

Master II Biologie Santé
Parcours Gestion Intégrée des Zoonoses et des
Maladies Animales Tropicales

Rapport de stage

Etude de la diversité des bactéries du genre *Rickettsia* présentes chez des tiques collectées sur différents hôtes à Madagascar

Présenté par

Arthur DEYGAS

Stage réalisé du **01 février 2026** au **31 juillet 2026**

Sous la direction de **Marlène DUPRAZ¹** et **Antsa RAKOTONIRINA²**

¹**UMR ASTRE, CIRAD, Plateforme CYROI - Saint-Denis, LA RÉUNION**

²**Unité Entomologie, Institut Pasteur de Madagascar - Antananarivo, MADAGASCAR**

Soutenu le **09 juillet 2026**

Année universitaire 2025 - 2026

Résumé

Madagascar est un pays insulaire où la pauvreté, la forte ruralité et la place des élevages favorisent l'exposition aux zoonoses et la circulation d'agents infectieux entre animaux, humains et environnement. Dans ce contexte, ce stage se porte sur l'étude de la diversité des espèces de bactéries du genre *Rickettsia* transmises par les tiques, afin d'évaluer le risque infectieux associé pour les populations humaines et animales. L'étude s'appuie sur des tiques collectées entre 2023 et 2025 dans six districts de Madagascar sur des zébus et des chiens. Au total, 78 tiques ont été sélectionnées et analysées par extraction d'ADN et qPCR ciblant le gène *gltA* de *Rickettsia*. Les échantillons positifs ont ensuite été inoculés sur cellules VERO-E6 pour être amplifiés puis séquencés par nanopore. L'ADN de *Rickettsia* a été détecté dans 51 des 55 tiques de l'espèce *Amblyomma variegatum* analysées (93%), mais n'a pas été détecté dans les tiques des espèces *Rhipicephalus sanguineus* et *R. microplus*. Les tentatives de culture n'ont pas permis d'isoler de *Rickettsia*. Les résultats suggèrent que les *Rickettsia* sont hautement prévalentes chez *A. variegatum*, mais que l'isolement reste difficile avec les protocoles utilisés. Le travail à venir consistera à optimiser la technique d'inoculation et de culture pour maintenir ces bactéries.

Mots-clés : *Rickettsia*, tiques, Madagascar, *Amblyomma variegatum*, cellules VERO-E6

Summary

Madagascar is an island country where widespread poverty, a large rural population, and the importance of livestock farming increase exposure to zoonotic diseases and facilitate the circulation of infectious agents among animals, humans, and the environment. In this context, this internship focused on investigating the diversity of *Rickettsia* species transmitted by ticks in order to assess the associated infectious risk for both human and animal populations. The study was based on ticks collected between 2023 and 2025 from zebu cattle and dogs in six districts of Madagascar. A total of 78 ticks were selected and analyzed by DNA extraction followed by qPCR targeting the *gltA* gene of *Rickettsia*. Positive samples were subsequently inoculated onto VERO-E6 cells for bacterial amplification and nanopore sequencing. *Rickettsia* DNA was detected in 51 of the 55 *Amblyomma variegatum* ticks analyzed (93%), whereas no *Rickettsia* DNA was detected in *Rhipicephalus sanguineus* or *R. microplus* ticks. However, the culture attempts were unsuccessful, and no *Rickettsia* isolates were isolated. These results suggest that *Rickettsia* are highly prevalent in *A. variegatum* ticks in Madagascar, although successful isolation remains challenging using the protocols employed. Future work will focus on optimizing the inoculation and culture procedures to improve the maintenance and isolation of these bacteria.

Key-words : *Rickettsia*, ticks, Madagascar, *Amblyomma variegatum*, VERO-E6 cells

Remerciements

A Marlène et Antsa, sans qui je n'aurais pas eu le privilège de partir si loin, si longtemps. Vous m'avez offert le stage idéal, c'était l'occasion rêvée de montrer de quoi je pouvais être capable. Vous savez comme moi que cette expérience jouera pour beaucoup dans la suite de mon parcours académique et professionnel. Mais elle jouera tout autant sur ma personnalité, c'était un challenge tellement immense que sans un tel sujet, je n'aurais jamais sauté le pas. Marlène, même durant ma mission, tu as été là pour me conseiller, m'orienter, m'écouter. Tu m'as aidé à démarrer et à conclure ce stage en douceur, toujours dans la bienveillance. Antsa, ton calme olympien et ta bonne humeur sont pour moi tes plus belles qualités. Tu étais toujours là quand j'avais besoin de quelque chose, de me plaindre ou d'éructer en voyant 5 ronds violets dans une pauvre cellule... La mission ne m'a pas permis de vous côtoyer plus de 3 mois chacune, à mon plus grand regret. J'espère avoir été le stagiaire que vous attendiez ! Merci pour votre confiance, votre engagement et votre soutien dans ma démarche de candidature en thèse, elle porte déjà ses fruits ! Je vous souhaite à toutes deux une belle recherche, avec moins de 30% d'imprévus si possible ;)

A Jaritiana, Aline, Manda et Olga que j'aime appeler la Team Rickettsia. J'espère que vous aurez autant aimé que moi le temps passé ensemble, cloîtrés dans le P3. Vous avez été une team en or, dévouée et tellement curieuse. Avec à vous, j'ai beaucoup appris sur Mada, sur la science, la culture, l'équipe et plus encore. J'espère que vous deviendrez des pros en culture de *Rickettsia* avec ce protocole long comme le bras. Vous pourrez être fier d'avoir réussi, je souhaite que ce ne soit que le début... Aline garde ton rire, il est beaucoup trop communicatif. Jaritiana, bon courage avec ton terrible amoureux du riz et surtout, n'oublies pas de tester le TGV ! Manda et Olga, continuez de me harceler avec vos remarques et vos questions, elles sont d'une pertinence admirable !

A Malala, Sandrine, Nil, Davy, Manou, Mirado, Fano et toute l'équipe Entomo de l'IPM, merci pour votre générosité et de m'avoir accueilli 3 mois durant. Merci Diego pour tes conseils et ton accueil si bienveillant et chaleureux. Cette intégration facilitée a beaucoup joué dans mon ressenti sur cette expérience, alors merci. Grâce à vous tous, ces semaines vont rester bien ancrées dans ma mémoire (pas de doute Mandimby je n'oublierais pas Mada et crois moi bien, quand je reviendrais, tu m'emmèneras dans un bar). Et au fait, Fano je n'ai jamais lu Camus, ni Proust... désolé de te décevoir, je n'aime que les mots fléchés. Et enfin, merci Marilou, qui m'a permis de déroutier mon anglais mais surtout qui devrait ouvrir une agence de tourisme à Tana. Misère que les weekends auraient été long sans toutes tes adresses.

A Liz, Nina, N'Djo, Fayçal, Cécile, Thierry et toute l'équipe Astre du CIRAD, en particulier David pour son aide précieuse pour le traitement de mes données. On a été pressé par le temps et les résultats sont... ce qu'ils sont mais sans toi, je n'aurais jamais pu obtenir tout ça si rapidement. A Anaïs pour avoir géré l'affreuse logistique de mes commandes.

A (L)Katell, qui je sais ne m'en voudra pas pour la blague. Comment dire à quel point on t'a attendu comme le messie, que t'emmener avec nous à Andasibe fut sans doute une épreuve à nos côtés, que partager un ciné avec toi a été une victoire personnelle madame Dupieux. On a formé un trio remarquable avec le singe, et jouer le rôle de l'aigri de service fut un honneur. Merci pour tout et, qui sait, on se voit à la fête de l'humain (...) ! La prochaine fois, lève-toi pour me dire aurevoir, espèce de sauvage :(

(Antsa et Marlène prière de ne pas tenir de ce qui va suivre, Matéo est un chic type)

A Matéoooooooo, misère Matéo. Le singe. Le tête-en-l'air. Le charmeur. Je pense que tu as dû me répéter une bonne quinzaine de fois que tu n'étais pas une pingre, que tu allais être la honte de l'équipe et d'autres expressions telles que « 67 » ou « diiiinguerie ». Mais comment j'aurais pu faire sans toi, je n'ose même pas y penser. Jamais de ma vie on ne m'avait autant appelé par un autre prénom que le mien. Personne ne pourra comprendre notre dépendance à l'un et à l'autre, c'est de l'ordre du mystique. Je pense que tout le monde doit savoir que tu as tout de même pété un téléphone, perdu le tien, dormi dans le labo faute de clefs et comble : perdu 2 badges en 48h. Mais pourtant, tu survivs. Mon bro, tu me vas me manquer, on se retrouvera en compète pour la même thèse la prochaine fois ;)

A Kevin, l'éternel passager de sa propre voiture, en qui j'espérais trouver le compère idéal pour les randos à La Réunion (quel idiot je fais). Toi qui as perdu la boule (et la santé) en venant passer des vacances à Mada. Sans toi j'aurais été condamné à partir dans le Makaï ou à Maurice. La prochaine fois, prends plus de médicaments, je ne suis pas compétent pour ça. A nos soirées *spill-the-tea* sur la vie avec un grand Z. Heureusement que tu as un peu de goût cinématographique, ouf tu me sauves la mise. Puis, que te souhaiter à part de retourner en « Nouvelle-Cal » ? Emmènes-y ta pote, moi je sais déjà tout de cette île au final.

A mes parents, ma sœur et toute ma famille, qui me manquent mais que je sais à mes côtés. Vous avez tous cru en moi, en ma capacité à surmonter, que dis-je, surfer sur cette expérience, vous m'avez accordé votre soutien inconditionnel. Je vous aime.

Sommaire

LEXIQUE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
I. MADAGASCAR, LE PAYS ET SES ENJEUX	7
II. LE PROJET PRERISK_OI INTERREG VI	8
III. LES TIQUES ET LEUR IMPLANTATION A MADAGASCAR	8
IV. LES <i>RICKETTSIA</i> CHEZ LES TIQUES DE MADAGASCAR	10
MATERIEL ET METHODE	13
I. ÉCHANTILLONNAGE	13
II. RECHERCHE D'ADN DE <i>RICKETTSIA</i> DANS LES TIQUES	13
1. Sélection des tiques	13
2. Lavage et broyage des tiques	14
3. Extraction d'ADN pré-culture	15
4. qPCR pour recherche d'ADN de <i>Rickettsia</i>	15
III. CULTURE DES <i>RICKETTSIA</i>	15
1. Infection des cellules	16
2. Suivi des cultures et observation	18
3. Arrêt des cultures	19
IV. EXTRACTION D'ADN ET SEQUENÇAGE	19
1. Lyse des cellules	19
2. Sélection d'un échantillon pour du séquençage par nanopore	20
3. Séquençage par nanopore	21
4. Traitement des données de séquençage	21
RESULTATS	23
I. SELECTION DES TIQUES POUR LA CULTURE DE <i>RICKETTSIA</i>	23
II. CULTURE DE <i>RICKETTSIA</i> DANS LES CELLULES VERO-E6	23
III. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LE SEQUENÇAGE	27
IV. SEQUENÇAGE DES ECHANTILLONS	28
DISCUSSION	30
PHASE DE PRE-CULTURE	30
PHASE D'INOCULATION DES BACTERIES	31
PHASE DE SUIVI DES INFECTIONS	32
PHASE DE SEQUENÇAGE	33
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	34
ANNEXES	35
BIBLIOGRAPHIE	36

Lexique des abréviations

- ATB : Antibiotique
- CIRAD : Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement
- Ct : Cycle Threshold
- dP : Dispositif de recherche et de formation en Partenariat
- EDTA : Ethylènediaminetétraacétique
- FOFIFA : Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural de Madagascar
- Go : Giga Octet
- IPM : Institut Pasteur de Madagascar
- LNSB : Laboratoire de Niveau de Sécurité Biologique
- MEM : Minimum Essential Medium (Milieu minimal essentiel)
- PBS : Phosphate-Buffered Saline (Tampon phosphate salin)
- PSMII : Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction quantitative en chaîne par polymérase)
- SFG : Spotted Fever Group (Groupe des Fièvres Boutonneuses)
- SVF : Sérum de Veau Fœtal
- TA : Température Ambiante
- TB : Tick-Borne (Agent Transmis par des Tiques)
- TG : Typhus Group (Groupe Typhus)
- TRG : Transitional Group (Groupe Transitionnel)
- UEM : Unité d'Entomologie Médicale
- UMR ASTRE : Unité Mixte de Recherche Agriculture, Santé, Territoires, Risques et Ecosystèmes

Introduction

I. Madagascar, le pays et ses enjeux

Madagascar est un pays insulaire de l'Océan Indien et considéré comme en voie de développement. Selon le Programme des Nations Unies pour le Développement, plus de 68% de la population vit sous un seuil de pauvreté, soit plus de 20 millions d'individus (Nations, 2025). Ce taux fait de Madagascar, un des pays les plus pauvres du monde. La population malgache étant largement rurale, son économie est ainsi basée principalement sur l'agriculture, l'élevage et l'industrie minière. Selon les dernières estimations des organisations internationales, cette population rurale est évaluée à plus de 21 millions de malagasys, soit environ 68% de la population globale de l'île (World Bank Group, 2024). Les pratiques agricoles usuelles sont parfois ancestrales, très peu ou pas mécanisées. Le défrichage sur brûlis et l'exploitation illégale des ressources forestières sont encore très courants (Aubert et al., 2014). Encore aujourd'hui, le zébu (*Bos taurus indicus*) reste l'outil privilégié pour le travail du sol après le défrichage et pour l'entretien des cultures. Le zébu est robuste et résistant à la chaleur, ce qui en fait un animal génétiquement adapté au climat de Madagascar (Vijayakumar et al., 2022). Cet animal, introduit il y a environ 1 000 ans sur l'île, occupe ainsi une importante place dans l'agriculture mais également dans le transport et la culture (A. De Saint Sauveur, 2007). Ses multiples usages font du zébu un bien d'échange à haute valeur monétaire et statutaire. Signe de richesse et de réussite, il est utilisé lors des cérémonies et rites traditionnels, en guise de présent ou de sacrifice (E. Fauroux, 1989). Le zébu est donc un animal qui évolue, comme leur utilisateur, à l'interface entre l'environnement sauvage où s'installent les cultures, et les villages, lieux de vie et de passage. L'utilisation extensive des ressources naturelles étend cette interface. Concrètement, la circulation au sein de ces territoires induit un risque de transmission d'agents pathogènes encore inconnus ou dont la présence n'avait jusqu'alors pas encore été identifiée. Ces problématiques ne sont pas spécifiques de Madagascar mais elles sont amplifiées par la pauvreté dans le pays, qui ne dispose pas de moyens efficaces à l'échelle du territoire pour la lutte et la prévention contre les agents pathogènes dits zoonotiques (Rabozzi et al., 2012).

Selon l'OMS, un agent pathogène est défini comme zoonotique lorsqu'il est susceptible de provoquer une zoonose, qui est une maladie ou infection se transmettant naturellement de l'animal à l'homme. Voici quelques exemples de zoonoses : l'influenza aviaire, la dengue, la brucellose ou la fièvre de la Vallée du Rift. A Madagascar, l'exposition à ces agents pathogènes zoonotiques y est donc de plus en plus fréquente mais la circulation croissante des populations humaines et les biens associés favorise la dissémination des maladies. Les

institutions nationales, soutenues par des organisations internationales, sont chargées de leur surveillance à travers le territoire, auprès des populations ou via la faune domestique et sauvage. Cette surveillance s'applique aux zoonoses les plus connues et rencontrées, mais reste très limitée car la sous-déclaration des cas est très importante. Le pays est ainsi un des derniers à présenter chaque année des cas de peste (*Yersinia pestis*) dont le rat est le principal réservoir (Andrianaivoarimanana et al., 2024). La rage, la fièvre de la Vallée du Rift ou encore le mpox, activement circulant depuis le début de l'année 2026, font également partis des zoonoses présentes à Madagascar (Andriamandimby et al., 2023; Raharinosy et al., 2026; Tantely et al., 2026). Cependant, d'autres agents pathogènes zoonotiques circulent à bas bruit, avec des faibles incidences. Ils sont donc moins prioritaires et peu étudiés.

II. Le projet PRERISK_OI Interreg VI

Le projet *Prévenir les Risques Infectieux dans l'Océan Indien* (PRERISK_OI) *Interreg VI* est un projet qui vise à améliorer la surveillance et le contrôle des risques infectieux dans la région du sud-ouest de l'Océan Indien¹. Il s'inscrit dans le **dp One-Health Océan Indien**, qui est un dispositif en partenariat, réunissant plusieurs partenaires et institutions de la région. Ce projet s'appuie sur le développement des connaissances sur les maladies infectieuses, qu'elles soient zoonotiques ou strictement animales, autant sur les agents pathogènes, que sur les organismes hôtes ou vecteurs. Les connaissances acquises et l'expérience des membres du projet permettent de proposer des solutions adaptées aux acteurs locaux : du décideur au professionnel d'une branche du secteur. La surveillance soutenue par ce projet s'intéresse aussi bien aux agents pathogènes qu'aux vecteurs qui leurs sont parfois associés.

III. Les tiques et leur implantation à Madagascar

La tique est un arthropode ectoparasite hématophage, dont les espèces se divisent en 3 familles taxonomiques : les tiques dites « dures » qui font références à la famille des Ixodidae, en opposition à la famille des tiques dites « molles » qui réfère aux Argasidae et la famille des Nuttalliellidae, intermédiaire (Guglielmone et al., 2010). Les tiques les plus décrites à ce jour sont les tiques dures qui correspondent aux tiques communes, rencontrées par les randonneurs ou les éleveurs sur leurs animaux. La famille des Ixodidae comprend les genres *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma* et *Rhipicephalus* (Guglielmone et al., 2010). Les tiques sont des parasites des vertébrés, comprenant les mammifères, les oiseaux et les reptiles (Sonenshine and Roe, 2014). Leur mode de vie implique de se nourrir sur un ou plusieurs hôtes, d'une espèce spécifiquement ou à partir d'un large spectre d'animaux. Selon

¹ Comprenant Madagascar, l'archipel des Comores, Maurice et Rodrigues, Mayotte, La Réunion et les Seychelles

les espèces, le cycle de vie de la tique varie en nombre de stases et en types d'hôtes (tropisme). L'Annexe 2 présente les différences entre le cycle d'une tique à 3 hôtes, dite trixène et d'une tique à un seul hôte, dite monoxène (Loomis, 1961; Sonenshine and Roe, 2014). Son écologie fait de la tique un vecteur² compétent pour des microorganismes présents chez un hôte, qui peuvent alors circuler d'un individu à un autre suivant le cycle de vie de la tique. Les tiques sont capables de transmettre une grande variété de microorganismes, tels que les bactéries, virus ou protozoaires. Certains de ces agents sont pathogènes et mêmes zoonotiques, pour n'en citer que quelques-uns : *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma* spp., *Rickettsia rickettsii* (Baneth, 2014; Dantas-Torres et al., 2012).

