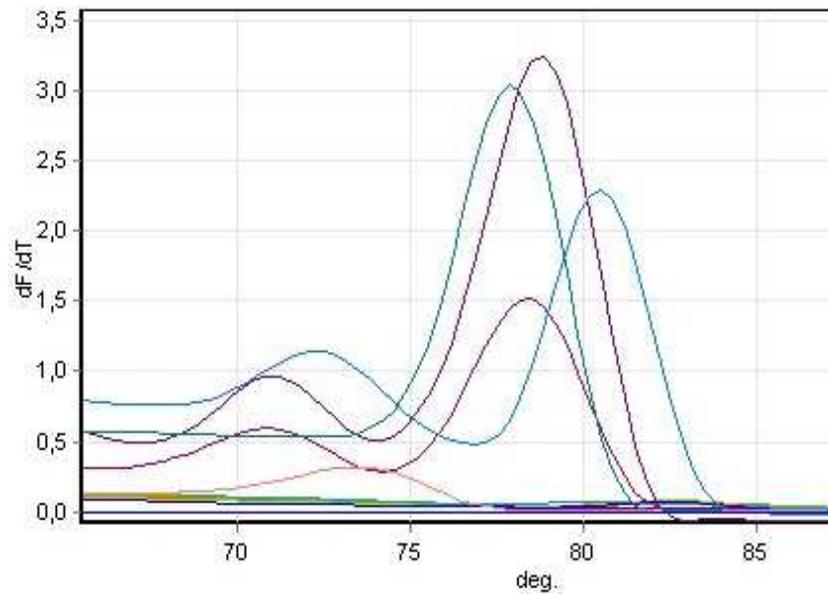


Figure 13 : Courbe de fusion des témoins des 4 espèces de *Plasmodium* et de tous les échantillons de lémuriens (Source : URP)

Légende :

Couleur	Nom	Pic
Blanc	Blanc	-
Blue	Témoins négatif	-
Teal	<i>P. falciparum</i>	77,8
Magenta	<i>P. malariae</i>	78,4
Purple	<i>P. ovale</i>	78,7
Light Blue	<i>P. vivax</i>	80,3
Yellow-Green	L 1	-
Teal	L 2	-
Light Green	L 3	-
Brown	L 4	-
Red	L 5	-

La recherche de *Plasmodium* dans les échantillons de lémuriens par la PCR en temps réel se révèle négative : leur courbe de fusion respective ne présente aucun pic correspondant à la température de fusion des contrôles positifs (Figure 13).

III.6.3.2. Recherche de *Wuchereria bancrofti*

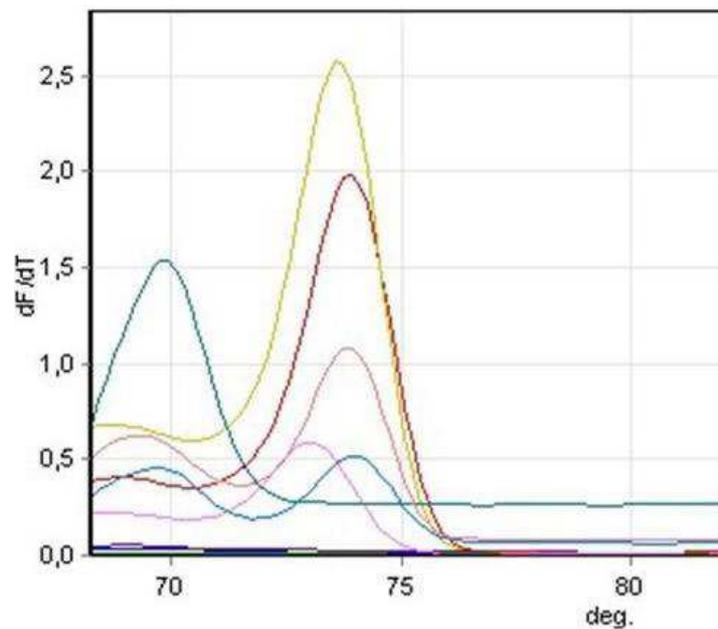


Figure 14 : Courbe de fusion des témoins en *Wuchereria bancrofti* et de tous les échantillons de lémurien (Source : URP)

Légende :

Couleur	Nom	Pic
■	Blanc	-
■	Témoin négatif	-
■	OMS 1	73,8
■	OMS 2	73,7
■	L 1	73
■	L 2	73,9
■	L 3	-
■	L 4	73,8
■	L 5	-

La visualisation des courbes de fusion des témoins (contrôles positifs de *Wuchereria bancrofti*) et de tous les échantillons de lémurien met en évidence les maxima identiques entre les températures de fusion des témoins positifs et des échantillons L02 et L04 (Figure 14).

Afin de vérifier la taille des amplicons, tous les produits de cette PCR en temps réel pour la recherche de *Wuchereria bancrofti* ont ensuite été déposés sur gel d'agarose (Photo 10).

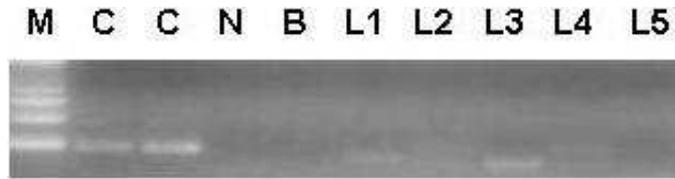


Photo 10 : Résultat de la migration sur gel d'agarose des produits de RT-PCR pour la détection de microfilaires chez les lémuriens (Source : URP)

Légende :

- M : marqueur de taille (100-bp)*
- C : ADN de microfilaire (contrôle positif)*
- N : ADN de Plasmodium (contrôle négatif)*
- B : blanc (H₂O)*
- L 1 à L 5 : ADN de lémuriens*

Des bandes présentant la même taille de 100 bp que les contrôles positifs de *Wuchereria bancrofti* sont perceptibles pour les amplicons de L 2 et L 4.

