

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للطب البيطري  
ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE VÉTÉRINAIRE - EL HARRACH

MÉMOIRE DE MAGISTÈRE EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES  
Option : Zoonoses Infectieuses ; Diagnostic et Thérapeutique

**Thème**

**Contribution à l'étude de la peste chez les chiens et chats errants dans  
la région d'Alger par la technique d'amplification en chaîne par  
polymérase (PCR)**

**Présenté par : Dr. Sara Zaidi**

**Soutenu publiquement le : 29/04/2012**

**Le jury :**

<b>Président :</b>	<b>BENMEHDI M.</b>	<b>Professeur</b>	<b>(ENSV)</b>
<b>Promoteur :</b>	<b>BITAM I.</b>	<b>Maitre de recherche</b>	<b>(IPA)</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>NAIM M.</b>	<b>Professeur</b>	<b>(FMA)</b>
	<b>AIT OUDHIA K.</b>	<b>Maître de conférences</b>	<b>(ENSV)</b>
	<b>GHALMI F.</b>	<b>Maître de conférences</b>	<b>(ENSV)</b>
	<b>HARHOURA K.</b>	<b>Maître assistant</b>	<b>(ENSV)</b>

*Année Universitaire 2011-2012*

# REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce duquel j'ai pu réaliser ce modeste travail.

- Mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance à mon encadreur, **Docteur Idir BITAM**, maître de recherche à l'institut Pasteur d'Algérie, tout d'abord d'avoir accepté de m'encadrer et son étroite collaboration en mettant à ma disposition son laboratoire tout en restant très attentif à mes doléances.
- Mes vifs remerciements s'adressent au **Professeur Benmehdi**, à l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.
- Mes remerciements s'adressent également au **Professeur Naim**, à la faculté de médecine d'Alger ; aux **Docteurs Ait Oudhia, Ghalmi, et Harhoura**, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger ; d'avoir accepté d'examiner ce travail.
- Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de la partie expérimentale avec leur aide, leur compréhension, et leur encouragement et tout particulièrement :
  - Aux personnels du laboratoire d'écologie des systèmes vectoriels de l'IPA : **Madame Ammara-Korba, Monsieur Kernif, Mlle Beneljouzi, Mlle Malek, Madame Nehmar.**
  - Aux personnels de l'HURBAL et particulièrement **Madame Saidi et Madame Zerouk.**
- Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers **Docteur Slimi**, chargé de la lutte contre les zoonoses au Ministère de la Santé, qui a accepté de me recevoir et répondre à mes questionnements.
- Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué de loin ou de prêt à la réalisation de ce travail.



## ***DEDICACES***

*À mon papa..*

*Qui m'a inculqué l'amour de la science et du savoir*

*À ma maman..*

*Pour sa patience, pour ses encouragements et d'être proche de moi tout au long de ma scolarité*

*À mes deux frères Lakhdar et Aghiless, à ma sœur Lynda..*

*Que j'aime énormément,*

*À Lyès Schiff..*

*Pour tous les merveilleux moments passés en sa compagnie et pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses précieux conseils,*

*À ma meilleure amie Amina Bessas..*

*Pour son amitié, son soutien, sa présence au prêt de moi dans les moments de joie et de peine,*

*À ma très chère amie Maha Makhroudja..*

*Avec qui j'ai passé des moments agréables et inoubliables,*

*À tout(e)s mes ami(e)s,*

*À toutes ma famille, oncles, tantes, cousins et cousines,*

*À tout mes enseignants avec un grand remerciement.*



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>3</b>
<b>I. Historique de la maladie</b> .....	<b>3</b>
<b>II. Bactériologie</b> .....	<b>5</b>
<b>III. Pathogénie</b> .....	<b>7</b>
<b>IV. Epidémiologie</b> .....	<b>8</b>
IV.1. Epidémiologie descriptive .....	8
IV.1.1. Répartition géographique .....	8
IV.1.2. Réémergence récente de la peste .....	9
<b>IV.2. Epidémiologie analytique</b> .....	<b>10</b>
IV.2.1. Sources d'infection et transmission .....	10
IV.2.2. Réservoirs et vecteurs de la peste .....	12
IV.2.2. Réservoirs de la peste .....	12
IV.2.2. Vecteurs de la peste .....	16
<b>V. Clinique</b> .....	<b>18</b>
V.1. La maladie chez l'homme .....	18
V.2. La maladie chez l'animal .....	18
<b>VI. Diagnostic</b> .....	<b>19</b>
VI.1. Diagnostic direct .....	20
VI.2. Diagnostic indirect .....	21
<b>VII. Moyens de lutte</b> .....	<b>22</b>
VII.1. Traitement .....	22
VII.2. Prévention .....	23
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>26</b>
<b>MATERIELS</b> .....	<b>26</b>
<b>I. Matériels biologiques</b> .....	<b>26</b>
I.1. Lieu et période de l'étude .....	26
II.1.1. Collecte de prélèvements .....	26
II.1.2. Analyse des prélèvements .....	27
I.2. Animaux .....	27
I.3. Types de prélèvements .....	27
I.4. Fiche de renseignement .....	27

<b>II.</b>	<b>Matériels non biologique</b>	<b>28</b>
II.1.	Matériels de mission sur terrain	28
II.1.1.	Matériels de protection personnelle	28
II.1.2.	Matériels de prélèvements d'organes	28
II.2.	Matériels de laboratoire	28
II.3.	Les réactifs et produits chimiques	28
<b>METHODES</b>		<b>29</b>
<b>I.</b>	<b>Prélèvements d'organes</b>	<b>29</b>
I.1.	Techniques de prélèvements	29
I.1.1.	Rappel anatomique	29
I.1.2.	Préparation du matériel	30
I.1.3.	Préparation de l'animal	31
I.1.4.	Prélèvement de la rate	31
I.2.	Techniques de conservation des organes	32
I.2.1.	Transport des prélèvements	32
I.2.2.	Conservation proprement dite	33
<b>II.</b>	<b>Protocole de la PCR</b>	<b>33</b>
II.1.	Historique	33
II.2.	Principe	33
II.3.	Méthode	34
II.3.1.	Première étape « Protocole d'extraction d'ADN »	34
II.3.2.	Seconde étape « PCR proprement dite »	43
II.3.2.1.	Préparation du mix	43
II.3.2.2.	L'ajout des ADN aux mix	47
II.3.2.3.	Programmation du thermocycleur	48
II.3.3.	Troisième étape «électrophorèse et révélation»	50
II.3.3.1.	Préparation du gel d'Agarose 1.5%	51
II.3.3.2.	Coulage des gels dans la cuve électrophorèse horizontale	52
II.3.3.3.	Le dépôt des échantillons dans le gel et leur migration	53
II.3.3.4.	Visualisation (lecture) par Transilluminateur	55
<b>III.</b>	<b>Analyse statistique</b>	<b>55</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>		<b>56</b>
<b>I.</b>	<b>Migration des échantillons sans amplification</b>	<b>56</b>
<b>II.</b>	<b>La recherche des agents pathogènes</b>	<b>57</b>
II.1.1.	Chez l'espèce féline	57

II.1.2. Chez l'espèce canine .....64

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....67**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXES**

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Distribution géographique des cas de peste, région d'Oranie, juin-juillet 2003 .....	5
<b>Figure 2</b> : Colonies de <i>Yersinia pestis</i> après culture sur une gélose CIN .....	6
<b>Figure 3</b> : Clonies de <i>Yersinia pestis</i> sur gélose au sang après 72 heures d'incubation .....	6
<b>Figure 4</b> : Schéma de la pathogénie de <i>Yersinia pestis</i> .....	8
<b>Figure 5</b> : Distribution géographique de la peste dans le monde .....	9
<b>Figure 6</b> : Voies de transmission de la peste .....	12
<b>Figure 7</b> : Certaines espèces de puces qui peuvent jouer le rôle de vecteurs pour <i>Yersinia pestis</i> .....	17
<b>Figure 8</b> : La forme bipolaire de <i>Yersinia pestis</i> sous microscopie .....	20
<b>Figure 9</b> : Anatomie interne du chat et du chien indiquant la position de la rate .....	29
<b>Figure 10</b> : Désinfection du matériel par autoclavage .....	30
<b>Figure 11</b> : Etiqueter les tubes à vice selon la fiche de renseignements correspondante .....	30
<b>Figure 12</b> : Etapes du prélèvement de la rate .....	32
<b>Figure 13</b> : Transport des prélèvements sous froid .....	32
<b>Figure 14</b> : Vérification des étiquettes et conservation des échantillons dans l'alcool .....	33
<b>Figure 15</b> : Réactifs du Kit QIA amp utilisés pour l'extraction d'ADN .....	34
<b>Figure 16</b> : Décontamination du matériel sous UV .....	35
<b>Figure 17</b> : Etapes de préparation des échantillons avant l'utilisation des réactifs d'extraction .....	36
<b>Figure 18</b> : Désinfection du matériel après chaque usage .....	36
<b>Figure 19</b> : L'ajout de l'ATL .....	37
<b>Figure 20</b> : Broyage des échantillons .....	37
<b>Figure 21</b> : L'ajout de la protéinase K .....	38
<b>Figure 22</b> : L'incubation au bain sec et centrifugation des échantillons .....	38
<b>Figure 23</b> : L'ajout du Buffer Al .....	39
<b>Figure 24</b> : Deuxième incubation au bain sec et la centrifugation des échantillons .....	39
<b>Figure 25</b> : Précipitation de l'ADN en ajoutant l'éthanol .....	40
<b>Figure 26</b> : Récupération de l'ADN dans les filtres des tubes collecteurs .....	41
<b>Figure 27</b> : Première purification : L'ajout de AW1 .....	41
<b>Figure 28</b> : Deuxième purification : L'ajout de AW2 .....	42
<b>Figure 29</b> : L'ajout du AE .....	42
<b>Figure 30</b> : Récupération des échantillons contenant l'ADN puis leur conservation sous froid .....	43
<b>Figure 31</b> : La salle de mix .....	43
<b>Figure 32</b> : Préparation du dNTPs.....	45
<b>Figure 33</b> : Les produits du mix .....	46
<b>Figure 34</b> : Le dépôt du mix dans les barrettes PCR .....	47
<b>Figure 35</b> : L'ajout des ADN (échantillons), du témoin positif et du témoin négatif aux mix .....	48
<b>Figure 36</b> : Appareil d'amplification de l'ADN : Thermocycleur .....	48
<b>Figure 37</b> : Salle des gels .....	51

<b>Figure 38</b> : La préparation du gel d'agarose 1.5% .....	51
<b>Figure 39</b> : Coulage du gel dans la cuve .....	52
<b>Figure 40</b> : TBE 5X dans la cuve à migration .....	53
<b>Figure 41</b> : Le transfert des échantillons (ADN amplifiés) dans les puits.....	53
<b>Figure 42</b> : Le dépôt des témoins et du marquer de PM dans les derniers puits .....	54
<b>Figure 43</b> : Application d'une tension électrique puis retrait du gel après migration .....	55
<b>Figure 44</b> : Visualisation du gel dans le transilluminateur à UV.....	55
<b>Figure 45</b> : Présence des AND dans les échantillons de rates de chats et de chiens avant amplification .....	57
<b>Figure 46</b> : Gel de PCR de <i>Yersinia pestis</i> (gène <i>Pla</i> ) sur des rates de chats .....	58
<b>Figure 47</b> : Prévalence des chats positifs en PCR pour <i>Yersinia pestis</i> .....	58
<b>Figure 48</b> : Répartition de la peste selon le sexe des chats .....	59
<b>Figure 49</b> : Répartition de la peste selon l'âge des chats .....	60
<b>Figure 50</b> : Gel de PCR de <i>Yersinia pestis</i> (gène <i>Pla</i> ) sur des rates de chiens .....	64

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Nombre de cas de peste observés en Algérie depuis 1935 .....	4
<b>Tableau 2 :</b> Réémergence récente de la peste dans le monde .....	10
<b>Tableau 3 :</b> Enquête de séroprévalence de l'infection canine et féline à <i>Yersinia pestis</i> .....	14
<b>Tableau 4 :</b> Les produits du mix .....	46
<b>Tableau 5 :</b> Le programme du thermocycleur .....	50
<b>Tableau 6 :</b> Les signes cliniques observés chez les chats positifs en PCR .....	61

# LISTE DES ABREVIATIONS

- **A** : Adénine
- **ADN** : Acide DéoxyriboNucléique
- **AE**: Elution Buffer
- **AL** : Lysis buffer for DNA purification
- **ATL** : Tissue lysis buffer
- **AW**: Wash Buffer
- **BET** : Bromure d'Ethidium
- **C** : Cytosine
- **DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane
- **dNTP** : 2'-désoxyribose Nucléoside TriPhosphate
- **EDTA** : Ethylène-Diamine-TétrAcétate
- **ELISA** : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- **EMJH** : Ellinghausen, Mac Cullough, Johnson et Harris
- **G** : Guanine
- **HURBAL** : Hygiène Urbaine d'Alger (Fourrière canine de Boumati, El-Harrach)
- **IFI** : ImmunoFluorescence Indirecte
- **IgG** : Immunoglobuline G
- **IgM** : Immunoglobuline M
- **IPA** : Institut Pasteur d'Algérie
- **MAT** : Test d'Agglutination Microscopique ou micro-agglutination
- **MgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Magnésium
- **OMS**: Organisation Mondiale de la Santé
- **pB**: paires de Base
- **PCR** : Polymérase Chaîne Réaction
- **Pla** : Plasminogène
- **PM** : Marqueur de Poids moléculaire
- **P** : Primer
- **Ta** : Température d'hybridation
- **TBE** : Tris Borique acide EDTA
- **Tm** : Melting Temperature (température de fusion)
- **T** : Thymine
- **T+** : Témoin positif
- **T-** : Témoin négatif
- **UV** : UltraViolet
- **V** : Volte
- **W** : Watt
- **Y** : Yersinia



# *Introduction Générale*

**L**a peste est avant tout une zoonose affectant les petits animaux et leurs puces. Elle peut également infecter l'homme (**Dennis et Gage, 1999 ; Gage et Kosoy, 2005 ; Duchemin et al., 2006**). Chez l'homme, la peste est une maladie très grave avec un taux de létalité atteignant 30 à 60 % en absence de traitement (**Carniel, 2002**).

Cette maladie a donné lieu à de grandes épidémies historiques et est considérée aujourd'hui comme une maladie réémergente dans le monde (**Carniel, 2002 ; Khan, 2004**), c'est une maladie à déclaration obligatoire soumise au règlement Sanitaire International (**Duchemin et al., 2006**). Pendant les 18 ans de 1985 à 2003, plus de 43 000 cas humains de peste ont été déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par 25 pays. Toutefois, en raison de mauvaises installations de diagnostic et de sous-déclaration, le nombre de cas est presque certainement beaucoup plus élevé (**Carniel, 2008**).

Les spécialistes de la surveillance internationale savent que le danger demeure. A partir des très nombreux foyers qu'elle s'est créés à travers le monde et où elle a su s'enraciner, la peste peut à tout moment s'étendre à la faveur d'une défaillance de la civilisation (**Baltazard, 1971**). C'est une maladie qui n'a jamais pu être éradiquée (**Dennis et Gage, 1999**). Au contraire, elle sévit toujours en Asie, en Afrique et en Amérique (**Carniel, 2002**). Personne ne peut prévoir comment et quand elle pourrait être supprimée. «Un monde sans peste» restera probablement un rêve pendant une période indéfinie (**Khan, 2004**).

En Algérie, la peste est réapparue, **dans la région de l'Oranie en 2003**, après une période de silence inter épidémique de 50 ans (**R.E.A., 2003**). Un autre foyer s'est déclaré dans la région de Laghouat, en 2008 (**Bitam et al., 2010a**). De ce fait, l'étude de cette pathologie, dans notre pays, s'avère plus que jamais nécessaire.

Des études antérieures ont révélé que le contact avec les animaux domestiques tels que les chiens et chats représente un facteur de risque potentiel d'infection pesteuse (**Eidson et al., 1988 ; Chomel et al., 1994 ; Leighton et al., 2001 ; Watson et al., 2001 ; Gould et al., 2008 ; Aragão et al., 2009 ; Wang et al., 2011**). Dans un milieu naturel, non soigné et en étant en contact avec des rongeurs, la population errante de ces carnivores est la plus exposée au risque d'attraper la maladie et de maintenir la propagation du bacille par la suite.

Le diagnostic de la peste dans notre pays présente certaines contraintes, puisque la culture qui est un moyen difficile à mettre en œuvre, nécessite un laboratoire d'une certaine sécurité (niveau 3). La sérologie qui par contre est un moyen de routine, ne peut être utilisée si l'infection est récente ni dans le but d'identifier le rôle réservoir que peuvent jouer les animaux.

Les méthodes moléculaires semblent être le moyen de diagnostic le plus adéquat par la facilité d'utilisation, la rapidité d'obtention des résultats et par la spécificité du test.

Nous avons mené une étude afin de répondre aux objectifs suivants :

- Mettre en évidence l'agent de cette pathologie dans la population errante de l'espèce canine et féline dans la région d'Alger et montrer le rôle que peut jouer ces animaux autant que réservoirs dans l'épidémiologie de cette maladie.
- Montrer l'intérêt de la technique « Réaction en chaîne par polymérase ou PCR » sur tissus animaux (chiens et chats) dans le diagnostic et le contrôle d'une pathologie assez redoutable comme la peste.



*Etude*  
*Bibliographique*



## I. Historique de la maladie

Aucune maladie infectieuse n'a causée autant de ravages à la population mondiale que la peste (**Schaechter et al., 1999**). Trois pandémies majeures ont émaillé l'histoire de l'homme (**Bussiéras et Chermette, 1991**).

➤ La première pandémie décrite est appelée «peste de Justinien», elle est survenue au 6<sup>ème</sup> siècle et a tué une population estimée à 100 millions de personnes en une cinquantaine d'années (**Schaechter et al., 1999**). Elle partit probablement d'Afrique centrale et atteignit le pourtour du bassin méditerranéen. Lorsque la maladie est apparue, elle déconcerta les médecins de l'époque car ils ne trouvaient pas de description, ni de traitements pour les malades (**Juif, 2011**).

➤ La seconde pandémie majeure «la peste noire», originaire d'Asie s'est répandue au 14<sup>ème</sup> siècle dans le Proche Orient et l'Europe. En Europe uniquement, un quart de la population est mort de cette maladie (**Schaechter et al., 1999**). La peste restait toujours aussi méconnue par les médecins. On invoqua des causes aussi variées qu'une conjonction d'astres néfastes, d'apparition de nombreuses comètes ou un désordre climatique (**Juif, 2011**).

➤ La troisième pandémie, ou peste orientale, Contrairement aux deux premières pandémies, elle fut mondiale. Elle a débuté en Chine en 1894 et elle a rapidement touché les cinq continents par l'intermédiaire des rats infectés à bord des bateaux (**Schaechter et al., 1999**). Au cours de cette pandémie, la nature infectieuse de la maladie fut élucidée et en quelques années, la bactérie responsable ainsi que son réservoir, le rat, furent identifiés par Alexandre Yersin ainsi que son vecteur, la puce, par Paul-Louis Simon (**Juif, 2011**).

➤ En 1896, Waldemar Haffkine trouva un vaccin antipesteux, qui ne prévenait pas la peste mais baissait sa mortalité. En 1933, Jean Robic développa un vaccin vivant atténué permettant une réduction de plus de 65% de la mortalité pour la peste bubonique. Ce vaccin fut utilisé jusqu'à la fin de la deuxième guerre mondiale où les antibiotiques, récemment découverts, prirent le relais pour lutter contre ce fléau (**Juif, 2011**).

➤ Le bacille pesteux est utilisable comme arme biologique avec l'utilisation d'aérosol provoquant des cas de peste pulmonaire. En 1348, les Tartares ont utilisé pour la première fois la



peste comme arme de guerre biologique lors du siège de Caffa en projetant les cadavres infestés de la peste par-dessus le mur des assièges. Dans les années 70 à 90, les soviétiques ont développé des méthodes permettant d'aérosoliser la bactérie sans altérer sa survie pour la fabrication de bombes biologiques avec des souches résistantes aux antibiotiques. En 2000, aux Etats-Unis, *Yersinia pestis* fut dispersée par un aérosol dans un musée, ce qui provoqua environ 4 000 pneumonies primitives liées à la peste et environ 2 000 décès (**Juif, 2011**).

Le bacille de la peste fait partie désormais de la liste des agents pathogènes les plus susceptibles d'être utilisés pour une arme biologique considérée comme une arme de destruction massive potentielle, au même titre que des armes nucléaires, radiologiques ou même chimiques (**Juif, 2011**).

### L'histoire de la peste en Algérie

Les manifestations de la peste en Algérie ont été plus fréquentes depuis 1911. Jusqu'à 1935, on a observé que deux épidémies, en 1921: 185 cas avec 97 décès ont été enregistré à Sour El Ghouzlane (Aumale), et en 1931: 86 cas de peste pulmonaire ont été notifiés dans le département de Constantine (**Pollitzer, 1954**).

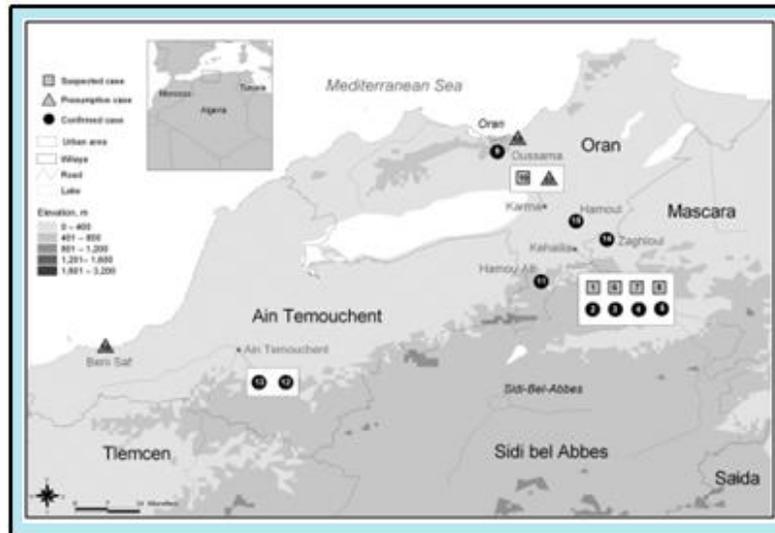
Le bilan de la peste depuis 1935 est résumé dans le tableau suivant (**Pollitzer, 1954**).

**Tableau 1** : Nombre de cas de peste observés en Algérie depuis 1935

Année	Nombre total	Observations
1935	11	10 cas constatés à Skikda
1936	10	3 cas constatés à Alger
1937	3	Tous à Alger
1939	2	Tous à Alger
1940	18	Tous à Alger
1944	95	94 cas à Alger
1945	11	Tous à Oran
1946	2	Les deux à Oran
1950	6	Tous à Oran



Au cours de mois juin-juillet 2003, la région Ouest du pays a déclaré la survenue de la peste sur son territoire. Selon les critères de définition de l'OMS : neuf cas confirmés et trois cas probables avec un décès. Cette épidémie a touché la région Ouest du pays : Oran, Mascara et Ain Temouchent. Il s'agit des cas de peste bubonique (R.E.A., 2003).



**Figure 1** : Distribution géographique des cas de peste, région d'Oranie, juin-juillet 2003 (Bertherat et al., 2007)

En 2008, une petite épidémie a touché des nomades dans la région de Laghouat, avec 4 cas (peste bubonique) et un décès (peste pulmonaires), La peste a été confirmé par culture de l'agent pathogène après une ponction des bubons (Bitam et al., 2010a).

## II. Bactériologie

Alexandre Yersin (1863 – 1943) le bactériologiste franco-suisse se rend à Hong-Kong et, pourvu de moyens dérisoires, réussit à identifier et isoler en trois semaines le responsable du fléau immémorial qui a terrorisé les hommes de toutes conditions et de tous pays. Il s'agit d'un microbe très résistant qui porte depuis lors le nom de son découvreur : le bacille de Yersin («*Yersinia pestis*») (Azizi et Azizi, 2010).

*Yersinia pestis* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Yersinia* comprend 15 espèces dont seulement trois sont pathogènes pour l'homme et les animaux : *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* et *Y. pestis* (Prentice et Rahalison, 2007).

*Yersinia pestis* est un coccobacille de 0,5 à 0,8 µm de largeur sur 1 à 3 µm de longueur, immobile, capsulé, Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif (Prentice et Rahalison, 2007).



Il présente une coloration bipolaire en présence des colorants Wright, Giemsa et Wayson (**Godeau et al., 2004**). L'isolement de *Yersinia pestis* par culture peut se faire sur gélose au sang 5%, bouillon coeur-cervelette ainsi que sur milieux sélectifs Mac Conckey et Cefsulodine-irgasan-novobiocine (CIN) incubés à 28°C pendant 72 heures (**Pourcel et al., 2004**).



**Figure 2 :** Clonies de *Yersinia pestis* sur gélose au sang après 72 heures d'incubation (**Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2007**)



**Figure 3 :** Colonies de *Yersinia pestis* après culture sur une gélose CIN (**Source internet n° 1**)

Il est possible de classer les souches de *Yersinia pestis* en trois biovars selon la capacité de réduire le nitrate et la fermentation de glycérol (**Eyquem et al., 2000**) :

Biovars	Fermentation de Glycérol	Réduction de nitrate en nitrite
Antiqua	+	+
Medievalis	+	-
Orientalis	-	+

On a longtemps considéré comme établi que chacune des trois pandémies était due à des biotypes différents de *Yersinia pestis* (**Devignat, 1951**). Cependant, Drancourt et al ont récemment montré, en utilisant une méthode de génotypage basée sur le séquençage de plusieurs «spacers» intergéniques, qu'un seul biotype, Orientalis, aurait causé les trois pandémies (**Drancourt et al., 2004**).



Lors de l'épidémie survenue en Algérie en 2003, la sensibilité aux bactériophage a été utilisé pour identifier la souche qui circulait, toutes les souches identifiées appartenait au biovar Orientalis **(Lounici et al., 2005)**.