Concernant les espèces de tiques à Madagascar, le travail le plus important et faisant référence pour ce territoire est l'inventaire mené par Harry Hoogstraal, publié en 1979 en partenariat avec l'Institut Pasteur de Madagascar (Uilenberg, G et al., 1979). Il y décrit notamment les espèces présentes, introduites et endémiques, complété par des travaux antérieurs non-publiés. Les espèces les plus généralistes se sont adaptées et sont retrouvées sur toute la surface du territoire. Pour n'en citer que les plus connues : *Amblyomma variegatum*, décrite pour la première fois en 1899 par Neumann, probablement importée avec un cheptel de zébus ; *Rhipicephalus sanguineus*, décrite également par Neumann en 1911, sans doute importée via des chiens ; et enfin *Rhipicephalus* (précédemment *Boophilus*) *microplus* décrite pour la première fois en 1901 (Uilenberg, G et al., 1979). Ces 3 espèces, exposées en Figure 1, sont aujourd'hui largement présentes dans les cheptels de bovidés et chez les chiens. R.

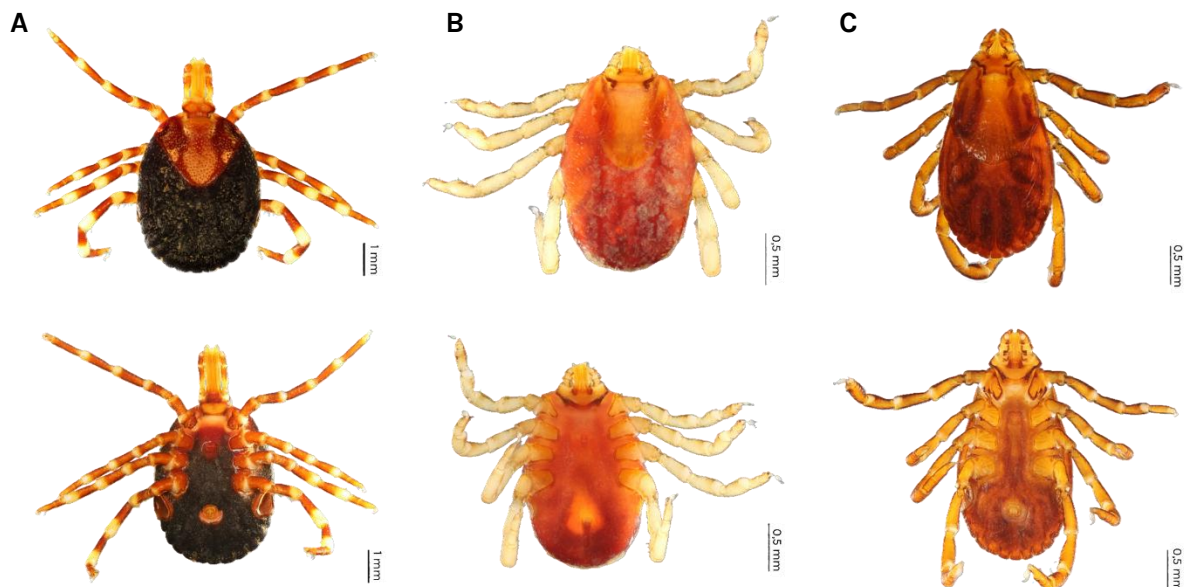


Figure 1. Tiques en vue dorsale (ligne du haut) et en vue ventrale (ligne du bas) de l'espèce *Amblyomma variegatum* (A), *Rhipicephalus microplus* (B) et *Rhipicephalus sanguineus* (C). (Crédits : Marlène Dupraz ; Brice Derepas - CIRAD)

² Agent capable de transmettre un organisme à un autre

microplus est préférentiellement une tique des bovins (zébus à Madagascar) et *R. sanguineus*, une tique des chiens (Matysiak et al., 2016; Stachurski et al., 2013).

L'aire de répartition d'*Amblyomma variegatum* et de *Rhipicephalus microplus* est large et s'étend sur la quasi-totalité de l'île (Pothmann et al., 2016; Rahajarison, P, 2015). Ces aires de répartition, globales à l'échelle du pays, font que ces espèces croisent les populations humaines et les animaux domestiques très fréquemment et occasionnellement les animaux sauvages. C'est dans cette interface que les agents pathogènes circulent, des territoires sauvages vers les zones anthropisées et inversement. *In fine*, les tiques sont des organismes qui participent à cette circulation et sont donc des cibles de choix pour étudier les agents pathogènes de l'interface.

IV. Les *Rickettsia* chez les tiques de Madagascar

Une étude exploratoire a été menée par l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) sur un panel de tiques collectées sur des chiens et des zébus pour déterminer les espèces de tiques présentes et les agents pathogènes associés. Les espèces de tiques identifiées sont *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* sur les zébus et *A. variegatum* et *R. sanguineus* sur les chiens. Parmi les agents pathogènes identifiés dans les tiques, le genre *Rickettsia* a une prévalence de 90% chez *A. variegatum* et d'environ 25% chez *R. microplus* (Rakotonirina et al. *en cours de préparation*). D'autres études ont montré une forte prévalence chez des tiques *Amblyomma* sp. et *Haemaphysalis* sp. trouvées pour la première chez des zébus et des tortues *Pyxis arachnoides*, pour la seconde chez des lémurins (Keller et al., 2016; Ehlers et al., 2016; Lado et al., 2018).

Les bactéries du genre *Rickettsia* sont des bactéries strictement intracellulaires infectant les cellules eucaryotes. Elles font parties de l'ordre des Rickettsiales qui englobe la famille des Anaplasmataceae (genre *Anaplasma*, *Wolbachia*, *Neorickettsia*, *Ehrlichia* et *Neoehrlichia*) et des Rickettsiaceae (genre *Rickettsia* et *Orientia*). Ce sont des bactéries Gram négatives de petite taille, en forme de coccobacilles ou de bâtons, comme présenté sur la Figure 2. Ce genre regroupe 32 espèces, dont la majorité sont pathogènes pour l'homme. Le terme « rickettsiose » est utilisé pour décrire les infections dues aux organismes de la famille des Rickettsiaceae. Cette dernière comprend les espèces responsables du typhus épidémique à l'origine de millions de décès au début du XX^{ème} siècle (Patterson, 1993) et de la fièvre boutonneuse des Montagnes Rocheuses qui est toujours présente sur le continent nord-américain, à moins grande échelle (Kjemtrup et al., 2022). Selon leur pathogénicité et leurs différences phylogénétiques, les espèces sont réunis en plusieurs groupes. Les 2 premiers groupes historiques ont été nommé d'après la maladie qu'ils induisent : le groupe des fièvres boutonneuses (Spotted Fever Group, abrégé **SFG**), le groupe typhus (Typhus Group, abrégé

TG). Et, un groupe a récemment été ajouté suite à l'évolution des techniques de génotypage : le groupe transitionnel (Transitional Group, abrégé **TRG**) (Abdad et al., 2018; Seidi et al., 2024).

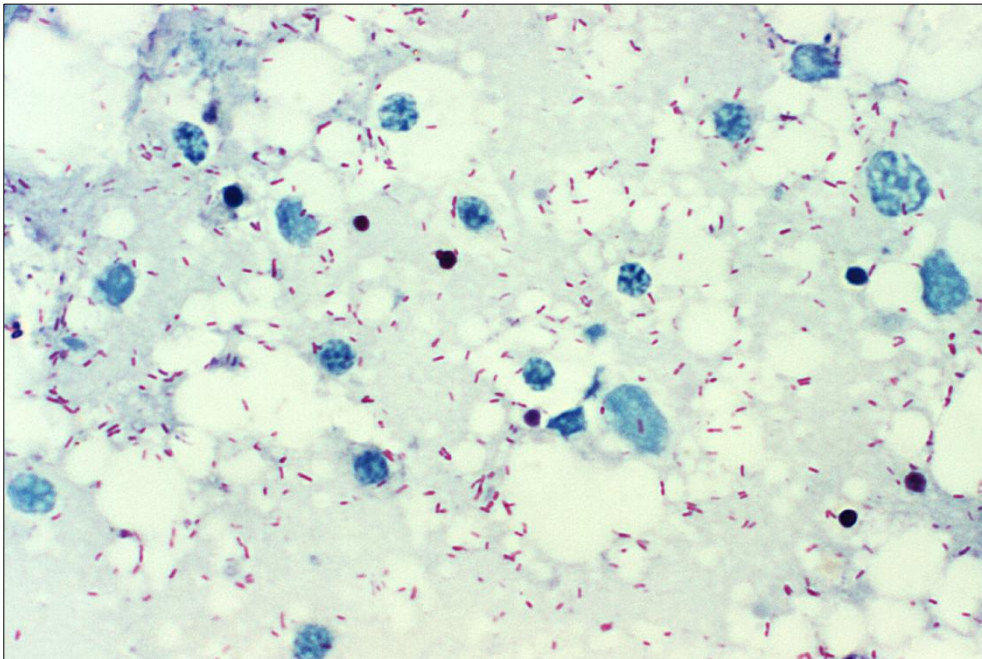


Figure 2. *Rickettsia rickettsii* (en fuchsia) dans une vésicule vitelline, visible sous coloration de Giménez (Crédit : Billie Ruth Bird – Centers for Disease Control and Prevention)

Les espèces correspondant à chaque groupe sont décrites en Annexe 1 (El Karkouri et al., 2022; Merhej et al., 2014; Parola et al., 2013). La taxonomie du genre *Rickettsia* est en constante évolution du fait de l'utilisation des techniques de biologie moléculaire sur des souches collectées à travers le monde et sur différents hôtes, ainsi la liste des espèces et l'existence même des groupes n'est pas fixe et varie beaucoup d'une étude à une autre. De plus, de nombreuses souches de *Rickettsia* n'ont, à ce jour, pas d'espèce attribuée car classées comme endosymbionte de tiques, portant à plusieurs dizaines le nombre potentiel d'espèces supplémentaires (El Karkouri et al., 2022; Schoch et al., 2020). Par exemple, *Rickettsia buchneri* est un endosymbionte de *Ixodes scapularis*, dont le génome contient des gènes appartenant à *R. buchneri*. Son statut d'espèce est contesté (Steiner et al., 2008; Kurtti et al., 2015; El Karkouri et al., 2022).

Ce genre bactérien est aussi très surveillé par les agences gouvernementales pour son usage détourné comme agent de bioterrorisme. Les *Rickettsia* sont classées comme agent biologique de classe III et doivent être systématiquement manipulées dans un laboratoire de niveau de sécurité biologique (LNSB) 3.

Les *Rickettsia*, étant strictement intracellulaires, elles ne peuvent pas survivre dans l'environnement et sont donc trouvées chez des hôtes d'une grande diversité, dans des aires tout aussi variées. Leurs hôtes peuvent être des protozoaires, vertébrés, arthropodes ou

végétaux, évoluant tant dans un milieu aquatique que terrestre (Morand et al., 2015). Dans le cas des infections aux vertébrés, la transmission d'un individu à un autre se fait via des vecteurs arthropodes. Les bactéries du TG sont transmises par les puces pour *Rickettsia typhus* et les poux pour *Rickettsia prowazekii* ; tandis que les bactéries du SFG et TRG sont généralement transmises par des tiques dures (Tick-Borne ou TB) (Perlman et al., 2006). A l'échelle du continent africain, les rickettsioses ne sont pas une problématique de santé publique. Mais des espèces pathogènes de *Rickettsia* ont été identifiées dans diverses études chez des tiques dures (Abdel-Shafy et al., 2012; Dupont et al., 1995; Ndip et al., 2004).

Ce stage a donc pour objectif de décrire et d'identifier les bactéries du genre *Rickettsia* présente chez des tiques de différentes espèces qui ont été collectées lors de précédentes missions à Madagascar. Ce travail s'inscrit dans le projet PRERISK_OI Interreg VI et est le fruit d'une collaboration entre le CIRAD et l'IPM. Pour la réalisation de ces travaux, le stage se déroule dans les locaux du CYROI qui héberge l'équipe de l'UMR ASTRE (CIRAD) à Saint Denis de La Réunion, encadré par le Dr. Marlène DUPRAZ. Une mission de 3 mois est réalisée au sein de l'UEM de l'IPM, à Antananarivo, encadré par le Dr. Antsa Harivolana Ando RAKOTONIRINA, pour réaliser l'ensemble des travaux de laboratoire. La mission bénéficie de l'appui des techniciens de l'IPM et de ses locaux, dont un LNSB3 mis à disposition par l'Unité de Virologie. Le personnel impliqué dans cette étude bénéficiera d'une formation en culture cellulaire et en séquençage par nanopore. Les résultats permettront d'évaluer le risque zoonotique pour les populations humaines et pour les animaux d'élevage associé à la pression de transmission des bactéries du genre *Rickettsia* par les espèces de tiques collectées. Ils permettront de mettre en place des mesures et des recommandations adaptées auprès des populations exposées.

Matériel et méthode

I. Échantillonnage

Les échantillons utilisés pour cette étude proviennent de plusieurs campagnes de collectes menées entre 2023 et 2025 dans le cadre du projet Africam, un consortium d'acteurs malgaches et français tels que le FOFIFA (Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural à Madagascar), l'IPM, des universités, les ministères de la Recherche, de la Santé, de l'Environnement et de l'Agriculture, et le CIRAD, coordinateur du projet, ainsi que le projet PRERISK_OI. Les collectes de tiques ont lieu dans 6 districts de l'île : Ifanadiana et Mananjary (sud-est), puis Belo-Sur-Tsiribihina, Mahabo et Morondava (sud-ouest), sur différentes espèces d'hôtes : chiens, zébus, chèvres ainsi que petits mammifères terrestres et volants. La Figure 3 présente les districts de collecte. Lors de la collecte, les tiques sont identifiées et placées dans des tubes pour être stockées à -80°C, pour préserver la viabilité des bactéries.



Figure 3. Carte des districts sélectionnés pour les collectes dans le cadre du projet Africam (Crédit : Arthur DEYGAS).

Le travail de laboratoire s'est déroulé de mars à mai 2026 dans les locaux de l'Unité d'Entomologie Médicale et de l'Unité de Virologie, toutes deux hébergées par l'IPM. Le LNSB3 est hébergé par l'Unité de Virologie.

II. Recherche d'ADN de *Rickettsia* dans les tiques

1. Sélection des tiques

Les tiques sélectionnées appartiennent majoritairement à l'espèce *A. variegatum*, car c'est celle pour laquelle la prévalence de *Rickettsia* est la plus importante (Rakotonirina et al. en

cours de préparation). Pour comparer les résultats, des *R. sanguineus* et *R. microplus* sont également sélectionnées. Ensuite, les tiques choisies sont des femelles au stade adulte, car elles prennent de longs repas sanguins et sont plus susceptibles d'ingérer et de transmettre des agents pathogènes. Elles sont choisies non-gorgées dans la mesure du possible car le sang de l'hôte contient des composants agissant comme des inhibiteurs de PCR et favoriserait la détection de bactéries associées à l'hôte plutôt qu'à la tique (Al-Soud and Rådström, 2001). Le panel sélectionné représente 78 individus femelles : 55 *A. variegatum*, 16 *R. sanguineus* et 7 *R. microplus*. Les caractéristiques de chacune des tiques sont données dans l'**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** : espèce de la tique, point de collecte, espèce de l'hôte, identifiant. Les 78 tiques sélectionnées sont individualisées dans des tubes et les tubes annotés : CC1A, 1 étant l'identifiant de l'hôte sur lequel la tique a été collectée et A étant l'identifiant de la tique pour l'hôte n°1.

2. Lavage et broyage des tiques

Les tiques sont transférées dans le LNSB3 et décongelées. Certaines tiques peuvent contenir des résidus de sang, il faut les retirer de l'abdomen : à l'aide d'une paire de ciseaux, une entaille verticale est effectuée sur l'arrière de l'abdomen. La tique est ensuite écrasée pour en extraire le maximum de sang résiduel. La tique est lavée pour limiter la contamination par des microorganismes de l'environnement. Pour cela, la tique est immergée successivement dans de l'eau, du peroxyde d'hydrogène puis de l'eau distillée stérile. Elle est ensuite plongée dans de l'eau de Javel à 10% puis de nouveau de l'eau distillée stérile, pendant 10 minutes respectivement. A chaque immersion, la tique est vortexée vigoureusement. Enfin, la tique est déposée 10 minutes dans de l'éthanol absolu. Après quoi, elle est mise à sécher sur une boîte de Petri stérile sous le PSMII (adapté de Karounos et al., 2025).

Pour faciliter le broyage, la tique est entièrement découpée, d'abord dans le sens sagittal pour que le capitulum soit bien scindé en deux. Après la découpe, 300 µL de Milieu Minimal Essentiel (MEM) sont ajoutés dans le tube contenant toute la tique. Dans le cas d'un broyage mécanique, une bille en tungstène de 3 mm est introduite dans le tube, avec le MEM. La tique est broyée grâce à un TissueLyser II (QUIAGEN®, Pays-Bas), sur une fréquence de 30 mouvements/seconde, pendant 3 minutes. La bille sera laissée dans le tube pour limiter le risque de contamination et ne pas perdre de matière. Quinze tiques (CC11A à CC19), pour lesquelles le TissueLyser II n'était pas disponible, sont broyées manuellement. Pour cela, la tique est écrasée avec un pilon stérile à la main. Lorsque le broyage est terminé, le tube est centrifugé 2 min à 500 g, pour déposer les débris de la tique dans le culot. Pour réaliser l'extraction d'ADN, 100 µL du surnageant sont transférés dans un nouveau tube de

1,5 mL. Ce tube et celui contenant le broyat (avec le surnageant restant) sont placés à -80°C, toujours dans le LNSB3.

3. Extraction d'ADN pré-culture

Cette technique permet de lyser les tissus et de libérer l'ADN dans un tampon. L'ADN est déposé sur une colonne avec les débris issus de la lyse, puis il est élué avec un tampon qui permettra de conserver l'ADN stable à -20°C. L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel®, Allemagne), suivant les recommandations du fabricant. Le protocole complet fourni par le fabricant est disponible en Annexe 4. Les premières étapes qui correspondent à la lyse de l'échantillon sont réalisées dans le LNSB3.

4. qPCR pour recherche d'ADN de *Rickettsia*

Une qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) permet d'estimer la quantité initiale d'ADN cible dans un échantillon. Le mix dans lequel l'échantillon est déposé va permettre d'amplifier l'ADN. Lors de l'amplification, une sonde est liée à l'ADN. Cette sonde émet un signal lumineux lorsqu'elle est dégradée et exposée à une certaine longueur d'onde. Plus la quantité initiale d'ADN cible dans l'échantillon est importante, moins il faudra de cycle d'amplification pour détecter un certain niveau d'émission de fluorescence. Ce nombre de cycle est traduit par un indicateur : le Ct (Cycle threshold). Plus le Ct est faible, plus la quantité théorique d'ADN cible dans l'échantillon est importante, par rapport aux autres échantillons. Les échantillons avec un Ct supérieur à 40 ne sont pas considérés comme positifs (Znazen et al., 2015).