Les ADN purifiés de ce gel d'agarose (Photo 10) ont été ré-amplifiés.

Les modifications du protocole mettent en évidence que les conditions optimales sont obtenues avec 1,5 µl d'ADN et une concentration d'amorces à 2,5 mM.

La bande spécifique de 100 pb pour L 2 et L 4 reste visible dans tous les cas (Photos 11 et 12).

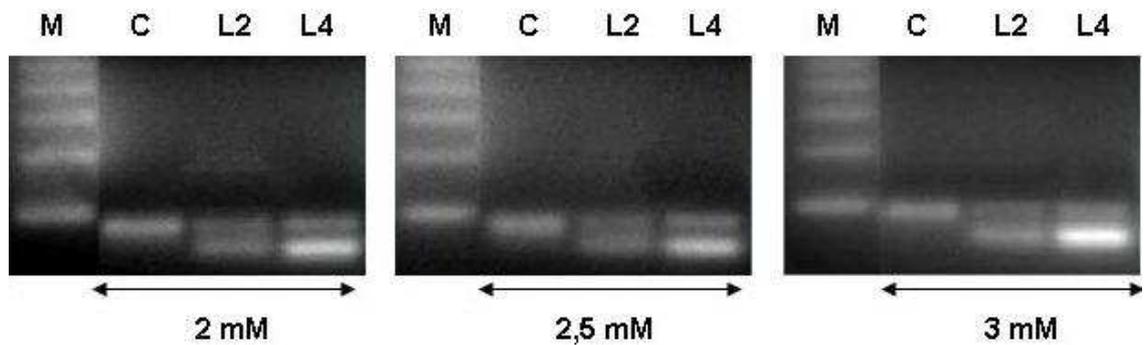


Photo 11 : Résultat de la PCR avec la variation de concentration en $MgCl_2$

(Source : URP)

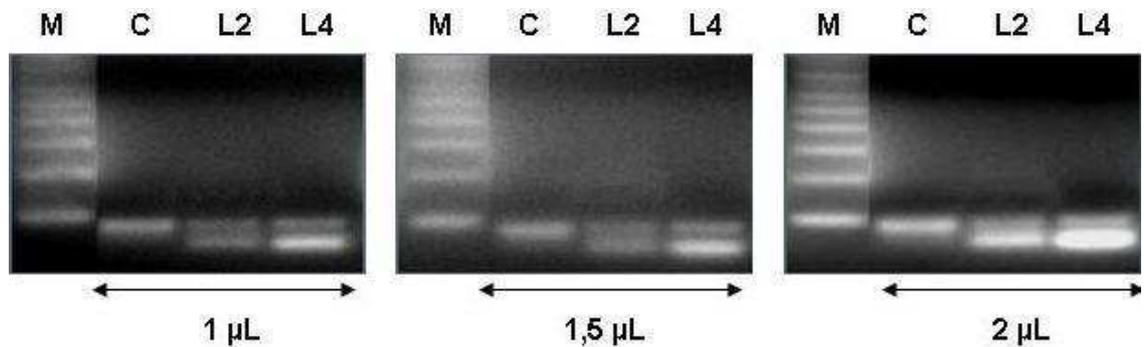


Photo 12 : Résultat de la PCR avec la variation du volume d'ADN

(Source : URP)

Légende :

- M* : marqueurs de taille (100-bp)
- C* : ADN de microfilaire (contrôle positif)
- L 2* : ADN ré-amplifié du lémurien ID n°2
- L 4* : ADN ré-amplifié du lémurien ID n°4

Tous les amplicons des ADN de lémuriens (ID n°2 et n°4) ont été extraits du gel, mélangés, dilués et ré-amplifiés dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant les amorces *LDR1/LDR2*.

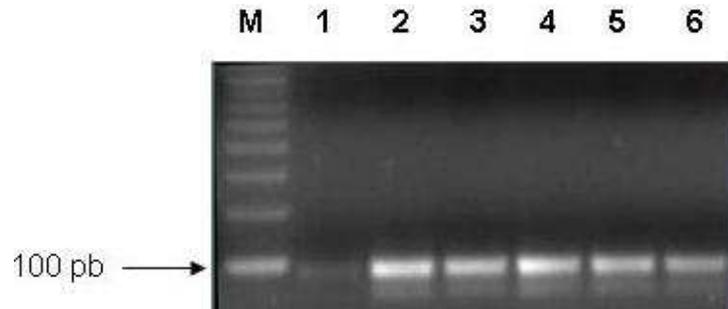


Photo 13 : Résultat de la PCR des produits ré-amplifiés à différentes dilutions, avec les amorces *LDR1/LDR2* (Source : URP)

Légende :

- M : marqueurs de taille (100-bp)*
- 1 : ADN ré-amplifié (1/1)*
- 2 : ADN ré-amplifié (1/100)*
- 3 : ADN ré-amplifié (1/200)*
- 4 : ADN ré-amplifié (1/400)*
- 5 : ADN ré-amplifié (1/800)*
- 6 : ADN ré-amplifié (1/1000)*

Le fragment de 100 pb est visible pour l'ensemble des 6 produits ré-amplifiés (Photo 13). Seule la bande du produit non dilué du puits n°1 est moins visible.

Les produits de PCR ré-amplifiés au 1/100^{ème} (voir puits n°2) pourront servir de **contrôle positif** pour les ultérieures mises au point de la recherche d'ADN de microfilaires chez les lémuriens.

IV. DISCUSSION

IV.1. Méthodes

IV.1.1. Microscopie et TDR

Pour le diagnostic du paludisme, la méthode de référence selon l'OMS reste la recherche des plasmodies par l'examen microscopique des frottis sanguins à grossissement 100x. L'observation des microfilaires est réalisée à magnitude 40x.