Cette distinction a une importance épidémiologique mais il n'y a pas de différence dans la pathogénicité des biotypes **(Acha et Szyfres, 2005)**.

Le séquençage complet du génome de *Yersinia pestis* a été réalisé en 2001 par l'équipe de Julian Parkhill de l'institut Sanger à Cambridge **(Parkhill et al., 2001)**, il est constitué de 38 616 paires de bases d'ADN **(Zhao et al., 2010)**.

### III. Pathogénie

La peau constitue la porte d'entrée habituelle de la peste bubonique, l'infection étant produite dans la plus part des cas par piqûre des puces d'animaux infectés, rarement par l'intermédiaire d'autres insectes hématophages, ou directement par contact avec les animaux infectés. La pénétration par les muqueuses telles que les amygdales et les conjonctives est possible mais rare **(Pollitzer, 1954)**.

La multiplication bactérienne, au point d'inoculation, induit une nécrose tissulaire puis, un bubon se forme dans la zone du point de piqure. Les bactéries sont très nombreuses dans le bubon et restent strictement extracellulaires, la dissémination sanguine de *Yersinia pestis* survient très précocement et les micro-organismes peuvent être observés dans les capillaires de tous les organes **(Boutiba, 2010)**.

D'intensité élevée, la bactériémie est associée à un état de choc ainsi qu'à une coagulation intra vasculaire disséminée avec dépôts de fibrine dans les capillaires. Ces manifestations sont probablement déclenchées par l'endotoxine **(Boutiba, 2010)**.

Une fois que la bactérie pénètre dans la circulation sanguine, elle migre vers les ganglions lymphatiques. La capacité de *Yersinia pestis* à inhiber la phagocytose permet d'éviter sa destruction par les cellules du système immunitaire comme les macrophages et ainsi de proliférer dans les ganglions lymphatiques, provoquant une adénopathie **(Adjemian et al., 2007)**.

Si l'hôte survit, des foyers infectieux se constituent dans la rate, le foie, les reins, le cerveau et les poumons, ce dernier site de multiplication des bactéries est la source de transmission de la maladie par aérosols, habituellement riches en bacilles. Au cours de la peste pulmonaires, les lésions de pneumonie nécrosantes et hémorragiques apparaissent quelques heures après l'inhalation des bactéries, avec dissémination sanguine précoces, entraînant rapidement la mort **(Boutiba, 2010)**.

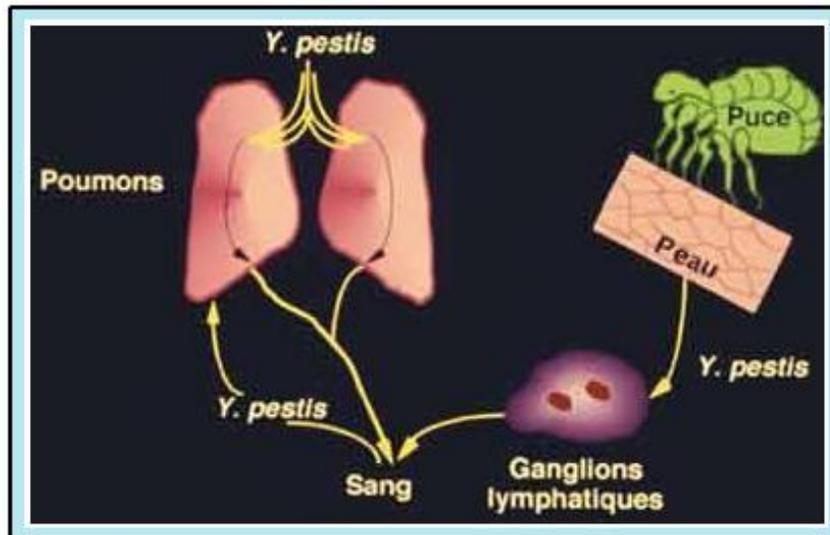
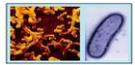


Figure 4 : Schéma de la pathogénie de *Yersinia pestis* (Source internet n° 2)

## IV. Epidémiologie

### IV.1. Epidémiologie descriptive

Quoique la peste ne soit plus de nos jours le fléau qu'elle a été dans le passé, grâce en particulier à la découverte de l'agent causal, du cycle de transmission, et surtout grâce à l'utilisation de traitements antibiotiques efficaces, elle est loin d'avoir été éradiquée. Près de 43 000 cas humains ont été déclarés à l'OMS par 25 pays au cours des vingt dernières années (1985-2003) et le nombre réel de cas est probablement beaucoup plus élevé du fait des difficultés de diagnostic ou de la notification insuffisante par certains pays (Carniel, 2008).

#### IV.1.1. Répartition géographique

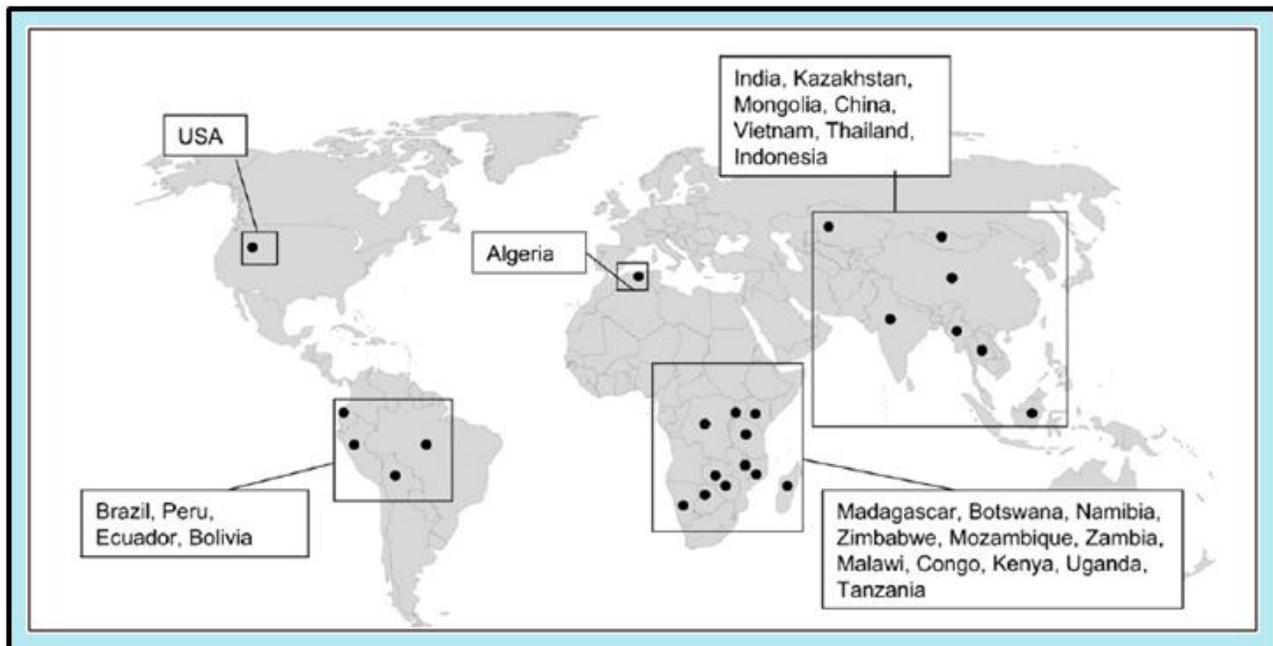
L'Afrique est le continent le plus touché suivie d'Asie puis d'Amérique. Aucun cas de peste n'a été signalé récemment en Océanie ou en Europe.

L'Afrique venant en première position tant par le nombre total de cas et de décès, que par le nombre de pays touchés, les pays qui ont connu la peste dans leur histoire sont : Angola, Botswana, Burkina Faso, Egypte, Kenya, Lesotho, Libye, Mauritanie, Maroc, Nigéria, Guinée, Sénégal, Somalie, Afrique du Sud et la Tunisie. Les pays qui sont toujours victimes de la peste ces dernières années (1995-2008) sont : Algérie, République démocratique du Congo, Madagascar, Malawi, Mozambique, Namibie, Tanzanie, Ouganda et Zimbabwe (Neerinckx et al., 2010).



L'Asie vient en deuxième position, de 1980 à 1997, la peste humaine a été signalée dans sept pays (Chine, Inde, Kazakhstan, Mongolie, Myanmar, République démocratique populaire lao et Viet Nam) (**Dennis et Gage, 1999**).

En Amérique la peste humaine a été signalée dans cinq pays (Bolivie, Brésil, Equateur, Etats-Unis d'Amérique et Pérou), dont trois (Brésil, Etats-Unis et Pérou) ont notifié des cas chez l'homme pratiquement chaque année au cours de la période de 18 ans entre 1980 et 1997 (**Dennis et Gage, 1999**).



**Figure 5** : Distribution géographique de la peste dans le monde (**Bitam et al., 2010b**)

#### IV.1.2 Réémergence récente de la peste

Une recrudescence significative des cas humains est observée depuis les années 1990 avec des foyers de peste silencieux pendant des décennies et que l'on croyait complètement éteints (**Dennis et Gage, 1999**). Cela a été le cas au niveau de la zone côtière de Mahajanga (Madagascar) en 1991, après 60 ans de silence (**Boisier et al., 1997**).

En Inde, la peste semblait avoir disparu depuis 1964 mais elle est réapparue en 1994 avec 50 décès, sous la forme d'une épidémie de peste pulmonaire (**Ramalingaswami, 1995**) qui a paralysé la vie économique du pays pendant plusieurs semaines avec un effondrement à l'échelle nationale dans le tourisme et le commerce (**Ganapati, 1995**).

À partir du Mozambique, où elle est réapparue en 1994 après 16 ans d'absence, la maladie s'est propagée au Zimbabwe et au Malawi (**Barreto et al., 1995**).



En Zambie, une épidémie de peste bubonique s'est déclarée fin 1996 alors qu'aucun cas humain n'y avait été signalé depuis plus de 30 ans (**Carniel, 2008**).

Des cas ont été rapportés en 1997 en Jordanie, plus de 80 ans après les derniers cas recensés dans ce pays (**Arbaji et al., 2005**).

Plus récemment, en 2003, la peste est revenue dans la région d'Oran en Algérie (**Bertherat et al., 2007**) puis en 2009 dans la région de Laghouat (**Bitam et al., 2010a**), alors qu'aucun cas n'avait été signalé dans ce pays depuis la célèbre *Peste* d'Albert Camus.

Les autorités sanitaires de la Jamahiriya arabe libyenne ont rapporté des cas de peste en 2009 après un silence de 25ans (**Tarantola et al., 2009**).

**Tableau 2** : Réémergence récente de la peste dans le monde (**Demeure et Carniel, 2009**)

Pays	Derniers cas	Nouvelles épidémie	Durée de silence
Madagascar	1928	1991	63 ans
Inde	1964	1994	30 ans
Mozambique	1978	1994	16 ans
Zambie	1954	1997	43 ans
Jordanie	1915	1997	>80 ans
Algérie	1946	2003	57 ans
Lybie	1984	2009	25 ans

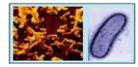
Ces données indiquent que *Yersinia pestis* peut rester viable et pleinement virulente pendant plusieurs années dans le sol. Une étude a été menée par Ayyadurai et al (2008) montre que le réservoir tellurique pourrait représenter un mécanisme alternatif pour l'entretien de foyers de peste (**Ayyadurai et al., 2008**).

## IV.2. Epidémiologie analytique

### IV.2.1. Source d'infection et transmission

La peste humaine peut être contractée dans les cas suivants :

1. Après piqûre des puces de rongeurs, exemple, à partir de rongeurs sauvages en milieu rural, dans le sud-ouest des Unis États (**Gage et al., 1995 ; Levy et Gage, 1999**), et l'exemple de l'Algérie dans la région de Laghouat (**Bitam et al., 2010a**), ou l'exemple des rongeurs commensaux



---

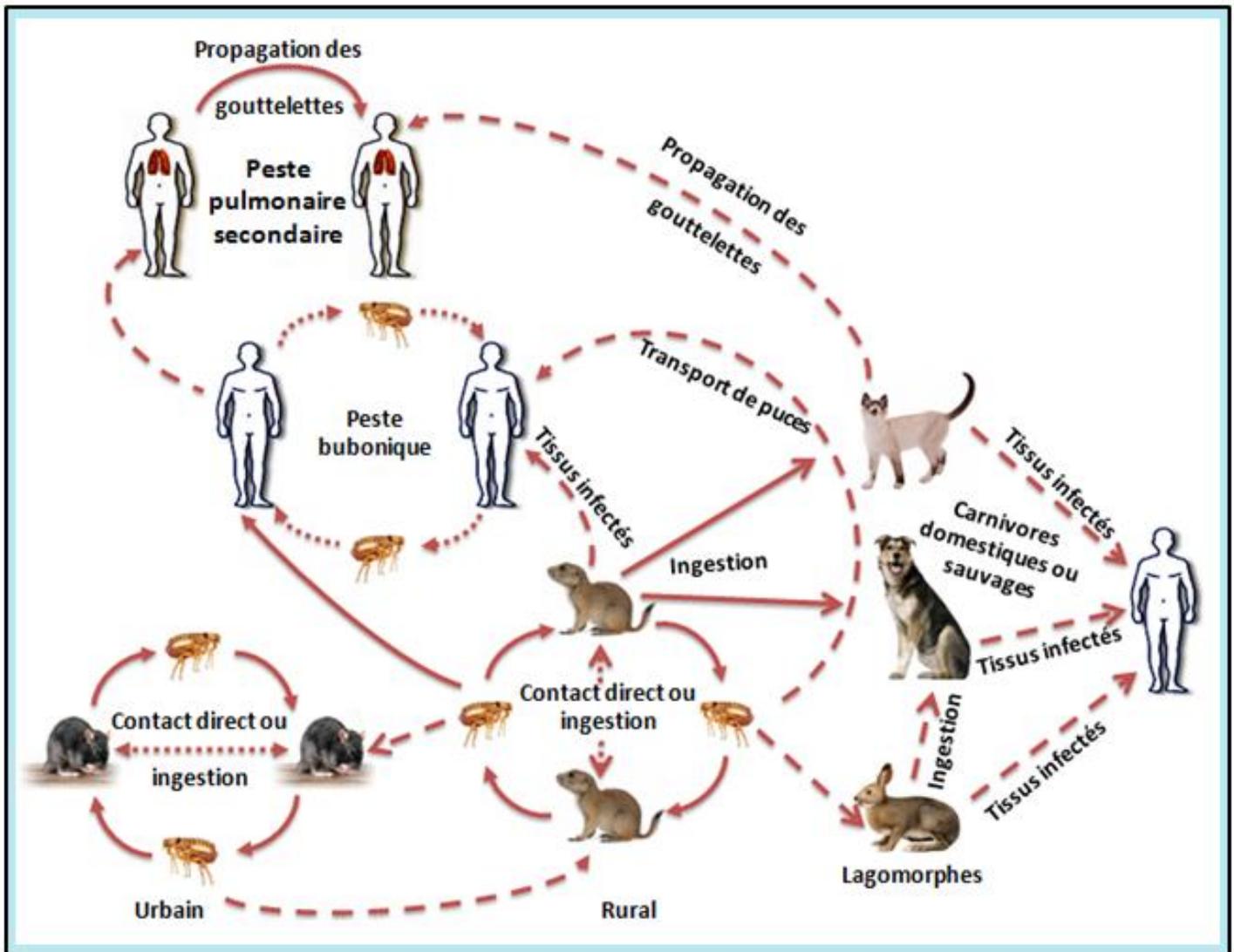
qui se déplacent librement entre les villages et les habitats forestiers, en Tanzanie (**Kaoneka et Solberg, 1994**).

2. Par la manipulation des chats infectés (exemple : en Afrique ou aux Etats-Unis) (**Kaufmann et al., 1981 ; Gage et al., 2000**). Ou en étant en contact avec des chiens malades (exemple : en chine) (**Wang et al., 2011**). Ou d'autres animaux sensibles tels que les cochons d'inde, au Pérou et en Equateur (**Gabastou et al., 2000 ; Ruiz, 2001**).

3. Après consommation de viande d'animaux infectés tels que des chameaux qui ont contracté la maladie par piqûre des puces de rongeurs, en Asie centrale et le Moyen-Orient (**Bin Saeed et al., 2005 ; Stenseth et al., 2008**).

4. La transmission se fait aussi d'homme à homme, soit directement par des gouttelettes respiratoires ou indirectement par l'intermédiaire des piqûres de puces (**Pollitzer, 1954 ; Blanc, 1956**).

La source d'infection pour les animaux domestiques est représentée par les rongeurs et leurs puces. Les chats peuvent être contaminés car ils sont naturellement chasseurs de rongeurs, et particulièrement sensibles au bacille pesteux (**Ganiere et al., 2001**). La contamination directe par inhalation de particules infectieuses entre les chats est possible dans le cas de la peste pulmonaires (**Eidson et al., 1988**).



**Figure 6 :** Voies de transmission de la peste

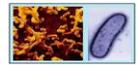
(Les lignes continues avec les flèches indiquent les voies de transmission habituelle, tandis que les lignes en pointillés avec les flèches indiquent les voies occasionnelles. Itinéraires théoriques, rares et/ou controversés sont représentés en pointillés avec des flèches) (Perry et Fetherston, 1997).

## IV.2.2. Réservoirs et vecteurs de la peste

### IV.2.2.1. Réservoirs de la peste

- Les rongeurs et Les lagomorphes

Alors que plus de 200 espèces de mammifères en 73 genres ont été signalés à être naturellement infectés par *Yersinia pestis* (Poland et al., 1994) (comprenant diverses espèces de souris, campagnols, gerbilles, écureuils terrestres, marmottes et les chiens de prairie) (Pollitzer, 1954 ;



**Poland et al., 1994 ; Salkeld et al., 2010**), les rongeurs constituent d'importants hôtes pour la peste, ils sont considérés comme hôtes enzootiques (**Poland et al., 1994**).

Dans le but de rechercher les réservoirs responsables de la peste en Algérie, en 2009, des rongeurs de différentes espèces (*Rattus rattus*, *Mus spretus*, *Psammomys obesus*, *Meriones shawii* et *Atelerix Faciatus*) ont été capturés, après analyse moléculaire des rates, la positivité était de 16% (**Bitam et al., 2010a**).

Les Lagomorphes transmettent la maladie aux êtres humains plus probablement par contact direct que par piqûre de puces (**Pollitzer, 1954**). *Yersinia pestis* a été isolée à partir de deux lapins, qui étaient responsables de la transmission de la peste bubonique à une femme après leur dépouillement, huit personnes ont été atteintes après un contact direct avec des lapins lors de la chasse, ainsi que trois autres par contact indirect (**Von Reyn et al., 1976**).

- Carnivores domestiques

Les chats et autres carnivores domestiques peuvent être infectés après ingestion des rongeurs ou lagomorphes infectés par *Yersinia pestis* (**Christie et al., 1980 ; Macy, 1998**). Les chiens et les chats domestiques peuvent transmettre *Yersinia pestis* à l'homme par l'intermédiaire de puces infectées provenant de rongeurs (**Gould et al., 2008 ; McElroy et al., 2010**). Les chats atteints de peste pulmonaire peuvent être une source d'infection directe, par leurs sécrétions respiratoires, la transmission peut se faire aussi par morsure ou par contamination des muqueuses ou des lésions cutanées avec des sécrétions ou des exsudats d'animaux malades (**Macy, 1998**).

En Amérique, de 1977 à 1998, 23 cas de peste humaine (7,7% du total des cas) sont dus au contact avec des chats infectés (**Gage et al., 2000**). Les chats domestiques aux Etats-Unis sont récemment devenus d'importantes sources de peste humaine (**Werner et al., 1984 ; Gasper et al., 1993 ; Poland et al., 1994 ; Doll et al., 1994 ; Dryden et Rust, 1994**). Au Nouveau-Mexique, de 1977 à 1985, 60 cas de peste féline étaient enregistrés (**Eidson et al., 1988**).

Les chiens sont fréquemment exposés à *Yersinia pestis* dans les zones où il ya des épizooties de peste, L'infection à *Yersinia pestis* a été diagnostiquée chez trois chiens, dans le sud des Etats-Unis (**Orloski et Eidson, 1995**). Un foyer de peste a été signalé en Juillet 2009 à la province du Qinghai, en Chine. 12 personnes ont été atteintes, trois d'entre elles sont mortes, l'enquête sur le terrain a révélé que cette épidémie a débuté par un chien décédé. Sept souches de *Y. pestis* ont été isolées à partir des chiens et des patients (**Wang et al., 2011**).



Le chien est considéré comme un animal indicateur pour la surveillance de la peste, ce qui suggère l'importance de la santé publique vis-à-vis des chiens comme une source de la peste (Wang et al., 2011).

Lors d'une infection pesteuse, les chats et les chiens développent des anticorps qui peuvent être détectés pendant plusieurs mois. Le dépistage sérologique d'une telle infection est particulièrement utile lors d'une suspicion clinique animale ou humaine et pour les enquêtes et programmes de surveillance épidémiologique (Chomel et al., 1994).

Des études de surveillance sérologique de la peste chez les carnivores domestiques furent réalisées dans différentes régions du monde, les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 3 :** Enquête de séroprévalence de l'infection canine et féline à *Yersinia pestis*

L'espèce animale	Région géographique	L'année de l'étude	Nombre des prélèvements (sérums)	Résultats positifs	Auteurs
Chien	Nouveau Mexique (USA)	—	1556	21,6%	Rust et al., 1971
Chien	Afrique du Sud	1982	5938	0,35%	Shepherd et al., 1983
Chien	Montagnes d'Usambara occidentaux (Tanzanie)	1980-1990	173	6,3%	Kilonzo et al., 1992
Chien	Lushoto (Tanzanie)	—	201	11 (5,5%)	Kilonzo et al., 1993
Chien et chat	Californie (USA)	1979-1991	4 115 chiens 466 chats	86 (2,09%) 15 (3,22%)	Chomel et al., 1994
Chien	Équateur	1998	14	5	Gabastou et al., 2000
Chien	Alberta et Saskatchewan (Canada)	1995	—	0,075%	Leighton et al., 2001
chiens et chats	Etat de Ceará (Brésil)	1990-1999	102 852	720 chiens 170 chats	Aragao et al., 2002
Chien	Jordanie (Frontières Saoudiennes)	1997	3	3	Arbaji et al., 2005
Chien	Karatu et Ngorongoro (Tanzanie)	—	49	2,0%	Kilonzo et al., 2005



Chien	Californie (USA)	—	—	2,7%	<b>Henn et al., 2007</b>
Chien et chat	Province du Yunnan (Chine)	2006	689 151	162(23,5%) 40 (26,5%)	<b>Li et al., 2008</b>
Chien et chat	Etat du Ceará (Brésil)	1997-2006	95 883 chiens 50 849 chats	2 234 (2,3%) 395 (0,8%)	<b>Aragão et al., 2009</b>
Chien	Madagascar	1999	63	23,8%	<b>Rajerison et al., 2009</b>
Chien	Etat de Bahia (Brésil)	—	480	Négatifs	<b>Saavedra et Dias, 2011</b>

- Autres mammifères

La peste naturelle a été confirmée ou soupçonnée chez un certain nombre d'animaux appartenant à divers ordres de mammifères autres que les rongeurs, lagomorphes et carnivores domestiques (**Pollitzer, 1954**).

Quelques observateurs dans le sud-est de la Russie ont jadis soupçonné l'existence de la peste chez les chameaux. Nikanoroff a pensé que le nombre d'épisodes de peste humaine rapporté dans la littérature semblait avoir comme mode de contamination, la consommation de viande de chameaux malades (**Pollitzer, 1954**). Les enquêteurs russes ont confirmé par la suite dans leur model expérimental que le chameau est une espèce sensible à la peste, et il peut être atteint à la suite de : piqûre de puces de rongeurs, transmission par les tiques ou par les aliments contaminés par des excréments de rongeurs infectés (**Federov et al., 1960**).

La consommation de la viande d'un chameau malade était la source de la contamination de neuf personnes en Libye, en 1976. Les sérums de sept d'entre eux étaient positifs au test d'hémagglutination passif. Six autres personnes sont tombées malades après avoir tué 2 chèvres, le sérum d'une chèvre contenait des anticorps dirigés contre *Y. pestis* (**Christie et al., 1980**).

En Arabie Saoudite, en 1994, une étude faite sur un groupe de cinq cas de peste humaine, a confirmé que la source de la contamination était la consommation du foie de chameau. *Yersinia pestis* a été isolée à partir de la moelle osseuse du chameau et les puces (*Xenopsylla cheopis*) prélevées à partir de chameau (**Bin Saeed et al., 2005**).



En 1997, une épidémie de peste a été rapportée en Jordanie, Onze des 12 personnes atteintes ont rapporté que 2-4 jours avant l'apparition des symptômes, avaient consommé la viande d'un même chameau, soit crue (10 cas) ou cuite (un cas) (**Arbaji et al., 2005**).

Cela confirme que le chameau et la chèvre sont sensibles à l'infection naturelle par la peste et ont un rôle dans la diffusion de la peste humaine (**Christie et al., 1980**).

Une espèce d'hérisson (*Tenrec ecaudatus*) a été révélée séropositive à la peste, suggérant une transmission récente du bacille pesteux au sein de cette espèce (**Migliani et al., 2001**).

Les carnivores sauvages sont exposés à la peste par les morsures de puces ou en consommant des proies infectées et jouent le rôle de source potentielle d'infection humaine (**Salkeld et al., 2006**). C'est l'exemple du lynx roux, du puma (**Bevins et al., 2009**), des coyotes (**Brown et al., 2011**) du renard (**Harrison et al., 2003**) et du blaireau (**Messick et al., 1983**). Récemment un biologiste est décédé aux Etats-Unis après avoir contracté la peste pulmonaire suite à une autopsie d'un lion mort, les analyses confirmaient par la suite que le lion était atteint de la peste et était la source de l'infection (**Wong et al., 2009**).