Le kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) est utilisé pour la qPCR. Les 2 amorces, ciblant le gène GltA de l'ADN des bactéries du genre *Rickettsia*, et la sonde TaqMan® sont fournies par Eurogentec. Le programme de qPCR et les séquences des amorces (Socolovschi et al., 2010) sont apportés dans l'Annexe 5. Le thermocycleur utilisé est un QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) et le logiciel de programmation est QuantStudio Design & Analysis (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Le logiciel permet ainsi de concevoir le programme de la qPCR et de visualiser les résultats.

III. Culture des *Rickettsia*

Le protocole de culture des *Rickettsia*, concernant l'infection et de suivi de la croissance, est repris de travaux publiés dans l'article de Ammerman et al., 2008.

1. Infection des cellules

Pour réduire le nombre d'échantillon à traiter simultanément et optimiser l'usage du matériel, des pools de tiques sont constitués. Ces pools, de maximum 5 individus, regroupent des tiques selon plusieurs critères, dans l'ordre inscrit ci-après :

1. Lieu de collecte (région, district puis commune).
2. Espèce de l'hôte.
3. Date de collecte.
4. Valeur du Ct

Malgré que les pools soient constitués en fonction des Ct, une étape de dilution individuelle est prévue pour éviter des écarts entre la prévalence des bactéries au sein d'un même pool, mais également pour limiter l'infection des cellules sur les premiers jours. Car si la quantité de bactéries est trop importante dès l'infection des cellules saines, le tapis cellulaire pourrait être détruit dans les premières heures, causant la perte des cellules mais aussi des bactéries, faute d'hôtes cellulaires.

Le protocole suivant est décrit dans la Figure 4. Les broyats sélectionnés sont ramenés de -80°C à température ambiante et la dilution s'effectue dans le MEM avec un volume final de 100µL. Le volume total des pools sera compris entre 200µL et 500µL (si pool entre 2 et 5 tiques). Le facteur de dilution des échantillons est déterminé selon le Ct issu de la qPCR :

- Ct < 20 : dilution à 1/1000 (inoculé individuellement, pas de pool)
- 20 < Ct < 25 : dilution à 1/100
- 25 < Ct < 30 : dilution à 1/10
- 30 < Ct < 35 : dilution à 1/5
- Ct > 35 : pas de dilution

Si le Ct est inférieur à 20, le broyat est inoculé individuellement car la quantité théorique de *Rickettsia* risque de provoquer une forte infection. Le volume final de l'inoculum est alors de 100µL.

Les bactéries sont cultivées dans des cellules VERO-E6 issues du singe *Chlorocebus*, particulièrement adaptées à la culture des *Rickettsia* (Karounos et al., 2025; Paddock et al., 2010; Radulovic et al., 1996; Tello-Martin et al., 2018). Pour démarrer une infection de cellules VERO-E6, ces dernières ont été mis en culture 24h avant l'infection en flasque de 25 cm² avec bouchon filtrant. Pour limiter l'effet cytopathique³ et optimiser le développement des

³ Ici, altération morphologique d'une cellule hôte infectée par une bactérie.

bactéries conjointement avec celui des cellules, le taux de confluence ne doit pas dépasser 80% lors de l'infection. Ainsi, pour atteindre ce taux en 24h, il faut déposer 14×10^5 cellules par flasque de 25 cm². Les cellules sont mises en culture dans 5 mL de MEM supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF). Les flasques sont placées en incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

Il est suggéré de supplémenter le milieu de culture MEM + 5% SVF avec des antimicrobiens auxquels les *Rickettsia* sont résistantes : 1% de pénicilline, 1% de streptomycine et 1% d'amphotéricine B (Rolain et al., 1998). Ce milieu sera abrégé MEM-ATB.

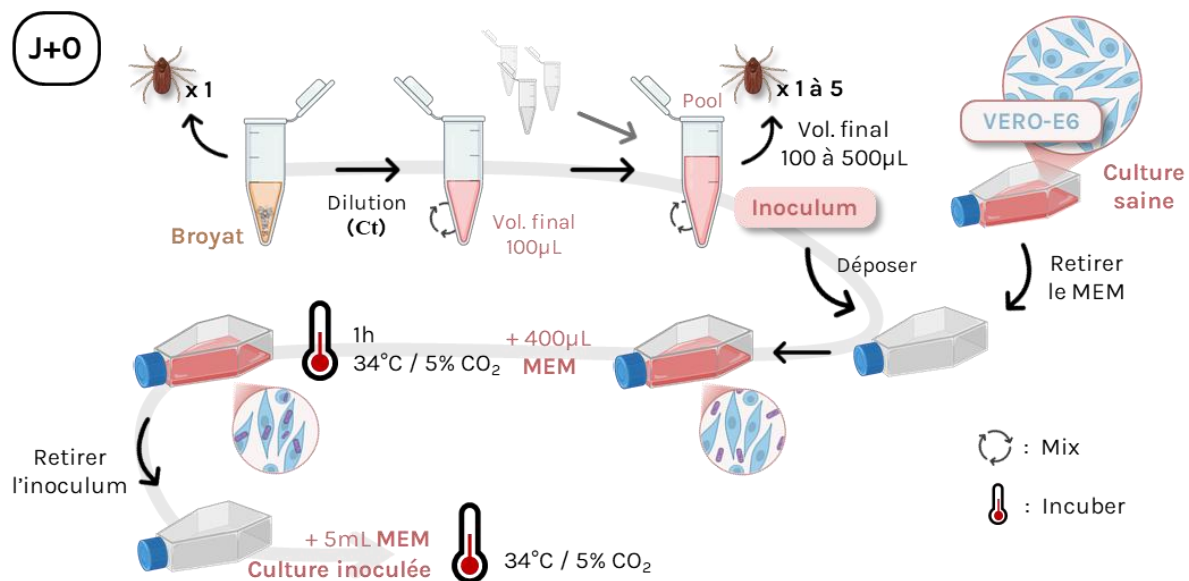


Figure 4. Infection des cellules VERO-E6 à partir de broyats de tique. (Crédit : Arthur DEYGAS)

Comme décrit dans la Figure 4, lors de l'infection, les flasques préparées la veille sont sorties de l'incubateur et le milieu de culture est retiré. La totalité du volume des échantillons préparés, en pool ou individuel, est déposé à la surface du tapis cellulaire. Comme les protocoles de culture recommandent un volume minimal de 500 µL pour l'infection des cellules cultivées dans une flasque de 25 cm², et que les volumes d'inoculum sont compris entre 100 et 500 µL, 400 µL de MEM sont ajoutés à chaque flasque, pour diluer également tous les inoculums. Cette dernière est ensuite mise à incuber 1h à 34°C + 5% CO₂. Après l'incubation, l'inoculum est retiré, puis remplacé par 5 mL de MEM. Ce protocole est détaillé dans la Figure 4. Une flasque témoin négatif est réalisée, inoculée avec 900 µL de MEM, en suivant le protocole décrit précédemment.

2. Suivi des cultures et observation

La culture est suivie selon le plan décrit dans la Figure 5. Le milieu de culture ne contient pas d'antimicrobien du J+0 au J+7. Les conditions de culture sous antimicrobiens sont testées à partir du J+7 seulement sur les cultures repiquées⁴, avec le milieu MEM-ATB.

Le tapis cellulaire est scruté au microscope inversé : taux de confluence, présence de vides, amas de cellules, détachement des cellules du support. Ces indicateurs donnent, à un temps donné et en comparaison des observations précédentes, un aperçu de l'effet cytopathique et de l'infection en cours.

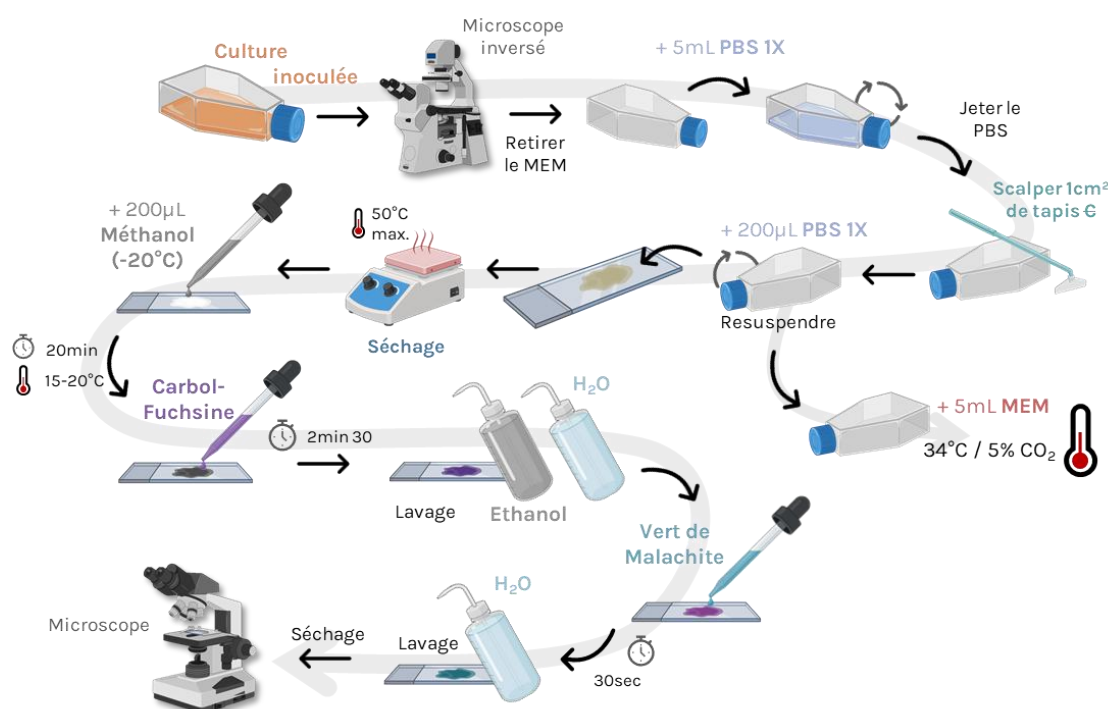


Figure 5. Protocole d'observation complète d'une culture cellulaire inoculée (Crédit : Arthur DEYGAS)

Pour colorer le dépôt, une technique adaptée de la coloration de Giménez est utilisée (Giménez, 1964). Ce protocole permet de colorer les bactéries intracellulaires en rose grâce à une solution aqueuse de carbol-fuchsin. La contre-coloration du tapis cellulaire en vert est faite via immersion dans du vert de malachite 0,8%. L'observation est faite à l'objectif x100 du microscope optique, car les *Rickettsia* sont des bactéries de petites tailles. Le protocole de préparation des colorants est disponible en Annexe 6.

A partir de J+7, les cultures sont repiquées et nommées d'après leur flasque d'origine comme suit : « x² ». Le protocole de repiquage est décrit dans la Figure 6. Dès le J+1², toutes les cultures [repiquées] sont observées quotidiennement, en suivant le protocole présenté

⁴ Prélèvement d'une culture de bactéries pour la transplanter sur un milieu neuf où elle continuera sa croissance.

en Figure 5. Les flasques pour lesquelles le tapis cellulaire a été prélevé pour le repiquage sont donc perdues. Les flasques pour lesquelles le milieu de culture a été prélevé à J+3 sont conservées et observées tous les 2 à 3 jours en suivant le protocole d'observation décrit en Figure 5.

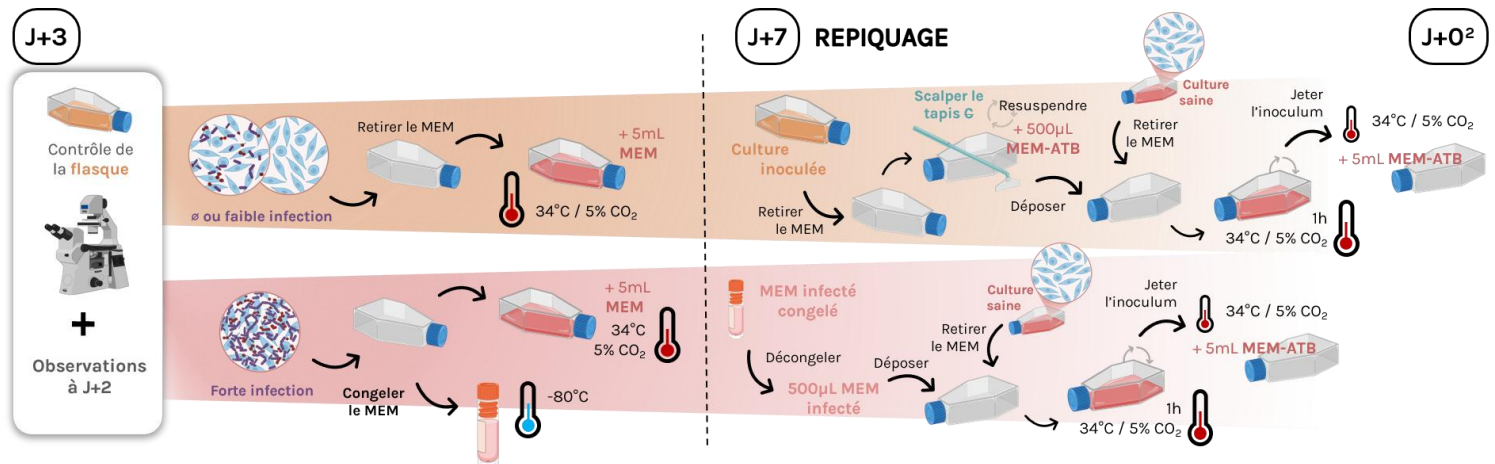


Figure 6. Repiquage à J+7 d'une culture à partir du milieu de culture prélevé à J+3 ou à partir du tapis cellulaire à J+7 (Crédit : Arthur DEYGAS)

3. Arrêt des cultures

La décision d'arrêter la culture cellulaire et de stocker les cellules infectées est prise suivant le niveau d'infection. Pour conserver la ou les souche(s) bactérienne(s) dans des conditions optimales, il faut congeler les bactéries dans leur phase de croissance la plus importante. L'optimal est donc une flasque de culture avec un tapis cellulaire à 90% de confluence et des bactéries présentes dans le milieu de culture et dans les cellules, qui auront été observées par lecture de lame. Lorsque ces 2 critères sont réunis, la culture est scalpée sur toute sa surface avec son milieu de culture, à l'aide d'un grattoir. Avec une seringue munie d'une aiguille de calibre 23G, la suspension cellulaire est aspirée puis refoulée à 5 reprises, pour casser les cellules. Elle est déposée dans 2 cryotubes pour être congelée à -80°C. Afin de minimiser la lyse, les tubes sont congelés progressivement dans un cryopréservateur.

IV. Extraction d'ADN et séquençage

1. Lyse des cellules

Le protocole utilisé pour cette technique est adapté de Abd El-Aziz et al., 2021 et Faria et al., 2015. Pour extraire des bactéries intracellulaires au terme de leur culture, il faut lyser les cellules hôtes. Cette étape est réalisée avec un détergeant qui va dégrader la membrane riche en stérols, qui est présente chez les organismes eucaryotes. Dans 1 mL de la suspension cellulaire, issue de la culture, 200 µL de saponine à 0,1% sont ajoutés. Le tube est homogénéisé délicatement puis placé à incuber pendant 15 min à température

ambiante. Le tube est centrifugé 15 min à 18 000g et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 1mL d'eau déionisée, ou DNA-free à défaut, et le tube est de nouveau centrifugé 15 min à 18 000g. Après avoir jeté le surnageant, le culot est repris dans 500µL de PBS 1X stérile. Le tube est centrifugé 5 min à 9 000g et le surnageant est jeté. Dès lors que les cellules ont été dégradées, leur ADN est libre dans le milieu. Pour éviter de polluer l'échantillon avec de grandes quantités d'ADN de cellule VERO-E6, un traitement à la DNase est appliqué pour dégrader tout ADN libre. Le culot est resuspendu dans 200µL de tampon DNase (10mM Tris-HCl ; 2,5mM MgCl₂ ; 0,5mM CaCl₂ ; pH 7,6). Pour 200µL de tampon, il est recommandé d'avoir 20 à 30 unités d'activité enzymatique. Un µL de DNase (34,8U/µL) est ajouté puis le tube est vortexé et mis à incuber 15 min à 37°C. La réaction enzymatique est arrêtée avec 2µL d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et le tube est centrifugé 5 min à 9 000g. Le surnageant est éliminé et le culot peut être conservé quelques heures, avec le tube bien fermé.

2. Sélection d'un échantillon pour du séquençage par nanopore

Le séquençage par nanopore génère des séquences d'ADN en passant les molécules d'ADN simple brin à travers un « pore » protéique inséré dans une membrane biphasique de lipides. Dans le cadre d'un séquençage sur génome complet, ce protocole nécessite une concentration d'ADN assez élevée (minimum de 20 ng/µL) avec de l'ADN de bonne qualité (non-fragmenté, et non-contaminé). Pour ceci, l'extraction d'ADN est réalisée avec le kit QIAamp® DNA MiniKit (QIAGEN®, Pays-Bas), suivant les recommandations du fabricant. L'extraction reprend le principe de celle décrite dans le paragraphe **II. 3. Extraction d'ADN pré-culture**. Le protocole complet fourni par le kit est disponible en Annexe 7. Le témoin de culture est appelé T-C et le témoin d'extraction d'ADN est appelé T-E.

La quantification de la concentration d'ADN est réalisée avec un spectrophotomètre de marque Qubit™ (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis), utilisant le Kit Qubit™ 1XDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). L'appareil est étalonné avec les 2 standards fournis dans le kit. Dix µL du standard #1 sont ajoutés à 190 µL du mix fourni et la solution est vortexée. Après 1 min d'incubation à température ambiante, la concentration d'ADN est lue directement dans le tube. Le résultat attendu pour le standard #1 est nulle. Pour le standard #2, le protocole est répété et la concentration attendue est de 100 ng/µL. Pour chaque échantillon à traiter, un tube contenant 199 µL du mix fourni et 1µL d'éluat est préparé. Après avoir vortexé le tube et laissé la solution incuber 1 min à température ambiante, la concentration est mesurée en ng/µL.

Avant de démarrer le séquençage, il faut contrôler que l'ADN d'intérêt est présent dans l'échantillon. Pour cela, une qPCR de recherche d'ADN cible est réalisée, selon le protocole décrit dans le paragraphe II. 4. **qPCR pour recherche d'ADN de Rickettsia**.