Si la goutte épaisse et le frottis sont de faible coût et nécessitent peu de matériels, ils requièrent toutefois de l'expérience de technicien qualifié ayant acquis la connaissance de la morphologie des parasites afin d'éliminer les diagnostics différentiels (babésies, artéfacts ...). La microscopie est également exigeante en temps dans le cas d'une faible parasitémie, d'une infection mixte, ou en cas de traitement incomplet donnant des formes altérées de parasites. Elle sous-estime les cas de co-infections plasmodiales (60).

Une large gamme de TDR pour le paludisme est disponible. Ils permettent la détection de *pLDH* (*parasite Lactate Dehydrogenase*) de toutes les espèces de *Plasmodium*, ou la détection de *HRP2* (*Histidin Rich Protein 2*) spécifique de *P. falciparum*, et même les deux simultanément. Des TDR qui détectent tous les isotypes d'anticorps spécifique à *P. falciparum* et *P. vivax* existent également (61). Pour la détection de microfilaires, des TDR spécifiques peuvent détecter les immunoglobulines tandis que d'autres détectent les antigènes de microfilaires dans le sang (62).

IV.1.2. Extraction de l'ADN génomique

La qualité de la recherche dépend directement de la qualité des prélèvements biologiques. Du matériel stérile et à usage unique diminue le risque de contamination microbiologique. Les prélèvements étaient du sang total.

La technique d'extraction d'ADN est maîtrisée. Deux différents kits ont été utilisés suivant les prélèvements (sang ou gel d'agarose). L'extraction a été réalisée avec une méthode manuelle à l'aide des kits *QIAamp DNA Blood Mini Kit* et *QIA quick gel extraction kit*. Les substances (éthanol ...) qui peuvent inhiber l'activité des enzymes polymérase doivent être si possible totalement éliminées.

Les culots sanguins ont été conservés et peuvent être extraits de nouveau en cas de besoin.

IV.1.3. PCR classique et PCR en temps réel

Le groupe de Myjak a mis en évidence la spécificité améliorée de la PCR par rapport au diagnostic microscopique du paludisme (63). La PCR réduit le temps de diagnostic des hémoparasites pour des dizaines d'échantillons en parallèle (37).

Même si la PCR a été critiquée en raison de son coût, c'est un outil utile pour l'estimation de l'endémicité de la filariose lymphatique humaine (64). Rao (65) souligne que les coûts pour l'instrumentation et les réactifs pour la PCR en temps réel sont en baisse au fil du temps, et les recherches visent à optimiser les méthodes pour réduire les coûts.

Tableau VII : Comparaison de la PCR classique à la PCR en temps réel utilisant le SYBR Green I (50)

	PCR classique	PCR en temps réel
Principe	Amplification cyclique d'un fragment d'ADN basée sur une réaction enzymatique	
Détection	Finale	A chaque élongation
Spécificité	- Amorces - Taille des amplicons	- Amorces - T_m des amplicons
Rapidité	1 à 2h sans la révélation	30 à 60 minutes
Reproductibilité	Bonne	Excellente
Quantification	Non	Oui
Avantages		- Insensibilité aux mésappariements - Facile
Inconvénients	Risque élevé de contamination	Pas de spécificité lors de la fluorescence
Application	Détection des produits amplifiés	Détection et quantification des produits amplifiés

En comparant la PCR conventionnelle, le délai d'exécution rapide de la RT-PCR est un avantage majeur : elle permet d'obtenir une identification immédiate des espèces donc de diminuer le temps de révélation. Le diagnostic en temps réel est capable de reconnaître plusieurs espèces avec des sensibilités de l'ordre du parasite par microlitre.

Cette sensibilité a été confirmée avec la détection de la microfilarémie chez des sujets humains porteurs d'un faible nombre de microfilaires (25). En outre, la RT-PCR présente l'avantage de diminuer les risques de contamination des échantillons par élimination des manipulations post-PCR (Tableau VII).

IV.1.4. Optimisation de la PCR

Le but de cette étude est de mettre au point une méthode PCR permettant la détection de l'ADN des hémoparasites dans les échantillons de terrain. Des essais de PCR classique (simplex et duplex) et de RT-PCR ont été développés pour détecter l'ADN de *Wuchereria bancrofti* et/ou de *Plasmodium*.

IV.1.4.1. Amplification de l'ADN par PCR

IV.1.4.1.1. Variation de la stringence du milieu réactionnel

La stringence est la capacité qu'a un ensemble de conditions d'une réaction à agir sur le processus d'appariement de l'ADN. Si la stringence est élevée, l'appariement de l'ADN est plus difficile. La concentration en $MgCl_2$ peut varier lors de la mise au point du test car l'ion Mg^{2+} est nécessaire au bon fonctionnement de la Taq polymérase et à la stabilisation des dNTPs. Des gammes de $MgCl_2$ ont été réalisées pour pouvoir optimiser les conditions expérimentales (Photo 11). La diminution de la concentration en $MgCl_2$ limite les appariements non spécifiques et augmente les chances de fixation de l'amorce à la séquence ciblée (donc de l'intensité du signal voulu). En outre, l'augmentation de température d'hybridation renforce le signal spécifique tout en limitant l'apparition de bandes non spécifiques qui gênent la lecture des gels.

IV.1.4.1.2. Choix des amorces et variation de leurs concentrations

Deux lots d'amorces différents ont été utilisés pour détecter *Wuchereria bancrofti*. Rao et al. (65) ont montré que l'efficacité des amorces *NV1/NV2* utilisées pour la RT-PCR n'est pas idéale contrairement aux résultats rapportés par Lulitanond (66). Dans un autre travail, les résultats de Rao (55) avaient démontré que *LDR1/LDR2* permettait d'effectuer des amplifications par PCR en temps réel.

Pour la PCR classique, l'optimisation des conditions de PCR s'est déroulée uniquement avec les amorces *LDR1/LDR2*. Différentes concentrations en amorces ont été testées (Photo 6).