#### IV.2.2.2. Vecteurs de la peste

##### ➤ Les puces (Siphonaptères)

La puce joue un rôle important dans la transmission et la virulence du germe *Yersinia pestis* (**Duchemin et al., 2006**).

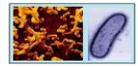
Plus de 1 500 espèces de puces ont été identifiées, alors que seulement un petit nombre (plus de 31) d'entre elles sont des vecteurs de la peste (**Poland et al., 1994**).

La majorité des espèces de puces vectrices de la peste sont des ectoparasites des rongeurs commensaux ou péri-domestiques. Comme elles vivent à proximité des êtres humains et de leurs habitations, ces puces se trouvent souvent sur le bétail et sur les animaux domestiques (**Pollitzer, 1954**).

En raison de son rôle dans les précédentes pandémies, *Xenopsylla cheopis* (la puce du rat d'Orient) est considérée comme le vecteur principal pour transmettre l'agent de la peste (**Poland et al., 1994**).

En Algérie, Beaucournu et Kowalski (1985) et Bitam et al (2006), ont étudié l'agent de la peste sur les puces. Après la réapparition de la peste humaine en Algérie en 2003, 95 *Xenopsylla cheopis* ont été testés pour la recherche de *Yersinia pestis* avec les méthodes de PCR, neuf puces étaient infectées (**Bitam et al., 2006**).

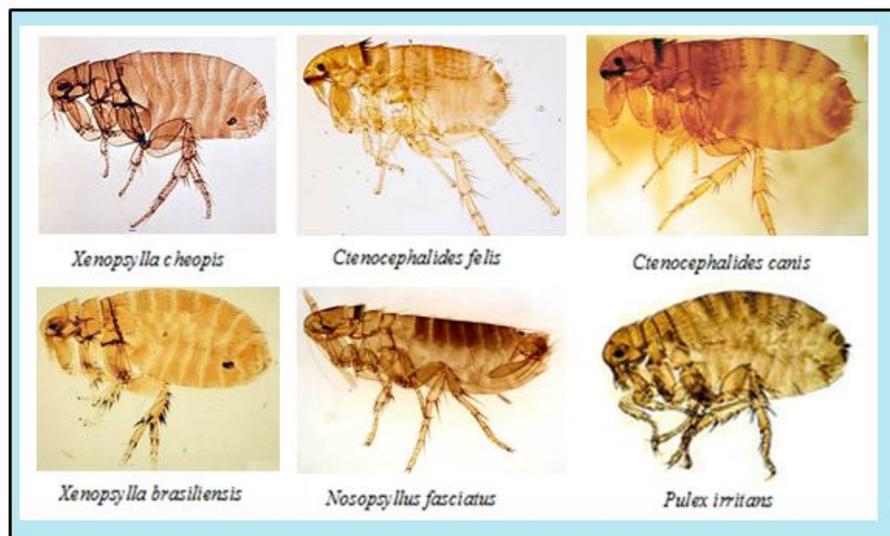
La puce de l'homme que l'on appelle (*Pulex irritans*) est considérée comme un vecteur très pauvre pour *Yersinia pestis* (**Blanc, 1956**). L'importance vectorielle de *Pulex irritans* au sein de la



population humaine fut d'ailleurs mise en évidence au Maroc dans un environnement proche de celui de l'Europe lors de la 2<sup>ème</sup> pandémie (**Blanc, 1956**). Cependant *Pulex irritans* était le vecteur idéal pour la peste par sa très grande abondance sur l'homme et dans ses habitations (**Beaucournu, 1995**).

La puce du chat (*Ctenocephalides felis*) et celle du chien (*Ctenocephalides canis*) peuvent transmettre la peste à l'être humain (**Dennis et Gage, 1999**). Cependant elles sont considérées comme des vecteurs pauvres et ne causent que rarement la maladie humaine (**Pollitzer, 1954**).

Au nord-ouest d'Ouganda, lors des dernières épidémies de peste, les puces de chat (*Ctenocephalides felis*) ont été signalées comme les puces les plus courantes dans l'environnement familial humain. Les études de laboratoires montrent que *Ctenocephalides felis* est un vecteur compétent pour *Yersinia pestis*, mais l'efficacité est faible par rapport aux autres espèces. Cependant, ces résultats indiquent que les puces de chat ne doivent pas être négligées par les programmes de contrôle car elles peuvent jouer un rôle important comme vecteurs secondaires (**Eisen et al., 2008**).



**Figure 7** : Certaines espèces de puces qui peuvent jouer le rôle de vecteurs pour *Yersinia pestis*  
(Source internet n°3)

Une étape clef de la transmission de *Yersinia pestis* chez les puces est le blocage proventriculaire démontré en 1914. Le blocage du proventricule ne se produit qu'avec *Yersinia pestis* à l'exclusion de toutes les autres bactéries et n'existe que chez les puces. Après piqûre d'un hôte présentant une septicémie, la puce héberge le bacille de la peste dans son tube digestif, les bactéries se multiplient dans le proventricule (dilatation située entre l'œsophage et l'estomac), formant le bouchon bactérien qui bloque finalement le passage du sang aspiré dans l'estomac (**Dryden et Rust, 1994**). La



formation du bouchon bactérien est due à l'apparition de fibrine à partir du sang ingéré, sous la double influence d'une coagulase sécrétée par *Yersinia pestis* et d'une enzyme protéolytique, voisine de la trypsine sécrétée par la muqueuse digestive. Ce blocage affame la puce et l'oblige à piquer son hôte plusieurs fois pour se nourrir. Lors d'une nouvelle piqûre, la puce aspire du sang qui arrive dans le proventricule, au contact du bouchon bactérien obligeant la puce à régurgiter dans la plaie le sang souillé qu'elle ne peut ingérer, inoculant ainsi le bacille de la peste à son hôte (**Rodhain et Pérez, 1985**).

#### ➤ **Autres arthropodes**

Certains auteurs ont évoqué l'intervention d'autres arthropodes autres que les puces (poux, punaises, tiques, acariens, mouches et moustiques..) dans l'acquisition de l'agent pesteux mais la possibilité de le transmettre aux animaux sensibles reste à prouver (**Pollitzer, 1954**). Selon Wu seuls les poux et les tiques de rongeurs méritent d'être pris sérieusement en considération (**Wu, 1936**).

Des études ont démontré que les ectoparasites humains y compris les poux (*Pediculus humanus*) ont pu transmettre la peste. Cela a été observé et confirmé par Baltazard et ses collaborateurs lorsque des cas de peste ont été déclarés au Maroc dans les années 40 (**Houhamdi et al., 2006**).

Les tiques aussi ont montré leur rôle comme vecteur de *Yersinia pestis*. Cinq espèces de tiques appartenant au genre *Ornithodoros* étaient infectées après avoir pris un repas sanguin à partir d'hôte infectés (**Thomas et al., 1990**).

## **V. Clinique**

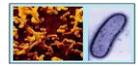
### **V.1. La maladie chez l'homme**

Chez l'homme, la peste est une maladie d'une extrême gravité, qui peut se manifester sous trois formes cliniques : bubonique, septicémique et pulmonaire. En l'absence de traitement les taux de létalité sont très élevés (de 30 à 60% dans la forme bubonique et de l'ordre de 100% dans la forme pulmonaire) (**Carniel, 2002**).

Les propriétaires de chats, les vétérinaires sont les plus exposés au risque de la peste d'origine féline (**Eidson et al., 1988**).

### **V.2. La maladie chez l'animal**

Le rat atteint de peste peut présenter une forme aiguë avec présence de bubons ou une forme chronique. Les deux formes retrouvées chez l'animal sont la peste bubonique et la peste septicémique. En général, la mortalité est importante chez les rongeurs infectés (**Juif, 2011**).



Dans les zones endémiques, les chats et les chiens domestiques, peuvent facilement être infectés par *Yersinia pestis* en cas d'exposition à des rongeurs infectés (**Gage et al., 2000**).

Les chiens sont généralement résistants à la peste. Bien qu'ils puissent être infectés, ils développent généralement des symptômes très légers tels que : la léthargie, la pyrexie, le gonflement des ganglions lymphatiques et ils peuvent devenir porteurs asymptomatiques de la bactérie (**Orloski et Eidson, 1995 ; Gage et al., 2000**), Les chiens développent des anticorps contre l'agent pathogène et peuvent jouer le rôle d'animaux sentinelles pour la peste dans les zones endémiques (**Chomel et al., 1994 ; Wang et al., 2011**).

Les chats sauvages et domestiques peuvent être infectés par la peste (**Eidson et al., 1988 ; Eidson et al., 1991 ; Gage et al., 2000**). Cependant certains auteurs suggèrent que l'augmentation de chats errants est un facteur de risque pour leur contamination (**Eidson et al., 1988**). Les chats malades peuvent développer les trois formes de la maladie (peste bubonique, septicémique ou pulmonaire) (**Eidson et al., 1988 ; Eidson et al., 1991 ; Gage et al., 2000**).

La forme bubonique étant la forme la plus souvent décrite avec une lymphadénopathie et une hyperthermie, les nœuds lymphatiques affectés ou bubons sont hémorragiques, nécrotiques et entourés d'œdème. Suite à l'ingestion de rongeurs contaminés, ils sont fréquents au niveau de la tête et du cou (**Desachy, 2005**). Environ 50% des chats infectés par *Yersinia pestis* meurent peu de temps après avoir développer la maladie (**Gage et al., 2000**). Si l'animal survit assez longtemps, des abcès contenant un pus épais et crémeux fistulent à la surface de la peau (**Desachy, 2005**). L'histopathologie chez les chats malades est comparable à celle décrite pour la peste humaine (une inflammation necrosuppurative dans les ganglions lymphatiques pour la peste bubonique, pneumonie dans le cas de la peste pulmonaire..) (**Watson et al., 2001**).

La forme pulmonaire des chats est la plus redoutable, puisque c'est une source d'infection importante pour l'être humain (**Rust et al., 1971 ; Gasper et al., 1993 ; Poland et al., 1994 ; Chomel et al., 1994 ; Gage et al., 2000**).

## VI. Diagnostic

Le diagnostic de la peste doit être évoqué chez l'être humain quant il présente de la fièvre avec prostration, avec exposition à des rongeurs ou un chat malade (**Chanteau et al., 2003**).

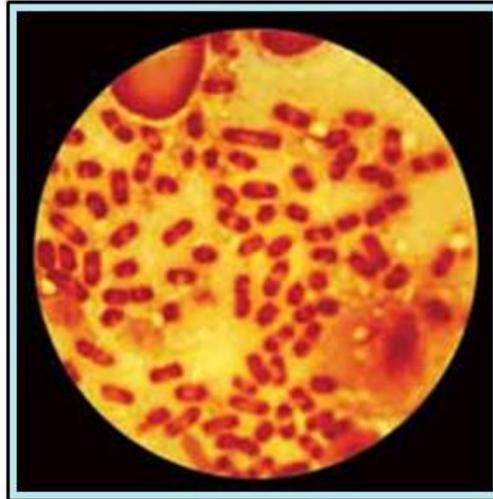
Les prélèvements destinés à la recherche de *Yersinia pestis* doivent être manipulés avec précautions, dans un laboratoire de niveau 3 (**Didier, 1998**).



## VI.1. Diagnostic direct

### ➤ Examen microscopique

Le produit de ponction est coloré par la coloration de Gram pour mettre en évidence des bacilles Gram négatifs (Pourcel et al., 2004). D'autres colorations peuvent être utilisées et mettre en évidence la morphologie bipolaire de *Yersinia pestis* telles que : la coloration de Wreight, la coloration de Wayson ou la coloration de Giemsa (Parija, 2009).



**Figure 8** : La forme bipolaire de *Yersinia pestis* sous microscopie (Bekhoucha et al., 2008)

### ➤ Culture

*Yersinia pestis* se développe sur milieux gélosés usuels (Drigalski, Mac Conkey, etc), et sur milieu sélectif CIN (Cefsulodine-irgasan-novobiocine). La température optimale est de 25-28°C et les colonies apparaissent le plus souvent après 48 heures sur milieu gélosé. Les hémocultures doivent être conservées 4 à 5 jours à 25°C. En milieu liquide, le trouble est inhomogène avec un voile en surface et un aspect floconneux en profondeur (Denis et Poly, 2007).

Après son isolement, on peut essayer d'infecter des animaux de laboratoire. Cette technique est la plus fiable mais longue de 7jours (Juif, 2011).

### ➤ Détection de l'ADN

Le diagnostic direct moléculaire est possible par amplification génique (PCR) du gène *Pla*, codant pour l'activateur du plasminogène (Hinnebusch et Schwan, 1993 ; Engelthaler et al., 1999).

La détection moléculaire est un test rapide, sensible et spécifique, c'est une alternative plus sûre pour l'identification de *Yersinia pestis* (Engelthaler et al., 1999). Récemment, plusieurs tests de PCR ont été développés pour le diagnostic de la peste (Hinnebusch et Schwan, 1993).



Des études récentes montrent que la PCR en temps réel pourrait être recommandée comme un outil de diagnostic lorsque la peste bubonique est cliniquement suspectée (**Riehm et al., 2011**).

Dans le domaine de recherche les méthodes moléculaires ont été rapportées pour la détection de *Yersinia pestis* dans des puces lors des enquêtes épidémiologiques (**Hinnebusch et Schwan, 1993 ; Bitam et al., 2006 ; Griffin et al., 2010**). La détection de *Yersinia pestis* chez les puces par PCR fournit un moyen rapide et sensible pour surveiller la peste dans la population d'animaux sauvages, permettant aux responsables de santé publique de mieux évaluer le risque potentiel de transmission aux humains (**Hinnebusch et Schwan 1993**).

La recherche par PCR de *Yersinia pestis* peut se faire chez les animaux réservoirs (rongeurs et autres), le prélèvement idéal est la rate (**Shivaji et al., 2000 ; Bitam et al., 2010a**) ou le foie (**Shivaji et al., 2000**).

## VI.2.Diagnostic indirect

Il existe un diagnostic sérologique pour la détection d'anticorps destinés contre l'antigène capsulaire F1 spécifique de *Yersinia pestis* (**Chanteau et al., 2003 ; Bianucci et al., 2007**).

Chez les réservoirs animaux la recherche d'anticorps peut être réalisé dans une approche de surveillance dans les zones endémiques (**Chomel et al., 2004 ; Wang et al., 2011**), elle est réalisée sur les animaux domestiques qui peuvent jouer le rôle de sentinelles pour la peste, c'est le cas du chat (**Chomel et al., 1994 ; Aragão et al., 2009 ; Wang et al., 2009**), et du chien (**Kilonzo et al., 1992 ; Chomel et al., 1994 ; Leighton et al., 2001 ; Arbaji et al., 2005 ; Aragão et al., 2009 ; Rajerison et al, 2009 ; Wang et al., 2009**), elle est réalisée sur le sérum des rongeurs obtenu après décantation du sang recueilli par ponction cardiaque ou sur le sang total (**Rajerison et al., 2009**).

Les méthodes immuno-enzymatiques en phase solide (ELISA) permettent de porter un diagnostic rétrospectif avec la détection des anticorps IgM et IgG. On peut aussi utiliser l'agglutination, la fixation du complément ou l'hémagglutination (**Dennis et Gage, 1999 ; Carniel, 2002 ; Acha et Szyfres, 2005**).

Un test immunochromatographique rapide a été mis en évidence récemment, c'est une méthode alternative à la méthode ELISA pour la détection des anticorps. Il peut détecter les anticorps dirigés contre l'antigène F1 de *Yersinia pestis* chez plusieurs espèces (homme, réservoirs rongeurs et chien). Il pourrait faciliter le diagnostic de la peste pendant les épidémies, en particulier lorsque seulement un seul échantillon de sérum est disponible (**Rajerison et al, 2009**).



## VII. Moyens de lutte

### VII.1. Traitement

#### ➤ Chez l'homme

La peste est une maladie grave, qui peut tuer très rapidement, en l'absence de traitement, d'où l'importance d'un diagnostic extrêmement précoce. Les antibiotiques sont très efficaces s'ils sont administrés dès les deux premiers jours (**Hinnebusch et al., 2002**).

Depuis son introduction en 1948, la streptomycine a été l'antibiotique de choix pour le traitement de la plupart des formes de la peste (**Butler, 1995**).

Outre la streptomycine, il ya un nombre limité d'antibiotiques dont l'efficacité est démontrée pour le traitement de la peste chez l'homme. La Gentamicine et les tétracyclines ont été utilisées avec succès (**Crook et Tempest, 1992**), le triméthoprime-sulfaméthoxazole a été employé aussi avec succès (**Nguyen et al., 1973**) néanmoins des résultats décevants ont été constatés (**Butler et al., 1967**). Pour le traitement de la peste pneumonique, la streptomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines ont démontré leur efficacité (**Crook et Tempest, 1992**).

Il ya un certain nombre d'antibiotiques, y compris les quinolones, les céphalosporines, l'ampicilline, amoxicilline, et la rifampicine, qui démontrent l'activité in vitro contre *Yersinia pestis* (**Frean et al., 1996**), mais l'efficacité in vivo reste à prouver.

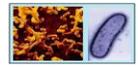
#### ➤ Chez l'animal

Lorsque la maladie est en début d'évolution, le traitement est possible ; mais lorsque la maladie évolue vers une forme pulmonaire, l'animal doit être euthanasié (**Desachy, 2005**).

Les tétracyclines administrés par voie orale toutes les 8 heures pendant 10 jours donnent de bons résultats. Le chloramphénicol, la gentamicine et l'association triméthoprime-sulfamide-thoxazole ont également été utilisés avec succès chez le chat. L'ampicilline semble peu efficace. La streptomycine est réservée à l'homme. La réponse à l'antibiothérapie est généralement bonne. Si le traitement est précoce, il ya seulement 10% d'échec (**Desachy, 2005**).

#### ➤ Résistance aux antibiotiques

Le bacille pesteux qui était habituellement sensible aux antibiotiques classiquement utilisés pour le traitement de la peste commence à montrer des antibio-résistances. Cependant en 1995, à Madagascar, deux souches portant des plasmides de résistance à des antibiotiques de première ligne



pour le traitement de la peste ont été isolées (**Chanteau et al., 2000 ; Galimand et al., 2006**). On a démontré par la suite que l'acquisition par *Yersinia pestis* de cette résistance aux antibiotiques avait lieu dans le tube digestif de la puce (**Hinnebusch et al., 2002**) et que le plasmide de multirésistance était présent chez des entérobactéries largement répandues dans les produits alimentaires (**Welch et al., 2007**). Ces résultats sont alarmants, cela fait redouter l'émergence et l'expansion de souches de *Yersinia pestis* multirésistantes, ce qui constituerait une menace majeure en santé publique, une vigilance redoublée dans les efforts de surveillance sur le terrain et de recherche en laboratoire doit être constamment soutenue (**Guinet et Carniel, 2000**).

## VII.2. Prévention

Les connaissances acquises grâce aux études menées à propos de cette maladie réémergente sont essentielles pour le développement de stratégies de prévention et de contrôle (**Gage et Kosoy, 2005**).

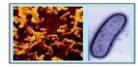
- Mesures auprès des réservoirs

Les mesures à prendre envers les animaux de compagnie sont les suivantes : Traiter les chiens et les chats domestiques par insecticides (**Kaufmann et al., 1981**), les colliers à puces ne sont pas considérés comme très efficaces. Manipuler les chats malades avec précaution, isoler les cas suspects pour empêcher leur contact avec l'être humain ou avec d'autres animaux (**Eidson et al., 1988**). Les propriétaires qui vivent dans les zones d'endémie de peste devraient empêcher leurs chats de sortir et restreindre l'accès des chiens et des chats aux carcasses de rongeurs ou de lapins morts (**Schaer, 2006**).

La lutte contre les rongeurs réservoirs peut se faire en utilisant les rodenticides néanmoins la lutte contre la puce vectrice est l'objectif primaire par rapport à la lutte contre le rongeur réservoir car la mort d'un grand nombre de rongeurs infectés engendre l'introduction dans l'environnement de puces qui chercheront un autre hôte, en propageant la maladie plus largement comme si que les rongeurs n'avaient pas été tués (**Juif, 2011**).

La lutte contre les puces vectrices peut être effectuée en utilisant les insecticides qui sont d'une activité de lutte à large échelle (**Juif, 2011**).

Cependant, la sensibilité des populations de puces cibles aux insecticides utilisés doit être mis en œuvre périodiquement puisque plusieurs résistances sont apparues. La résistance au DDT a été confirmée pour la première fois chez *Xenopsylla cheopis* dans le district de Poona, en Inde (**Patel et al., 1960**). Des tests de résistance aux insecticides ont été réalisés suivant la procédure de l'OMS sur



des élevages de puces à Madagascar, *Xenopsylla cheopis* a présenté pour la première fois sa résistance multiple aux organochlorés, organophosphorés et carbamate (**Coulanges et Randrianantoanina, 1985**). Une nouvelle étude a été réalisée par Ratovonjato et ses collaborateurs confirme la résistance de *Xenopsylla cheopis* au DDT et aux pyréthriinoïdes (**Ratovonjato et al., 2000**).

Ces résultats devraient conduire à la mise en place de moyens suffisants pour mieux connaître les différentes résistances des puces aux insecticides et la possibilité de diffusion des gènes de résistance (**Ratovonjato et al., 2000**).

Lorsque la peste est diagnostiquée chez un animal, il doit immédiatement être isolé. Les locaux et le matériel avec lesquels il a été en contact doivent être désinfectés avec des composés iodés ou phénoliques. La litière des animaux doit être incinérée (**Desachy, 2005**).

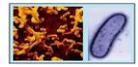
- Mesures préventives chez l'homme

Les êtres humains atteints de peste pulmonaire doivent être isolés et traités, les personnes ayant été en contact avec ces personnes malades doivent être surveillées. Si on le juge nécessaire, une antibiothérapie prophylactique peut être mise en place aux personnes qui ont été en contact avec des malades (**Gage et al., 2000**) ou avec des animaux infectés (**Desachy, 2005**).

Pour le personnel de laboratoire, la manipulation des produits biologiques doit être conduite en laboratoire avec un degré de confinement de niveau 3 (**Didier, 1998**) tout en respectant les consignes suivantes : manipulation sous hôte et port de gants (**Boutiba, 2010**).

Les vétérinaires et leurs aides doivent être informés du risque de la peste dans les régions où des cas ont été diagnostiqués (informations appropriées sur les symptômes chez les chats) (**Gage et al., 2000**). Ils doivent porter des gants, une blouse et des lunettes de protection lors de la manipulation d'un animal suspect (**Desachy, 2005**).

Il existe plusieurs vaccins contre la peste, atténués ou tués qui ont été utilisés dans le passé ; mais la faible durée de l'immunité et l'importance des effets secondaires ont conduit à l'arrêt de la vaccination. Aujourd'hui, plusieurs vaccins recombinants acellulaires ou cellulaires sont en cours d'étude, mais ils n'ont pas été testés dans les conditions naturelles des foyers endémiques et épidémiques de la peste (**Carniel, 2008**).



*En conclusion de ce chapitre...*

La peste ne se présente plus aujourd’hui sous la forme des épidémies massives et dévastatrices qui ont marqué l’histoire. Cependant, cette maladie pose encore au monde actuel d’importants défis puisqu’elle représente de nos jours un danger potentiel à l’échelle planétaire avec la réapparition récente de plusieurs foyers restés silencieux pendant plusieurs décennies, indiquant que l’éradication d’un foyer de peste établi ne peut jamais être tenue pour acquise.

De plus, les modifications climatiques observées actuellement (printemps plus chauds, étés plus humides) offrent des conditions favorables à l’apparition d’épizooties de peste. À cela s’ajoute une menace majeure liée à la capacité maintenant démontrée du bacille à acquérir et transmettre des plasmides de résistance aux antibiotiques dans des conditions naturelles.

Le maintien, ou même le renforcement, d’une surveillance sur le terrain et les recherches visant à améliorer nos connaissances sur les conditions de circulation du bacille, sur les espèces hôtes et puces vectrices et à introduire des méthodes de diagnostic rapides et efficaces et faciles à mettre en œuvres, restent plus que jamais nécessaires.



*Matériels &*

*Méthodes*



**L'**objectif de notre travail est de rechercher l'agent de la peste par méthodes moléculaires (PCR) chez les chiens et chats errants capturés dans la région d'Alger.

## MATERIELS

### I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

#### I.1. Lieu et période de l'étude

##### I.1.1 Collecte de prélèvements

Une période de collecte de prélèvements a été effectuée de Décembre 2010 à Mars 2011 au niveau de la fourrière canine de la wilaya d'Alger.

La fourrière canine est le lieu où hébergent les chiens et les chats errants, elle procède à la capture de ces animaux.

La wilaya d'Alger ne dispose que d'une seule fourrière canine située dans la commune d'El-Harrach. Elle est en activité plus d'un siècle depuis l'époque coloniale (appelée fourrière municipale), actuellement elle dépend du bureau d'hygiène communal de la ville d'Alger (HURBAL), ayant en charge l'ensemble des communes de la wilaya d'Alger et même Tipaza.

La fourrière a pour rôles :

- De capturer et de prendre en charge les animaux errants ;
- De mettre en observation les animaux suspects de maladies contagieuses (zoonoses) telle que la rage ;
- De restituer les animaux capturés réclamés par leurs propriétaires ;
- D'abattre et d'enfouir les animaux capturés après chaulage.

Les champs d'action de la fourrière canine :

Pour capturer les animaux, chiens et chats errants principalement, les agents interviennent : dans les voies publiques au niveau de 57 communes en collaboration avec les bureaux d'hygiène communal ;

- Les collectivités (hôpitaux, hôtels..) ;
- A domicile chez les particuliers.



- Le rayon peut être exceptionnellement plus grand lorsque la capture a lieu dans les wilayas limitrophes (Boumerdes, Tipaza et Blida) (Saidi, 2006).

### I.1.2 Analyse des prélèvements

Une période d'analyse de prélèvements a été effectuée dans le laboratoire d'écologie des systèmes vectoriels à l'annexe El-Hamma de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), durant 4 mois.