3. Séquençage par nanopore

Comme décrit précédemment, les échantillons avec une concentration d'ADN supérieure ou égale à 20 ng/μL et positifs à la recherche d'ADN d'intérêt en qPCR sont sélectionnés pour être séquencés. La préparation de la librairie est réalisée avec le kit Rapid Barcoding Sequencing Kit 96 V14 (Oxford Nanopore Technologies™, Royaume-Uni). Le protocole utilisé est celui fourni par le kit, il est décrit en Annexe 8. Le témoin négatif utilisé pour le séquençage est réalisé en duplicat et abrégé T-S1 et T-S2, il est traité exactement comme un échantillon avec de l'H2O DNA-Free à la place de l'ADN. La librairie est séquencée avec une Flow-Cell MinION™ Version R10 et un séquenceur MinION™ Mk1D connectée à un ordinateur équipé du logiciel MinKNOW™ (Oxford Nanopore Technologies™, Royaume-Uni). Le protocole de séquençage est décrit en Annexe 8.

4. Traitement des données de séquençage

Les données de séquençage, sous format **.fastq**, sont regroupées selon leurs barcodes à l'aide d'un script sous R dans l'interface RStudio (version 2026.05.0, Annexe 9). Les séquences des barcodes et adaptateurs sont retirés utilisant la fonctionnalité « trim » du logiciel Dorado (version 2.0.1). L'outil SeqKit (version 2.13.0) est ensuite utilisé pour obtenir des statistiques concernant le nombre et la longueur des « reads » (séquences), et ces statistiques sont utilisées pour évaluer la qualité des données obtenues. Un indicateur clé est le N50, décrit dans la Figure 7. Cet indice donne la longueur de la séquence telle que 50% de la taille totale de l'assemblage est contenue dans des reads de cette taille ou plus grand. Il permet donc de donner le niveau de fragmentation du matériel génétique séquencé.

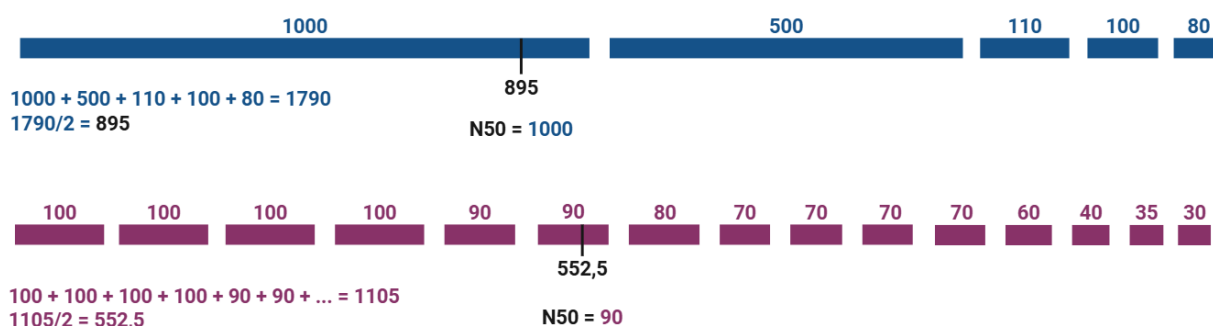


Figure 7. Exemple de calcul de N50

La classification taxonomique des séquences est réalisée avec le système Kraken2 (version 2.17.1). Ce programme utilise une approche basée sur les k -mères⁵ qui permet d'obtenir très rapidement des résultats en comparant les assemblages de k -mères avec la base de données de Kraken2. Les fichiers obtenus sont interprétés et présentés avec l'outil Pavian (version 1.0 <https://fbreitwieser.shinyapps.io/pavian/>) qui est une interface interactive d'analyse de résultats de classification.

⁵ En bioinformatique, fragmentation de l'ADN en séquences de longueur k à partir d'une séquence plus longue.

Résultats

I. Sélection des tiques pour la culture de *Rickettsia*

Les échantillons issus de tiques *Rhipicephalus microplus* et *R. sanguineus* étaient tous négatifs à la recherche d'ADN de *Rickettsia*. Parmi les 55 échantillons issus des tiques *Amblyomma variegatum*, 51 étaient positifs, comme présenté sur la Figure 8. Le Ct moyen était de 32,33 et les échantillons sont distribués comme suivant :

- 2 échantillons < Ct 20
- Ct 20 < 10 échantillons < Ct 30
- Ct 30 < 28 échantillons < Ct 35
- Ct 35 < 11 échantillons < Ct 40

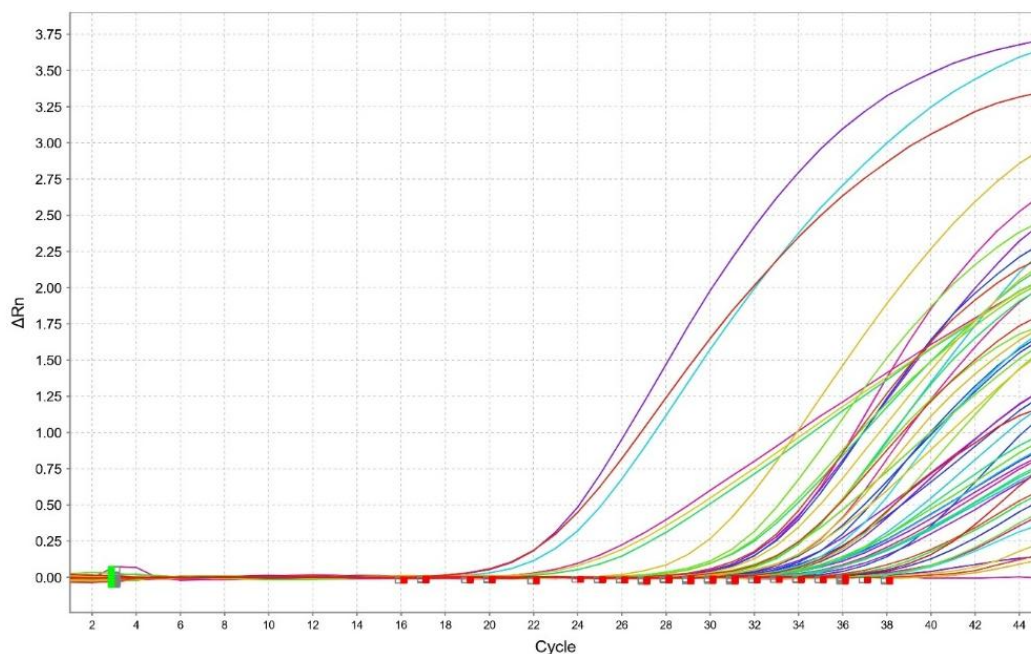


Figure 8. Graphique des signaux d'amplification des éluats d'ADN issus de tiques *Amblyomma variegatum*. Chaque courbe correspond à un échantillon. Le Ct est d'autant plus faible que la phase exponentielle de la courbe débute tôt. Cette phase exponentielle atteindra un plateau à partir d'un certain seuil.

Les témoins positifs et négatifs ont validé la qPCR.

II. Culture de *Rickettsia* dans les cellules VERO-E6

Les échantillons sélectionnés et leur Ct respectifs sont exposés dans le Tableau 1. Les flasques 13 et 16 ne contenaient pas de pool, mais seulement un seul échantillon, car les Ct de ces derniers étaient les plus faibles (< 20).

Tableau 1 : Sélection des échantillons mis en culture et pools constitués (dilutions suivies selon le Ct : 1/1000, 1/100, 1/10, 1/5, aucune dilution).

Flasque	1					2		3			4	
ID Tique	CC16A	CC16B	CC17	CC18A	CC18B	CC20A	CC20C	CC22A	CC22B	CC22C	CC24B	CC24A
Ct	31,72	31,05	31,19	33,00	32,60	30,20	26,89	23,51	20,39	30,02	31,73	29,77

Flasque	5			6		7			8		
ID Tique	CC21	CC25	CC26	CC27A	CC27B	CC28A	CC28B	CC28C	CC29A	CC29B	CC29C
Ct	28,28	30,82	30,25	28,62	28,58	30,81	31,98	33,42	22,45	29,45	31,53

Flasque	9					10				11	
ID Tique	CC30A	CC30B	CC30C	CC30D	CC30E	CC35C	CC35D	CC35J	CC35I	CC36C	CC36B
Ct	30,68	33,97	34,02	32,57	32,18	34,89	34,79	33,45	22,79	33,79	33,73

Flasque	12		13	14			15			16
ID Tique	CC33	CC38	CC19	CC13	CC14A	CC14B	CC14C	CC12	CC15B	CC20B
Ct	34,64	34,06	19,58	37,16	39,01	35,94	39,85	33,42	33,23	19,42

Flasque	17					18		19
ID Tique	CC35B	CC35E	CC35F	CC35G	CC35H	CC11A	CC36A	T-C
Ct	38,76	37,87	35,36	38,41	36,67	37,57	35,04	NA

Les infections ont commencé à J0, le 21/04. Les résultats détaillés des observations à J+2, J+4 et J+6 sont détaillés en Annexe 10. Sur la lame, les bactéries intracellulaires ont été coloré en violet et les cellules ont pris une coloration verte à bleue, comme montré sur la Figure 9.

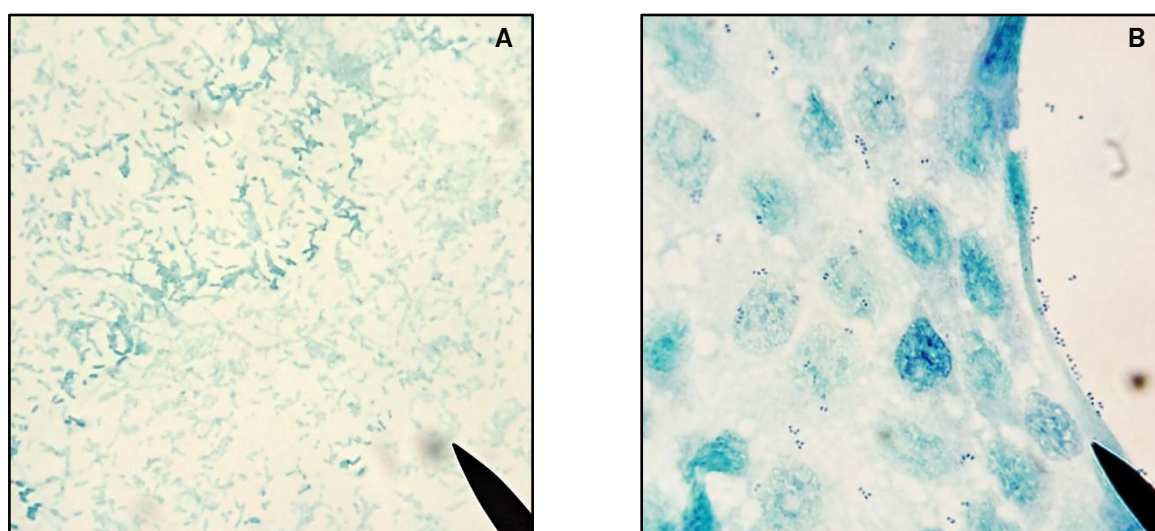


Figure 9. Bactéries et cellules VERO-E6 observées sur lame avec une coloration de Giménez. **A.** Flasque 16 à J+6, tapis de bacilles extracellulaires. **B.** Flasque 3 à J+2, les bactéries dites *Rickettsia*-shaped dans et hors des cellules VERO-E6. (Grossissement x100. Contraste, netteté et colorimétrie des photographies accentués. Crédit : Arthur DEYGAS)

Pour ces 6 jours de suivi des cultures cellulaires, la plupart des bactéries vues sur lame avaient une forme de bacille, de taille plus ou moins importante et très généralement extracellulaires avec une coloration bleue parfois très claire (Figure 9A). Celles-ci n'étaient pas classées comme étant potentiellement des *Rickettsia*. D'autres bactéries s'apparentant à des *Rickettsia* (dites **Rickettsia-shaped**) ont été aperçus : forme de coccobacille ou très petit bacille, coloration plus foncée et placées dans les cellules et les débris cellulaires (Figure 9B). A J+3, les cultures dont le milieu de culture a été collecté, étaient les flasques 1, 2, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18. Le tapis cellulaire du témoin négatif a été évalué entre 90% et 100% de confluence, le milieu de culture est resté translucide.

Tableau 2 : Résultats d'observations des cultures après repiquage, à J+1², J+2², J+3² et J+10²

J+1 ²			J+2 ²		J+3 ²		J+10 ²		
N°	Microscope	Lame	Microscope	Lame	Microscope	Lame	Microscope		
1 ²	Quelques C	Rick. In/out	Amas C + Rick.		Stoppée et stockée à J+2 ²				
2 ²	TC ≈ 80%		Amas C + Rick.		Stoppée et stockée à J+2 ²				
3 ²	MEM trble + TC	Rick. In/out	Amas C + Rick.		Stoppée et stockée à J+2 ²				
4 ²	TC		TC		TC	TC	TC		
5 ²	TC		TC		TC + qq amas dtc.	TC + Artefacts = Rick.	TC		
6 ²	TC perforé	Bact. non-identifiables	Amas C + Bact. ⁺⁺		Stoppée et stockée à J+2 ²				
7 ²	+++ Bact. TC ≈ 5%	Non lisible	Stoppée et stockée à J+1 ²						
8 ²	MEM trble + TC	Rick. In/out	Amas C + Rick.			Stoppée et stockée à J+2 ²			
9 ²	TC + Bactéries		Amas C dtc. + TB		Non lisible	Abs. TC		Stoppée et stockée à J+3 ²	
10 ²	TC		TC			TC	TC	TC	
11 ²	TC		Amas C dtc. + TB	TB, abs. C = Rick.	Abs. TC		Stoppée et stockée à J+3 ²		
12 ²	MEM trble + TC		Amas C dtc. + TB	Rick.	TC ≈ 10% + Rick.		Stoppée et stockée à J+3 ²		
13 ²	TC		TC		TC + Amas C dtc.	TC	TC		
14 ²	TC		TC		TC	TC + Artefacts = Rick.	TC		
15 ²	TC perforé	Rick. In/out	Amas C + Rick.		Stoppée et stockée à J+2 ²				
16 ²	TC		Amas C dtc. + TB		TB, abs. C = Rick.	TC + Bact. ≈ Rick.		Stoppée et stockée à J+3 ²	
17 ²	TC Rickettsia		Amas C dtc. + TB		Rickettsia	Abs. TC		Stoppée et stockée à J+3 ²	
18 ²	TC ≈ 80%		Amas C dtc. + TB		TB, abs. C = Rick.	Abs. TC		Stoppée et stockée à J+3 ²	
T- ²	TC	OK	TC		OK		TC	OK	TC

- **T** : Tapis
- **Rick.** : Bactéries *Rickettsia*-shaped
- **In/out** : dans et hors des cellules
- **Abs.** : Absence
- **Qq** : Quelques
- **B/Bact.** : Bactérien/Bactérie
- **C** : Cellule/Cellulaire
- **Trbl.** : Trouble
- **Dtc.** : Détaché(s)

Les résultats des observations des jours J+1², J+2², J+3² et J+10² sont présentés dans le Tableau 2. Certaines cultures cellulaires repiquées et initiales ont été arrêté à partir du J+1 car elles montraient un tapis cellulaire dégradé ou plein et des *Rickettsia*-shaped à la lecture de lame. Ces flasques arrêtées et stockées sont signalées par un trait rouge dans le Tableau 2.

A J+1, sur toutes les lames lues (cultures 1², 3², 6², 8², 15²), des bactéries *Rickettsia*-shaped était présentes dans et hors des cellules. A J+2², des lames sont préparées pour les cultures 9², 11², 12², 16², 17² et 18². Sur toutes les lames lues, des bactéries *Rickettsia*-shaped ont été relevé. Le tapis cellulaire des cultures 4², 5², 10², 13², 14² et T-² ne montrant pas de signes d'infection, ces flasques ont été conservé. A J+3², les cultures 4², 5², 10², 13², 14² et T-² présentaient toutes un tapis cellulaire en bon état, avec quelques détachements de cellules pour les flasques 5² et 13². Leur milieu de culture a été renouvelé lors de la préparation de la lame. Ces cultures 4², 5², 10², 13², 14² et T-² n'ont pas présenté de signe d'infection entre le J+3² et le J+10². Donc à J+10², la culture T-² a été stoppé et conservé à -80°C. Les autres cultures ont été éliminé.

En parallèle, les cultures initiales à J+10 (1, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18) ont toutes été observées et les résultats sont présentés dans le Tableau 3. Ces cultures n'ont pas été entretenu depuis le J+6 et étaient toujours cultivées dans un MEM sans ATB. La flasque 17 montrait un tapis cellulaire important. Une lame a été préparé et sa lecture a révélé la présence de bactéries *Rickettsia*-shaped, dans les cellules et leurs débris et dans le milieu extracellulaire, visibles dans la Figure 10. D'autres bactéries de forme et de coloration différentes sont également visibles. La culture 17² ayant été stoppé suite à l'observation de *Rickettsia*-shaped, la culture 17 est arrêtée. Le milieu de culture des flasques 1, 7, 9, 10, 11, 15 et 18 a été renouvelé avec du MEM-ATB.

A J+13, les flasques 1, 7, 9, 10, 11, 15 et 18 montraient encore des importants signes d'infection après l'ajout d'antibiotiques. La lecture des lames préparées a montré la présence de bactéries *Rickettsia*-shaped pour toutes les cultures. Ces dernières ont toutes été arrêté à J+14.

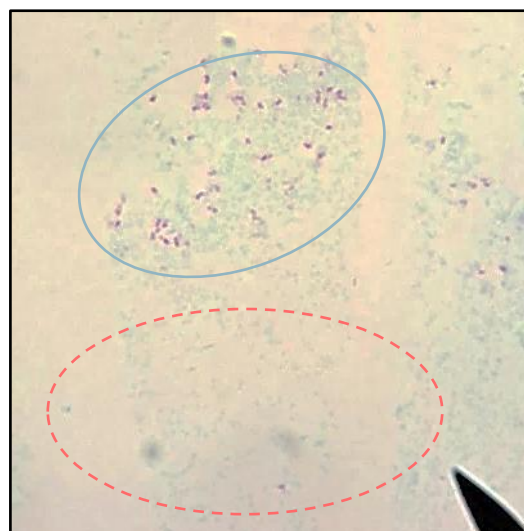


Figure 10. Lecture de la culture 17 à J+10. Les points violets fuchsia sont des *Rickettsia*-shaped prises dans des débris cellulaires (cercle bleu) et des bactéries vertes/bleues claires sont visibles en tapis (cercle rose) (Grossissement x100. Contraste, netteté et colorimétrie des photographies accentués. Crédit : Arthur DEYGAS)

Tableau 3 : Résultats d'observations des cultures initiales, à J+10 et J+13

J+10		J+13	
N°	Microscope	Microscope	Lame
1	TC + MEM trble.+++	TC + Bact.++	Abs. TC + Rick. ? ≈ Co-infection
6	TC + qq amas dtc.	Stoppée et stockée à J+10	
7	TC + MEM trble.+++	TC + Bact.++	Abs. C + Bact. ≈ Rick. ?
9	TC + MEM trble.+++	TC + Bact.++	Abs. C + TB ≈ Rick. ?
10	TC + MEM trble.+++	TC + Bact.++	Abs. C + TB ≈ Rick. ?
11	TC + MEM trble.+++	TC + Bact.++	Abs. C + TB ≈ Rick. ?
12	TC + qq amas dtc.	Stoppée et stockée à J+10	
15	TC + MEM trble.+++	TC + Bact.++	Abs. C + TB ≈ Rick. ?
16	TC + qq amas dtc.	Stoppée et stockée à J+10	
17	TC + MEM trble.+++	Stoppée et stockée à J+10	
18	TC + MEM trble.+++	TC + Bact.++	Abs. C + TB ≈ Rick. ?