Les amorces *rPlu5/rPlu6* principalement utilisées en PCR nichée (67) amplifiant la plupart des espèces de *Plasmodium*, ont été choisies ici pour détecter *Plasmodium* en PCR classique. Pour les réactions de RT-PCR, le protocole choisi a été décrit par Mangold (56), utilisant une seule paire d'amorces pour une unique réaction en 3 heures, comprenant la préparation des mix, l'amplification et la détection.

IV.1.4.1.3. Volume d'ADN

Les tests menés par Rao (55) ont montré qu'en variant les concentrations d'ADN dans les réactions duplex, les faibles concentrations d'ADN d'une cible ne sont pas détectées lorsque la concentration d'ADN de l'autre cible est en excès (Photo 9). Toutefois, les concentrations élevées d'ADN utilisées et responsables des interférences ne sont pas susceptibles d'être rencontrées dans les échantillons récoltés sur le terrain.

IV.1.4.1.4. Variation des cycles d'amplification

La programmation des cycles a varié au cours de la mise au point du test. En PCR classique, les durées des étapes de dénaturation initiale et d'élongation finale sont toujours restées identiques à savoir 5 minutes et 10 minutes respectivement.

Une des causes principales d'échec de la PCR peut être une mauvaise séparation des brins d'ADN cibles lors des premiers cycles. Un compromis doit être alors trouvé entre une forte température de dénaturation et la perte d'activité de l'enzyme lors de température trop élevée. Ainsi, l'augmentation de température de la phase d'hybridation (de 50 à 56°C) a permis une meilleure fixation des amorces sur l'ADN et donc une meilleure amplification des fragments attendus (Tableau IV). La durée d'élongation a été fixée à 2 minutes. Le nombre de cycles a aussi été modifié pour favoriser les signaux les plus faibles : 40 cycles pour la PCR conventionnelle simplex et 35 pour la mutliplex (Photos 6 et 9).

IV.1.4.2. Révélation des produits amplifiés

La PCR classique nécessite la visualisation et l'interprétation des amplifications sur gels d'agarose. Certaines situations laissent un doute lorsque l'intensité des bandes positives reste très faible. Dans cette étude, deux gels de migration différents ont été utilisés : le gel d'agarose à 2,5% et le gel polyacrylamide recommandé pour la migration de petits fragments. Aucune différence majeure de résultats de migration n'a été observée entre ces deux types de gels (Photos 4 et 5).

La PCR est compatible avec de nombreux colorants spécifiques des doubles brins d'ADN comme le bromure d'éthidium et le SYBR Green I (49, 68). Ces colorants sont facilement disponibles et la synthèse de sonde n'est pas nécessaire. Si un colorant de double brin d'ADN est inclus dans la PCR, une augmentation de fluorescence en fonction du nombre de cycle est observée (49). En RT-PCR, l'utilisation du SYBR Green I permet une meilleure discrimination entre les différentes espèces (56) (Figure 11). La génération et la détection du signal fluorescent sont réalisées dans un tube fermé au cours de la réaction. Les produits peuvent être différenciés au cours de l'amplification par l'analyse des courbes de fusion (69) (Figure 14).

IV.2. Résultats des PCR

Une compétition est toujours présente lors des réactions PCR entre les échantillons et les réactifs PCR ; les amorces en particulier d'autant plus lorsque plusieurs lots d'amorces sont prévus. Les résultats reportés montrent la compatibilité des différents lots d'amorces (Photos 6 et 9).

La sensibilité correspond à l'intensité des différentes bandes. Pendant la mise au point de notre test, la sensibilité a été variable en fonction des conditions de PCR utilisées. Le fragment à 1200 pb a toujours été bien visible. Par contre, l'obtention du signal à 100 pb a été plus difficile. La sensibilité de la PCR doit être encore améliorée.

La spécificité correspond à la fixation correcte des amorces aux endroits attendus. Un manque de spécificité peut avoir comme origine l'hybridation non spécifique des amorces sur une partie du génome non ciblée ou l'hybridation des amorces entre elles (dimérisation). Lors de la mise au point, des bandes non-spécifiques sont apparues. Avec la modification des conditions expérimentales, elles ont presque été toutes effacées sauf une bande vers 100 pb qui persiste mais ne gêne pas la lecture du gel (Photos 11 et 12).

L'optimisation de la réaction classique a permis de détecter des bandes spécifiques distinctement séparées des dimères d'amorces. Les bandes spécifiques révélées sur gel correspondent à la taille du fragment d'ADN amplifié attendu pour *W. bancrofti* (Photo 5). Les réactions PCR avec les ADN servant de contrôles positifs ainsi que les contrôles négatifs garantissent les règles de spécificité et les craintes de contamination lors de la détection (Photo 10 et Figure 13).

Dans le cadre de cette étude, les réactions PCR établies à partir des prélèvements sanguins de lémurien (L2 et L4) ont permis de mettre en évidence un signal correspondant à *Wuchereria bancrofti*. Des interrogations subsistent encore sur l'identité véritable de ces bandes tant que la vérification par séquençage n'est pas réalisée mais la présence de ces bandes ouvre la réflexion autour du cycle des filaires chez les animaux sauvages, leurs rôles et ingénierie vis-à-vis de celui de l'homme. L'ADN de ces hémoparasites pourrait être cloné permettant de disposer de matériels en suffisance pour les étapes ultérieures de l'analyse et apporter quelques éléments de réponses. D'autres mises au point sont encore nécessaires plus tard pour standardiser le protocole des PCR simplex et multiplex.

Toutefois, comparé à la négativité de la recherche du *Plasmodium* et de *Wuchereria bancrofti* par la microscopie et par le TDR chez les 5 lémurien, le résultat de la PCR démontre que cette méthode de diagnostic est techniquement dotée d'une plus grande sensibilité et de spécificité.