### I.2. Animaux

Notre étude a été effectuée sur 55 chiens et 45 chats, de la fourrière canine d'EL Harrach (Boumati). La fourrière canine a reçu un total de 1 937 chiens et 4 021 chats pendant les mois de Janvier, Février et Mars 2011, ces animaux sont capturés par l'équipe de la fourrière dans différentes communes de la wilaya d'Alger dans le cadre des campagnes sanitaires organisées dans la capitale. Les animaux capturés sont transportés dans des cages jusqu'aux locaux de séquestration de la fourrière.

Après une semaine de séquestration, les animaux sont abattus à l'aide d'une décharge électrique de 380 volts. L'abattage se fait généralement le Jeudi, exceptionnellement le mardi.

Les animaux ont été examinés avant d'être abattus puis prélevés, les animaux étaient de tous âge et sexe, les informations relatives aux animaux sont notés dans des fiches de renseignement accompagnant chaque animal (**annexe n°1**).

### I.3. Type de prélèvements

Les prélèvements choisis dans notre étude pour rechercher *Yersinia pestis* étaient des rates chez 55 chiens et 45 chats.

### I.4. fiche de renseignement

Pour chaque animal une fiche de renseignement a été établie (**annexe n°1**), dans laquelle les informations les plus importantes ont été notés (espèce, race, sexe, âge...) ainsi que les signes observés (**annexe n°2**).

Chaque tube de prélèvement est identifié sur place par le numéro de la fiche de renseignement correspondante.



---

## II. MATÉRIEL NON BIOLOGIQUE

### II.1. Matériels de mission sur le terrain

#### II.1.1. Matériels de protection personnelle

Les prélèvements chez des animaux errants au niveau de la fourrière canine doivent se faire avec précaution, une protection personnelle doit être de mise, un matériel de protection peut être utilisé : (Lunettes de protection, masque de protection (FFP2), gants stériles, charlotte, blouse ou combinaison, bottes).

#### II.1.2. Matériels de prélèvements d'organes

Le matériel utilisé pour prélever ces animaux est cité dans l'**annexe n°3**.

### II.2. Matériels de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé pour analyser nos prélèvements est cité dans l'**annexe n°3**.

### II.3. Les réactifs et produits chimiques

Les réactifs utilisés dans notre expérimentation étaient les suivants :

- Alcool à 70%
- Extraction : Eau distillée stérile, ATL, protéinase K, Al, Ethanol, AW1, AW2, AE.
- La PCR : Buffer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, eau distillée stérile, Taq polymérase de la bactérie *thermus aquaticus*, Primers (A, B).
- Le gel : Agarose, BET, TBE, eau distillée à pH 7
- Tampon de charge (Bleu de Bromo phénol)
- Marqueur de poids moléculaire



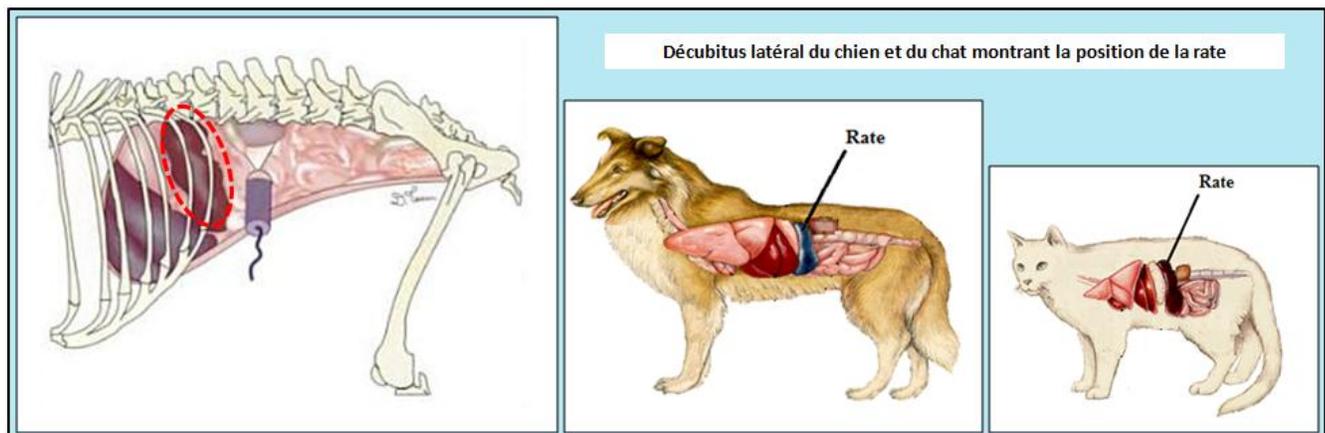
## METHODES

### I. PRELEVEMENT D'ORGANES

#### I.1. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT

##### I.1.1.1. Rappel anatomique

La rate est le plus volumineux organe lymphoïde périphérique, située dans la loge sous-diaphragmatique gauche. C'est un organe mou et délimité par une capsule, sa position varie en fonction de l'état de réplétion de l'estomac et lors d'une splénomégalie importante, elle peut s'étendre jusqu'au pubis. Chez le chien, elle est relativement peu mobile et maintenue en place par les ligaments spléno-colique et gastro-splénique. De grandes variations de formes et de tailles existent selon les espèces, son poids correspond à 0,2 % du poids total chez les carnivores. Dans les conditions physiologiques, chez le chien, elle pèse de 8 à 150 g selon la race, la taille et l'individu ; chez le chat, elle est de 2 à 25 g. Sa longueur varie de 8 à 30 cm chez le chien, et de 8 à 14 cm chez le chat (Noroy B., 2003).



**Figure 9** : Anatomie interne du chat et du chien indiquant la position de la rate (Source internet n° 4)



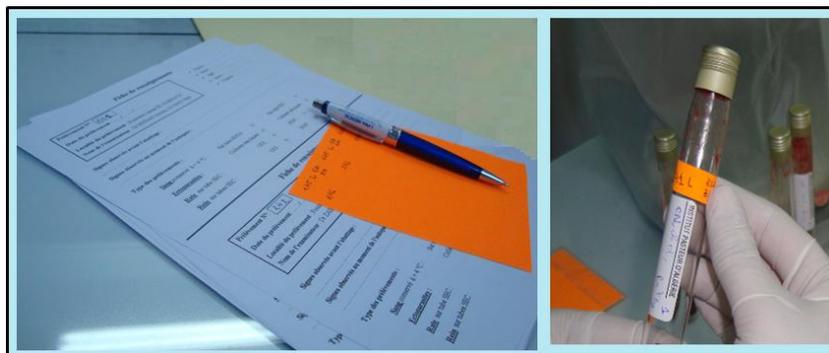
### I.1.2. Préparation du matériel

Une trousse de matériel chirurgical est préparée, contenant des pinces, des ciseaux, un bistouri et un écarteur, le matériel est désinfecté par autoclavage au niveau de l'Institut Pasteur avant son utilisation.



**Figure 10 :** Désinfection du matériel par autoclavage (Personnelle, 2011)

Les tubes à vice stériles utilisés ultérieurement pour les prélèvements de l'organe doivent être étiquetés pour pouvoir les numéroter par la suite selon le numéro de la fiche de renseignement qui lui correspond.



**Figure 11 :** Etiquetage des tubes à vice selon la fiche de renseignements correspondante (Personnelle, 2011)



### **I.1.3. Préparation de l'animal**

Procéder à un examen clinique de l'animal et remplir les fiches de renseignements numérotées au paravent, noter les signes cliniques les plus apparents ainsi que les renseignements de l'animal (espèce, sexe, âge...).

L'autopsie est réalisée juste après l'euthanasie de l'animal, l'animal est déposé en décubitus latéral droit sur une table propre, un bon rasage au niveau de la partie abdominale gauche est effectué, suite à cela, une désinfection rigoureuse à l'aide de l'alcool et du coton doit être pratiquée avant l'incision. Des champs stériles laissant apparaître l'endroit de l'incision sont déposés et bien fixés à fin d'éviter une éventuelle contamination.

### **I.1.4. Prélèvement de la rate**

Dans la partie haute de l'abdomen gauche, juste derrière la dernière cote, la peau de l'animal est bien tenue à l'aide des pinces, une petite incision de la peau a été réalisée en utilisant des ciseaux fins.

L'incision est maintenue ouverte à l'aide d'un écarteur, les plans musculaires sont incisés un après l'autre jusqu'à apparition du péritoine, l'accès à la rate est facile après ouverture de ce dernier. Dans certains cas, la recherche de cet organe au tour de l'incision s'avère nécessaire.

Compléter la fiche de renseignement avec les signes lésionnels existants.

Une fois l'organe est repéré, il est maintenu en place à l'aide d'une pince, le prélèvement d'un bout de rate s'effectue grâce à un bistouri puis mis directement dans un tube à vice stérile qui sera placé dans une glacière dans le but de l'acheminer jusqu'au laboratoire.

Il ne faut pas oublier de recopier à chaque fois le numéro de la fiche de renseignement sur le tube qui lui correspond.

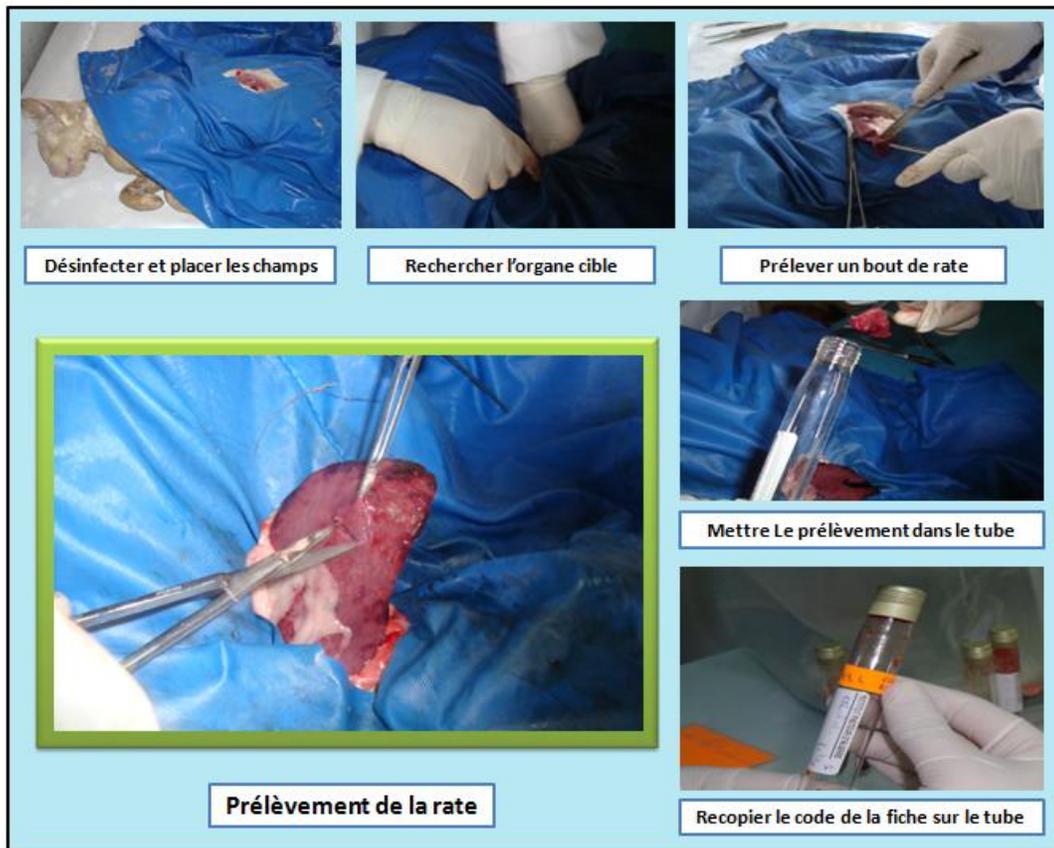


Figure 12 : Etapes du prélèvement de la rate (Personnelle, 2011)

## I.2. TECHNIQUES DE CONSERVATION DES ORGANES

### I.2.1. Transport des prélèvements

Juste après avoir été prélevés, les prélèvements des rates sont transportés au laboratoire, dans une glacière à une température d'à peu près  $+4^{\circ}\text{C}$ .



Figure 13 : Transport des prélèvements (Personnelle, 2011)



### I.2.2. Conservation proprement dite

Au laboratoire, les prélèvements sont conservés dans l'éthanol absolu à température ambiante, le temps de réaliser les analyses par PCR (extraction d'ADN).

Vérifier que les étiquettes sont bien collées et leurs numéros sont lisibles.



Figure 14 : Vérification des étiquettes et conservation des échantillons (Personnelle, 2011)

## II. PROTOCOLE DE LA P.C.R. (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

### II.1. Historique

La Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtint pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993 (Watson et al., 1994). La technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées, Il s'agit de la Taq polymérase isolée d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* adaptée à la vie dans les sources chaudes. Elle permet une automatisation de la technique dans les thermocycleurs (Etienne J., 2000).

### II.2. Principe

La réaction PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné ARN ou ADN (par exemple dans notre cas : recherche de l'ADN de *Yersinia pestis*) afin d'en obtenir une quantité suffisante pour pouvoir le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double



brin est répétée en boucle, en présence d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une DNA Polymérase. Dans notre étude nous avons réalisé une PCR classique.

### II.3. Méthode

#### II.2.1. Première étape « Protocole d'extraction d'ADN »

Cette étape consiste en l'extraction des acides nucléiques (ADN), à l'aide d'un Kit spécial QIA amp (kit QIAGEN®, Hilden, Germany), selon les constructions du QIAGEN (**QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2007**).

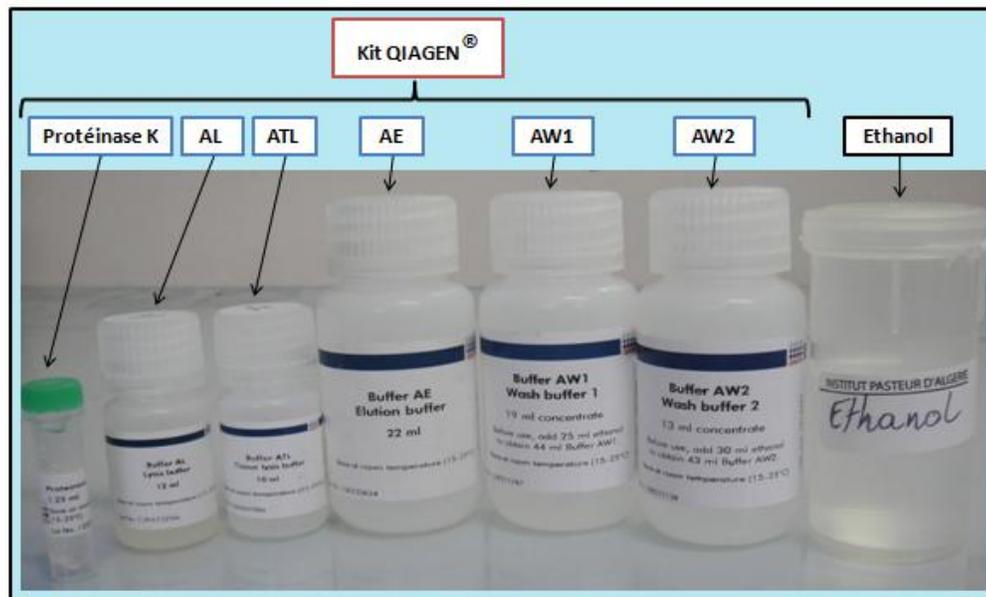


Figure 15 : Réactifs du Kit QIA amp utilisés pour l'extraction d'ADN (Personnelle, 2011)

L'extraction totale de l'ADN génomique nécessite trois étapes distinctes :

- **Lyse cellulaire** : utilisation du Tampon ATL, la protéinase K et le AL.
- **Élimination des débris** : utilisation des colonnes à filtres suivie par deux étapes de lavage à l'aide deux tampons (AW1 et AW2).
- **Élution de l'ADN** : utilisation du tampon AE.



### Les étapes de l'extraction sont les suivantes :

Le travail doit être réalisé dans des conditions d'hygiène rigoureuse (sous une hotte à flux laminaire, avec port de gants et bavette stériles).

1. Décontaminer le matériel d'extraction sous UV avant son utilisation.



**Figure 16 : Décontamination du matériel sous UV (Personnelle, 2011)**

2. les tissus conservés dans l'éthanol absolu, sont mis dans une boîte de pétrie et rincés à l'eau distillée stérile.
3. Prendre 10 mg de nos échantillons, les couper en petits morceaux à l'aide d'une pince et un bistouri (Il est important de couper le tissu en petits morceaux pour diminuer le temps de lyse) puis les introduire dans des tubes Eppendorf.



**Figure 17 : Etapes de préparation des échantillons avant l'utilisation des réactifs d'extraction (Personnelle, 2011)**

NB : désinfecter le matériel utilisé (boîte de pétrie, bistouri et pince) d'un échantillon à l'autre avec du coton imbibé d'alcool.



**Figure 18 : Désinfection du matériel après chaque usage (Personnelle, 2011)**



- Ajouter **180µl** de Buffer ATL (**tissue lysis buffer**, tampon de lyse). Le tampon ATL sert à macérer les tissus en lysant les cellules et les membranes nucléaires.

NB : changer à chaque fois l'embout de la micropipette pour éviter les contaminations entre les échantillons (même procédure pour toutes les étapes suivantes).

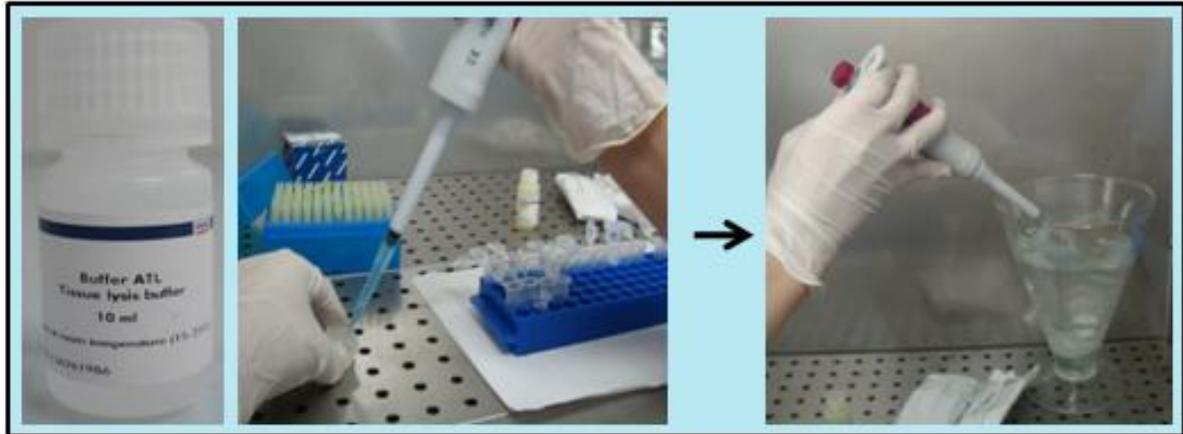


Figure 19 : L'ajout de l'ATL (Personnelle, 2011)

- broyer les échantillons en utilisant un broyeur pour chaque échantillon.



Figure 20 : Broyage des échantillons (Personnelle, 2011)

- Ajouter **20µl** de la **protéinase K**, puis agiter rapidement à l'aide du vortex.

Après avoir lysé les cellules à l'aide de l'ATL, l'ADN sera exposé aux protéines des tissus, l'ajout de l'enzyme protéinase K qui est une sérine protéase à large spectre s'avère indispensable pour dénaturer les protéines et les nucléases et garder ainsi l'ADN intact.



Figure 21 : L'ajout de la protéinase K (Personnelle, 2011)

7. Mettre les échantillons en incubation dans le bain à sec à **56°C** pendant **2 heures**, ou à **37°C** pendant **une nuit**, conditions optimales pour l'activation de l'enzyme responsable de la lyse complète du tissu.
8. centrifugation rapide pendant **30 secondes** (il faut bien équilibrer les tubes de façon qu'ils soient parallèles).

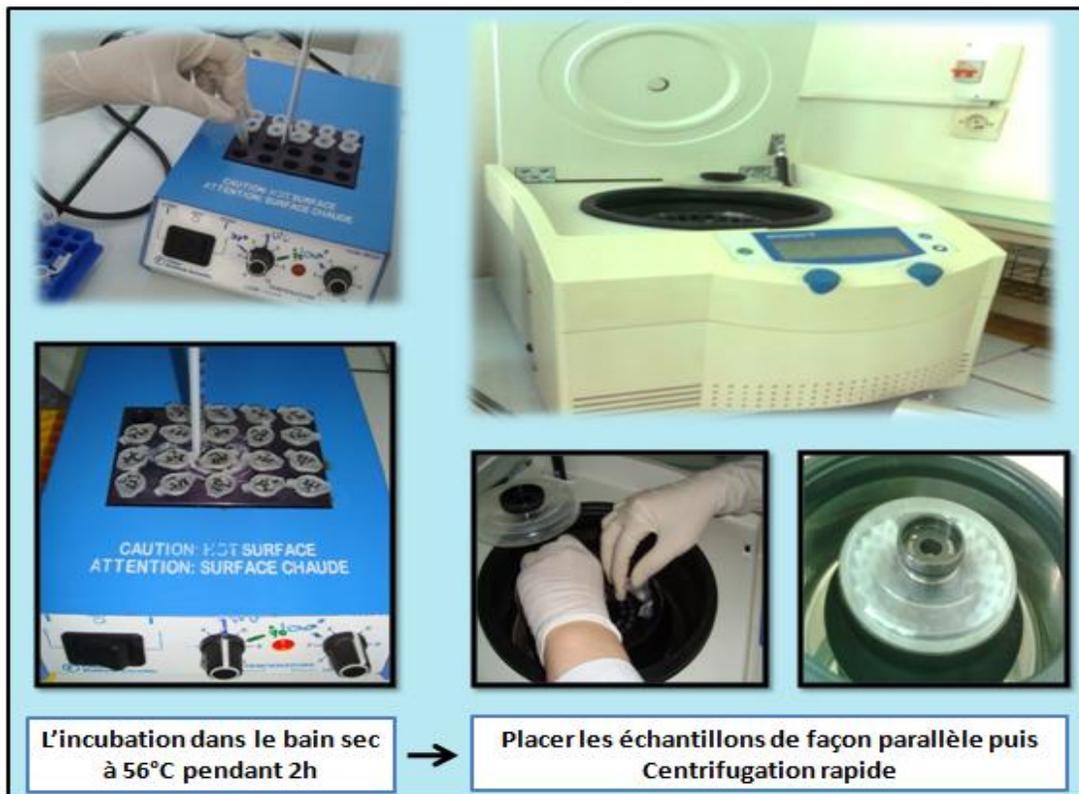


Figure 22 : L'incubation au bain sec et centrifugation des échantillons (Personnelle, 2011)



9. Ajouter **200µl** de Buffer AL (pour compléter la lyse), agiter au vortex pendant **15 secondes**.

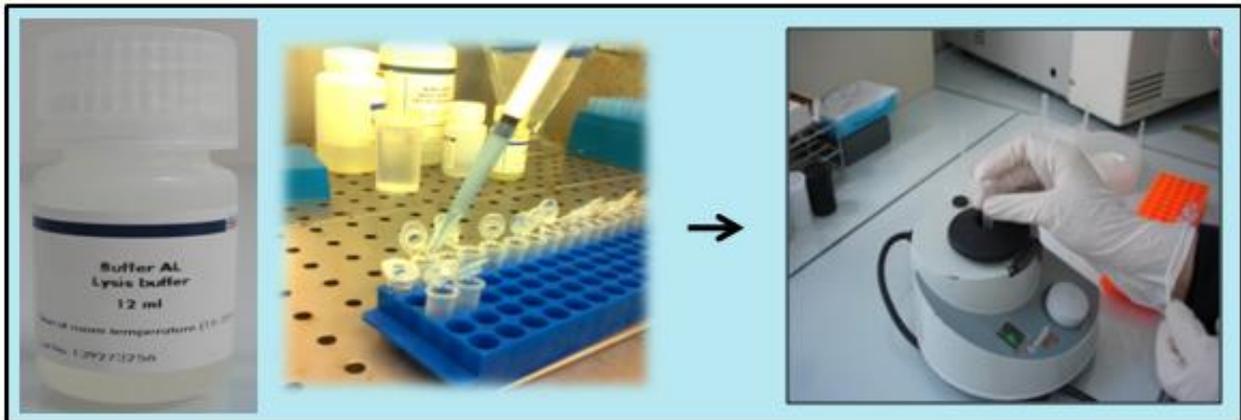


Figure 23 : L'ajout du Buffer Al (Personnelle, 2011)

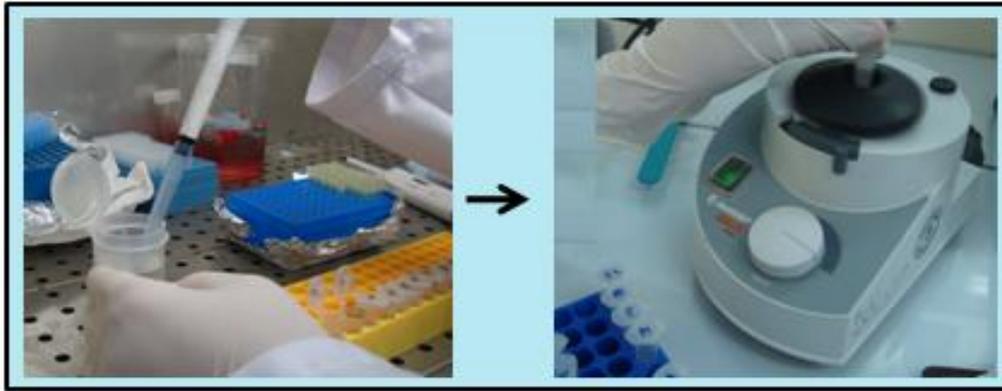
Mettre les échantillons au bain sec à **70°C** pendant **10 minutes**, permettant de finir l'étape de digestion en inhibant l'action de la protéinase K puis centrifuger rapidement.