– **T** : Tapis

– **Rick.** : Bactéries Rickettsia-shaped

– **Abs.** : Absence

– **Qq** : Quelques

– **B/Bact.** : Bactérien/Bactérie

– **C** : Cellule/Cellulaire

– **Trbl.** : Trouble

– **Dtc.** : Détaché(s)

III. Préparation des échantillons pour le séquençage

Les résultats de la quantification d'ADN présent dans les 23 échantillons de culture sont présentés dans le Tableau 4. Pour rappel, la quantification d'ADN au Qubit n'est pas spécifique. De l'ADN a été détecté dans le témoin négatif de culture cellulaire mais pas dans le témoin d'extraction.

Tableau 4 : Résultats de la quantification d'ADN dans les échantillons au Qubit™

Echantillon	1	1 ²	2	2 ²	3 ²	6 ²	7	7 ²	8 ²	9	9 ²	10
[ADN] (ng/μL)	48,4	99,0	19,5	57,2	9,12	89,4	12,5	91,2	170	104	143	102
Echantillon	11	11 ²	12 ²	15	15 ²	16 ²	17	17 ²	18	18 ²	T-C	T-E
[ADN] (ng/μL)	97,6	189	131	206	134	27,0	20,4	81,0	59,6	106	26,2	∅

Les échantillons ont tous été testés par qPCR et les courbes d'amplifications obtenues sont affichées dans la Figure 11. Aucun échantillon n'a été testé positif, les témoins négatifs et positifs ont tous été validés.

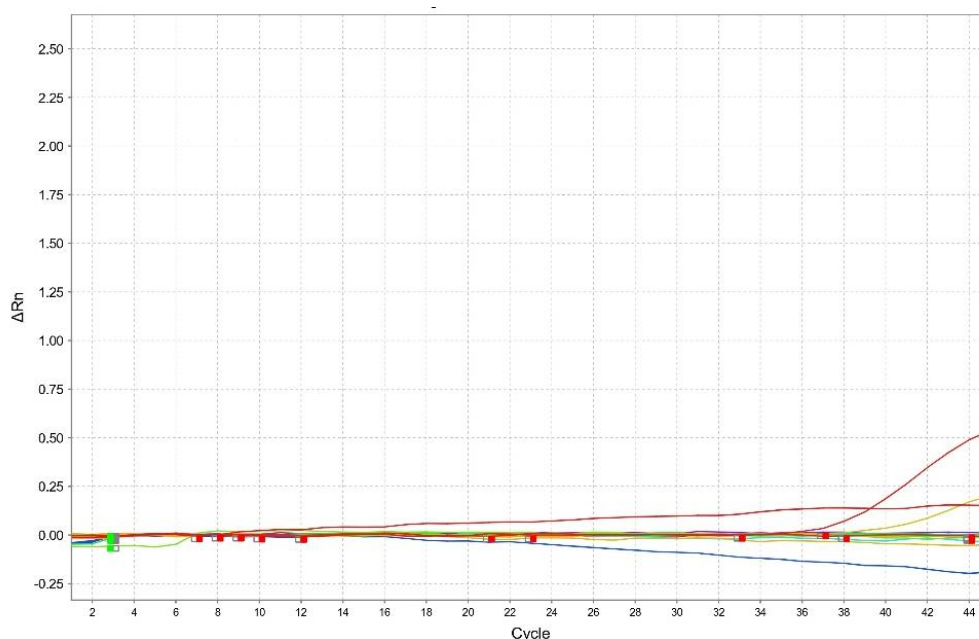


Figure 11. Graphique des signaux d'amplification par qPCR des éluats d'ADN issus des cultures cellulaires. Chaque courbe correspond à un échantillon.

IV. Séquençage des échantillons

Les échantillons suivants ont été préparé et séquencés :

- 1	- 7 ²	- 11 ²	- 17	- T-C
- 1 ²	- 8 ²	- 12 ²	- 17 ²	- T-E
- 2	- 9 ²	- 15	- 18	
- 2 ²	- 10	- 15 ²	- 18 ²	
- 6 ²	- 11	- 16 ²		

L'analyse de la Flow-Cell utilisée pour le séquençage indiquait que 1 600 pores étaient disponibles. Le séquençage a duré 72h et le basecalling⁶ environ 5 jours. Les données brutes représentaient un volume de 162 Go. Après une analyse statistique préliminaire concernant la qualité du matériel séquencé, la quantité de reads dans les contrôles est en moyenne 2 fois plus faible que celle des échantillons. Le N50 des contrôles est en moyenne 100 fois plus faible par rapport au N50 moyen des échantillons. Ces résultats sont présentés dans la Figure 12.

En moyenne 80,7% des k-mères obtenus avec les échantillons séquencés ont été attribué à un taxon. Pour les témoins, ce pourcentage moyen était de 6,8%. Le pourcentage d'attribution pour chaque échantillon et témoin est décrit dans la Figure 13. Concernant les échantillons, 79,6% des k-mères attribués à un taxon ont été assigné au domaine des bactéries. Aucune espèce de *Rickettsia* n'a été identifié grâce aux données de séquençage. Les espèces qui ont été détectées appartenaient très majoritairement au genre

⁶ Décodage du signal électrique, créé par le passage de l'ADN dans les pores, en nucléotides.

Stenotrophomonas. D'autres genres bactériens très minoritaires ont été identifié : *Deftia*, *Burkholderia*, *Elizabethkingia*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia* et *Brucella*. Ces résultats sont représentés dans la Figure 14A, ils n'indiquent que les genres auxquels plus de 5% des k-mères d'un échantillon ont été attribué. Concernant les témoins négatifs, les résultats des taxons identifiés sont présentés en Figure 14B. Les reads classifiés du témoin d'extraction (24,7% d'attribution) ont été à 85,2% assigné au genre *Homo*.

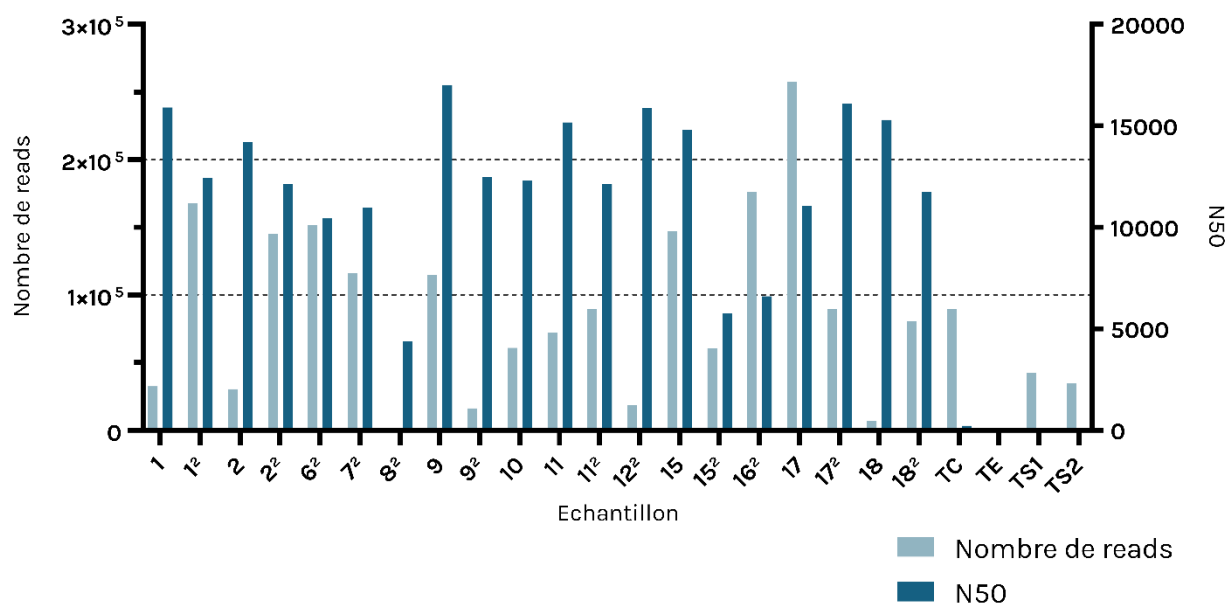


Figure 12. Nombre de reads obtenus lors du séquençage et N50 calculé pour les échantillons séqués.

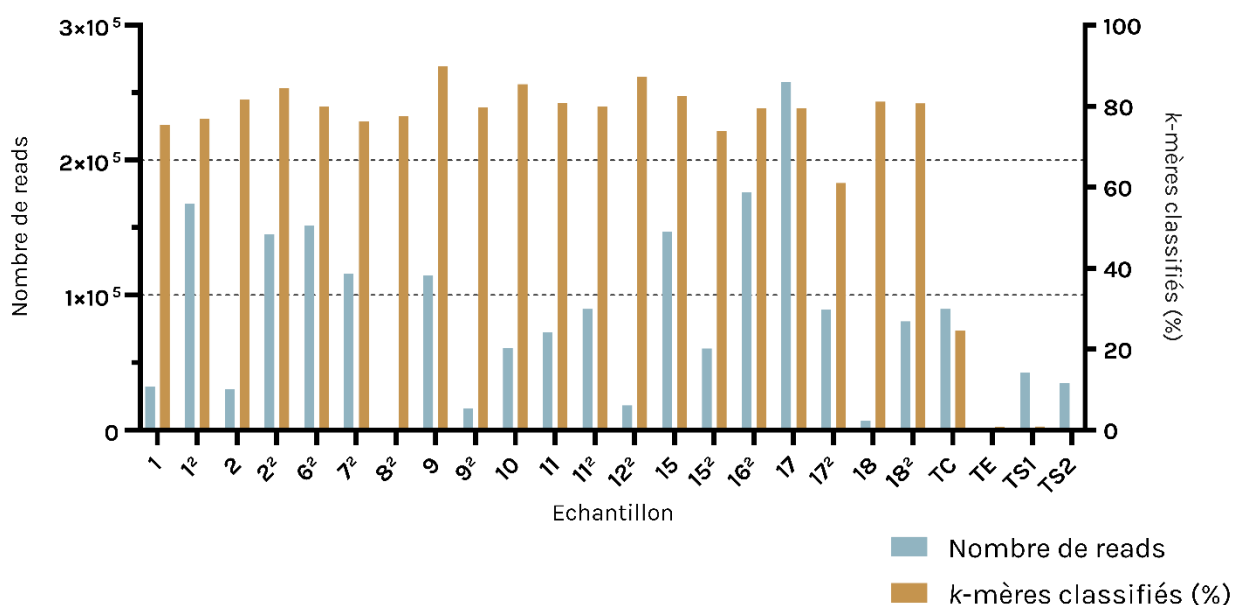


Figure 13. Pourcentage de k-mères attribués à taxon et nombre de reads obtenus pour chacun des échantillons séqués.

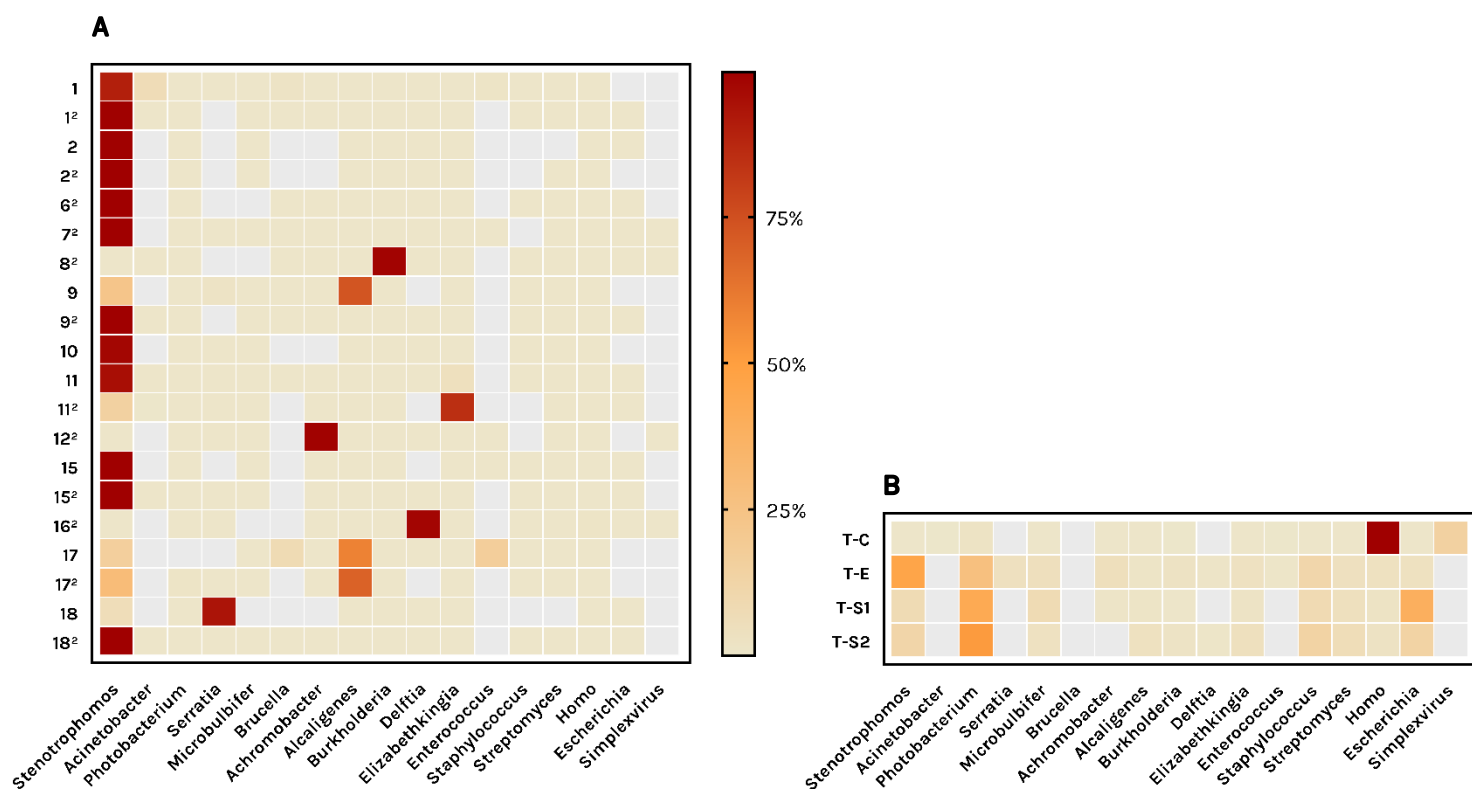


Figure 14. Taxons attribués aux k-mères issus du traitement par Kraken2. Les taxons représentés correspondent à minimum 5% d'attribution pour au moins un échantillon ou témoin. La légende correspond au pourcentage de k-mères attribués. **A.** Echantillons **B.** Témoins

Discussion

Ce protocole est exploratoire, s'agissant de la première tentative de culture de ces bactéries à l'IPM et même à Madagascar. Les *Rickettsia* sont des organismes qui sont décrits comme labiles et difficile à cultiver (Ammerman et al., 2008). Il est important de préciser que la sélection des échantillons mis en pré-culture se base sur l'ADN des *Rickettsia*. Ce qui veut dire que si elles ont été lysées lors du broyage ou des cycles congélation/décongélation, leur ADN sera bien détectable dans le milieu mais les bactéries ne seront plus compétentes pour infecter les cultures cellulaires. Les résultats et les contrôles montrent que les *Rickettsia* ont été perdus entre le lavage des tiques et la culture cellulaire, incluse. La lyse des cellules, l'extraction d'ADN et le séquençage ne sont pas à l'origine de leur perte. Ce sont sur les étapes « critiques » que les améliorations proposées dans cette discussion porteront.

Phase de pré-culture

Lors de la préparation des tiques, l'ouverture de l'abdomen et le retrait du sang dans certaines tiques peut conduire à l'exposition de l'intestin aux détergents utilisés pour le lavage. Ces détergents pourraient éliminer les endosymbiontes et autres agents pathogènes présents dans l'intestin. Il pourrait être testé de réduire le protocole de lavage et le nombre

de détergents utilisés. En effet, une étude de Binetruy et al., 2019 avait démontré que le lavage avec l'eau de Javel suffisait à stériliser l'extérieur de la tique. Cela réduirait le risque de détruire les bactéries d'intérêt dans l'intestin des tiques, même si cela ne concernait qu'un faible nombre d'individus.

Après le broyage, les débris des tiques contiennent tous les microorganismes de la tique. Etant donné que les *Rickettsia* sont intracellulaires, l'utilisation d'une technique pour ne garder que les cellules de la tique permettrait de réduire le volume de microorganismes extracellulaires. Pour cela, le broyat de la tique pourrait être resuspendu dans du DMEM-ATB et déposé dans une seringue montée avec un filtre de 0,45µm. Le passage du milieu au travers de la membrane emporterait un grand nombre de contaminants, et ainsi les cellules de la tique et les débris seraient retenus sur la membrane (Zhang et al., 2021). Une autre hypothèse, plus délicate serait d'utiliser de la saponine pour lyser le matériel cellulaire après filtration pour faciliter la sortie des *Rickettsia* mais l'absence d'enveloppe cellulaire et la congélation sans cryopréservateur pourraient provoquer la lyse des *Rickettsia* libérées. L'ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou de glycérol est donc à privilégier pour limiter les dégâts liés aux cycles congélation/décongélation (Wijnveld et al., 2016).

Concernant la qPCR pré-culture, l'absence d'ADN de *Rickettsia* et donc des *Rickettsia* elles-mêmes dans les tiques *Rhipicephalus sanguineus* et *R. microplus* correspondait à ce qui a déjà été établi par Rakotonirina et al. (en cours de publication). Des améliorations à cette étape ne permettraient pas de favoriser la détection dans ces espèces.

Phase d'inoculation des bactéries

La culture des *Rickettsia* est l'étape la plus critique du protocole. Elle commence avec l'inoculation des bactéries dans les cellules. Tout d'abord, la technique du pool n'est pas tout à fait adaptée à ce stade de développement du protocole. Les pools qui ont permis de réduire le nombre de cultures en simultané n'auraient pas permis d'identifier des co-infections au sein d'un même individu. Cette technique n'a pas permis de conclure sur les dilutions effectuées en fonction des Ct car plusieurs échantillons avec différentes dilutions étaient parfois poolés ensemble. La technique du pool pourrait être de nouveau utilisée si la technique de culture et l'isolement des souches de *Rickettsia* était maîtrisée (Karounos et al., 2025). Malgré tout, les pools ont permis de constater que la charge bactérienne initiale n'avait pas d'incidence sur la culture si cette dernière n'est pas bien optimisée, car les niveaux d'infection qui ont été observés par la suite ne dépendaient pas des Ct, ni du nombre d'individus dans le pool.