V. SUGGESTIONS

La qualité des échantillons dépend de leur conditionnement. Le prélèvement de sang sur papier filtre, séché et conservé, trouve ainsi ici toute sa place et mérite d'être développé pour remplacer le prélèvement de sang total sur tube EDTA qui nécessite une température constante de +4°C. La conservation à température ambiante est possible avec l'ajout d'un dessiccant qui allège les contraintes liées au transport et au conditionnement. Dans la recherche des plasmodies et des microfilaires, le diagnostic moléculaire à partir de l'ADN extrait des confettis contenant du sang périphérique montre une positivité supérieure parmi les échantillons et offre par la même occasion une commodité dans le cadre de la surveillance du paludisme et de la filariose lymphatique (70, 71).

La détection simultanée de plusieurs hémoparasites en une seule réaction est prometteuse dans l'évaluation voire l'élimination des maladies, en passant par la recherche des réservoirs éventuels. Elle permet de réduire le temps de travail et le coût des réactifs tout en minimisant le risque de contamination. La standardisation d'une réaction PCR multiplex efficace, fiable et répliquable devient nécessaire servant d'outil de diagnostic pour vérifier si les cas de co-infection sont courants ou non dans les régions où une superposition de la distribution géographique de ces deux maladies est observée (3). Toutefois, une quantification de l'ADN détecté par chacun des lots d'amorces dans cette réaction PCR multiplex devrait encore être effectuée afin de déterminer leur seuil de sensibilité.

Il est primordial d'évaluer le risque pour les gens habitant les villages dans ou avoisinant les réserves naturelles, les employés des parcs et pour toutes les personnes en contact avec les animaux sauvages ou vivant en semi-liberté si leurs microfilaires peuvent être infestantes pour l'homme. Il faudra alors rechercher la présence de microfilaires dans des échantillons de sang de la faune locale (animaux domestiques, lémuriens, carnivores sauvages) ayant des rapports étroits avec l'homme et les habitations humaines.

Une étude a mis en évidence, chez des lémuriens de la famille des *Lemuridae*, des microfilaires (dont la position taxonomique reste encore à identifier), des cas de portage de *Plasmodium* et un cas de co-infection par diagnostic microscopique (72). Toutefois, les recherches sur les plasmodies des primates en particulier des lémuriens, à

Madagascar, doivent encore être poursuivies et approfondies pour évaluer les risques d'une zoonose émergente probable (73).

Ce travail servira alors d'outil dans le suivi de l'impact des infestations de la faune sauvage sur la santé publique comme l'existence d'un risque probable de zoonose de paludisme et l'éventualité des lémuriens à être des réservoirs potentiels de *Wuchereria bancrofti*. Un suivi de l'infection parasitologique de ces animaux devrait être prévu avec la mise en place d'un traitement adapté. En outre, l'idéal serait que les lignes directrices relatives de lutte contre le paludisme et l'élimination de la filariose lymphatique dont la prise en charge et les moyens de dépistage devraient être réexaminées en considérant la co-infection et les réservoirs éventuels, notamment lors des délocalisations.

A long terme, la création d'un centre de référence vétérinaire pouvant utiliser les technologies modernes comme la PCR en temps réel permettrait de surveiller les parasitoses, les viroses et autres zoonoses, particulièrement celles qui sont émergentes. Ce laboratoire de recherche aura pour missions entre autres la surveillance des principales maladies animales et zoonotiques, la recherche de la bio-écologie des vecteurs, le développement d'outils de diagnostic sensibles, spécifiques, rapides et à moindre coût pour mieux suivre l'évolution de ces maladies et améliorer les mesures de prophylaxie.

CONCLUSION

Le paludisme et la filariose sont des maladies graves et importantes parce que leur lutte doit intégrer les problèmes scientifiques aux données financières.

Le frottis sanguin est le premier examen pour mettre en évidence les hémoparasites. Il est simple et rapide mais conduit à de nombreux faux négatifs. Les TDR peuvent manquer de sensibilité. La technique de choix pour détecter les hémoparasites est la PCR. Elle possède une excellente sensibilité et une très bonne spécificité même en cas de faible parasitémie. Dans la présente étude, deux cas révélés négatifs en *Wuchereria bancrofti* chez les lémuriens par la microscopie et le TDR s'avèrent positifs avec l'optimisation de la PCR notamment la variation des cycles d'amplification, de la concentration en amorces et du volume d'ADN.

Les PCR occupent de nos jours une importance capitale dans le contrôle et le diagnostic du paludisme et de la filariose lymphatique. Toutefois, elle présente un sérieux handicap en raison de son coût élevé, ce qui réduit par conséquent son usage. Le développement d'une PCR unique amplifiant simultanément les *Plasmodium* et *Wuchereria bancrofti* est une option pour trouver un compromis entre un diagnostic sensible, spécifique et à coût raisonnable.

Un clonage des ADN de hémoparasites de lémuriens, après confirmation par séquençage des résultats de ce travail, permettrait de préparer des contrôles positifs facilitant la détection spécifique chez les lémuriens.

De nouvelles études devraient être menées ultérieurement afin de préciser davantage les modalités de l'infection des lémuriens au paludisme et à la filariose lymphatique. Il faut en particulier approfondir notre connaissance sur l'épidémiologie de ces deux maladies chez la faune sauvage malgache.

BIBLIOGRAPHIE ET WEBOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

3. OMS. Position de l'OMS concernant la gestion intégrée des vecteurs pour lutter contre le paludisme et la filariose lymphatique. Relevé épidémiologique hebdomadaire 2011;86:121-126.
4. Grassé PP. Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie. Masson, Paris 1953,1160.
5. Raharimanga V, Ariey F, Cardiff S, Goodman S, Tall A, Rousset D. Hemoparasites of bats in Madagascar. Arch Inst Pasteur Madagascar 2003;69:70-76.
6. Chabaud AG, Choquet MT. Two nematode parasites of lemurs. Ann Parasitol Hum Comp 1955;30:329-338.
7. Mittermeier RA, Louis EE, Richardson M, Schwitzer C, Langrand O, Rajaobelina S et al. Lemurs of Madagascar. Conservation International 2010,767.
8. Mittermeier R, Konstant WR, Hawkins F, Louis EE et al. Lemurs of Madagascar. Second Edition. Conservation International, United States 2006,520.
13. Sabbatani S, Fiorino S. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? Braz J Infect Dis 2010;14:299-309.
14. Manguin S, Carnevale P, Mouchet J, Coosemans M, Julvez J, Richard-Lenoble D et al. Biodiversity of Malaria in the World. John Libbey Eurotext 2008,464.
15. Gaüzère BA, Aubry P, Simon B. 2006. Conseils de santé pour les délégués se rendant à Madagascar. Croix-rouge française 2006,8.
17. Kaup FJ, Schwibbe M. Primates as experimental animals. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2002;109:104-108.
18. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D et al. Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eurotext Edition 2004, 428.

19. Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The primate malarias. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Washington DC 1971,366.
20. Cogswell FB. Malaria and Piroplasms of Non-Human Primates. Bowman DD Edition, Companion and Exotic Animal Parasitology 2000.
22. Collins WE, McClure HM, Strobert E, Filipski V, Skinner JC, Stanfill PS et al. Infection of chimpanzees with the Uganda I/CDC strain of *Plasmodium malariae*. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:99-103.
23. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. *OIE* 2005;3.
25. Peters W. Malaria of the orang-utan (*Pongo pygmaeus*) in Borneo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1976;275:439-482.
27. Champetier De Ribes G, Ranaivoson G, Rakotonjanabelo A, Radoerimanana R, Rabeson D. La filariose de Bancroft à Madagascar: une endémie persistante. *Médecine Tropicale* 2000;60:141-145.
28. Galliard H, Brygoo P, Golvan Y. Description of the microfilaria of *Wuchereria bancrofti vauceli*. *Ann Parasitol Hum Comp* 1955;30:481-487.
29. Manguin S, Bangs MJ, Pothikasikorn J, Chareonviriyaphap T. Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infection, Genetics and Evolution* 2010;10:159-177.
30. Ambily VR, Pillai UN, Arun R, Pramod S, Jayakumar KM. Detection of human filarial parasite *Brugia malayi* in dogs by histochemical staining and molecular techniques. *Vet Parasitol* 2011;181:210-214.
31. Snowden KF, Hammerberg B. The lymphatic pathology of chronic *Brugia pahangi* infection in the dog. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:670-678.
32. Denham DA, Fletcher C. The cat infected with *Brugia pahangi* as a model of human filariasis. *Ciba Found Symp* 1987;127:225-235.

33. Hamon J, Burnett GF, Adam JP, Rickenbach A, Grjebine A. *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, *Wuchereria bancrofti* Cobbold and the economic development of tropical Africa. Bull World Health Organ 1967;37:217-237.
34. Junge RE, Park zoologique de Saint Louis. Communication personnelle 2000.
36. Raina VK, Joshi MC, Singh S, Joshi RD, Bhattacharjee KK, Kumar A et al. Epidemiology of *Brugia malayi* infection and its co-existence with *Wuchereria bancrofti* in and around Sillaberia PHC, District Midnapur, West Bengal. J Commun Dis 1990;22:205-208.
37. Mishra K, Raj DK, Hazra RK, Dash AP, Supakar PC. The development and evaluation of a single step multiplex PCR method for simultaneous detection of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. Mol Cell Probes 2007;21:355-362.
38. Schuurkamp GJ, Matango M, Kereu R, Napil J. Malaria, splenomegaly and filariasis in the Ok Tedi area of the Star Mountains, Papua New Guinea, three years after residual DDT spraying. P N G Med J 1987;30:291-300.
40. Ribot JJ, Blancou J, Razafindrakoto D. Les tuberculoses des animaux à Madagascar. Terre malgache 1972,13:143-162.
41. Volney B, Pouliquen JF, de Thoisy B, Fandeur T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. Acta Trop 2002;82:11-23.
42. Fandeur T, Volney B, Peneau C, de Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum/P. malariae* malaria. Parasitology 2000;120:11-21.
43. Ambily VR, Pillai UN, Arun R, Pramod S, Jayakumar KM. Detection of human filarial parasite *Brugia malayi* in dogs by histochemical staining and molecular techniques. Vet Parasitol 2011;181:210-214.
44. Tan LH, Fong MY, Mahmud R, Muslim A, Lau YL, Kamarulzaman A. Zoonotic *Brugia pahangi* filariasis in a suburbia of Kuala Lumpur City, Malaysia. Parasitol Int 2011;60:111-113.

46. Griffith B, Scott JM, Carpenter JW, Reed C. Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science* 1989;245:477-480.
47. Leighton FA. Health risk assessment of the translocation of wild animals. *Rev Sci Tech* 2002;21:187-195.
49. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology, New York* 1992;10:413-417.
50. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology* 2002;2:2-11.
51. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
53. Ekala MT, Lekoulou F, Djikou S, Dubreuil G, Issifou S, Ntoumi F. Evaluation of a simple and rapid method of *Plasmodium falciparum* DNA extraction using thick blood smears from Gabonese patients. *Bull Soc Pathol Exot* 2000;93:8-11.
54. Zhong M, McCarthy J, Bierwert L, Lizotte-Waniewski M, Chanteau S, Nutman TB et al. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:357-363.
55. Rao RU, Huang Y, Bockarie MJ, Susapu M, Laney SJ, Weil GJ. A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:365-370.
56. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium spp.* *J Clin Microbiol* 2005;43:2435-2440.
57. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1990;60:687-692.
60. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 2004;20:233-240.