Figure 24 : Deuxième incubation au bain sec et la centrifugation des échantillons (Personnelle, 2011)

10. Précipitation de l'ADN en ajoutant **200µl** d'éthanol (**96%-100%**), puis agiter au vortex pendant **10 à 15 secondes**.

Ne pas utiliser d'autres alcools que l'éthanol, car cela pourrait conduire à des rendements réduits.



**Figure 25 : L'ajout de l'éthanol (Personnelle, 2011)**

#### 11. Récupération de l'ADN sur membrane :

- Après la destruction des enzymes hydrolytiques et la précipitation de l'ADN, le processus de purification d'ADN est réalisé en versant le mix (Les composants cellulaires, y compris l'ADN) dans les tubes collecteurs à filtre (éviter de verser les débris visible à l'œil nu avec le contenu car ils peuvent bloquer le filtre) :
- Centrifuger à **8.000 tours/min** pendant **1 minute** (veuillez à bien fermer les tubes pour éviter la formation d'aérosols pendant la centrifugation), Si la solution n'a pas complètement passé à travers la membrane du filtre, centrifuger à nouveau à une vitesse plus élevée jusqu'à ce que toute la solution traverse le filtre. La centrifugation va permettre le passage de tout les débris à travers le filtre sauf l'ADN qui reste dans le filtre.
- Jeter l'éluat et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur.



Figure 26: Récupération de l'ADN dans les filtres des tubes collecteurs (Personnelle, 2011)

12. Première purification de l'ADN des débris cellulaires : Ajouter **500 $\mu$ l** de AW1 pour faire un premier lavage:

- Centrifuger à **8.000 tours/min** pendant **1 minute**.
- Jeter l'éluât et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur.

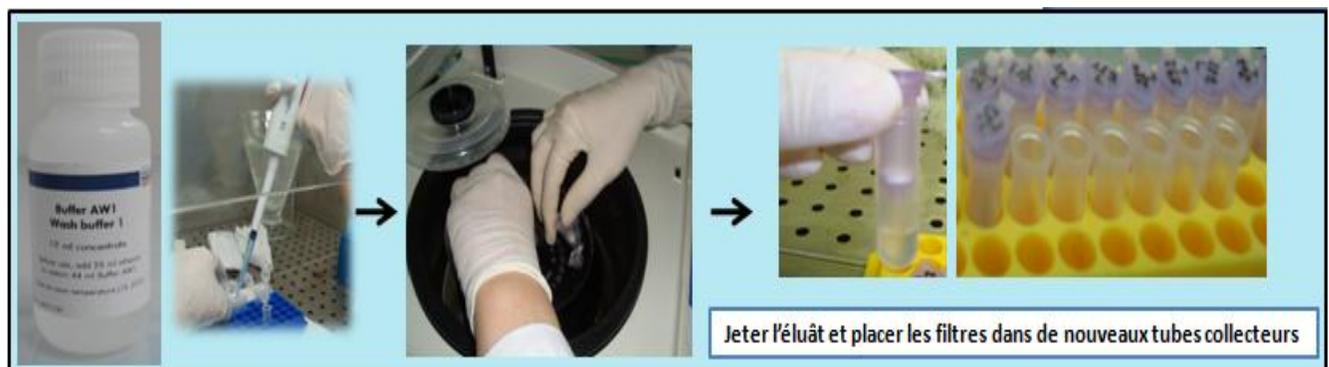


Figure 27 : Première purification : L'ajout de AW1 (Personnelle, 2011)



13. Deuxième purification : Ajouter **500µl** de **AW2** pour faire un deuxième lavage:

- Centrifuger à **14.000 tours/min** pendant **3 minutes**.
- Jeter l'éluat et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur.
- Centrifuger une nouvelle fois à **14.000 tours/min** pendant **1 minute**.



Figure 28 : Deuxième purification : L'ajout de AW2 (Personnelle, 2011)

14. Placer le filtre dans un tube Eppendorf et ajouter entre **150 à 200µl** de tampon **AE**, cette étape permet de supprimer l'ADN du filtre, en éluant l'ADN dans le tube collecteur.

- Incuber **1 à 5 minutes** à température ambiante.
- Centrifuger une dernière fois à **8.000 tours/min** pendant **1 minute**.



Figure 29 : L'ajout du AE (Personnelle, 2011)

15. Récupérer l'éluat qui contient l'échantillon d'ADN :

- Conserver l'échantillon à **+4°C** (Si utilisation dans les brefs délais, sinon stocker à **-20°C**).

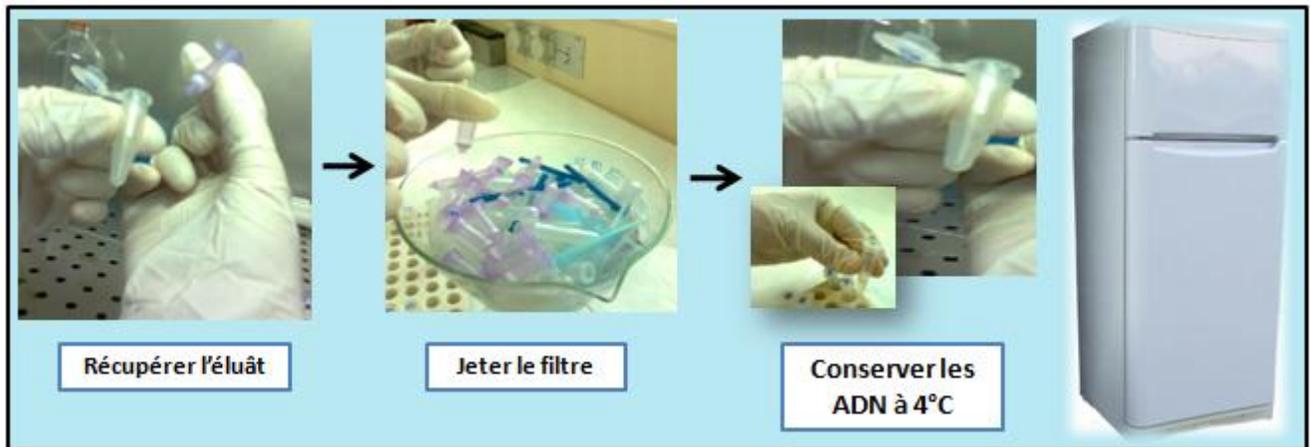


Figure 30 : Récupération des échantillons contenant l'ADN puis leur conservation sous froid (Personnelle, 2011)

## II.3.2. Seconde étape : « La PCR proprement dite »

### II.3.2.1. Préparation du mix

Cette opération se déroule dans une pièce isolée et sous une hotte pour éviter toute contamination du mix, avec le port de gants stériles.

Avant de commencer la préparation du mix, préparé tout le matériel qui le faut et le stériliser dans la hotte sous UV pendant à peu près 30 minutes.



Figure 31 : La salle de mix (Personnelle, 2011)

Le mix est un mélange de produits ou un ensemble de réactifs servant à la réaction PCR. La quantité et la concentration des réactifs utilisés dans le mix, doivent être respectées car peut être considéré



comme point critique pour la réussite d'une PCR, notant que ces quantités et concentrations diffèrent d'un protocole à l'autre, mais généralement contiennent tous :

- **Deux amorces, aussi appelées « primers »** : Contenant une courte chaîne de 20 à 30 oligonucléotides complémentaires des extrémités du fragment à amplifier. Ces deux amorces ont leur extrémité 3-prime (3') dirigée l'une vers l'autre encadrant ainsi la séquence à amplifier. Elles sont indispensables à l'accrochage de la polymérase.

Les amorces de L'ADN de *Yersinia pestis* que nous avons utilisé sont les oligonucléotides spécifiques du gène *Pla* de la taille de 300 pb (Bitam et al., 2010a) :

**Primer forward : 5'-ATG-GAG-CTT-ATA-CCG-GAA-AC-3'**

**Primer reverse : 5'-GCG-ATA-CTG-GCC-TGC-AAG-3'**

Le gène *Pla* code pour l'activateur du plasminogène qui est une protéase de surface cellulaire qui induit la fibrinolyse et dégrade la matrice extracellulaire et les membranes basales, c'est un facteur de virulence important permettant la propagation de *Yersinia pestis* à partir des sites sous-cutanés vers la circulation sanguine (Kukkonen et al., 2001 ; Sebbane et al., 2006).



Les amorces (Primers) utilisés dans le mix Eurogentec® (Belgique)

- **La Taq polymérase** : Une enzyme issue d'une bactérie thermophile nommée *Thermophilus aquaticus* (Saiki et al., 1988). Elle est adaptée pour les réactions PCR (résiste à de très hautes températures); capable d'amplifier l'ADN avec des amorces différentes. Elle polymérise l'ADN en ajoutant des désoxynucléotides à l'extrémité 3-prime.
- **Des désoxynucléotides** : Un **dNTP** est l'appellation courante du mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy **adénine** tri-phosphate), dCTP (désoxy **cytosine** tri-phosphate), dGTP (désoxy **guanine** tri-phosphate), dTTP (désoxy **thymine** tri-phosphate). C'est l'élément de synthèse de l'ADN complémentaire.



Figure 32 : Préparation du dNTPs (Personnelle, 2011)

- **Du MgCl<sub>2</sub>** : qui donne un pH et une concentration saline optimale au bon fonctionnement des amorces et de la Taq polymérase. Donc la concentration de MgCl<sub>2</sub> peut avoir un effet dramatique sur la spécificité et le rendement de la PCR.
- **Buffer PCR** : Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la Taq polymérase. Il contient du MgCl<sub>2</sub>.

Le mélange a été préparé pour un nombre déterminé de réactions :  $n + 2$  (pour les erreurs de pipetage). Le tableau suivant donne les valeurs de chaque réactif pour une seule réaction.

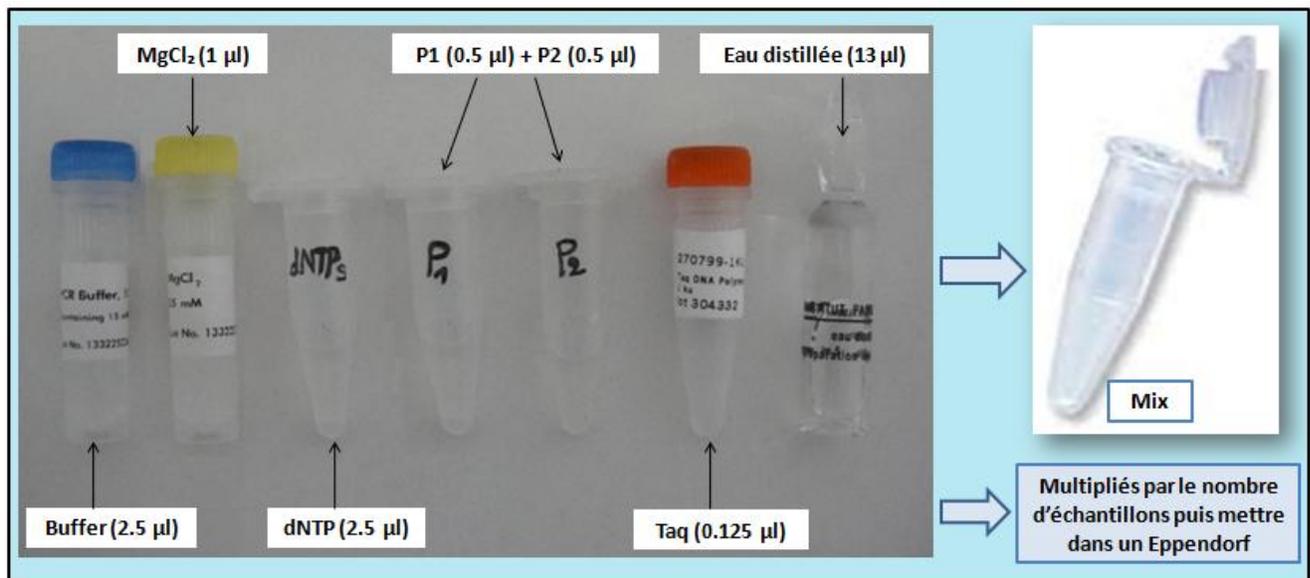


**Tableau 4** : les produits du mix (Bitam et *al.*, 2010a)

Produits	Concentration	Réaction pour un échantillon
Buffer 10x	10x	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1µl
dNTP	Figure 33	2,5µl
Primer 1 (forward)	1/100	0,5µl
Primer 2 (reverse)	1/100	0,5µl
Taq Polymérase	5 Unité/µl	0,125µl
Eau distillée sterile	----	13µl
<b>Total du mix</b>	----	<b>20µl</b>

Les primers (Eurogentec) ; Buffer, Mgcl2, dNTP, Taq polymérase (QIAGEN®, Hilden, Germany)

- Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés, puis mettre le tout dans un Eppendorf.



**Figure 33** : Les produits du mix (Personnelle, 2011)

- 20µl de ce mélange est distribué dans les barrettes PCR ou les barrettes à 8 stériles préalablement numérotés :



Figure 34 : Le dépôt du mix dans les barrettes PCR (Personnelle, 2011)

### II.3.2.2. L'ajout des ADN au mix

Prendre les barrettes PCR dans la salle de préparation d'ADN pour rajouter :

- **Témoin négatif** : 5µl d'eau distillé stérile au 20µl de mix.

Le témoin ou le contrôle négatif ne contient pas d'ADN, donc rien ne devrait être amplifié dans le puit du témoin négatif. Si nous aurons une bande à ce niveau, cela s'expliquera par une contamination des réactifs et les résultats obtenus peuvent être considérés comme des faux positifs.

- **Témoin positif** : 5µl de DNA positif pour 20µl du mix.

Le témoin ou le contrôle positif est un produit dont le résultat est déjà connu pour être positif, il sert à contrôler l'amplification, une bande bien visible à ce niveau, s'explique par une bonne amplification (Nous avons utilisé la souche *Yersinia pestis montanensis*, espèce endémique du MONTANA aux Etats-Unis).

- **Echantillons** : 5µl d'ADN de nos échantillons sont ajoutés dans le reste des tubes de barrettes PCR contenant 20µl de mix chacune. Le dépôt des échantillons doit se faire de façon attentive pour ne pas se tromper des numéros.

**Remarque** : le volume total dans chaque Eppendorff est de 25µl.

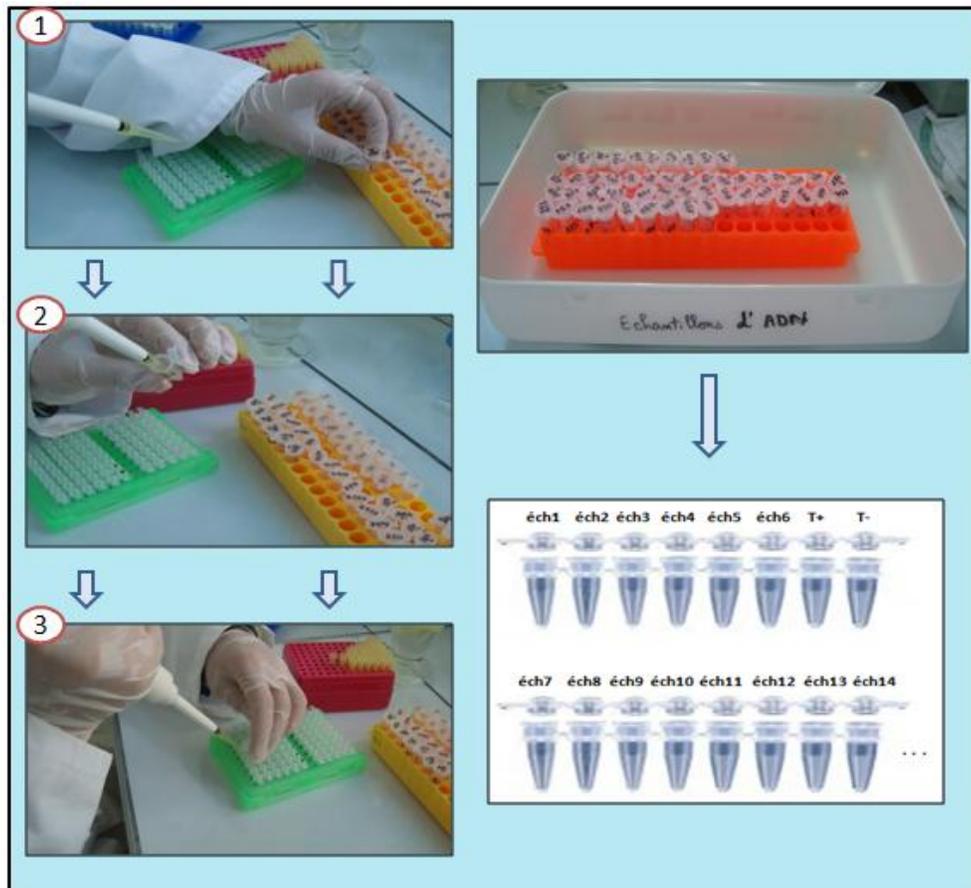


Figure 35 : L'ajout des ADN (échantillons) (Personnelle, 2011)

### II.3.2.3. Programmation du thermocycleur

- Les barrettes contenant le mix et les ADN sont introduits dans le thermocycleur.



Figure 36 : Appareil d'amplification de l'ADN : Thermocycleur (Personnelle, 2011)

Le but de cette technique est de détecter de faibles quantités d'ADN. Cette réaction est cyclique, et elle se fait en trois étapes qui constituent un cycle de PCR. Les trois différents cycles sont effectués



à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 39 cycles).

Les trois étapes sont les suivantes (**Lepoivre, 2003**) :

- **Dénaturation** : Consiste à chauffer à une température élevée de 94°C (température supérieure à la température de fusion des molécules d'ADN), à cette température, les liaisons faibles (hydrogènes) qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN servant de matrice à l'ADN polymérase.
- **Hybridation (annelage)** : une fois l'ADN séparé, un refroidissement rapide permet ensuite aux séquences des amorces (Primers) de s'apparier aux séquences complémentaires présentes dans la molécule d'ADN cible.

Cette étape d'hybridation des amorces est un paramètre essentiel à la spécificité de la PCR. La température et la durée de l'hybridation des amorces aux brins d'ADN vont dépendre de leur composition en nucléotides ainsi que de leur longueur.

La température de fusion (**T<sub>m</sub>** ou Melting Temperature) des amorces peut être calculée à l'aide de diverses équations. La formule la plus utilisée pour des amorces de moins de 20 nucléotides est la suivante :

$$\mathbf{Tm_1 = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)}$$

$$\mathbf{Tm_2 = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)}$$

$$\mathbf{Tm = (Tm_1 + Tm_2) / 2}$$

(Où A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide ; T<sub>m1</sub> = La température de fusion de la première amorce ; T<sub>m2</sub> = La température de fusion de la deuxième amorce).

La température d'hybridation, **T<sub>a</sub>**, est inférieure de 5°C à la température de demi-dénaturation (T<sub>m</sub>), cette température varie de 50 à 60°C.

$$\mathbf{Ta = Tm - 5^\circ C}$$



- **La polymérisation ou élongation (extension des amorces) :** Après la fixation des amorces qui servent de point de départ, l'ajout de la Taq polymérase et de nucléotides permet la synthèse des nouveaux brins d'ADN. La température de polymérisation de la Taq polymérase est de 72°C.
- **Nouvelle amplification :** après le premier cycle un nouveau cycle avec dénaturation, hybridation et polymérisation se produit, et les produits du premier cycle servent comme matrice pour le deuxième cycle.

Ce **cycle** dénaturation-amplification est effectué **39** fois dans notre étude. Le programme du Thermocycleur pour *yersinia spp* (Gène *pla*) est présenté dans le tableau suivant.

**Tableau 5 :** Le programme du thermocycleur (Malek, 2010)

	Températures	Temps	Etapes
Premier cycle	95°C	15 minutes	Dénaturation initiale
39 cycles	94°C	1 minute	Dénaturation
	58°C	0.5 minute	Hybridation
	72°C	1 minute	Elongation
Dernier cycle	72°C	5 minutes	Elongation finale
Conservation des échantillons	4°C		Fin

Les produits PCR peuvent être visualisés après migration en électrophorèse sinon les conservés à +4°C en attendant de réaliser la migration sur gel.

### II.3.3. Troisième étape : « Electrophorèse et révélation »

Les fragments d'ADN amplifiés précédemment sont révélés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5%. Dans ce type de gel, les migrations des fragments d'ADN dépendent de la charge et de la taille du fragment. La détermination précise des tailles des fragments séparés est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser.



### II.3.3.1. Préparation du gel d'Agarose 1.5% :

La préparation du gel d'agarose et la migration se fait dans la salle des gels.



Figure 37 : Salle des gels (Personnelle, 2011)

- Prendre 1.5 g d'agarose et le mettre dans le verre gradué.
- Ajouter 100 ml de **TBE 1X**.

Le **Tampon TBE** (pour Tris, Borate, EDTA) est un tampon de migration utilisé en électrophorèse et composé de Tris, d'acide borique et d'EDTA, la préparation du TBE 1X et du TBE 0,5X est expliquée dans l'**annexe n°4**.

- Faire chauffer dans un four à Micro-onde à 460W pendant 2 à 5 minutes jusqu'à ce que le liquide devient limpide.
- laisser le gel se refroidir à température ambiante.



Figure 38 : La préparation du gel d'agarose 1.5% (Personnelle, 2011)



### II.3.3.2. Coulage des gels dans la cuve à électrophorèse horizontale :

- Nettoyer la cuve ou le support avec son peigne à l'eau courante puis placer le peigne dans sa cuve.
- Ajouter 7 $\mu$ l de BET avec prudence dans le verre contenant les 100 ml d'agarose 1.5% puis verser le tout dans la cuve.
- Laisser polymériser.
- Après polymérisation du gel au bout de 30 minutes retirer le peigne.

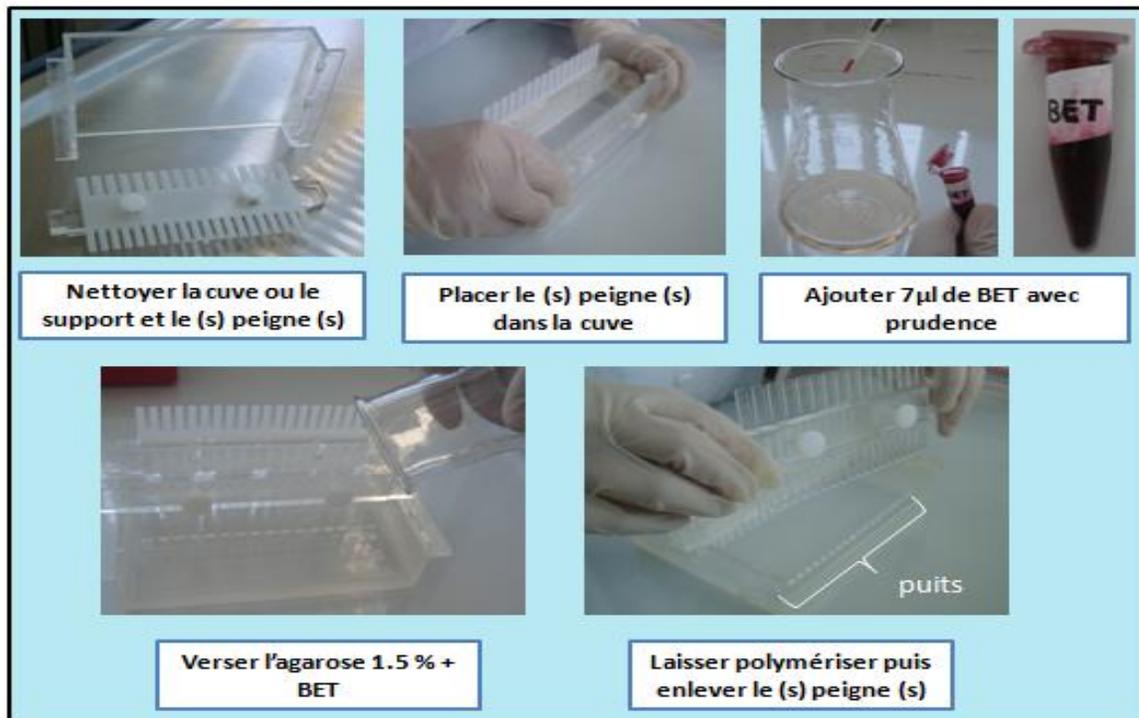


Figure 39 : Coulage du gel dans la cuve (Personnelle, 2011)

- **BET (bromure d'éthidium)** : c'est un agent intercalant, il se fixe sur l'ADN et permet la visualisation des bandes d'ADN. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée.

C'est un produit très cancérigène et mutagène, à manipulé avec une extrême prudence. Il doit être conservé à 4°C et enrobé avec du papier aluminium à l'abri de la lumière.

- Mettre le gel dans la cuve à migration contenant au préalable du **TBE 0,5X**.

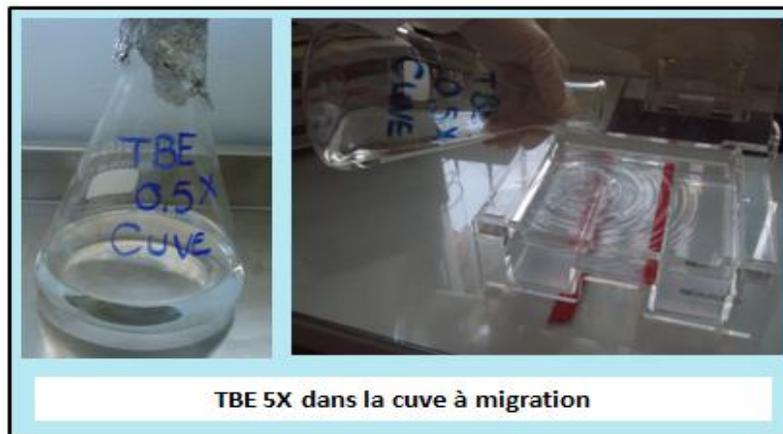


Figure 40 : TBE 5X dans la cuve à migration (Personnelle, 2011)

### II.3.3.3. le dépôt des échantillons dans le gel et leur migration :

- Prendre un morceau de Parafilm sur lequel est mis pour chaque échantillon à part : 7 $\mu$ l d'échantillon et 3 $\mu$ l de **tampon de charge** (Bleu de Bromo phénol).
- **Le bleu de bromophénol** : est un marqueur coloré utilisé afin de vérifier le bon déroulement d'une électrophorèse, il assure le maintien du dépôt en immersion dans le puit et permet la visualisation de la migration, il est légèrement chargé négativement à un pH modéré, il migre alors dans la même direction que l'ADN sur le gel.