Ensuite, tant que les pools ne sont pas utilisés, la dilution des échantillons en fonction des Ct n'est pas optimale. Il est préférable de gérer la culture avec des échantillons individualisés, et éventuellement, des différences pourront être observées dans les cultures en fonction des Ct. L'équilibrage final des inoculums avec du MEM n'est également pas à reconduire, car il fausse malgré tous les calculs de dilution.

La littérature recommande, pour l'inoculation de cellules par des bactéries intracellulaires, de centrifuger les flasques de cultures durant l'incubation (Karounos et al., 2025; McOrist et al., 1995). Cette étape n'a pas été intégrée au protocole car les flasques utilisées ne le permettraient pas. Pour les prochaines cultures, l'utilisation de plaques 6 puits, adaptées à la centrifugeuse disponible est à privilégier, car les *Rickettsia* ont pu être perdues à cette étape-ci. Si elles n'ont pas pu rentrer dans les cellules et sont restées dans le milieu, c'est qui a pu conduire à leur lyse progressive.

La perte très rapide du tapis cellulaire empêche les éventuelles *Rickettsia* de se développer, faute d'hôtes. Il faut donc optimiser la survie des cellules. Tout d'abord, les cellules utilisées, VERO-E6, sont décrites comme adaptées pour des cultures généralistes de *Rickettsia* mais le risque associé est qu'elles ne sont pas spécifiquement adaptées pour une espèce de *Rickettsia*. Les cellules HEL, XTC-2, C6/36 pourraient être des solutions alternatives, car elles aussi adaptées aux cultures de *Rickettsia* (Tello-Martin et al., 2018).

Ensuite, le milieu de culture suggéré dans la littérature est du MEM Dulbecco (DMEM) contre le MEM utilisé pour cette étude. Le DMEM est plus riche que le MEM et favorise la croissance cellulaire, ce qui permettrait aux cellules de mieux survivre face à l'infection généralisée. La concentration de Sérum de Veau Fœtal peut aussi permettre de favoriser la résistance des cellules mais elle avait déjà été augmentée à 5% dans ce protocole, contre 2% dans la littérature (Karounos et al., 2025).

Les antibiotiques sélectionnés : pénicilline (β -lactamines) et streptomycine (aminosides) ne permettent pas de sélectionner uniquement les *Rickettsia* car des bactéries retrouvées dans les échantillons sont résistantes à ces familles d'antibiotiques (Huang, 2020; Sánchez, 2015). L'ajout de co-trimoxazole dans la culture pourrait réduire le spectre des bactéries présentes (Rolain et al., 1998).

Phase de suivi des infections

Après l'inoculation, la phase de suivi qui passe par l'observation des flasques de culture au microscope inversé, n'a pas été effectuée par le même technicien. Cela a conduit à des différences et des nuances entre les méthodes d'observation. L'appréciation générale (coloration et turbidité du milieu, absence ou présence de tapis cellulaire) n'a pas été

influencé mais l'évaluation de la confluence des tapis cellulaires et de l'effet cytopathique n'était pas systématiquement réalisée. A l'avenir, il faudra s'assurer que le technicien en charge des observations cellulaires puisse être présent tout le long de la culture ou bien qu'une formation spécifique soit dispensée aux autres techniciens. Cette recommandation est valable pour les lectures de lames au microscope optique, mais pour cette étude, le lecteur n'a pas changé.

Concernant la préparation des lames, les colorants utilisés pour les observations n'étaient pas neufs et le carbol-fuchsine s'est avéré très difficile à préparer à partir d'une poudre, très volatile. La solution de coloration a tout de même fonctionné mais l'utilisation d'une préparation de carbol-fuchsine prête à l'emploi serait préférable. La lecture des lames au microscope s'est avérée très complexe avec les bactéries cultivées. Car la coloration n'était pas systématiquement uniforme et lorsqu'il n'y avait qu'un tapis bactérien extracellulaire, la coloration utilisée n'est pas adaptée : les bactéries prenaient une coloration très claire, presque invisible. Si ces bactéries étaient des *Rickettsia* libérées dans le milieu suite à la lyse des cellules hôtes, il était impossible de les caractériser.

Comme énoncé précédemment, un essai préliminaire de culture avait été effectué à partir de quelques individus. Le milieu de culture sans antimicrobiens d'un échantillon avait été collecté à J+3 et testé par qPCR. De l'ADN de *Rickettsia* avait été identifié et les bactéries visibles sur lames ressemblaient fortement à celles lues sur les lames de cette étude. Donc, ces dernières étaient fortement suspectées comme étant des *Rickettsia*. Cependant, il se peut que l'ADN de *Rickettsia* identifié à J+3 lors de l'essai préliminaire appartienne aux *Rickettsia* résiduelles introduites via l'inoculum mais qui n'ont pas infectées les cellules. Donc lors des prochaines cultures de *Rickettsia*, en plus de suivre la culture au microscope inversé et sur la lame, des qPCR ciblant l'ADN de *Rickettsia* devraient être réalisées à intervalles réguliers. Cela impliquerait de faire une extraction d'ADN sur le milieu de culture et sur quelques cellules resuspendues après avoir été scalpées. Ces qPCR de contrôle permettraient de vérifier si l'inoculum se perd au fil des jours post-infection ou si l'optimisation de la culture permet de cultiver des *Rickettsia*.

Phase de séquençage

Enfin, la technique de séquençage a été validée selon les points suivants. Le nombre de pores actifs était de 1 600 alors que Oxford Nanopore Technologies™ établit le seuil minimum de pores actifs à 800. La quantité de données générées, d'environ 160 Go, signifie que les pores ont continué à séquencer durant les 3 jours qu'a duré la lecture. Un pore qui n'est pas utilisé est un pore qui finit par perdre son activité et « meurt ». Pour rester en activité, il faut maximiser la quantité d'ADN à séquencer et pour cela, 2 facteurs sont à prendre en compte :

la concentration d'ADN et la longueur des brins. Dans cette étude, la concentration qui avait été dosée en amont était suffisante et la longueur des brins séquencés a été évalué avec l'indice N50. Le N50 moyen était supérieur à 12 000 paires de bases qui indique que l'ADN était non fragmenté. L'absence de *Rickettsia* dans les résultats de séquençage est conforme aux résultats de la qPCR pré-séquençage. Les taxons identifiés correspondent généralement à des bactéries pathogènes opportunistes, trouvées dans l'environnement. Leur origine serait donc les tiques, puisque le témoin de culture n'a pas été contaminé. Les témoins négatifs correspondent tous à ce qui était attendu, le témoin de culture avait une concentration d'ADN équivalente à un échantillon, qui s'est avéré très dégradé (N50 = 250) et son séquençage a permis d'identifier les taxons du genre *Homo*, génétiquement proche du genre dont sont issues les cellules VERO-E6.

Malgré tout, le séquençage pourrait être réalisé, en première intention directement sur le broyat, avec ou sans traitement à la saponine et à la DNase. Cette approche, qui relève de la métagénomique, permettrait éventuellement de visualiser quelles espèces de bactéries sont présentes. La limite qui a freiné l'utilisation de cette technique jusqu'alors est sa sensibilité. Le risque majeur est d'obtenir tellement de données, à partir des cellules de la tique et des autres espèces de bactéries sur-représentées dans la tique (i.e. *Coxiella*, *Francisella* chez *A. variegatum*), qu'elles masqueraient les *Rickettsia* (Aziz et al., 2026; Narasimhan and Fikrig, 2015).

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail était d'étudier la diversité des bactéries du genre *Rickettsia* présentes chez des tiques collectées à Madagascar. Il s'agissait de la suite directe d'une première étude exploratoire qui avait permis de détecter *Rickettsia* chez *Amblyomma variegatum* notamment. L'identification des espèces de cette bactérie aurait permis de donner un aperçu des risques auxquels sont exposés le bétail et les populations humaines face aux tiques dans deux zones distinctes de Madagascar. Un second objectif, plus technique, s'agissait de former et de faire monter en compétences l'Unité d'Entomologie Médicale de l'IPM. Les techniciens qui ont participé à ce travail ont acquis de multiples techniques grâce aux nombreuses étapes du protocole. Malgré l'absence de résultats attendus, l'exploration du protocole ouvre de multiples pistes d'optimisation. Le prochain volet de ce travail sera principalement dédié à l'amélioration de la culture cellulaire, qui est le point critique de cette étude.

Des études ont déjà été mené en Afrique continentale sur *R. africae* et sa séroprévalence chez l'Homme et le bétail, mais aussi sa présence chez *A. variegatum* principalement. Les résultats montrent de grands écarts entre la présence chez les tiques, très importante et la séroprévalence chez les hôtes, très faible (Barradas et al., 2021; Hsi et al., 2020; Maina et al.,

2014). En parallèle de cette présente étude, un travail pourrait donc être effectué sur la séroprévalence des populations humaines et des animaux domestiques à Madagascar mais face à plusieurs espèces de tiques potentiellement vectrices, en lien avec les futurs résultats du travail de ce rapport. Car une forte prévalence chez les tiques et la mise en évidence de certaines espèces de *Rickettsia* indiqueraient une forte pression infectieuse sur les hôtes. Mais à ce jour, les rickettsioses transmises par les tiques ne sont pas une problématique de santé publique à Madagascar. Alors plusieurs hypothèses peuvent être formulées : soit les cas humains sont sous-déclarés (absence de diagnostic et de connaissances, absence de symptômes). Soit la transmission n'est pas efficace de la tique vers l'hôte. Soit les hôtes ne sont pas sensibles aux rickettsioses. Une étude sérologique à large spectre recherchant les *Rickettsia* dans les populations humaines et les animaux domestiques permettrait de caractériser la prévalence des *Rickettsia* et d'éliminer quelques hypothèses quant à la transmission de la bactérie. Une dernière hypothèse serait que l'ADN de *Rickettsia* détecté dans les échantillons soit des insertions dans le génome des tiques, étant donné que la littérature référence des cas chez *Ixodes scapularis* et que *Rickettsia* est hautement prévalente chez les tiques *Amblyomma variegatum*.

Annexes

Annexe 1 : Liste des espèces de <i>Rickettsia</i>	43
Annexe 2 : Cycle de vie des tiques trixènes et monoxènes.....	44
Annexe 3 : Tiques sélectionnées pour l'étude et leurs caractéristiques.....	45
Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit NucleoSpin® Tissue de MACHERY-NAGEL®.....	47
Annexe 5 : Design de qPCR pour recherche d'ADN de <i>Rickettsia</i>	48
Annexe 6 : Protocole de préparation des colorants pour une coloration de Giménez.....	49
Annexe 7 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit QIAamp® DNA MiniKit de QIAGEN®.....	50
Annexe 8 : Protocole de séquençage MinION™.....	51
Annexe 9 : Pipeline d'exploitation des résultats de séquençage.....	53
Annexe 10 : Résultats des observations des cultures cellulaires à J+2, J+4 et J+6.....	55

Bibliographie

A. De Saint Sauveur, 2007. Le zébu dans le Sud-Ouest malgache, gardien des espaces pastoraux et des territoires ancestraux. IRD.

Abd El-Aziz, N.K., Gharib, A.A., Mohamed, E.A.A., Hussein, A.H., 2021. Real-time PCR versus MALDI-TOF MS and culture-based techniques for diagnosis of bloodstream and pyogenic infections in humans and animals. *J. Appl. Microbiol.* 130, 1630-1644. <https://doi.org/10.1111/jam.14862>

Abdad, M.Y., Abou Abdallah, R., Fournier, P.-E., Stenos, J., Vasoo, S., 2018. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 56, 10.1128/jcm.01728-17. <https://doi.org/10.1128/jcm.01728-17>

Abdel-Shafy, S., Allam, N.A.T., Mediannikov, O., Parola, P., Raoult, D., 2012. Molecular Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae Associated with Ixodid Ticks in Egypt. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12, 346-359. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0241>

Al-Soud, W.A., Rådström, P., 2001. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J. Clin. Microbiol.* 39, 485-493. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.2.485-493.2001>

Ammerman, N., Beier-Sexton, M., Azad, A., 2008. Laboratory Maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 3, Unit 3A.5. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc03a05s11>

Andriamandimby, S.F., Volasoa, M.H., Razafindraibe, N.P., Ranoaritiana, D.B., Razafindramparany, M.H., Rafisandratanantsoa, T., Nomenjanahary, L.A., Rakotondrabe, N., Andriamananjara, M.A., Guis, H., Lacoste, V., Dreyfus, A., 2023. Rabies surveillance in Madagascar from 2011 to 2021: can we reach the target? *Front. Vet. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1270532>

Andrianaivoarimanana, V., Savin, C., Birdsell, D.N., Vogler, A.J., Le Guern, A.-S., Rahajandraibe, S., Brémont, S., Rahelinirina, S., Sahl, J.W., Ramasindrazana, B., Rakotonanahary, R.J.L., Rakotomanana, F., Randremanana, R., Maheriniaina, V., Razafimbiana, V., Kwasiborski, A., Balière, C., Ratsitorahina, M., Baril, L., Keim, P., Caro, V., Rasolofo, V., Spiegel, A., Pizarro-Cerda, J., Wagner, D.M., Rajerison, M., 2024. Multiple Introductions of *Yersinia pestis* during Urban Pneumonic Plague Epidemic, Madagascar, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 30, 289-298. <https://doi.org/10.3201/eid3002.230759>

Aubert, S. (ed), Razafiarison, S. (ed), Bertrand, A. (ed), 2014. Déforestation et systèmes agraires à Madagascar : les dynamiques des tavy sur la côte orientale. CIRAD.

- Aziz, M.U., Tong, S.L.Y., Lontsi-Demano, M., Weyou, Z.N., Gbambie, A.C., Tchuinkam, T., Sparagano, O.A., Butaye, P., 2026. Genome-resolved microbiome and resistome profiling of cattle-associated *Amblyomma variegatum* and *Hyalomma truncatum* in Cameroon. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-9591884/v1>
- Baneth, G., 2014. Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *Int. J. Parasitol.*, ICOPA XIII 44, 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.011>
- Barradas, P.F., Mesquita, J.R., Ferreira, P., Gärtner, F., Carvalho, M., Inácio, E., Chivinda, E., Katimba, A., Amorim, I., 2021. Molecular identification and characterization of *Rickettsia* spp. and other tick-borne pathogens in cattle and their ticks from Huambo, Angola. *Ticks Tick-Borne Dis.* 12, 101583. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101583>
- Binetruy, F., Dupraz, M., Buysse, M., Duron, O., 2019. Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasit. Vectors* 12, 268. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3517-5>
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., Otranto, D., 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>
- Dupont, H.T., Brouqui, P., Faugere, B., Raoult, D., 1995. Prevalence of Antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, and *Rickettsia typhi* in Seven African Countries. *Clin. Infect. Dis.* 21, 1126–1133. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.5.1126>
- E. Fauroux, 1989. Le boeuf et le riz dans la vie économique et sociale sakalava de la vallée de la Maharivo, MRSTD&ORSTROM. ed. Paris.
- Ehlers, J., Ganzhorn, J.U., Silaghi, C., Krüger, A., Pothmann, D., Yedidya Ratovonamana, R., Veit, A., Keller, C., Poppert, S., 2016. Tick (*Amblyomma chabaudi*) infestation of endemic tortoises in southwest Madagascar and investigation of tick-borne pathogens. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.011>
- El Karkouri, K., Ghigo, E., Raoult, D., Fournier, P.-E., 2022. Genomic evolution and adaptation of arthropod-associated *Rickettsia*. *Sci. Rep.* 12, 3807. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07725-z>
- Faria, M., Conly, J., Surette, M., 2015. The development and application of a molecular community profiling strategy to identify polymicrobial bacterial DNA in the whole blood of septic patients. *BMC Microbiol.* 15, 215. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0557-7>
- Giménez, D.F., 1964. Staining *Rickettsiae* in Yolk-Sac Cultures. *Stain Technol.* 39, 135–140. <https://doi.org/10.3109/10520296409061219>

Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada Peña, A., Horak, I.G., Shao, R., Barker, S.C., 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1.1>

Hsi, T.-E., Hsiao, S.-W., Minahan, N.T., Yen, T.-Y., de Assunção Carvalho, A.V., Raoult, D., Fournier, P.-E., Tsai, K.-H., 2020. Seroepidemiological and molecular investigation of spotted fever group rickettsiae and *Coxiella burnetii* in Sao Tome Island: A One Health approach. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 36–43. <https://doi.org/10.1111/tbed.13191>

Huang, C., 2020. Extensively drug-resistant *Alcaligenes faecalis* infection. *BMC Infect. Dis.* 20, 833. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05557-8>

Karounos, M., Korla, P.K., Wilson, J., Clarke, S., Little, S., Qurollo, B., 2025. Isolation, culture, and genome analysis of *Rickettsia oklahomensis* sp. nov. (Rickettsiales: Rickettsiaceae) from *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick-Borne Dis.* 16, 102482. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2025.102482>

Keller, C., Krüger, A., Schwarz, N.G., Rakotozandrindrainy, R., Rakotondrainiarivelo, J.P., Razafindrabe, T., Derschum, H., Silaghi, C., Pothmann, D., Veit, A., Hogan, B., May, J., Girmann, M., Kramme, S., Fleischer, B., Poppert, S., 2016. High detection rate of *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* but low prevalence of anti-rickettsial antibodies in healthy pregnant women in Madagascar. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.08.005>

Kjemtrup, A.M., Padgett, K., Paddock, C.D., Messenger, S., Hacker, J.K., Feiszli, T., Melgar, M., Metzger, M.E., Hu, R., Kramer, V.L., 2022. A forty-year review of Rocky Mountain spotted fever cases in California shows clinical and epidemiologic changes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, e0010738. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010738>

Kurti, T.J., Felsheim, R.F., Burkhardt, N.Y., Oliver, J.D., Heu, C.C., Munderloh, U.G., 2015. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 965–970. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000047>

Lado, P., Qurollo, B., Williams, C., Junge, R., Klompen, H., 2018. The microbiome of *Haemaphysalis lemuris* (Acari: Ixodidae), a possible vector of pathogens of endangered lemur species in Madagascar. *Ticks Tick-Borne Dis.* 9, 1252–1260. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.003>

Loomis, E.C., 1961. Life Histories of Ticks under Laboratory Conditions (Acarina: Ixodidae and Argasidae). *J. Parasitol.* 47, 91–99. <https://doi.org/10.2307/3274989>