62. Rocha A, Braga C, Belem M, Carrera A, Aguiar-Santos A, Oliveira P et al. Comparison of tests for the detection of circulating filarial antigen (Og4C3-ELISA and AD12-ICT) and ultrasound in diagnosis of lymphatic filariasis in individuals with microfilariae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:621-625.
63. Myjak P, Nahorski W, Pieniazek NJ, Pietkiewicz H. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:215-218.
64. Farid HA, Hammad RE, Hassan MM, Morsy ZS, Kamal IH, Weil GJ et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:29-32.
65. Rao RU, Atkinson LJ, Ramzy RM, Helmy H, Farid HA, Bockarie MJ et al. A real-time PCR-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in blood and mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:826-832.
66. Lulitanond V, Intapan PM, Pipitgool V, Choochote W, Maleewong W. Rapid detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Parasitol Res* 2004;94:337-341.
67. Genc A, Eroglu F, Koltas IS. Detection of *Plasmodium vivax* by nested PCR and real-time PCR. *Korean J Parasitol* 2010;48:99-103.
68. Ferreira ID, Rosario VE, Cravo PV. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2006;5:1.
69. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-160.
70. Itoh M, Gunawardena NK, Qiu XG, Weerasooriya MV, Kimura E. The use of whole blood absorbed on filter paper to detect *Wuchereria bancrofti* circulating antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998;92:513-515.

71. Al-Harhi SA, Jamjoom MB. PCR assay in malaria diagnosis using filter paper samples from Jazan region, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol* 2008;38:693-706.
72. Safia S. Contribution à l'étude des parasites sanguins des Lémuriens dans le Parc National de Ranomafana dans la zone périphérique. Mémoire de DEA de Biologie, Ecologie parasitaire. Université d'Antananarivo 2005.
73. Duval L, Fourment M, Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh SA, Goodman SM et al. African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the *Laverania* subgenus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:10561-10566.

WEBOGRAPHIE

1. OMS. Paludisme. Aide mémoire N°94 [en ligne]. Avril 2012 [Consulté le 14/06/12].
Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>
2. OMS. Filariose lymphatique. Aide mémoire N°102. [Consulté le 23/08/10].
Septembre 2000 [en ligne]. Disponible sur : <https://apps.who.int/inf-fs/fr/am102.html>
9. Lemurs' Park. [en ligne] Crédit photos : Grandin GF, Teza Tamtam, Lemurs'Park.
[Consulté le 07/04/10]. Disponible sur : <http://www.lemurspark.com/>
10. OMS. Voyages internationaux et santé, situation au 1er janvier 2003 [en ligne].
[Consulté le 08/06/10].
Disponible sur : <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9242580287.pdf>
11. OMS. Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde [en ligne]. [Consulté le
11/06/12]. Disponible sur : http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/wmr2011_summary_keypoints_fr.pdf
12. Institut Pasteur. Le Paludisme. [en ligne]. [Consulté le 02/07/12]. Disponible sur :
[http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses / paludisme](http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/paludisme)
16. Université Virtuelle Médicale Francophone. Paludisme. 2010/2011. [en ligne].
[Consulté le 02/07/12] Disponible sur : [http://umvf.univ-nantes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/ site/html/cours.pdf](http://umvf.univ-nantes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf)
21. Centre National de la Recherche Scientifique - Département des sciences du vivant.
Paludisme 2010 [en ligne]. [Consulté le 02/07/12]
Disponible sur : <http://ethique.ipbs.fr/sdv/paludisme.pdf>
24. Baskin GB. Pathology of Nonhuman Primates. Tulane Regional Primate Research
Center 1999 [en ligne]. [Consulté le 17/05/10]
Disponible sur : <http://pin.primate.wisc.edu/research/vet/pola6-99.html>

26. Université Virtuelle Médicale Francophone. Filarioses humaines. [en ligne]. 2008/2009 [Consulté le 02/07/12]. Disponible sur : <http://umvf.univ-nantes.fr/parasitologie/enseignement/filarioses/site/html/cours.pdf>
35. Impact malaria. Paludisme et co-infections. 2008 [en ligne]. [Consulté le 16/03/10]
Disponible sur : <http://www.impact-malaria.com/iml/cx/fr/layout.jsp?scat=0F90F84C-4E29-4953-BC78-B3F71AA47D00>
39. David JA. Wildlife emerging infectious diseases: what's next? in IVIS with the permission of the North American Veterinary Center. [en ligne] 2007. [Consulté le 28/05/10]. Disponible sur : <http://www.ivis.org/>
45. IUCN, the Commission on Species Survival, the Commission on Ecology, the Commission on Environmental Policy, Law and Administration. IUCN Position Statement on Translocation of Living Organisms: introductions, reintroductions and re-stocking. [en ligne]. 1987. [Consulté le 09/07/12]. Disponible sur : <http://www.iucnsscrg.org/download/IUCNPositionStatement.pdf>
48. Institut Louis Malardé. Déroulement d'un cycle PCR [en ligne]. [Consulté le 10/03/10]. Disponible sur : <http://www.ilm.pf/PCR>
52. CTK Biotech. Présentation du kit CTK IgM/IgG Combo [en ligne]. [Consulté le 09/03/10]. Disponible sur : <http://www.grupomoscaro.com/servicios/Insertos/CTK/ctk%20inserts/R0150C.pdf>
58. Thermocycleur Eppendorf [en ligne]. [Consulté le 03/08/10] Disponible sur : <http://www.eppendorf.com/int/index.php?l=5&sitemap=2.3&pb=fb1d6fa4807355b5&action=products&contentid=1&productpage=11&catalognode=10378>
59. Thermocycleur Corbett [en ligne]. [Consulté le 03/08/10] Disponible sur : <http://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/nucleic-acid/corbett-rotor-gene.php>
61. Standard diagnostics Products. Test de diagnostic rapide de paludisme [en ligne]. [Consulté le 09/07/12].
Disponible sur : http://www.standardia.com/html_e/mn03/mn03_01.asp

VELIRANO

« Eto anatrehan' i Zanahary, eto anoloan'ireo mpikambana ao amin'ny Holafitra Nasionalin'ny Dokotera Veterinera Malagasy sy ireo Mpampianatra ahy, mianiana aho fa hitandro lalandava ary hatraiza hatraiza ny haja amam-boninahitry ny Dokotera Veterinera sy ny asa.