NB : il ne faut pas oublier de changer l'embout de la micropipette pour chaque échantillon.

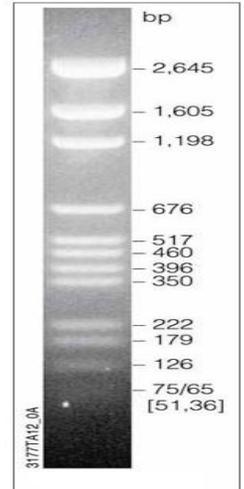
- Mélanger l'échantillon et le tampon de charge, mettre le mélange dans un micro-puit du gel.



Figure 41 : Le transfert des échantillons (ADN amplifiés) dans les puits (Personnelle, 2011)



- Déposer 5  $\mu\text{l}$  de marqueur de PM (poids moléculaire) d'une concentration de  $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dans le premier puit.
- **Un marqueur de poids moléculaire (BenchTop pGEM<sup>®</sup> DNA Markers, PR-G752A) :** est une solution de molécules d'ADN (d'une taille allant de 36bp à 2645bp) servant à déterminer le poids moléculaire de fragments d'ADN, il sert de référence pour estimer la taille (inconnue) des molécules d'intérêt.



**Figure 42 : Le dépôt des témoins et du marqueur de PM dans les derniers puits (Personnelle, 2011)**

Les trois derniers puits sont réservés pour : le témoin positif, le témoin négatif et le marqueur de poids moléculaire respectivement.

- Déposer les échantillons dans les autres puits.
- Fermer la cuve. Brancher les cordons de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-).

La molécule d'ADN est chargée négativement, ce qui lui permet de migrer vers l'anode (+) une fois un champ électrique est appliqué.

- Appliquer une tension de 120 V pendant environ une demi-heure de migration. Les baisses de tensions entraînent des migrations plus longues.
- Couper l'alimentation quand le colorant a parcouru la distance requise ou laisser la migration arriver jusqu'à 1 cm du bord de la cuve (cette ligne est appelée le front de migration).
- Débrancher le générateur de la cuve.



**Figure 43 : Application d'une tension électrique puis retrait du gel (Personnelle, 2011)**

#### II.3.3.4. Visualisation (lecture) par Transilluminateur :

La révélation du profil électrophorétique (visualisation des bandes d'ADN) se fait dans une chambre noire sur la table UV (transilluminateur), à une onde de 312 ou 365 nm: le BET fluorescent aux UV s'est fixé sur l'ADN et va permettre de visualiser les fragments d'ADN dans le gel placé sur la table UV. Une photo de chaque gel a été prise.



**Figure 44 : Visualisation du gel dans le transilluminateur à UV (Personnelle, 2011)**

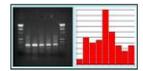
En fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés, on repèrera la bande et sa taille respectivement par rapport au témoin positif et au marqueur de PM.

### III. ANALYSE STATISTIQUE :

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel EXCEL 2007. Nous avons utilisé le test Fisher exacte pour comparer nos résultats (influence de l'âge, du sexe, des signes cliniques sur l'apparition de la maladie). La différence est considérée significative au risque d'erreur à 5 %.



## *Résultats & Discussion*



**N**ous évaluons, dans cet essai la présence de *Yersinia pestis* par PCR chez les chiens et les chats errants de la région d'Alger.

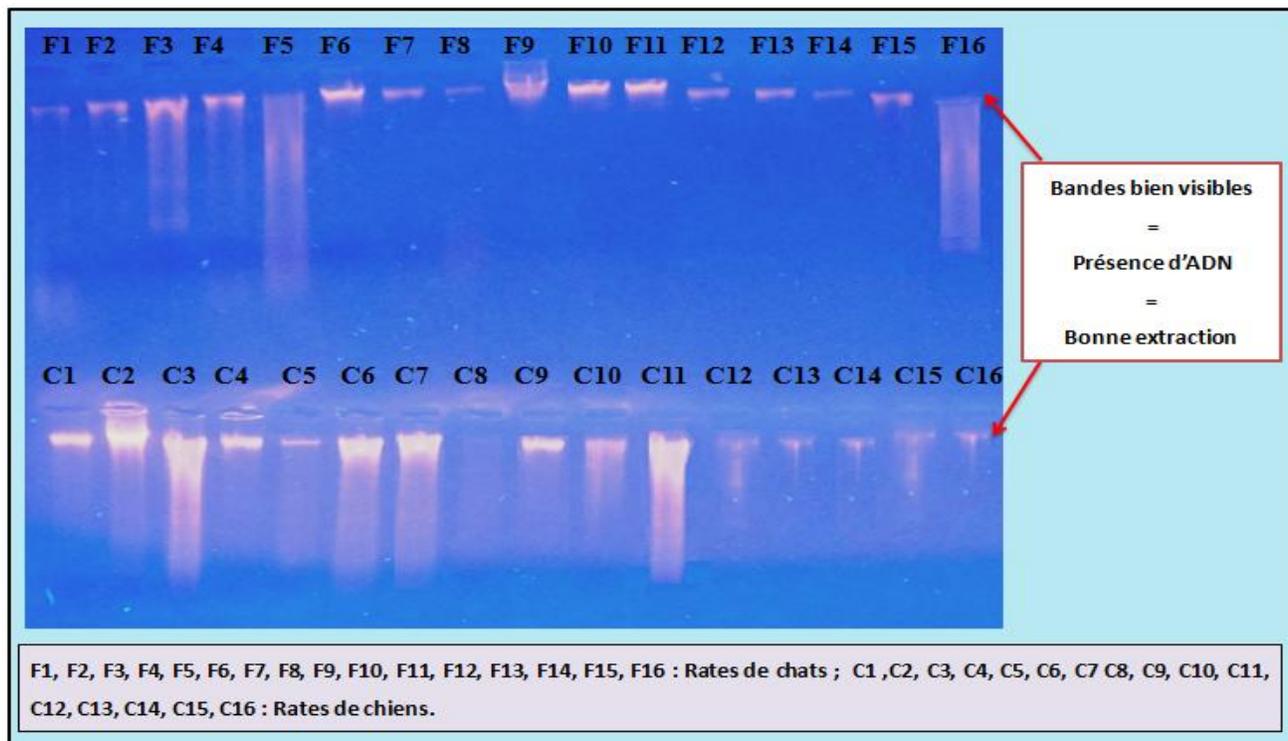
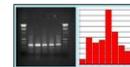
Les prélèvements de rates de chiens et de chats que nous avons récupéré de la fourrière canine d'EL Harrach ont été conservés dans l'éthanol absolu au laboratoire jusqu'au jour où l'extraction a été programmée, un échantillonnage de ces prélèvements a été effectué pour la réalisation de l'extraction, les ADN extraits ont été mis sous froid jusqu'à la réalisation de la PCR et la migration sur gels, la visualisation de ces derniers sur transilluminateur à UV a été effectuée le jour même après récupération des ADN amplifiés par le thermocycleur. Les résultats finaux ont été enregistrés et les gels obtenus ont été pris en photo.

### **I. Migration des échantillons sans amplification**

La vérification du bon déroulement de l'extraction se confirme en faisant migrer les produits d'extraction sur le gel d'agarose avant leur amplification. La présence de bandes bien visibles confirme que l'extraction des prélèvements a été bien faite et que les échantillons contiennent de l'ADN (**figure 45**).

La présence des smears (taches qui occupent une partie significative du puit) d'ADN sur le gel peut s'expliquer par une éventuelle dégradation d'ADN dans les échantillons.

Après vérification de la présence des ADN dans nos échantillons ou produits d'extraction, les étapes de la PCR proprement dite avec amplification peuvent être réalisées pour rechercher les gènes cibles (dans notre cas le gène *Pla* pour *Yersinia pestis*).



**Figure 45 : Gel qui montre la présence des ADN dans les échantillons de rates de chats et de chiens avant amplification (Personnelle, 2011)**

## II. La recherche de l'agent pesteux

La recherche de *Yersinia pestis* par PCR après extraction a porté sur 35 rates de chiens et 25 rates de chats sur un total de prélèvements de 55 rates de chiens et 45 rates de chats.

L'impossibilité d'analyser tout les prélèvements effectués s'explique par le manque de réactifs (réactifs extrêmement onéreux).

Les rates qui ont été testées par PCR étaient choisies au hasard de façon à avoir des échantillons prélevés dans des dates différentes. Chaque prélèvement porte un numéro et un code afin de le distinguer sur le gel.

### II. 1. Chez l'espèce féline

Après visualisation des bandes d'ADN lors de la migration sur gel d'agarose 1,5%, l'analyse par PCR révèle la positivité sur quatre rates appartenant à des chats (**figure 46**). Cette migration d'ADN amplifié par PCR révèle la présence d'ADN de *Yersinia pestis*, avec des bandes homogènes, uniformes de même poids moléculaire (300 pb), pour le gène *Pla*.

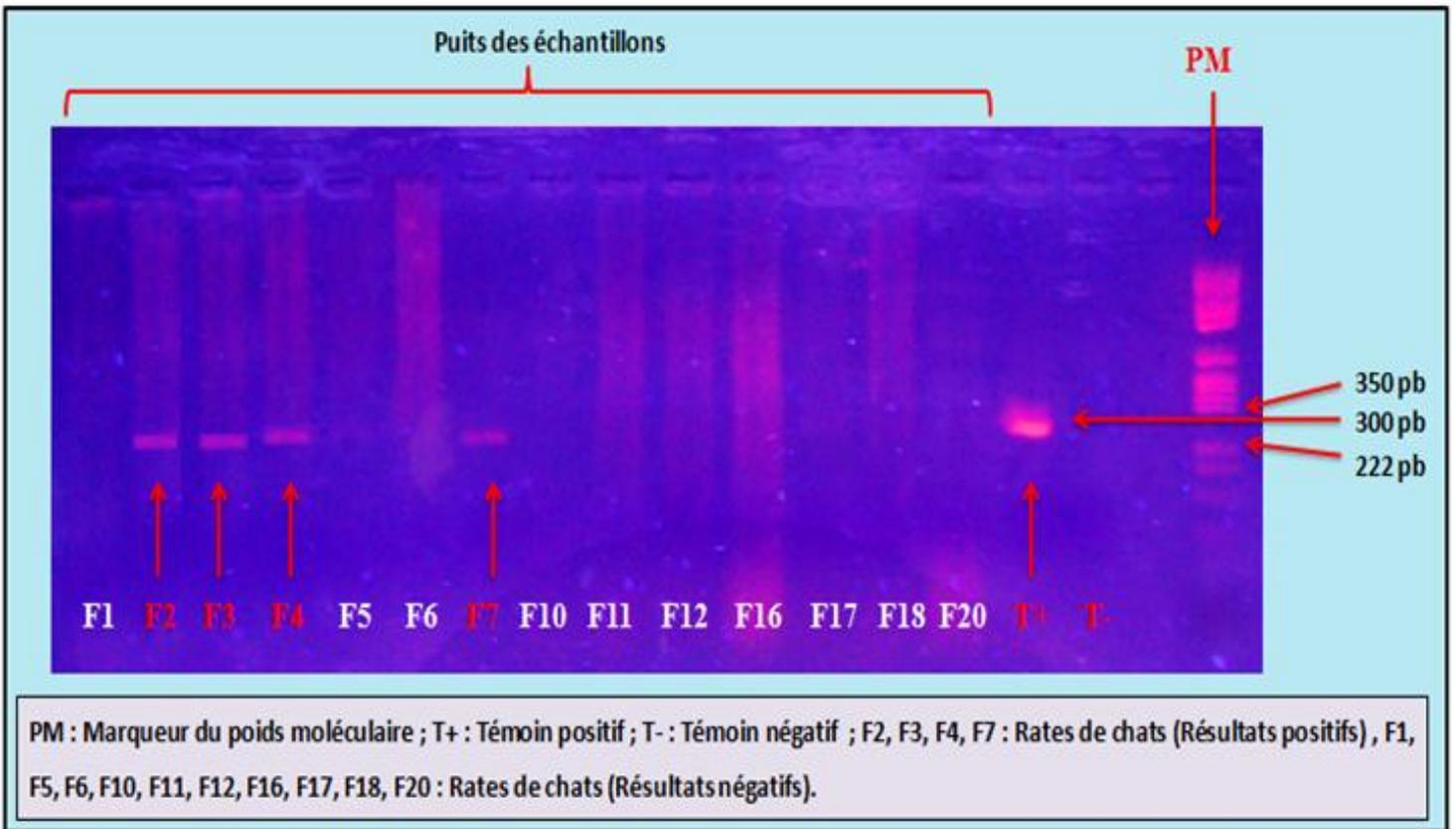
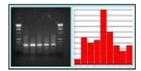


Figure 46 : Gel de PCR de *Yersinia pestis* (gène *Pla*) sur des rates de chats (Personnelle, 2011)

Au total, 4 chats étaient atteints de la peste sur les 25 testés par PCR, soit un taux de 16%.

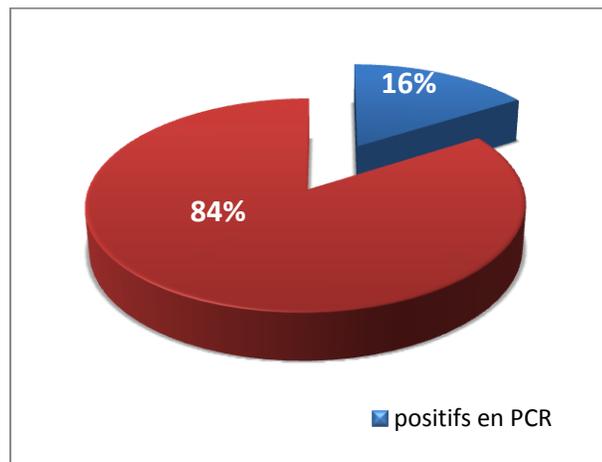
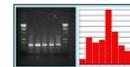


Figure 47 : Prévalence de chats positifs en PCR pour *Yersinia pestis* (Personnelle, 2011)



#### ❖ Répartition des chats atteints selon leur sexe :

Sur les 25 chats prélevés 10 étaient des mâles et 15 étaient des femelles soit des taux de 40% et 60% respectivement. Les deux sexes étaient touchés, nous avons eu 2 mâles et 2 femelles positifs à la PCR. L'influence du sexe sur l'apparition de la maladie n'est statistiquement pas significative ( $p < 0,05$ ).

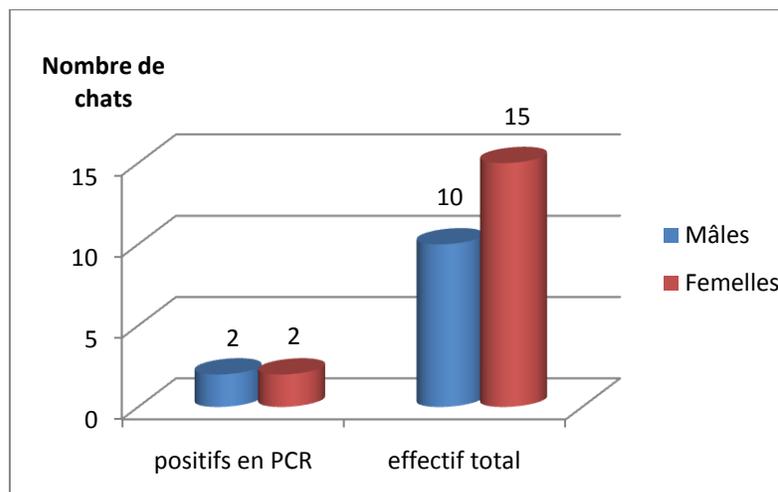


Figure 48 : Répartition de la peste selon le sexe des chats (Personnelle, 2011)

#### ❖ Répartition des chats atteints selon leur âge

Nous avons réparti les chats en deux tranches d'âge. Les jeunes chats qui sont âgés de moins d'un an et les adultes âgés de plus d'une année. Cette distribution a donné lieu à une prédominance de la tranche d'âge de plus d'une année avec 21 chats (84%), concernant les jeunes de moins d'1 année nous avons eu 4 chats seulement (16%).

Les animaux atteints étaient tous des adultes cela s'explique par le taux élevé de chats adultes prélevés par rapport aux jeunes. La différence d'âge n'étant statistiquement pas significative ( $p < 0,05$ ).

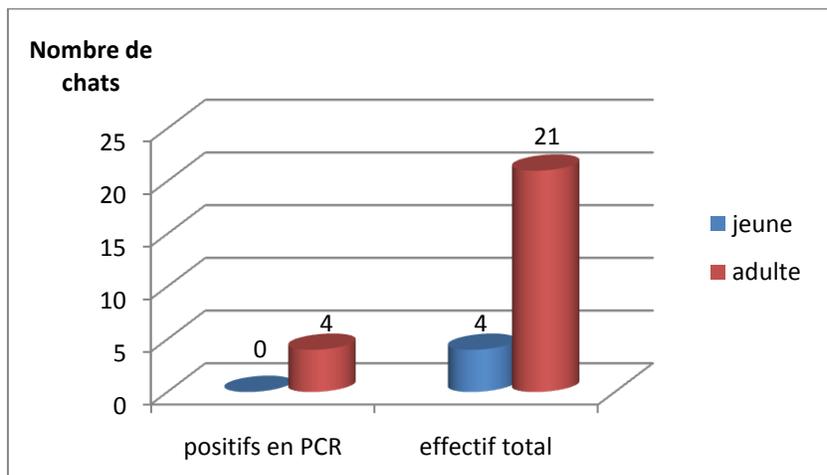
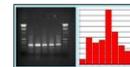


Figure 49 : Répartition de la peste selon l'âge des chats (Personnelle, 2011)

#### ❖ Répartition des chats positifs en PCR selon les signes cliniques

La répartition des chats positifs en PCR selon les signes cliniques observés (état général de l'animal, la couleur des muqueuses et l'hypertrophie ganglionnaire) est représentée dans le tableau ci dessous (**tableau 6**).

Trois chats parmi les quatre chats positifs étaient en mauvais état général, avec une hypertrophie des ganglions, deux d'entre eux avaient une coloration pâle des muqueuses. Aucun autre signe clinique n'a été observé chez ces animaux. La présence de puces ou preuve de piqûres de puces sur les chats n'a pas été noté. L'influence de ces signes cliniques sur l'apparition de l'infection, n'est statistiquement pas significative ( $p < 0,05$ ).

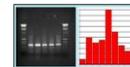


Tableau 6 : Les signes cliniques observés chez les chats positifs en PCR

Les chats atteints	Les symptômes observés		
	Etat général	Coloration des muqueuses	Hypertrophie ganglionnaire
F2	Bon	Rose	Non
F3	Mauvais	Pâle	Oui
F4	Mauvais	Rose	Oui
F7	Mauvais	Pâle	Oui

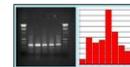
### Discussion :

Nous avons recherché le gène *Pla* de *Yersinia pestis* dans les rates de chats (**figure 46**), Nous avons constaté quatre bandes visibles homogènes, uniformes de même poids moléculaire (300 pb), ce qui révèle la présence d'ADN de *Yersinia pestis* chez les chats analysés.

La mise en évidence de la positivité de la peste par PCR chez les chats errants dans la région d'Alger peut conclure que le bacille pesteux circule de façon silencieuse en forme d'épizootie entre animaux errants, sachant que cela représente un risque potentiel puisque il peut être transmis aux animaux domestiques et à l'être humain sous l'effets de facteurs favorisants.

Le changement climatique (réchauffement planétaire) a favorisé l'apparition de plusieurs maladies vectorielles à l'échelle mondiale. La température élevée joue un rôle important dans le maintien et l'activité des ectoparasites qui transmettent la maladie d'un réservoir à un autre. La réapparition de la peste dans plusieurs pays du monde après plusieurs années de silence, a obligé les spécialistes de l'étudier avec profondeur.

Notre pays a connu la réapparition de la peste en 2003 à Oran (**R.E.A., 2003**) et dernièrement en 2008, un nouveau foyer est apparu dans la région de Laghouat où une petite épidémie a touché des nomades. Dans le but de rechercher les réservoirs responsables de cette épidémie, des rongeurs de



plusieurs espèces ont été capturés en 2009 dans différentes régions d'Algérie (Benaouali, Lagouat). Après une extraction effectuée sur leurs rates en utilisant le kit QIAamp Tissue, une amplification par PCR du gène de l'activateur du plasminogène (PLA) était réalisée, la positivité était de 16% **(Bitam et al., 2010a)**.

Dans notre étude, la PCR était positive dans les échantillons de rates de 4 chats parmi les 25 rates testés, soit un taux de 16%. L'apparition de la peste chez les chats errants dans notre région s'explique probablement par le fait que ces animaux sont en mauvais état d'hygiène en étant en contact avec des rongeurs comme prédateurs de ces derniers ou encore avec leurs puces, ce qui les exposera facilement au bacille pesteux.

Les symptômes que nous avons pu noter chez ces chats positifs étaient principalement le mauvais état de santé et l'hypertrophie ganglionnaire, autres symptômes n'ont pas été identifiés.

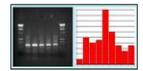
L'atteinte des chats par *Yersinia pestis* après ingestion de souris ou de rongeurs infectés a été déjà prouvée expérimentalement par Gasper et al (1993) et par Watson et al (2001).

D'après Gasper et al (1993), 38% des chats exposés à *Yersinia pestis*, ont eu un issu fatal, 44% ont développé une forme passagère de la maladie avec récupération et 19% ne présentaient aucun signe de la maladie.

Selon Watson et al (2001), la forme bubonique et la forme septicémique étaient les plus fréquentes, observées chez tous les chats inoculés, la forme pulmonaire était observée seulement dans 28% des cas, autrement dit les chats sont les seuls carnivores qui peuvent présenter les trois formes après une exposition à *Yersinia pestis*. Watson et al (2001) montrent que les chats infectés par voie orale présentent les mêmes symptômes que les chats infectés naturellement (ingestion de rongeurs infectés), avec l'apparition de nombreuses lésions dans les ganglions de la tête et du cou.

Eidson et al (1983) ont rapporté que la majorité des cas de peste féline survenus au nouveau Mexique présentaient une léthargie, de la fièvre et une hypertrophie ganglionnaire.

L'exposition aux chats infectés par *Yersinia pestis* est un risque reconnu depuis longtemps, le chat peut être une source d'infection pour les être humains suite à des griffures ou des morsures ou même



---

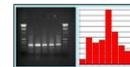
un simple contact (**Kaufmann et al., 1981**). La peste pulmonaire primaire contractée à partir des chats est devenue de plus en plus reconnue (**Doll et al., 1994**).

La peste féline était la source de l'infection humaine dans plusieurs régions du monde et plusieurs cas de chats atteints de cette infection ont été constatés avec 60 cas de peste féline au Nouveau-Mexique de 1977 à 1985 (**Eidson et al., 1988**) et 297 cas à l'ouest des Etats-Unis de 1977 à 1998 dont 23 (7.7%) étaient associés aux cas humains (**Gage et al., 2000**).

Le premier facteur de risque pour la peste féline semble être la chasse et l'ingestion des rongeurs morts dans les zones d'endémie. L'augmentation de chats errants est un facteur de risque pour leur acquisition de la peste (**Eidson et al., 1988**). Des enquêtes ont été réalisées dans la province orientale du Cap d'Afrique du Sud en 1982 où une épidémie de peste humaine a été déclarée. Il semble qu'au moins un cas humain a été contracté à partir d'un chat domestique infecté (**Shepherd et al., 1983**).

Une épidémie de peste chez des chasseurs a été signalée en Inde, Joshi et al (2009) mentionnent que les rongeurs morts n'ont pas été signalés et la puce du rat responsable de la maladie n'a été identifiée ce qui suggère que la cause était probablement liée à l'inhalation de particules infectantes après contact avec des chats sauvages et domestiques.

Lors d'une infection pesteuse, les chats peuvent jouer le rôle de sentinelles et développent des anticorps qui peuvent être détectés pendant plusieurs mois. Le dépistage sérologique d'une telle infection est particulièrement utile lors d'une suspicion clinique animale ou humaine et pour les enquêtes et programmes de surveillance épidémiologique (**Kaufmann et al., 1981**). Ce qui a été prouvé par plusieurs études sérologiques : 3,22% en Californie (USA) (**Chomel et al., 1994**) ; 170 chats au Etat de Ceará (Brésil) (**Aragao et al., 2002**) ; 26,5% a la Province du Yunnan (Chine) (**Li et al., 2008**) et 0,8% à Etat du Ceará (Brésil) (**Aragão et al., 2009**).