- Maina, A.N., Jiang, J., Omulo, S.A., Cutler, S.J., Ade, F., Ogola, E., Feikin, D.R., Njenga, M.K., Cleaveland, S., Mpoke, S., Ng'ang'a, Z., Breiman, R.F., Knobel, D.L., Richards, A.L., 2014. High Prevalence of *Rickettsia africae* Variants in *Amblyomma variegatum* Ticks from Domestic Mammals in Rural Western Kenya: Implications for Human Health. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14, 693–702. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1578>
- Matysiak, A., Dudko, P., Dudek, K., Dudek, M., Junkuszew, A., Tryjanowski, P., 2016. The occurrence of pathogens in *Rhipicephalus microplus* ticks from cattle in Madagascar. *Veterinárni Medicína* 61, 516–523. <https://doi.org/10.17221/59/2016-VETMED>
- McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., Berschneider, H.M., Rowland, A.C., Lawson, G.H.K., 1995. Entry of the bacterium ileal symbiont *intracellularis* into cultured enterocytes and its subsequent release. *Res. Vet. Sci.* 59, 255–260. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90013-6)
- Merhej, V., Angelakis, E., Socolovschi, C., Raoult, D., 2014. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infect. Genet. Evol.* 25, 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.014>
- Morand, S., Krasnov, B.R., Littlewood, D.T.J., 2015. *Parasite Diversity and Diversification*. Cambridge University Press.
- Narasimhan, S., Fikrig, E., 2015. Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol.* 31, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010>
- Nations, U., 2025. 2025 Global Multidimensional Poverty Index (MPI), Human Development Reports. United Nations.
- Ndip, L.M., Fokam, E.B., Bouyer, D.H., Ndip, R.N., Titanji, V.P.K., Walker, D.H., McBride, J.W., 2004. DETECTION OF *RICKETTSIA AFRICAE* IN PATIENTS AND TICKS ALONG THE COASTAL REGION OF CAMEROON. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 363–366. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.363>
- Paddock, C.D., Fournier, P.-E., Sumner, J.W., Goddard, J., Elshenawy, Y., Metcalfe, M.G., Loftis, A.D., Varela-Stokes, A., 2010. Isolation of *Rickettsia parkeri* and Identification of a Novel Spotted Fever Group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast Ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2689–2696. <https://doi.org/10.1128/AEM.02737-09>
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.-E., Raoult, D., 2013. Update on Tick-Borne *Rickettsioses* around the World: a Geographic Approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 657–702. <https://doi.org/10.1128/cmr.00032-13>

- Patterson, K.D., 1993. Typhus and its control in Russia, 1870–1940. *Med. Hist.* 37, 361–381. <https://doi.org/10.1017/S0025727300058725>
- Perlman, S.J., Hunter, M.S., Zchori-Fein, E., 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 2097–2106. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3541>
- Pothmann, D., Poppert, S., Rakotozandrindrainy, R., Hogan, B., Mastropaolo, M., Thiel, C., Silaghi, C., 2016. Prevalence and genetic characterization of *Anaplasma marginale* in zebu cattle (*Bos indicus*) and their ticks (*Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*) from Madagascar. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 1116–1123. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.013>
- Rabozzi, G., Bonizzi, L., Crespi, E., Somaruga, C., Sokooti, M., Tabibi, R., Vellere, F., Brambilla, G., Colosio, C., 2012. Emerging Zoonoses: the “One Health Approach.” *Saf. Health Work* 3, 77–83. <https://doi.org/10.5491/SHAW.2012.3.1.77>
- Radulovic, S., Feng, H., Morovic, M., Djelalija, B., Popov, V., Crocquet-Valdes, P., Walker, D.H., 1996. Isolation of *Rickettsia akari* from a Patient in a Region Where Mediterranean Spotted Fever Is Endemic. *Clin. Infect. Dis.* 22, 216–220.
- Rahajarison, P., 2015. Les tiques (Ixodoidea) de Madagascar et leur role vecteur. UNIVERSITE D'ANTANANARIVO, Antananarivo.
- Raharinosy, V., Ramiarimanana, M.B., Andriamandimby, S.F., Razanadrakoto, I.I., Razanajatovo, I., Razanajatovo, N., Razafindratsimandresy, R., Dia, N., Faye, M., Zapelloni, F., Maharo, A.A., Heraud, J.-M., 2026. Emergence of human monkeypox virus Clade Ib in Madagascar: first genomic evidence of introduction and local transmission. *Viol. J.* 23, 159. <https://doi.org/10.1186/s12985-026-03165-7>
- Rolain, J.M., Maurin, M., Vestris, G., Raoult, D., 1998. In Vitro Susceptibilities of 27 *Rickettsiae* to 13 Antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1537–1541. <https://doi.org/10.1128/aac.42.7.1537>
- Sánchez, M.B., 2015. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00658>
- Schoch, C.L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hottton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S., Karsch-Mizrachi, I., 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

- Seidi, S., Omid, A.H., Esmaeili, S., 2024. Distribution of different *Rickettsia* species in countries of the WHO Eastern Mediterranean (WHO-EMRO) region: An overview. *Travel Med. Infect. Dis.* 58, 102695. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2024.102695>
- Socolovschi, C., Mediannikov, O., Sokhna, C., Tall, A., Diatta, G., Bassene, H., Trape, J.-F., Raoult, D., 2010. *Rickettsia felis* –associated Unruptive Fever, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1140–1142. <https://doi.org/10.3201/eid1607.100070>
- Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), 2014. *Biology of ticks*, 2nd ed. ed. Oxford University Press, New York.
- Stachurski, F., Tortosa, P., Rahajarison, P., Jacquet, S., Yssouf, A., Huber, K., 2013. New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands. *Vet. Res.* 44, 79. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-79>
- Steiner, F.E., Pinger, R.R., Vann, C.N., Grindle, N., Civitello, D., Clay, K., Fuqua, C., 2008. Infection and Co-infection Rates of *Anaplasma phagocytophilum* Variants, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, and the *Rickettsial* Endosymbiont in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from Sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin. *J. Med. Entomol.* 45, 289–297. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.2.289>
- Tantely, L.M., Guis, H., Raharinirina, M.R., Ambinintsoa, F.M., Miharisoa, S., Andriamiarimanana, M.R., Rakotoarivony, I., Andrianandrasana, M.F., Nepomichene, T.N., Razafiarimanga, Z.N., Ayala, D., Garros, C., Cêtre-Sossah, C., Héraud, J.-M., Tran, A., Walker, T., Girod, R., 2026. Determining factors of the blood feeding behaviour of mosquito vectors of West Nile and Rift Valley fever viruses in Madagascar. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-026-46448-3>
- Tello-Martin, R., Dzul-Rosado, K., Zavala-Castro, J., Lugo-Caballero, C., 2018. Approaches for the successful isolation and cell culture of American *Rickettsia* species. *J. Vector Borne Dis.* 55, 258. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.256560>
- Uilenberg, G., Hoogstraal, H., Keln, J.M., 1979. LES TIQUES (IXODOIDEA) DE MADAGASCAR ET LEUR' ROLE VECTEUR.
- Vijayakumar, P., Singaravadivelan, A., Mishra, A., Jagadeesan, K., Bakayaraj, S., Suresh, R., Sivakumar, T., 2022. Whole-genome comparative analysis reveals genetic mechanisms of disease resistance and heat tolerance of tropical *Bos indicus* cattle breeds. *Genome* 65, 241–254. <https://doi.org/10.1139/gen-2021-0030>
- Wijnveld, M., Schötta, A.-M., Pintér, A., Stockinger, H., Stanek, G., 2016. Novel *Rickettsia raoultii* strain isolated and propagated from Austrian *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasit. Vectors* 9, 567. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1858-x>

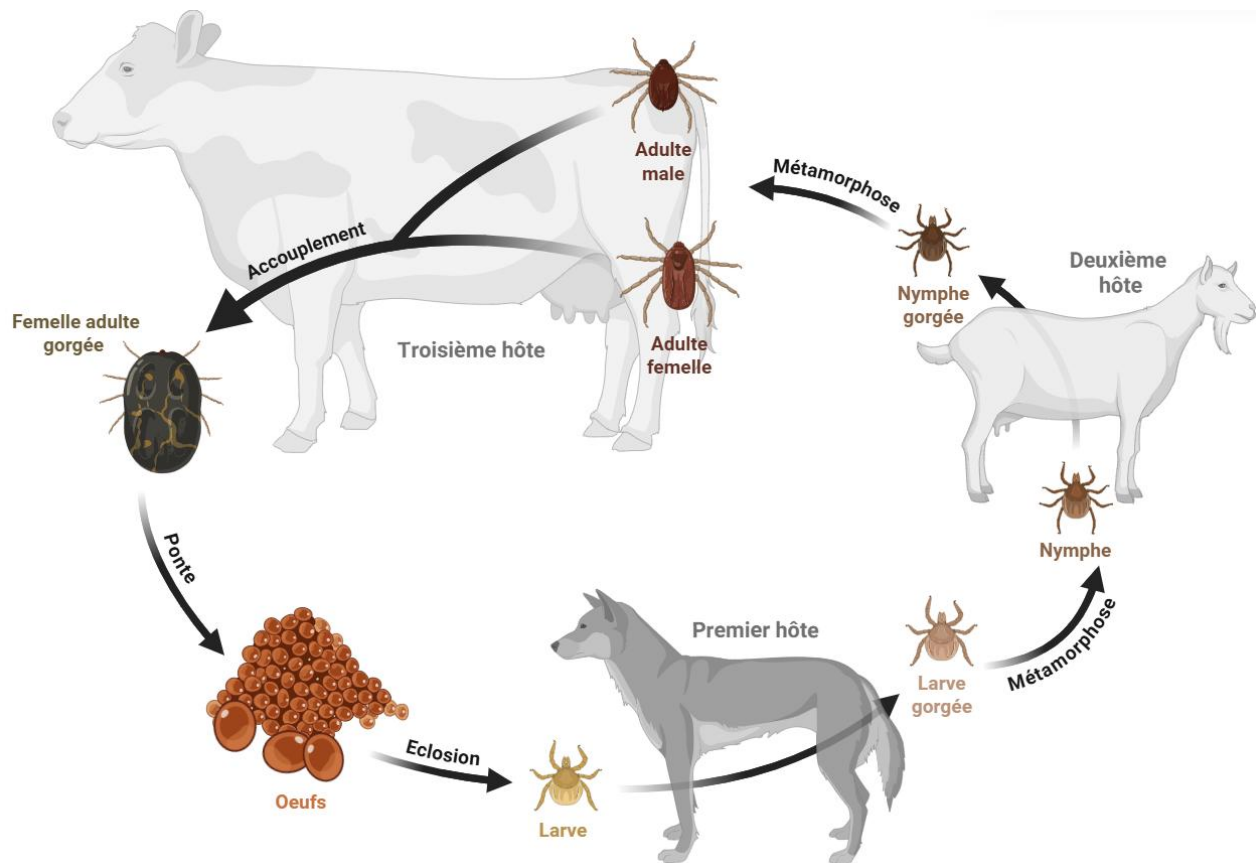
World Bank Group, 2024. Madagascar Country Climate and Development Report. Washington, DC: World Bank. <https://doi.org/10.1596/42263>

Zhang, P., Kaushik, A.M., Mach, K.E., Hsieh, K., Liao, J.C., Wang, T.-H., 2021. Facile syringe filter-enabled bacteria separation, enrichment, and buffer exchange for clinical isolation-free digital detection and characterization of bacterial pathogens in urine. *Analyst* 146, 2475–2483. <https://doi.org/10.1039/D1AN00039J>

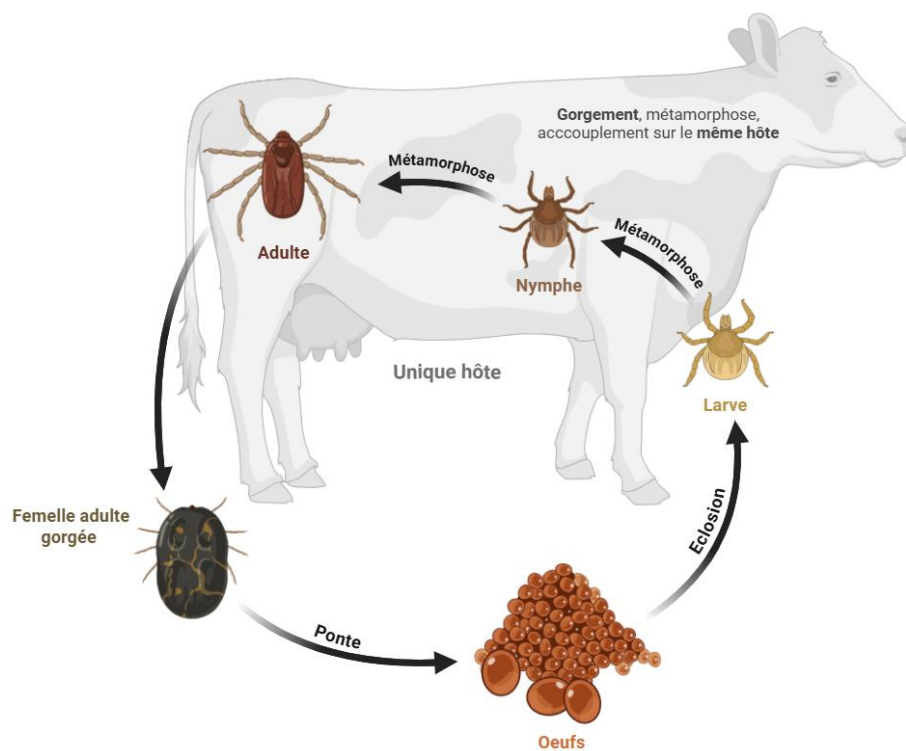
Znazen, A., Sellami, H., Elleuch, E., Hattab, Z., Sassi, L.B., Khrouf, F., Dammak, H., Letaief, A., Jemaa, M.B., Hammami, A., 2015. Comparison of Two Quantitative Real Time PCR Assays for *Rickettsia* Detection in Patients from Tunisia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003487. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003487>

Annexe 1 : Liste des espèces de Rickettsia

Groupe	Espèce	Pathogénicité
Groupe des Typhus - TG	<i>Rickettsia typhi</i>	Typhus murin
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Typhus épidémique
Groupe des Fièvres Boutonneuses - SFG	<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	Rickettsiose à fièvre boutonneuse
	<i>Rickettsia africae</i>	Fièvre africaine par morsure de tique
	<i>Rickettsia amblyommatis</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia asiatica</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia buchneri</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	Fièvre boutonneuse d'Astrakhan
	<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>	Fièvre boutonneuse israélienne
	<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>indica</i>	Typhus de la tique indien
	<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	Fièvre boutonneuse méditerranéenne
	<i>Rickettsia fournieri</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia gravesii</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	Rickettsiose de l'Extrême-Orient
	<i>Rickettsia honei</i>	Fièvre boutonneuse des Îles Flinders
	<i>Rickettsia japonica</i>	Fièvre boutonneuse japonaise
	<i>Rickettsia massiliae</i>	Fièvre boutonneuse méditerranéenne
	<i>Rickettsia monacensis</i>	Rickettsiose à fièvre boutonneuse
	<i>Rickettsia montanensis</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia parkeri</i>	Pathogène
	<i>Rickettsia peacockii</i>	Non-pathogène
	<i>Rickettsia rhipicephali</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Fièvre boutonneuse des Montagnes Rocheuses
	<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	Typhus à tiques de Sibérie
	<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i>	Rickettsiose (associée à une lymphangite)
	<i>Rickettsia slovacae</i>	Rickettsiose (associée à une lymphangite)
	<i>Rickettsia tamurae</i>	Rickettsiose à fièvre boutonneuse
Groupe Transitionnel - TRG	<i>Rickettsia australis</i>	Typhus de la tique du Queensland
	<i>Rickettsia akari</i>	Rickettsiose vésiculeuse (pox)
	<i>Rickettsia asembonensis</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia hoogstraalii</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia felis</i>	Rickettsiose à fièvre boutonneuse
	<i>Rickettsia tillamookensis</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia helvetica</i>	Pathogène
	<i>Rickettsia bellii</i>	Non-décrite
	<i>Rickettsia canadensis</i>	Non-décrite



Cycle de vie d'une tique à 3 hôtes ou trixène (adaptation Arthur DEYGAS, d'après Sonenshine and Roe, 2014)



Cycle de vie d'une tique à un seul hôte ou monoxène (adaptation Arthur DEYGAS, d'après Sonenshine and Roe, 2014)

Annexe 3 : Tiques sélectionnées pour l'étude et leurs caractéristiques

Date de collecte	Région	District	Commune	Fokontany	Alt.	Espèce	Espèce hôte	ID Tique
19/05/25	Menabe	Morondava	Morondava	Ambalanomby	NA	R. sanguineus	Canis sp.	CC1A ; CC1B ; CC1C ; CC1D
19/05/25	Menabe	Morondava	Morondava	Ambalanomby	NA	R. sanguineus	Canis sp.	CC2A ; CC2B ; CC2C ; CC2D ; CC2E ; CC2F
20/05/25	Menabe	Morondava	Bemanonga	Bemanonga Miraisoa	NA	R. sanguineus	Canis sp.	CC3
22/05/25	Menabe	Belo sur Tsiribihina	Belo sur Tsiribihina	Atsinanantsena	NA	R. sanguineus	Canis sp.	CC4A ; CC4B
22/05/25	Menabe	Belo sur Tsiribihina	Belo sur Tsiribihina	Avaradrova	NA	R. sanguineus	Canis sp.	CC5
22/05/25	Menabe	Belo sur Tsiribihina	Belo sur Tsiribihina	Avaradrova	NA	R. sanguineus	Canis sp.	CC6
25/05/25	Menabe	Belo sur Tsiribihina	Belo sur Tsiribihina	Andrefantsena	NA	R. sanguineus	Canis sp.	CC7
23/03/24	Vatovavy	Ifanadiana	Ifanadiana	Ambodirafia	507	R. microplus	B. tarus indicus	CC9
26/03/24	Vatovavy	Ifanadiana	Ifanadiana	Kelilalina	616	R. microplus	B. tarus indicus	CC10
12/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Mahatsinjo	19	A. variegatum	B. tarus indicus	CC11A ; CC11B
12/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Mahatsinjo	23	A. variegatum	B. tarus indicus	CC12
13/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Marofinaritra	6	A. variegatum	B. tarus indicus	CC13
13/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Marofinaritra	6	A. variegatum	B. tarus indicus	CC14A ; CC14B ; CC14C
14/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Antsenavolo	180	A. variegatum	B. tarus indicus	CC15A ; CC15B
14/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Antsenavolo	188	A. variegatum	B. tarus indicus	CC16A ; CC16B
15/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Sandrohy	112	A. variegatum	B. tarus indicus	CC17
16/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Ambalamainty	180	A. variegatum	B. tarus indicus	CC18A ; CC18B
17/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Ambalamisy	58	A. variegatum	B. tarus indicus	CC19
17/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Kianjavato	66	A. variegatum	B. tarus indicus	CC20A ; CC20B ; CC20C
17/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Kianjavato	65	A. variegatum	B. tarus indicus	CC21
17/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Kianjavato	65	A. variegatum	B. tarus indicus	CC22A ; CC22B ; CC22C
18/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Manakana I	37	R. microplus	B. tarus indicus	CC23
18/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Manakana I	108	A. variegatum	B. tarus indicus	CC24A ; CC24B
18/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Tsiatosika	13	A. variegatum	B. tarus indicus	CC25
18/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Marokarima	56	A. variegatum	B. tarus indicus	CC26
18/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Marokarima	56	A. variegatum	B. tarus indicus	CC27A ; CC27B
19/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Marofinaritra	14	A. variegatum	B. tarus indicus	CC28A ; CC28B ; CC28C
19/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Marofinaritra	14	A. variegatum	B. tarus indicus	CC29A ; CC29B ; CC29C
19/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Marofinaritra	14	A. variegatum	B. tarus indicus	CC30A ; CC30B ; CC30C ; CC30D ; CC30E

20/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Ambohimiarina II	25	R. microplus	B. tarus indicus	CC31
20/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Ambohimiarina II	25	R. microplus	B. tarus indicus	CC32
20/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Ambohimiarina II	25	A. variegatum	B. tarus indicus	CC33
21/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Tsarahafatra	71	A. variegatum	B. tarus indicus	CC34
21/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Tsarahafatra	71	A. variegatum	B. tarus indicus	CC35A ; CC35B ; CC35C ; CC35D ; CC35E ; CC35F ; CC35G ; CC35H CC35I ; CC35J
21/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Tsarahafatra	71	A. variegatum	B. tarus indicus	CC36A ; CC36B ; CC36C
21/03/24	Vatovavy	Mananjary	Mananjary	Tsaravary	22	A. variegatum	B. tarus indicus	CC38
11/09/24	Menabe	Morondava	Morondava	Antsakoameloky	12	R. microplus	Capra sp.	CC39
13/09/24	Menabe	Belo sur Tsiribihina	Belo sur Tsiribihina	Beraketa	12	R. microplus	Capra sp.	CC40

Partie en LNSB3 :

1. Décongeler le broyat destiné à l'extraction d'ADN. Son volume doit être de 100 µL.
2. Mettre 180 µl de **tampon T1** dans chaque échantillon (Le tampon de lyse T1 doit être limpide, s'il y a de la cristallisation chauffer le flacon à 56°C).
3. Ajouter 25 µl de **protéinase K** dans chaque échantillon, puis vortexer et incuber 3h à 56°C.
4. Ajouter 200 µl de **tampon B3**, vortexer vigoureusement.
5. Incuber 10 min à 70°C, puis vortexer brièvement.