Noho izany dia manome toky ary mianiana aho fa:

- Hanatanteraka ny asako eo ambany fifehezan'ny fitsipika misy ary hanaja hatrany ny rariny sy ny hitsiny.
- Tsy hivadi-belirano amin'ny lalàn'ny voninahitra, ny fahamendrehana, ny fanajana ny rariny sy ny fitsipi-pitondran-tena eo am-panatanterahana ny asa maha-Dokotera Veterinera.
- Hanaja ireo nampianatra ahy, ny fitsipiky ny hai-kanto.
- Hampiseho ny sitraka sy fankatelemana amin'izy ireo ka tsy hivaona amin'ny soa nampianarin'izy ireo ahy.
- Hanaja ny ain'ny biby, hijoro ho toa ny andry hiankinan'ny fiarovana ny fahasalaman'izy ireo sy ho fanatsarana ny fiainany ary hikatsaka ny fivoaran'ny fahasalaman'ny olombelona sy ny toe-piainany.
- Hitazona ho ahy samirery ny tsiambaratelon'ny asako.
- Hiasa ho an'ny fiarovana ny tontolo iainana sy hiezaka ho an'ny fisian'ny fiainana mirindra ho an'ny zavamanan'aina rehetra ary hikatsaka ny fanatanterahana ny fisian'ny rehetra ilaina eo amin'ny fiaraha-monina tsy misy raoraon'ny olombelona sy ny biby.
- Hiezaka ahafehy ireo fahalalana vaovao sy hai-tao momba ny fitsaboana biby ary hampita izany ho an'ny hafa ao anatin'ny fitandroana ny fifanakalozana amin'ny hairaha mifandray amin'izany mba hitondra fivoarana ho azy.

Na oviana na oviana aho tsy hanaiky hampiasa ny fahalalako sy ny toerana misy ahy hitondra ho any amin'ny fahalovana sy hitarika fihetsika tsy mendrika.

Ho toavin'ny mpiara-belona amiko anie aho raha mahatanteraka ny velirano nataoko.

Ho rakotry ny henatra sy horabirabian'ireo mpiray asa amiko kosa aho raha mivadika amin'izany ».

Name and first names : ANDRIANONY Sitraka Arilalaina
Title of thesis : DEVELOPMENT OF PCR TO DETECT MALARIA
AND FILARIASIS IN LEMURS
Topic : Parasitology
Number of pages : 75 **Number of references** : 73
Number of figures : 27 **Number of tables** : 07

SUMMARY

This is a prospective study conducted at the Institut Pasteur de Madagascar (IPM) laboratory from March to August 2010. The aim of this study is to establish a method for detecting *Plasmodium* and *Wuchereria bancrofti* by using simplex and multiplex PCR. Malaria and lymphatic filariasis are two of the most important vector-borne diseases in public health. Those infections are poorly studied in lemurs. Estimation and identification of malaria and filaria species among reservoir hosts (both human and animal) are required to evaluate intervention programs in Madagascar. This approach is based on the PCR, a method used in the reference laboratory at the Unit Malaria Research of IPM. This work consisted in development of the PCR (conventional and in real time with SYBR Green I), the application of the techniques on lemurs' samples, and the evaluation of the PCR performance compared to microscopy and rapid diagnostic test.

The results of this study using molecular amplification techniques revealed two suspected positive cases of filariasis in lemurs which are negative by microscopy and rapid diagnostic test. This suspicion will be confirmed by DNA sequencing and sequence analysis, to reaffirm the role of wildlife as probable reservoirs and sources of human pathogens.

Key words : *Plasmodium*, *Wuchereria bancrofti*, PCR, lemurs
President of thesis : Professor RASAMINDRAKOTROKA Andry
Director of thesis : Professor RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël
Author address : Lot IVD 89 A Behoririka

Nom et prénoms : ANDRIANONY Sitraka Arilalaina
Titre de thèse : MISE AU POINT DE LA PCR POUR DETECTER
LE PALUDISME ET LA FILARIOSE CHEZ LES LEMURIENS
Rubrique : Parasitologie
Nombre de pages : 75 **Nombre de références** : 73
Nombre de figures : 27 **Nombre de tableaux** : 07

RESUME

Il s'agit d'une étude prospective effectuée au laboratoire de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) du mois de mars au mois d'août 2010. L'objectif de ce travail est d'établir une méthode de détection de *Plasmodium* et de *Wuchereria bancrofti* en utilisant les PCR (simplex et mutliplex). Le paludisme et la filariose lymphatique sont deux des plus importantes maladies à transmission vectorielle en santé publique. Ces infections sont peu étudiées chez les lémuriens. L'estimation et l'identification des espèces de plasmodies et de filaires chez les hôtes réservoirs (humain et animal) sont nécessaires pour évaluer les programmes d'intervention à Madagascar. Cette approche peut être basée sur la PCR, méthode utilisée dans le laboratoire de référence de l'Unité de Recherche sur le Paludisme à l'IPM. Ce travail a consisté aux mises au point de la technique PCR (conventionnelle et en temps réel avec le SYBR Green I), l'application des techniques sur des échantillons de lémuriens, et à l'évaluation de la performance de la PCR par rapport à la microscopie et au test de diagnostic rapide (TDR).

Le résultat de cette étude en utilisant des techniques d'amplification moléculaire a révélé deux cas suspects positifs de filariose chez les lémuriens mais négatifs à la microscopie et au TDR. Cette suspicion sera confirmée par le séquençage de l'ADN et l'analyse de séquence, pour réaffirmer le rôle de la faune sauvage en tant que sources et réservoirs probables des agents pathogènes humains.

Mots clés : *Plasmodium*, *Wuchereria bancrofti*, PCR, lémurien
Président de thèse : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry
Directeur de thèse : Professeur RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël
Adresse de l'auteur : Lot IVD 89 A Behoririka