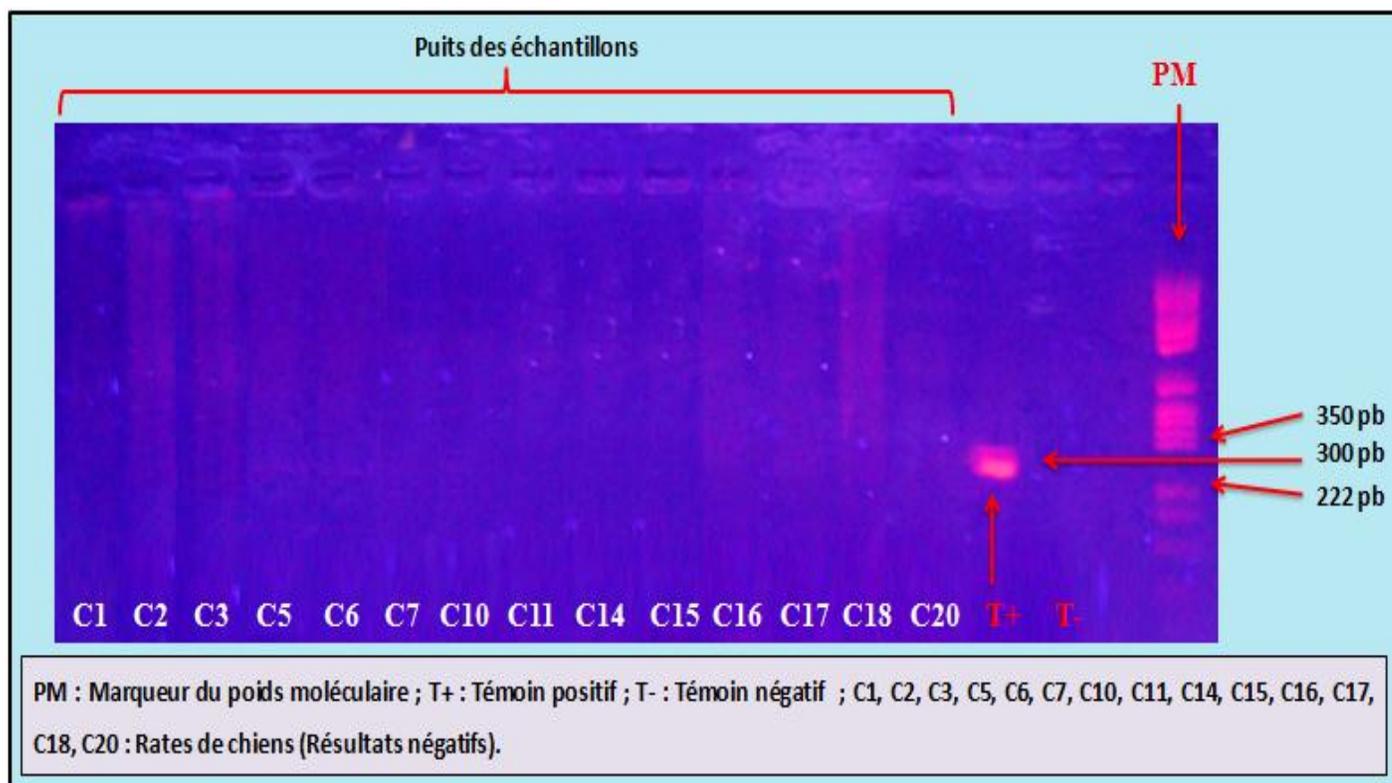


## II. 2. Chez l'espèce canine

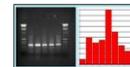
Les 35 échantillons de rates de chiens choisis aléatoirement ont été testés par PCR pour la recherche de *Yersinia pestis*, le gène *Pla* de la taille de 300 pb était ciblé dans notre étude.

Sur les 35 chiens 19 sont des mâles et 16 femelles soit des taux de 54% et 46% respectivement. Sur ces chiens testés, 29 étaient des adultes et 6 seulement des jeunes soit des taux de 82,8% et 17,2% respectivement.

Après amplification d'ADN et visualisation des gels sous UV, Les chiens se sont révélés tous négatifs à la PCR (**figure 50**).



**Figure 50 : Gel de PCR de *Yersinia pestis* (gène *Pla*) sur des rates et chiens (Personnelle, 2011)**



## Discussion :

Dans notre étude les résultats de PCR obtenus sur les rates de chiens étaient tous négatifs, aucune bande n'a été visible sur le gel. Nos résultats négatifs peuvent s'expliquer comme suit :

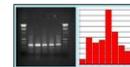
- Soit par une dégradation des ADN dans les échantillons suite à une mauvaise manipulation,
- Le chien est animal qui résiste parfaitement à la peste, de ce fait la détection de l'ADN de *Yersinia pestis* chez cette espèce est rare, cela a été déjà constaté par certains auteurs (Li et al., 2008),
- Par ailleurs, l'échantillon analysé n'était pas suffisant (faute de réactifs) pour pouvoir confirmer la résistance de cette espèce au bacille pesteux.

Le rôle du chien comme source d'infection pesteuse n'a pas été bien élucidé par les scientifiques. Dans les régions endémiques le chien peut avoir un rôle important dans l'épidémiologie de cette pathologie. Cela a été constaté au cours de l'épidémie qui a été déclarée en 2009 à la province du Qinghai, en Chine où 12 personnes ont été atteintes et où un chien décédé semblait être la source de l'infection (**Wang et al., 2011**).

Dans certains pays où la peste sévit de façon endémique tel que l'ouest des États-Unis et où les chiens sont fréquemment exposés à *Yersinia pestis* ; la peste doit être comprise dans le diagnostic différentiel avec d'autres pathologies lorsque l'on examine les chiens avec de la fièvre non spécifique et la léthargie (**Orloski et Eidson, 1995**).

Dans étude qui a été menée par Gould et al (2008) dans l'Ouest des États-Unis afin de mieux définir les risques associés aux animaux de compagnie, 79% des personnes atteintes de la peste avaient au moins un chien et 59% avaient au moins un chat. Les résultats suggèrent que les chiens peuvent faciliter le transfert de puces infectées des rats pesteux dans les habitations et que les activités avec les contacts étroits et prolongés avec les chiens peuvent augmenter le risque d'infection pesteuse (**Henn et al., 2007 ; Gould et al., 2008 ; Wang et al., 2009**).

D'après Li et al (2009), le chien domestique, l'un des hôtes animaux de *Yersinia pestis*, semble être très résistant à la peste quand il est infecté et présente une forme inapparente ou bénigne de la maladie. Cependant les chiens peuvent développer des titres d'anticorps élevés détectables après plusieurs mois, sans apparition de symptômes. Donc le chien est considéré comme un animal indicateur pour la surveillance de la peste et l'étude sérologique peut nous donner un indice sur les



zones où l'infection est active (**Rajerison et al., 2009** **Wang et al., 2011**).

Plusieurs études sérologiques ont été menées dans différentes régions du monde, confirmant ainsi que les chiens sont des sentinelles utiles pour donner la prévalence de la peste : 21,6% au Nouveau Mexique (USA) (**Rust et al., 1971**) ; 0,35% en Afrique du Sud (**Shepherd et al., 1983**) ; 6,3% aux montagnes d'Usambara occidentales (Tanzanie) (**Kilonzo et al., 1992**) ; 5,5% au Lushoto (Tanzanie) (**Kilonzo et al., 1993**) ; 2,09% en Californie (USA) (**Chomel et al., 1994**) ; 35% en Équateur (**Gabastou et al., 2000**) ; 0,075% à Alberta et Saskatchewan (Canada) (**Leighton et al., 2001**) ; 2,0% à Karatu et Ngorongoro (Tanzanie) (**Kilonzo et al., 2006**) ; 2,7% en Californie (USA) (**Henn et al., 2007**) ; 23,5% à la Province du Yunnan (Chine) (**Li et al., 2008**) ; 2,3% à l'Etat du Ceará (Brésil) (**Aragão et al., 2009**) ; 23,8% en Madagascar (**Rajerison et al., 2009**).

L'étude sérologique menée chez les chiens à l'Etat de Bahia au Brésil a été révélée négative, mais d'après Saavedra et al (2011), ces résultats ne peuvent pas confirmer l'éradication de la maladie dans l'État, puisque la nature cyclique de la peste indique que la maladie peut rester sous forme silencieuse pendant de longues périodes et ensuite ressurgit à nouveau, touchant un grand nombre d'animaux et de personnes. Ainsi, la détection précoce et le développement de mesures de contrôle adéquates s'avèrent nécessaires (**Saavedra et al., 2011**).



## *Conclusion & Perspectives*

**Conclusion :**

**L**es chiens et les chats errants posent de nombreux problèmes de salubrité dans nos villes. Leur gestion passe par une meilleure connaissance des principales maladies qu'ils peuvent contracter et transmettre à l'homme et à leurs congénères.

Le présent travail a pour but de surveiller la population errante de chiens et de chats de la région d'Alger contre la peste qui est à la fois dangereuse pour l'être humain que pour les animaux, en utilisant des méthodes de diagnostic qui n'ont pas pour habitude d'être utilisées chez les animaux, c'est les méthodes moléculaires (PCR).

Un travail sur terrain a eu lieu sur une période de quatre mois qui nous a permis de récupérer les prélèvements de rates des carnivores après leur euthanasie, puis analysés par méthodes moléculaires (PCR) à l'Institut Pasteur d'Alger, pour la recherche de *Yersinia pestis*.

Les résultats de PCR ont révélé la présence de l'agent de la peste dans les rates de chats avec un pourcentage de 16% (4/25), les résultats sur les rates de chiens étaient négatifs.

Nos résultats montrent que la peste féline est une pathologie qui sévit d'une façon silencieuse dans notre pays et qui menace la santé publique.

Les responsables de la santé publique doivent être vigilants concernant l'activité de la peste dans la population des carnivores errants et des rongeurs ainsi que d'autres animaux qui peuvent jouer le rôle de réservoirs. Les vétérinaires devraient soupçonner la peste féline chez les chats malades ou décédés.

Nos laboratoires doivent introduire des méthodes de diagnostic rapides et faciles à mettre en œuvre telles les méthodes moléculaires (PCR), pour surveiller les maladies dangereuses d'une transmission rapide et qui nécessitent une haute sécurité au laboratoire comme la peste.

***Perspectives :***

-  La peste fait partie des maladies les plus mortifères de l'histoire de l'humanité mais pourtant, elle est devenue dans les esprits une maladie du passé. Elle n'a cependant pas disparu et persiste à bas bruit dans ses réservoirs naturels..
- Dans le cadre de la surveillance de cette pathologie historique, il est nécessaire de faire une étude plus détaillée de cet agent infectieux chez le réservoir sentinelle qui est le chien.
  - Concernant le chat, il serait souhaitable d'établir en collaboration avec l'HURBAL pour récupérer toute carcasse de chats collectés par les agents afin de connaître l'origine de la mort de ces animaux et ceci permettra de savoir si cet agent circule chez nos chats qui sont très sensibles.
  - A propos du diagnostic de cette pathologie, l'utilisation des méthodes moléculaires d'une spécificité plus élevée telle que la PCR en temps réel ou le séquençage est nécessaire pour élargir le domaine de recherche de cette maladie dans notre pays.



*Références  
Bibliographiques*

1. **Acha P.N. et Szyfres B. (2005)** : Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'Homme et aux Animaux, 3e édition, Vol. I Bactérioses et mycoses. *Off. Int. Des Epizooties*, Paris, 382p.
2. **Adjemian J.C., Foley, P., Gage K.L. et Foley J.E. (2007)** : Initiation and spread of traveling waves of plague, *Yersinia pestis*, in the western United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(2), p: 365-375.
3. **Aragão A.I., Pinheiro K.M., Seoane A.C., Tavares C. et Almeida AM. (2009)** : Prevalence of antibodies against *Yersinia pestis* in domestic carnivores, in plague foci in the State of Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* , 42(6), p: 711.
4. **Aragao A.I., Seoane A.C., Leal T.C., Leal N.C. et Almeida A.M. (2002)** : Surveillance of plague in the State of Ceará: 1990-1999. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 35(2), p: 143-148.
5. **Arbaji A., Kharabsheh S., Al-Azab S., Al-Kayed M., Amr Z.S., Abu Baker M. et Chu M.C.A. (2005)** : 12-case outbreak of pharyngeal plague following the consumption of camel meat, in north-eastern Jordan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* , 99(8), p: 789-793.
6. **Ayyadurai S., Houhamdi L., Lepidi H., Nappez C., Raoult D. et Drancourt M. (2008)** : Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil. *Microbiology.* 154(9), p: 2865-2871.
7. **Azizi M.H., Azizi F. (2010)** : A history of the human plague in Iran. *Arch. Iran. Med.*, 13(6), p: 563-569.
8. **Baltazard M. (1971)** : Evolution de la recherche sur l'épidémiologie de la peste. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1(4), p: 203-218.
9. **Barreto A., Aragon M., Epstein P.R. (1995)** : Bubonic plague outbreak in Mozambique, 1994. *Lancet*, 345(8955), p: 983-984.
10. **Beaucournu J.C et Kowalski K. (1985)**: New data on fleas (Insecta-Siphonaptera) of Algeria. *Bull. Soc.Pathol. Exot. Filial.*, 78(3), p: 378-392.
11. **Beaucournu J.C. (1995)** : A propos du vecteur de la peste en Europe occidentale au cours de la deuxième pandémie. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 13(2), p: 233-252.
12. **Bekkhoucha S., Abi-ayad R. et Chougrani S. (2008)** : Diagnostic bactériologique de la peste au cours de l'épidémie de juin 2003. 1<sup>ère</sup> journée nationale de microbiologie clinique. SAMIC/ALAM (consulté sur : [www.alam-dz.com/Files/peste\\_com\\_2008.pps](http://www.alam-dz.com/Files/peste_com_2008.pps)).
13. **Bertherat E., Bekhoucha S., Chougrani S., Razik F., Duchemin J.B., Houti L., Deharib L., Fayolle C., Makrrougrass B., Dali-Yahia R., Bellal R., Belhabri L., Chaieb A., Tikhomirov E. et Carniel E., (2007)** : Plague Reappearance in Algeria after 50 Years, 2003. *Emerging Infectious Diseases*, 13(10), p: 1459-1462.
14. **Bevins S.N., Tracey J.A., Franklin S.P., Schmit V.L., Macmillan M.L., Gage K.L., Schriefer M.E., Logan K.A., Sweanor L.L., Alldredge M.W., Krumm C., Boyce W.M., Vickers W., Riley S.P., Lyren L.M., Boydston E.E., Fisher R.N., Roelke M.E., Salman M., Crooks K.R. et Vandewoude S. (2009)** : Wild felids as hosts for human plague, Western United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 15(12), p: 2021-2024.
15. **Bianucci R., Rahalison L., Ferroglio E., Massa ER. et Signoli M. (2007)** : Détection de l'antigène F1 de *Yersinia pestis* dans les restes humains anciens à l'aide d'un test de diagnostic rapide. *C. R. Biologies.*, 330(10), p: 747-754.
16. **Bin Saeed A.A., Al-Hamdan N.A. et Fontaine R.E. (2005)** : Plague from eating raw camel liver. *Emerg. Infect. Dis.*, 11(9), p: 1456-1457.
17. **Bitam I., Ayyadurai S., Kernif T., Chetta M., Boulaghman N., Raoult D. et Drancourt M. (2010)a** : New rural focus of plague, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.*, 16(10), p: 1639-1640.
18. **Bitam I., Baziz B., Rolain J.M., Belkaid M. et Raoult D., (2006)** : Zoonotic Focus of Plague, Algeria. *Emerg.*

- Infect. Dis.*, 12(12), p: 1975-1977.
19. **Bitam I., Dittmar K., Parola P., Whiting M-F., Raoult D. (2010)b:** Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*. 14(8):e667-76.
  20. **Blanc G. (1956) :** Une opinion non conformiste sur le mode de transmission de la peste. *Revue d'Hygiène et de Médecine Sociale*, 4(6), p: 532-562.
  21. **Boisier P., Rasolomaharo M., Ranaivoson G., Rasoamanana B., Rakoto L., Andrianirina Z., Andriamahefazafy B. et Chanteau S. (1997) :** Urban epidemic of bubonic plague in Majunga, Madagascar: epidemiological aspects. *Trop. Med. Int. Health*, 2(5), p: 422-427.
  22. **Boutiba B.B.I. (2010) :** Cours sur l'Actualité sur la peste. Laboratoire de Microbiologie EPS Charles Nicolle. Collège des Maladies Infectieuses, Microbiologie et Parasitologie et Mycologie, Tunis. (consulté sur : [http://www.infectiologie.org.tn/pdf/cmi/27-05-2010/actualite\\_ peste.pdf](http://www.infectiologie.org.tn/pdf/cmi/27-05-2010/actualite_ peste.pdf)).
  23. **Brown H.E., Levy C.E., Ensore R.E., Schriefer M.E., Deliberto T.J., Gage K.L. et Eisen R.J. (2011) :** Annual Seroprevalence of *Yersinia pestis* in Coyotes as Predictors of Interannual Variation in Reports of Human Plague Cases in Arizona, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11(11), p: 1439-1446.
  24. **Bussiéras P. et Chermette R. (1991) :** Abrégé de parasitologie vétérinaire (fascicule IV : Entomologie vétérinaire). Edition: Maison Elford. p : 37-51 ; 89-96.
  25. **Butler T. (1995) :** *Yersinia* species (including plague) In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York, N.Y: Churchill Livingstone, p. 2075.
  26. **Butler T., Levin J., Linh N.N., Chau D.M, Adickman M. et Arnold K. (1967) :** *Yersinia pestis* infection in Vietnam. II. Quantitative blood cultures and detection of endotoxin in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *J. Infect Dis.*, 133(5), p: 493-499.
  27. **Carniel E. (2002) :** La peste. Academie des sciences/Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, *Comptes Rendus Biologies*, 325(8), p: 851-853.
  28. **Carniel E. (2008) :** Plague today. *Med. Hist. Suppl.*, (27), p: 115-122.
  29. **Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, Carniel E et Nato F. (2003) :** Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*, 361(9353), p: 211-6.
  30. **Chanteau S., Ratsitorahina M., Rahalison L., Rasoamanana B., Chan F., Boisier P., Rabeson D. et Roux J. (2000) :** Current epidemiology of human plague in Madagascar. *Microbes and Infection. Science direct*. 2(1), p: 25-31.
  31. **Chomel B.B., Jay M.T., Smith C.R., Kass P.H., Ryan C.P. et Barrett L.R. (1994) :** Serological surveillance of plague in dogs and cats, California, 1979-1991, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 17 (2), pp. 111-123.
  32. **Christie A.B., Chen T.H. et Elberg S.S. (1980) :** Plague in camels and goats: their role in human epidemics. *J Infect Dis.*, 141(6), p: 724-726.
  33. **Coulanges P. et Randrianantoanina E. (1985) :** Resistance des puces pestigènes malgaches aux insecticides organochlorés, organophosphorés et aux carbamates. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 51(1), p: 253-260.
  34. **Crook L.D. et Tempest B. (1992) :** Plague: a clinical review of 27 cases. *Arch. Intern. Med.*, 152(6), p: 1253-1256.
  35. **Demeure C. et Carniel E. (2009) :** *Yersinia pestis*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 415, p: 33-39.

36. **Denis F. (2007)** : Bactériologie médicale: techniques usuelles. *Elsevier Masson*, 573 p.
37. **Dennis T.D. et Gage K. L (1999)** : Manuel de la Peste : Epidémiologie, répartition, surveillance et lutte. World Health Organization, 102p. (consulté sur : <http://www.who.int/csr/resources/publications/plague/whocdscsredc992Fa.pdf>)
38. **Desachy F. (2005)** : Les zoonoses: transmission des maladies des animaux à l'homme, De Vecchi, 180 p.
39. **Devignat R. (1951)** : Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis* : nouvelle hypothèse. *Bull. OMS*, 4(2), p: 247- 263.
40. **Didier R. (1998)** : Dictionnaire de maladies infectieuses: diagnostic, épidémiologie, répartition géographique, taxonomie, symptomatologie. Elsevier Masson, 1162 p.
41. **Doll J.M., Zeitz P.S., Ettsetad P., Bucholtz A.L., Davis T. et Gage K. (1994)** : Cat-transmitted fatal pneumonic plague in a person who traveled from Colorado to Arizona. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51(1), p: 109 -114.
42. **Drancourt A.M., Roux V., Dang H.L. et Tran-Hung L., Castex D., Chenal-Francisque V., Ogata H., Fournier P.E., Crubezy E. et Raoult D. (2004)** : Genotyping, Orientalis- like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg Infect Dis*; 10(9), p: 1585-1592.
43. **Dryden M.W. et Rust M.K. (1994)** : The cat flea : biology, ecology, and control. *Vet. parasitol.*, 52(1-2), p: 1-19.
44. **Duchemin J-B., Fournier P.E. et Parola P. (2006)** : les puces et les maladies transmises à l'homme. *Med. Trop.*, 66(1), p: 21-29.
45. **Eidson M., Thilsted J.P. et Rollag O.J. (1991)** : Clinical, clinicopathologic, and pathologic features of plague in cats: 119 cases (1977-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 199(9), p: 1191-1197.
46. **Eidson M., Tierney L.A., Rollag O.J., Becker T., Brown T. et Hull H.F. (1988)** : Feline plague in New Mexico: risk factors and transmission to humans. *Am. J. Public. Health.*, 78(10), p: 1333-5.
47. **Eisen R.J., Borchert J.N., Holmes J.L., Amatre G., Van Wyk K. et Ensore R.E. (2008)** : Early phase transmission of *Yersinia pestis* by cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and their potential role as vectors in a plague-endemic region of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(6), p: 949–956.
48. **Engelkirk P.G. et Duben-Engelkirk J.L. (2007)** : Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic, Lippincott wiliams et wilkins, 754p.
49. **Engelthaler, D.M., Gage, K.L., Monteneri, J.A., Chu, M. and Carter, L.G. (1999)** : PCR Detection of *Yersinia pestis* in fleas: Comparison with mouse inoculation. *J. Clin. Microbiol.*, 37(6), p: 1980-1984.
50. **Etienne J. (2000)** : Biochimie, génétique et biologie moléculaire. 6ème édition MASSON, Paris, 505p.
51. **Eyquem A., Alouf J. et Montanier L. (2000)** : Traité de microbiologie clinique, *Piccin*, (20), p : 228.
52. **Fedorow V.N. (1960)** : Plague in camels and its prevention in the USSR. *Bull. OMS*, 23(2,3), p: 275-281.
53. **Frean J.A., Arntzen L., Capper T., Bryskier A. et Klugman K.P. (1996)** : In vitro activities of 14 antibiotics against 100 human isolates of *Yersinia pestis* from a southern African plague focus. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(27), p: 2646–2647.
54. **Gabastou J.M., Proano J., Vimos A., Jaramillo G., Hayes E., Gage K., Chu M., Guarner J., Zaki S., Bowers J., Guillemard C., Tamayo H. et Ruiz A. (2000)** : An outbreak of plague including cases with pneumonic infection, Ecuador, 1998. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94(4), p: 387–391.
55. **Gage K.L., Dennis D.T., Orloski K.A., Ettestad P.J., Brown T.L., Reynolds P.J., Pape W.J., Fritz C.L., Carter L.G. et Stein J.D. (2000)** : Cases of cat-associated human plague in the Western US, 1977–1998. *Clin. Infect. Dis.*,

- 30(6), p: 893–900.
56. **Gage K.L., Ostfeld R.S. et Olson J.G. (1995)** : Nonviral vector-borne zoonoses associate with mammals in the United States. *J. Mammal.*, 76(3), p: 695–715.
  57. **Gage KL et Kosoy MY. (2005)** : Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu Rev Entomol.* 50, p: 505-528.
  58. **Galimand M, Carniel E et Courvalin P. (2006)** : Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50(10), p: 3233-3236.
  59. **Ganapati M. (1995)** : India's pneumonic plague outbreak continues to baffle. *BMJ.*, 16,311(7007), p: 706.
  60. **Ganiere J.P., Ruvoen N. et Andre-Fontaine G. (2001)** : Zoonoses infectieuses d'origine canine et féline. *Méd. Mal. Infect.*, 31 (2), p: 109-125.
  61. **Gasper, P. W., Barnes A. M., Quan T. J., Benziger J. P., Carter L. G., Beard M. L., et Maupin G. O., (1993)** : Plague (*Yersinia pestis*) in cats: description of experimentally induced disease. *J. Med. Entomol.*, 30(1), p: 20–26.
  62. **Godeau P., Herson S. et Piette J.C. (2004)** : Traité de Médecine, Flammarion. Tome 2, p: 2109.
  63. **Gould L.H., Pape J., Ettestad P., Griffith K.S. et Mead P.S. (2008)** : Dog-associated risk factors for human plague. *Zoonoses Public Health.*, 55(8-10), p:448-454.
  64. **Griffin K.A., Martin D.J., Rosen L.E., Sirochman M.A., Walsh D.P., Wolfe L.L., Miller M.W. (2010)** : Detection of *Yersinia pestis* DNA in prairie dog-associated fleas by polymerase chain reaction assay of purified DNA. *J. Wildl. Dis.*, 46(2), p: 636-643.
  65. **Guinet F. et Carniel E., (2000)** : Situation actuelle de la peste : Epidémiologie et problèmes de résistance aux antibiotiques. *Refdoc.*, 2(2), p: 110-114.
  66. **Harrison R.L., Patrick M.J. et Schmitt C.G. (2003)** : foxes, fleas, and plague in new mexico. *the southwestern Association of naturalist*, 48(4), p: 720-728.
  67. **Henn J.B., Gabriel M.W., Kasten R.W., Brown R.N., Theis J.H., Foley J.E. et Chomel B.B. (2007)** : Gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) as a potential reservoir of a Bartonella clarridgeiae-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *J. Clin. Microbiol.*, 45(8):2411-8.
  68. **Hinnebusch B. J., Rosso M.L., Schwan T. G. et Carniel E. (2002)** : High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. *Molecular Microbiology.* 46(2), p: 349-354.
  69. **Hinnebusch J. et Schwan T.G. (1993)** : New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas. *J. Clin. Microbiol.*, 31(6), p: 1511-1514.
  70. **Houhamdi L., Lepidi H., Drancourt M. et Raoult D. (2006)** : Experimental model to evaluate human body louse as a vector of plague. *J. Infect. Dis.* 194(11), p:1589-1596.
  71. **Joshi K., Thakur J.S., Kumar R., Singh A.J., Ray P., Jain S. et Varma S. (2009)** : Epidemiological features of pneumonic plague outbreak in Himachal Pradesh, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 103(5), p: 455-60.
  72. **Juif M. (2011)** : Les zoonoses transmissibles du rat a l'homme : Conseils en officine. Thèse en vue d'obtention du diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université Henri Poincaré – Nancy, France, 135 p.
  73. **Kaoneka A.R.S. et Solberg B. (1994)** : Forestry-related land use in the West Usambara mountains, Tanzania. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 49(2), p: 207-215.