Partie en LNSB2 :

1. Ajouter 200 µl **d'éthanol 96-100%** et vortexer vigoureusement. Centrifuger quelques secondes avec une centrifugeuse de paillasse pour culotter les gouttes qui seraient sur les parois ou dans le bouchon.
2. Transférer le lysat dans la **colonne verte** et centrifuger 1 min à 11 000 g (augmenter le temps de centrifugation si des débris colmatent la membrane). Jeter l'éluat et mettre la colonne dans un nouveau tube de collection.
3. Ajouter 500 µl de **tampon BW** et centrifuger pendant 1 min à 11 000 g. Jeter l'éluat et mettre la colonne dans un nouveau tube de collection.
4. Ajouter 600 µl de **tampon B5** et centrifuger 1 min à 11 000 g. Eliminer l'éluat.
5. Centrifuger la colonne à sec 1 min à 11 000 g, puis mettre la colonne dans un micro-tube 1,5ml annoté.
6. Ajouter 30 µl de **tampon d'élution BE** chaud à 70°C. Bien le déposer au centre de la membrane, sans la toucher. Incuber 3 min à T°C ambiante et centrifuger 1 min à 11 000 g.
7. Ajouter 20 µl de **tampon d'élution BE** chaud comme précédemment. Incuber 3 min à T°C ambiante et centrifuger 1 min à 11 000 g.
8. Jeter la colonne et conserver ADN à -20°C.

Kit utilisé pour le design de la qPCR : **Kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR** (Thermo Fisher Scientific)

Amorces utilisées :

Amorce	Séquence
RKND03 F	5' – GTGAATGAAAGATTACACTATT – 3'
RKND03 R	5' – GTATCTTAGCAATCATTCTAATAGC – 3'
RKND03 Probe	6 – FAMCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCTAMRA

D'après Socolovschi et al., 2010

Conception du mix de qPCR, pour un seul échantillon :

Réactifs	Concentration Initiale (UA)	Concentration Finale (UA)	Volume (µL) /puits
H ₂ O			4,4
RKND03 F	10	0,60	1,2
RKND03 R	10	0,60	1,2
RKND03 Probe	10	0,20	0,40
AgPath 2X One-Step RT-PCR	2	1	10
RT PCR enzyme	25	1	0,8
Vol. du mix			18
ADN (éluat)			2
Vol. final/puit			20

Pour une seule analyse par qPCR, prévoir les témoins suivants :

- Témoin négatif – MIX : Absence d'ADN dans le mix
- Témoin positif – MIX : Ajout d'ADN de l'échantillon de collection AFR27, AFR26 ou 5W45
- Témoin négatif – EXTRACTION : Ajout de l'éluat du témoin négatif de l'extraction d'ADN

Programme de la qPCR :

1. Dénaturation initiale : 95°C – 10 min
2. Dénaturation : 95°C – 20 sec
3. Hybridation et élongation : 60°C – 40 sec

Cycles : 45 cycles de l'étape 2. et 3.

1. Phosphate de sodium 0,1M – Volume final = 1000 mL

- Préparer la solution en condition stérile pour limiter les poussières.
- Dans une fiole de 1000 mL, peser 10,93 g de phosphate de sodium dibasique ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) et 2,76 g. de phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4).
- Compléter la fiole avec de l'eau distillée stérile.
- Homogénéiser et stocker à température ambiante.

2. Carbol-Fuchsine 1% - Volume final = 500 mL

- Dans une fiole de 500 mL, peser 5 g de fuchsine. Prêter attention à la fuchsine qui est une poudre très volatile, qui se colore et se nettoie à l'alcool.
- Ajouter 50 mL d'éthanol absolu et 27,5 mL de phénol aqueux.
- Agiter avec un barreau aimanté et compléter la fiole avec de l'eau distillée stérile.
- Continuer d'agiter jusqu'à dissolution complète de la fuchsine.
- Stocker à l'abri de la lumière et à 4°C.

3. Oxalate de vert de Malachite 0,8% - Volume final = 100 mL

- Dans une fiole de 100 mL, peser 0,8 g d'oxalate de vert de Malachite.
- Compléter la fiole avec de l'eau distillée.
- Agiter avec un barreau aimanté jusqu'à dissolution complète.
- Stocker à température ambiante.

4. Coloration Carbol-Fuchsine – Volume final = 42 mL

- Dans un Falcon 50 mL, déposer 30 mL de phosphate de sodium 0,1M et 12 mL de carbol-fuchsine 1%.
- Bien homogénéiser au vortex.
- Filtrer la solution avec une seringue et un filtre 0,45 μm , pour éliminer les éventuels dépôts.
- La solution est prête pour la coloration, elle peut être conservée 48h.

Protocole en LNSB3 :

1. Centrifuger la culture cellulaire et retirer le surnageant.
2. Resuspendre le culot dans 100 µL du **tampon ATL**.
3. Ajouter 10 µL de **protéinase K** et 100 µL de **tampon AL**, vortexer fortement 15 sec et incuber 10 min à 56°C. (Idéalement, agiter les échantillons pendant l'incubation).
4. Centrifuger brièvement pour retirer les gouttes des parois du tube.
5. Ajouter 50 µL d'**éthanol 96-100%**, vortexer fortement 15 sec et incuber 3 min à température ambiante.
6. Centrifuger brièvement pour retirer les gouttes des parois du tube.
7. Transférer le lysat dans la **colonne**, montée sur un tube de collecte, sans toucher les parois et centrifuger 1 min à 6 000 g.
8. Jeter le tube de collecte et son contenu, et remplacer un tube de collecte neuf sous la colonne.
9. Déposer 500 µL de **tampon AW1** dans la colonne sans toucher les parois et centrifuger 1 min à 6 000 g.
10. Jeter le tube de collecte et son contenu, et remplacer un tube de collecte neuf sous la colonne.
11. Déposer 500 µL de **tampon AW2** dans la colonne sans toucher les parois et centrifuger 1 min à 6 000 g.
12. Jeter le tube de collecte et son contenu, et remplacer un tube de collecte neuf sous la colonne.
13. Centrifuger à 20 000 g (vitesse maximale) pendant 3 min pour sécher la membrane.
14. Jeter le tube de collecte et son contenu, et remplacer un tube de collecte neuf sous la colonne.
15. Déposer 55 µL du **tampon d'élution AE**, incuber 1 min à température ambiante et centrifuger à 20 000 g (vitesse maximale) pendant 2 à 3 min.
16. Renouveler une seconde fois avec 25 µL du **tampon d'élution AE**.
17. Sortir les échantillons du LNSB3 et congeler à -20°C.

➔ **Préparation de la librairie – Kit Rapid Barcoding Sequencing Kit 96 V14 de Oxford Nanopore Technologies™**

1. Sortir les réactifs suivants du congélateur à -20°C et les placer sur glace : RA, EB, ADB, Barcodes (plaque de 96 puits)
2. Sélectionner les échantillons positifs en qPCR et qui ont une concentration en ADN supérieure à 15 ng/μL.
3. Diluer les échantillons dans de l'eau DNA-Free pour avoir 200 ng/15 μL par puit, en 4 réplicats. Donc 800 ng d'ADN dans un tube.
4. Dans un puit de plaque 96, déposer 15 μL de la dilution d'ADN et 2 μL du **barcode**. Répliquer 3 fois supplémentaires pour le même échantillon avec 4 barcodes différents.
5. Prévoir des témoins négatifs, avec un volume d'eau DNA-Free de 15 μL. En prévoir assez pour compléter la plaque de 96 puits.
6. Homogénéiser avec une pipette en aspirant-refoulant.
7. Incuber la plaque dans un thermocycleur 2 min à 30°C puis 2 min à 80°C et laisser refroidir à 4°C.
8. Centrifuger la plaque et pooler tous les échantillons dans un seul tube de 2mL. Si la plaque était pleine, le volume final doit être d'environ 1 600 μL.
9. Déposer 2 fois 552 μL dans 2 nouveaux tubes. Conserver le volume restant et un des 2 tubes à 4°C.
10. Diviser le tube restant en 2 nouveaux tubes de 276 μL.
11. Vortexer les beads (**Beads NEB Next Sample Purification Beads de NEWENGLAND BIOLABS®**) et déposer 276 μL de ces beads dans chacun des tubes.
12. Incuber 10 min à TA, en agitant manuellement par retournement successif.
13. Centrifuger brièvement et poser les tubes sur un portoir magnétique, jusqu'à l'étape 16. Attendre que le surnageant devienne limpide.
14. Retirer délicatement le surnageant.
15. Déposer 1 mL **d'éthanol à 80%**, dilué dans l'eau DNA-Free.
16. Retirer l'éthanol sans toucher les billes et répéter le lavage à l'éthanol une seconde fois.
17. Centrifuger brièvement et reposer les tubes sur le portoir magnétique. Pipeter les résidus d'éthanol après culottage et laisser sécher pendant 30 sec à l'air libre.
18. En dehors du portoir, resuspendre les beads dans 20 μL de **EB** et incuber 10 min à TA.
19. Culotter les tubes sur le portoir magnétique. Lorsque l'éluat est limpide, le retirer et le déposer dans un nouveau tube, en poolant les 2 tubes.
20. Contrôler la présence d'ADN au Qubit™.
21. Diluer 1,5 μL de **RA** dans 3,5 μL de **ADB** dans un nouveau tube.
22. Transférer 33 μL de l'éluat poolé dans un nouveau tube et ajouter 3 μL du **RA dilué**. Homogénéiser à la pipette.
23. Incuber 5 min à TA et ajouter 28 μL de **EB**.

→ **Séquençage – MinION™ Flow-Cell R10 Version de Oxford Nanopore Technologies™**

1. Sortir les réactifs suivants du congélateur à -20°C et les placer sur glace : *FCT*, *FCF*, *BSA 50mg/mL*, *SB*, *LB*
2. Dans un tube, préparer la **librairie** pour le séquençage avec 37,5 µL de **SB**, 25,5 µL de **LB** et 12 µL de la **librairie** préparée précédemment.
3. Dans un tube, préparer le "**Flow-Cell priming mix**", avec 1 170 µL de **FCF**, 30 µL de **FCT** et 5 µL de **BSA** et bien homogénéiser.
4. Ouvrir la Flow-Cell et l'insérer dans le MinION pour connaître le nombre de pores disponibles. Si le nombre de pores est supérieur à 600, la Flow-Cell peut être utilisée.
5. Récupérer la Flow-Cell et ouvrir le port de priming en faisant pivoter le capot du port.
6. Poser une pipette de 1 000 µL, réglée sur 200 µL, sur le port et aspirer 20 à 30 µL de liquide en faisant tourner la molette de réglage du volume.
7. Déposer 800 µL de "**Flow-Cell priming mix**" dans le port de priming en faisant perler une goutte sur le tip de la pipette, puis en poussant le liquide déjà présent dans la Flow-Cell.
8. Soulever le capot Spot-On.
9. Déposer 200 µL supplémentaires de "**Flow-Cell priming mix**" dans le port de priming comme précédemment.
10. Resuspendre la librairie préparée pour le séquençage.
11. Déposer 75 µL de la **librairie** dans le port Spot-On, goutte par goutte. Attendre l'aspiration de la première goutte pour déposer la seconde.
12. Refermer le capot Spot-On et repivoter le capot du port de priming dans sa position initiale.
13. Placer la Flow-Cell dans le MinION™.
14. Démarrer le séquençage en "Super Accurate" avec une durée limite de 72 h.

➔ Ce script est utilisé sur un ordinateur équipé du logiciel dorado et Kraken2. Il est recommandé de le faire tourner sous Linux, également équipé de Python.

```
dir="/media/astre/DATA1/CIRAD/Arthur/"
setwd(dir)
reticulate::use_python("~/miniconda3/bin/python3")
dat=read.xlsx("data.xlsx")
un=unique(dat$ID)

dir.create("temp")
dir.create("combined")

for(x in 1:length(un)){

  ## Copier tous les fichiers compressés correspondant à chaque barcode dans un fichier par
  ## échantillon
  to a temporary folder
  ls=list.files(path="fastq_pass",full.names = T,recursive = T,pattern =
  paste("pass_",dat$barcode[dat$ID %in% un[x]],collapse = "|",sep=""))
  for(y in 1:length(ls)){
    file.copy(from = ls[y], to=paste0("temp/",basename(ls[y])))
  }

  ## Décompresser tous les fichiers compressés
  system("gunzip temp/*.gz")

  ## Combiner tous les fichiers fastq décompressés dans un seul fichier par échantillon
  system("cat temp/*.fastq > temp/combined.fastq")

  ## Eliminer les fichiers originaux
  for(y in 1:length(ls)){
    system(paste0("rm temp/",gsub(".gz","",basename(ls[y]))))
  }

  ## Utiliser dorado pour vérifier que les barcodes et adaptateurs ont été retiré
  trim on combined sequences
  system("dorado trim --emit-fastq -t 20 -k SQK-RBK114-96
  temp/combined.fastq > temp/trimmed.fastq")
```

```

## Copier les séquences combinées dans un nouveau dossier
file.copy(from="temp/trimmed.fastq",to=paste0("combined/",un[x],".fastq"))

## Supprimer les fichiers temporaires
system("rm temp/trimmed.fastq")
system("rm temp/combined.fastq")
}

## Extraire les statistiques des données brutes avec "seqkit"
system("seqkit stats --all -T combined/*.fastq > combined/stats.tab")

## Classification taxonomique avec kraken2
dir.create("kraken")
krtab=lapply(1:length(un),function(x) {
  if(!file.exists(paste0("kraken/",un[x],"_output"))){
    system(paste0("~/bioinfo/kraken2-2.17.1/kraken2 --db
~/bioinfo/kraken2-2.17.1/db/k2_standard_08_GB_20251015/ --output
kraken/",un[x],"_output --report kraken/", un[x], "_report.tab --use-names
combined/",un[x],".fastq"))
  }
  tmp=read.table(paste0("kraken/",un[x],"_report.tab"),sep="\t")
  colnames(tmp)=c("percentage","reads_group","reads_taxon","level","taxID","tax_name")
  return(tmp)
})
for(x in 1:length(krtab)){
  krtab[[x]]$sample=paste0("sample_",x)
}
kt=do.call(rbind,krtab)

pavian::runApp(port=5000)

```

Annexe 10 : Résultats des observations des cultures cellulaires à J+2, J+4 et J+6

N°	J+2		J+4		J+6	
	Microscope	Lame	Microscope	Lame	Microscope	Lame
1	TC + Rick. ?	TB	TC	TB Débris C	TC décollé	TB très clair
2	TC + Rick. ?	Débris C Abs Bact.	TC	TB	TC	TB
3	TC	C + Rick. In/out C	TC	Rick. dans le milieu ?	TC	Rick. ?
4	TC	TC dense	TC	TC	TC + Rick. ?	TC + Artefacts = Rick. ?
5	TC	TC	TC ≈ 100%	TC	TC abimé	TC
6	TC + Bactéries	Débris C + Rick. ?	TC	TB	TC décollé	TB clair
7	<i>Non-décrit</i>	TB	Amas C	TB + Rick. ?	Amas C	TB + Rick. ?
8	TC maj. infecté	TC	TC	C + Bact. Rick. ?	Abs. TC Artefacts ronds	Grandes bact. en tapis
9	TC ↓ Conflu. Bactéries	Abs. C + Rick. ?	TC	TB	TC Amas C	B extracell+ Rick.
10	<i>Non-décrit</i>	Amas C TB clair	TC	TB	TC ≈ 70%	TB
11	Peu de C	Qq débris C + Rick. ?	Qq C	TB	TC infecté	TB
12	Abs. C	TB très clair	Abs. TC	TB	Abs. TC	TB
13	TC	TC	TC	TC	TC	TC + Rick. ?
14	TC	C + Rick. ?	TC	C + Rick. ?	TC	<i>Non-identifiable</i>
15	Peu de C	TB	TC	TB	TC ≈ 50%	TB
16	Abs. C	TB = Rick. ?	Abs. TC	TB	Abs. TC	TB
17	TC + Bactéries	TB = Gros bacilles	Amas C	TB	Amas C	TB rose = Rick. ?
18	TC ≈ 20% Bactéries	TB très clair	TC	TB + Rick. ?	TC	TB + Rick. ?
T-	TC OK	TC OK	TC OK	TC OK	TC OK	TC OK

- **T** : Tapis
- **B/Bact.** : Bactérien/Bactérie
- **C** : Cellule/Cellulaire
- **Rick.** : Bactéries *Rickettsia*-shaped
- **Abs.** : Absence
- **Qq** : Quelques
- **In/out** : dans et hors des cellules