74. **Kaufmann A.F., Mann J.M., Gardiner T.M., Heaton F., Poland J.D., Barnes A.M. et Maupin G.O. (1981) :** Public health implications of plague in domestic cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 179(9), p: 875-878.
75. **Khan I.A. (2004) :** Plague: the dreadful visitation occupying the human mind for centuries. *Transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 98(5), p: 207-227.
76. **Kilonzo B.S., Gisakanyi N.D. et Sabuni C.A. (1993) :** Involvement of dogs in plague epidemiology in Tanzania. Serological observations in domestic animals in Lushoto District. *Scand. J. Infect. Dis.*, 25(4), p: 503-506.
77. **Kilonzo B.S., Makundi R.H. et Mbise T.J. (1992) :** A decade of plague epidemiology and control in the western Usambara mountains, north-east Tanzania. *Acta. Trop.*, 50(4), p: 323-329.
78. **Kilonzo B.S., Mbise T.J., Mwalimu D.C. et Kindamba L. (2006) :** Observations on the endemicity of plague in Karatu and Ngorongoro, northern Tanzania. *Tanzan. Health. Res. Bull.*, 28(1), p: 1-6.
79. **Kukkonen M., Lähteenmäki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emödy L., Lång H. et Korhonen T.K. (2001) :** Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.*, 40(5), p: 1097-1111.
80. **Leighton F.A., Artsob H.A., Chu M.C. et Olson J.G. (2001) :** A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can. J. Public. Health.* , 92(1), p: 67-71.
81. **Lepoivre P. (2003) :** Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Supérieur, 224: 432p.
82. **Levy C.E. et Gage K.L. (1999) :** Plague in the United States 1995–1996. *Infect. Med.*, 16, p: 54–64.
83. **Li B., Guo Y., Guo Z., Liang Y., Zhu Z., Zhou Q., Yan Y., Song Z. et Yang R. (2008) :** Serologic survey of the sentinel animals for plague surveillance and screening for complementary diagnostic markers to F1 antigen by protein microarray. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(5), p: 799-802.
84. **Lounici M., Lazri M. et Rahal K. (2005) :** Plague in Algeria: about five strains of *Yersinia pestis* isolated during the outbreak of June 2003. *Pathol, Biol.*, 53(1), p: 15-18.
85. **Macy D.W. (1998) :** Plague. In: C.E. Greene, Editor, *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (2nd edn), WB Saunders Co., Philadelphia, pp. 295–300.
86. **Malek M.A. (2010) :** Contribution à l'étude des agents pathogènes par les techniques de biologie moléculaire sur les vecteurs arthropodes et animaux réservoirs en Algérie. Mémoire en vue d'obtention du diplôme de master II.USTHB. 34p.
87. **McElroy K. M., Blagburn B. L., Breitschwerdt E. B., Mead P. S. et McQuiston J. H. (2010) :** Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends in Parasitology*, 26 (4), p: 197-204.
88. **Messick J.P., Smith G.W. et Barnes A.M. (1983) :** Serologic testing of badgers to monitor plague in southwestern Idaho. *J. Wildl. Dis.*, 19(1), p: 1-6.
89. **Migliani R., Ratsitorahina M., Rahalison L., Rakotoarivony I., Duchemin J.B., Duplantier J.M., Rakotonomenjanahary J. et Chanteau S. (2001) :** Resurgence of the plague in the Ikongo district of Madagascar in 1998. 1. Epidemiological aspects in the human population. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 94(2), p: 115-118.
90. **Neerinckx S., Bertherat E. et Leirs H. (2010) :** Human plague occurrences in Africa: an overview from 1877 to 2008. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 104(2), p: 97-103.
91. **Nguyen V.A., Nguyen D.H., Pham V.D. et Nguyen V.L. (1973) :** Co-trimoxazole in bubonic plague. *Br. Med. J.*,

- 4(5884), p: 108–109.
92. **Noroy B. (2003)** : les conséquences de la splénectomie totale chez le chien, thèse pour obtention de grade de docteur vétérinaire ENV de Lyon, 128p.
  93. **Orloski K.A. et Eidson M. (1995)** : *Yersinia pestis* infection in three dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 207(3), p: 316-318.
  94. **Parija S.C. (2009)** : Textbook of Microbiology & Immunology. *Elsevier India*. 700 p.
  95. **Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebahia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tárraga A.M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S. et Barrell B.G. (2001)** : Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 413(6855), p: 523- 527.
  96. **Patel T.B., Bhatia S.C. et Deobhanker R.B. (1960)** : A confirmed case of DDT-resistance in *Xenopsylla cheopis* in India. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 23, p: 301–312.
  97. **Perry R.D. et Fetherston J.D. (1997)** : *Yersinia pestis* - Etiologic Agent of Plague. *Clinical microbiology reviews*, 10(1), p: 35–66.
  98. **Poland J.D., Quan T.J. et Barnes A.M. (1994)** : Plague. In G. W. Beran (ed.), Handbook of zoonoses. Section A. Bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic, 2nd ed. CRC Press, Inc., Ann Arbor, Mich. p. 93–112.
  99. **Pollitzer R. (1954)** : La Peste : Monographie Organisation mondiale de la santé, Genève, 737 p.
  100. **Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H., Ramisse F. et Vergnaud G. (2004)** : Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol*, 4, p: 22.
  101. **Prentice M.B. et Rahalison L. (2007)** : Plague, *Lancet*, 369(9568), p: 1196-1207.
  102. **QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (2007)** : Sample & Assay Technologies, Second Edition, 71p.
  103. **Rajerison M., Dartevelle S., Ralafiarisoa LA., Bitam I., Tuyet DTN., Andrianaivoarimanana V., Nato F. et Rahalison L. (2009)** : Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of *Yersinia pestis* Antibodies in Humans and Reservoirs. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 3(4): e421.
  104. **Ramalingaswami V. (1995)** : Plague in India. *Nat. Med.*, 1(12), p: 1237-1239.
  105. **Ratovonjato J., Duchemin J.B., Duplantier J.M. et Chanteau S. (2000)** : *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera : Xenopsyllinae), puces des foyers ruraux de peste des Hautes Terres malgaches : niveau de sensibilité au DDT, aux pyréthrinoides et aux carbamates après 50 années de lutte chimique. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 66 (1-2), p: 9-12.
  106. **REVENU EPIDEMIOLOGIQUE ANNUEL (2003)** : Situation épidémiologique de l'année 2003 sur la base des cas déclarés à l'I.N.S.P (Institut nationale de santé publique, Algérie).
  107. **Riehm J.M., Rahalison L., Scholz H.C., Thoma B., Pfeffer M., Razanakoto L.M., Al Dahouk S., Neubauer H. et Tomaso H. (2011)** : Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. *Mo.l Cell. Probes.*, 25(1), p: 8-12.
  108. **Rodhain F. et Pérez C. (1985)** : Précis d'entomologie médicale et vétérinaire : notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs, 458 p.

109. **Ruiz A. (2001)** : Plague in the Americas. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(3), p: 539–540.
110. **Rust J. H., Cavanaugh D. C., O’Shita R., et Marshall J. D. (1971)** : The role of domestic animals in the epidemiology of plague. I. Experimental infection of dogs and cats. *J. Infect. Dis.*, 124(5), p: 522–526.
111. **Saavedra Rda C. et Dias J.P. (2011)** : *Yersinia pestis* infection in the State of Bahia: effective control or epidemiological silence?. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 44(2), p: 223-227.
112. **Saidi Benjaballah, M. (2006)** : Rôle prophylactique de la fourrière canine. Journée de formation sur les MTH et les zoonoses. EL-Harrach : secteur sanitaire.
113. **Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. et Erlich, H.A. (1988)** : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), p: 487-491.
114. **Salkeld D.J. et Stapp P. (2006)** : Seroprevalence rates and transmission of plague (*Yersinia pestis*) in mammalian carnivores. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 6(3), p: 231-239.
115. **Salkeld D.J., Salathé M., Stapp P. et Jones J.H. (2010)** : Plague outbreaks in prairie dog populations explained by percolation thresholds of alternate host abundance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , 107(32), p: 14247-14250.
116. **Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. (1999)** : Microbiologie et pathologie infectieuse, Deboek Université, 856, p : 1000.
117. **Schaer M. (2006)** : Médecine clinique du chien et du chat. Elsevier Masson, 576p.
118. **Shepherd A.J., Hummitzsch D.E., Leman P.A. et Hartwig E.K. (1983)** : Studies on plague in the eastern Cape Province of South Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77(6), p: 800-808.
119. **Sebbane F., Jarrett C.O., Gardner D., Long D. et Hinnebusch B.J. (2006)** : Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in role in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(14), p: 5526-5530.
120. **Shivaji S., Bhanu N.V. et Aggarwal R.K. (2000)** : Identification of *Yersinia pestis* as the causative organism of plague in India as determined by 16S rDNA sequencing and RAPD-based genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol Lett.*, 189(2), p: 247-252.
121. **Stenseth N.C., Atshabar B.B., Begon M., Belmain S.R. et Bertherat E. Carniel E., Gage K.L., Leirs H. et Rahalison L. (2008)** : Plague : Past, Present, and Future. *PLoS Med.*, 5(1): e3.
122. **Tarantola A., Mollet T., Gueguen J., Barboza P. et Bertherat E. (2009)** : Plague outbreak in the Libyan Arab Jamahiriya. *Euro Surveill.*, 14(26). pii: 19258.
123. **Thomas R.E., Karstens R.H. et Schwan T.G. (1990)** : Experimental infection of *Ornithodoros* spp. ticks (Acari: Argasidae) with *Yersinia pestis*. *J. Med. Entomol.*, 27(4), p: 720-703.
124. **Von Reyn C.F., Barnes A.M., Weber N.S. et Hodgin U.G. (1976)** : Bubonic plague from exposure to a rabbit: a documented case, and a review of rabbit-associated cases in the United States. *Am. J. Epidemiol.*, 104(1), p: 81–87.
125. **Wang H., Cui Y., Wang Z., Wang X., Guo Z., Yan Y., Li C., Cui B., Xiao X., Yang Y., Qi Z., Wang G., Wei B., Yu S., He D., Chen H., Chen G., Song Y. et Yang R. (2011)** : A dog-associated primary pneumonic plague in Qinghai Province, China. *Clin. Infect. Dis.*, 52(2), p: 185-190.
126. **Wang L.M., Song X.Y., Zhu X.P., Xie F., Li G.Q., Luo Z.D., Duan Y.J., Qi T., Li F. et Wu C.X. (2009)** : Monitoring the *Microtus fuscus* plague epidemic in Sichuan province during 2000 - 2008. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.*, 30(11), p: 1175-1178.

127. **Watson J. D., Gilman M., Revelant O., Witkowski J. et Zoller M. (1994)** : ADN recombinant. édition 2. *de boeck*, bruxelles. ISBN 2804115976. 642p.
128. **Watson R.P., Blanchard T.W., Mense M.G. et Gasper P.W. (2001)** : Histopathology of experimental plague in cats. *Vet. Pathol.* , 38(2), p: 165-172.
129. **Welch T.J., Fricke W.F. et McDermott P.F. (2007)** : Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One*; 2 : e309.
130. **Werner S.B., Weidmer C.E., Nelson B.C., Nygaard G.S., Goethals R.M. et Poland J.D. (1984)** : Primary plague pneumonia contracted from a domestic cat at South Lake Tahoe, Calif. *JAMA.*, 251(7), p: 929 -931.
131. **Wong D., Wild M.A., Walburger M.A., Higgins C.L., Callahan M., Czarnecki L.A., Lawaczeck E.W., Levy C.E., Patterson J.G., Sunenshine R., Adem P., Paddock C.D., Zaki S.R., Petersen J.M., Schriefer M.E., Eisen R.J., Gage K.L., Griffith K.S., Weber I.B., Spraker T.R., et Mead P.S. (2009)** : Primary Pneumonic Plague Contracted from a Mountain Lion Carcass. *Clinical Infectious Diseases*. 49(3), p: 33-38.
132. **Wu L.T., Chun J.W.H., Pollitzer R. et Wu C.Y. (1936)** : Plague : a Manual for Medical and Public Health Workers. 547 pp.
133. **Zhao X., Wu W., Qi Z., Cui Y., Yan Y., Guo Z., Wang Z., Wang H., Deng H., Xue Y., Chen W., Wang X. et Yang R. (2010)** : The complete genome sequence and proteomics of *Yersinia pestis* phage Yep-phi, *J. Gen. Virol.*, 92(Pt 1), p: 216-221.

### Sources internet : (vérifiés le 29/12/2011)

**Source internet n° 1** : Colonies de *Yersinia pestis* après culture sur une gélose CIN

(Disponible sur : <http://lapeste42.e-monsite.com/rubrique,peste-pulmonaire,1236997.html> )

**Source internet n° 2** : Schéma de la pathogénie de *Yersinia pestis*

(Disponible sur : [http://www.provence-corse.cnrs.fr/IMG/userfiles/file/SERVICES/COM/CP\\_Lovastatine.pdf](http://www.provence-corse.cnrs.fr/IMG/userfiles/file/SERVICES/COM/CP_Lovastatine.pdf) )

**Source internet n° 3** : Certaines espèces de puces qui peuvent jouer le rôle de vecteurs pour *Yersinia pestis*

Disponible sur :

<http://tolweb.org/Siphonaptera>

[http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/A-F/Fleas/body\\_Fleas\\_il1.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/A-F/Fleas/body_Fleas_il1.htm)

<http://biotecfortaleny.blogspot.com/2010/09/pulga-del-perro-ctenocephalides-canis.html>

<http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Xenopsyllabrasiliensis.htm>

<http://www.pestcontrolsystems.co.uk/fleas/>

<http://www.imunilar.com.br/pulga.html>

**Source internet n° 4** : Anatomie interne du chat et du chien indiquant la position de la rate

(Disponible sur : <http://www.vetmed.wsu.edu/cliented/anatomy/> )



*Annexes*

## Annexe n°1 : Fiche de renseignements

---

### Type des prélèvements : Rate et rein

Prélèvement N° :

Date du prélèvement: ...../...../.....

Localité du prélèvement : Fourrière canine EL HARRACH

- Espèce: .....
- Race: .....
- Age: .....
- Sexe: .....
- Origine: .....

### Signes cliniques observés :

Etat général de l'animal :

Bon

Mauvais

Coloration des muqueuses :

Rose

Pale

Hypertrophie ganglionnaire :

Oui

Non

Température (°C) : .....

Autres signes

:

.....

.....

## Annexe n°2 : Tableaux de renseignements

### Renseignements concernant les chiens prélevés dans fourrière canine

N° des chiens	Date de prélèvement	Sexe	Race	Age	Etat général de l'animal	T°	Muqueuses	Hypertrophie des ganglions	Rate : Extraction-PCR
C1	23/12/2010	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Non	<b>oui</b>
C2	23/12/2010	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Non	<b>oui</b>
C3	23/12/2010	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Non	<b>oui</b>
C4	23/12/2010	M	race commune	jeune	Bon	-	Pale	Non	
C5	30/12/2010	M	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Oui	<b>oui</b>
C6	30/12/2010	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C7	30/12/2010	F	Berger allemand	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C8	30/12/2010	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Oui	
C9	30/12/2010	F	Berger croisé	jeune	Bon	N	Rose	Non	
C10	06/01/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C11	06/01/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C12	06/01/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Non	
C13	06/01/2011	M	race commune	jeune	Mauvais	N	Pale	Oui	
C14	20/01/2011	F	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Non	<b>oui</b>
C15	20/01/2011	M	race commune	adulte	Mauvais	39,2 °	Pale	Oui	<b>oui</b>
C16	20/01/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C17	20/01/2011	M	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Non	<b>oui</b>
C18	20/01/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C19	20/01/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C20	20/01/2011	F	race commune	jeune	Mauvais	40,1 °	Pale	Oui	
C21	27/01/2011	F	race commune	adulte	Mauvais	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C22	27/01/2011	M	Berger croisé	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C23	27/01/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C24	27/01/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Non	<b>oui</b>
C25	27/01/2011	M	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Non	
C26	27/01/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	
C27	10/02/2011	M	Berger croisé	jeune	Mauvais	-	Pale	Oui	<b>oui</b>
C28	10/02/2011	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Non	<b>oui</b>
C29	10/02/2011	M	race commune	adulte	Mauvais	-	Pale	Non	<b>oui</b>
C30	10/02/2011	F	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Non	<b>oui</b>
C31	10/02/2011	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Non	<b>oui</b>
C32	10/02/2011	F	race commune	adulte	Mauvais	-	Pale	Oui	
C33	17/02/2011	M	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C34	17/02/2011	M	race commune	jeune	Mauvais	39,5 °	Pale	Oui	<b>oui</b>
C35	17/02/2011	F	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Oui	<b>oui</b>

C36	17/02/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C37	17/02/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C38	17/02/2011	F	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Non	<b>oui</b>
C39	17/02/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Non	
C40	17/02/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	
C41	24/02/2011	F	Berger croisé	jeune	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C42	24/02/2011	M	Berger croisé	jeune	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C43	24/02/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Oui	
C44	24/02/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	
C45	24/02/2011	M	race commune	adulte	Bon	39,2 °	Rose	Non	
C46	24/02/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Oui	<b>oui</b>
C47	03/03/2011	F	race commune	adulte	Mauvais	39,8 °	Pale	Non	<b>oui</b>
C48	03/03/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	<b>oui</b>
C49	03/03/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Non	<b>oui</b>
C50	03/03/2011	F	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Non	
C51	03/03/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	
C52	10/03/2011	F	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Non	
C53	10/03/2011	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	
C54	10/03/2011	F	race commune	adulte	Mauvais	39,5 °	Pale	Oui	
C55	10/03/2011	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Non	

**Adulte : plus d'un an**

**Jeune : mois d'une année**

## Renseignements concernant les chats prélevés dans fourrière canine

N° des chats	Date de prélèvement	Sexe	Race	Age	Etat général de l'animal	Muqueuses	Hypertrophie des ganglions	Rate/extraction-PCR
F1	23/12/2010	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F2	23/12/2010	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F3	23/12/2010	F	race croisée	Adulte	Mauvais	Pale	Oui	<b>oui</b>
F4	30/12/2010	M	race croisée	adulte	Mauvais	Rose	Oui	<b>oui</b>
F5	30/12/2010	M	race croisée	jeune	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F6	30/12/2010	M	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Oui	<b>oui</b>
F7	30/12/2010	F	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Oui	<b>oui</b>
F8	30/12/2010	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	
F9	30/12/2010	M	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Oui	
F10	06/01/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F11	06/01/2011	F	race croisée	jeune	Bon	Pale	Non	<b>oui</b>
F12	06/01/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F13	06/01/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	
F14	06/01/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	
F15	06/01/2011	F	race européenne	adulte	Bon	Rose	Non	
F16	20/01/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F17	20/01/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F18	20/01/2011	M	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Oui	<b>oui</b>
F19	27/01/2011	M	race croisée	jeune	Bon	Pale	Non	
F20	27/01/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F21	27/01/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Pale	Non	<b>oui</b>
F22	27/01/2011	F	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Non	
F23	27/01/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Pale	Non	
F24	10/02/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F25	10/02/2011	F	race croisée	adulte	Mauvais	Rose	Oui	<b>oui</b>
F26	10/02/2011	F	race croisée	jeune	Mauvais	Rose	Oui	<b>oui</b>
F27	10/02/2011	M	race européenne	jeune	Bon	Rose	Non	
F28	10/02/2011	M	race européenne	jeune	Bon	Rose	Non	
F29	17/02/2011	F	race croisée	adulte	Mauvais	Rose	Non	<b>oui</b>
F30	17/02/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F31	17/02/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	
F32	24/02/2011	F	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Oui	<b>oui</b>
F33	24/02/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F34	24/02/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Pale	Non	<b>oui</b>
F35	24/02/2011	M	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Oui	<b>oui</b>
F36	24/02/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	<b>oui</b>
F37	24/02/2011	F	race croisée	jeune	Bon	Rose	Non	
F38	10/03/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	

F39	10/03/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Oui	
F40	10/03/2011	F	race croisée	adulte	Bon	Pale	Non	
F41	10/03/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	
F42	10/03/2011	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Non	
F43	10/03/2011	M	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Non	
F44	10/03/2011	M	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Non	
F45	10/03/2011	F	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Non	

**Adulte : plus d'un an**

**Jeune : mois d'une année**

**La Température na pas été prise chez les chats à cause de leur agressivité**

## Annexe n°3 : Matériels utilisés

---

<b>Matériels de prélèvement d'organe</b>	<b>Matériels de laboratoire</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>● Matériel de rasage</li><li>● Alcool chirurgical</li><li>● Champs stériles</li><li>● Coton</li><li>● Ciseaux</li><li>● Scalpel (bistouri)</li><li>● Pincés</li><li>● Ecarteurs</li><li>● Tubes à vice stérils étiquetés</li><li>● Glacière</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Hôte à flux laminaire</li><li>● Vortex</li><li>● Ultracentrifugeuse (14000 tours/ minute)</li><li>● Four à micro-onde</li><li>● Thermocycleur</li><li>● Cuve à Electrophorèse (horizontal) avec bloc d'alimentation électrique</li><li>● Bain à sec</li><li>● Transilluminateur à UV</li><li>● Balance de précision</li><li>● Autoclave</li><li>● Agitateur magnétique</li><li>● Micropipettes et leurs embouts</li><li>● Fiole Erlenmeyer</li><li>● Les portoirs</li><li>● Tubes Eppendorf</li><li>● Tubes collecteurs à filtre</li><li>● Broyeurs</li><li>● Pince</li><li>● Boites de pétri</li><li>● Parafilm</li></ul>



Matériels de laboratoire

## Annexe n°4 : Préparation du TBE (tampon de migration)

### Préparation du TBE 5 X (Tris, Borate, EDTA) Le TBE est un tampon de migration utilisé en électrophorèse

1. Dans une fiole Erlenmeyer, mélanger Tris, acide borique et l'EDTA et 800ml d'eau distillée (Voir tableau ci-dessous).
2. Faire dissoudre le tout à l'aide d'un agitateur magnétique et un barreau d'agitation magnétique, faciliter la dissolution en appliquant de basses températures.
3. ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtention de 1L de volume.
4. Stocker à température ambiante.



#### Préparation du TBE 5 X

Tris base	5.4g
Acide borique	27,5g
EDTA (pH = 8)	20ml
Eau distillée	Ajusté jusqu'à 1L de contenance

#### Les dilutions du TBE 5 X

TBE 0.5 X (TBE de la cuve de migration) :  
= 100 ml 5X TBE + 900 ml H<sub>2</sub>O

TBE 1 X (TBE pour préparer le gel) :  
= 200 ml 5X TBE + 800 ml H<sub>2</sub>O

Après plusieurs électrophorèses, la capacité du tampon TBE 0.5X est épuisée, le changement de la solution s'avère nécessaire.

## Résumé

La peste est une maladie zoonotique majeure d'une importance considérable dont le réservoir principal est le rongeur. Les chiens et les chats errants étant en contact avec les rongeurs peuvent jouer le rôle de réservoirs potentiels pour cette pathologie et transmettre l'agent pesteux aux humains et aux autres animaux.

55 prélèvements de rates de chiens et 45 de chats ont été réalisés dans la fourrière canine d'Alger de Décembre 2010 à Mars 2011, pour la recherche de *Yersinia pestis*. 35 parmi les prélèvements de rates de chiens et 25 de chats ont été analysés par PCR.

Les résultats de la PCR montrent que les chats sont des réservoirs pour la peste avec un taux de 16% (4/25). Témoinnant ainsi le danger que peut jouer nos chats dans la possibilité de transmettre la peste. Concernant les chiens, les résultats de PCR étaient négatifs.

Les méthodes moléculaires (PCR) semblent être le meilleur moyen de diagnostic pour surveiller et étudier cette pathologie.

**Mots Clés :** Peste, Alger, fourrière canine, chiens errants, chats errants, *Yersinia pestis*, PCR, rates.

## Abstract

The plague is a major zoonotic disease of considerable importance which the principal reservoir is rodents. Dogs and cats being in contact with rodents may be as potential reservoirs for this disease and transmit the pathogen to humans and other animals.

55 spleens samples of dogs and 45 of cats were collected in dog pound of Algiers from December 2010 to March 2011, to search *Yersinia pestis*. 35 among spleens samples of dogs and 25 of cats were analyzed by PCR (Polymerase chain reaction).

The PCR results show that cats are reservoirs for plague with a rate of 16% (4/25). This result demonstrate that cats can play a role in transmission of plague. About spleens samples of dogs, PCR results were negatives.

Molecular methods (PCR) appear to be the best diagnostic to control and study this disease.

**Key words:** Plague, Algiers, dog pound, stray dogs, stray cats, *Yersinia pestis*, PCR, spleens.

## ملخص

داء الطاعون هو مرض حيواني المنشأ ذات أهمية كبيرة حيث تعتبر القوارض الخزان الاساسي لهذا الداء. كون الكلاب والقطط الضالة على اتصال مع القوارض فإنها تعتبر بمثابة خزانات محتملة لهذا المرض ، و بإمكانها نقل العدوى إلى البشر والحيوانات الأخرى.

55 عينة من طحال الكلاب و 45 من طحال القطط تم أخذها من محشرة الحيوانات الضالة للجزائر العاصمة وهذا من ديسمبر 2010 إلى مارس 2011، للبحث عن بكتيريا الطاعون (*Yersinia pestis*) . 35 من عينات طحال الكلاب و 45 من طحال القطط تم الكشف عنها عن طريق التفاعل

البوليميريز المتسلسل (PCR) .

تبين أن القطط هي خزانات للطاعون وذلك بنسبة 16% (4/25). موضحا بذلك الخطر الذي قد تلعبه القطط في امكانية نقل عدوى الطاعون. أما في ما يخص الكلاب فتنتج التفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR) كانت سلبية.

تعتبر الأساليب الجزيئية احسن طريقة تشخيص لمراقبة ودراسة هذا المرض.

**كلمات أساسية :**

الطاعون، الجزائر، محشرة الحيوانات الضالة، الكلاب الضالة، القطط الضالة، داء الطاعون، الطحال، التفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR)

كلمات لاتينية : *Yersinia pestis*