

Traduction Française de

Experimental Implantation Trials of *Xenopsylla cunicularis* Smit (Siphonaptera: Pulicidae) in Northern France with the Objective to Use it as Vaccine Vector.

International Journal of Insect Science (2013), 5:21-34.

Essais d'implantation expérimentale de *Xenopsylla cunicularis* Smit (Siphonaptera: Pulicidae) dans le nord de la France, dans le but de l'utiliser comme vecteur de vaccin

Anne Darries-Vallier, Aurélien Ausset, Pierre Besrest

BIO ESPACE, Laboratoire d'Entomologie, Mas des 4 Pilas,
Route de Bel-Air, 34570 Murviel-les-Montpellier, France.
Auteur pour la correspondance: ADV - bioespace.labo@gmail.com

Résumé

Pour combattre les maladies de la faune sauvage, nous proposons d'utiliser *Xenopsylla cunicularis* Smit (Siphonaptera: Pulicidae), une puce spécifique du lapin de garenne *Oryctolagus cuniculus* L. (Lagomorpha), comme vecteur de vaccin afin de protéger les populations sauvages de lapins de garenne contre des maladies mortelles. *Oryctolagus cuniculus* est présent dans toute l'Europe, mais *X. cunicularis* n'occupe naturellement que les zones arides du Maroc, d'Espagne et le sud-ouest de la France, soulevant la question de son utilisation à grande échelle et du risque de prolifération incontrôlée à l'extérieur de son aire de répartition. Pour évaluer ce risque, des puces ont été lâchées dans 5 parcs expérimentaux contenant des lapins (4 dans le nord de la France et 1 parc témoin dans le sud-ouest). Un peu plus d'un an après, les puces (adultes et stades immatures) ont été récupérées sur les lapins et dans les garennes. Le climat a été relevé tout au long des expérimentations et la granulométrie du sol des garennes a été analysée. Nos résultats montrent que *X. cunicularis* ne peut pas persister dans le nord de la France car les températures trop basses réduisent le développement des puces et les précipitations élevées réparties sur toute l'année gardent le sol humide, rendant le sol asphyxique pour les puces, même en sol sableux. Ces essais d'implantation suggèrent qu'une prolifération incontrôlée et l'installation permanente de ces puces sont improbables dans le nord de la France.

Mots-clé:

Puce, Pulicidae, Xenopsylla cunicularis, lapin, Oryctolagus cuniculus, aire de répartition, myxomatose, maladie hémorragique du lapin, VHD, vaccination, insecte vecteur de vaccin, introduction, lâchers, lutte biologique, maladies de la faune sauvage, France.

Key-words :

Flea, Siphonaptera, Pulicidae, Xenopsylla cunicularis, European wild rabbit, Oryctolagus cuniculus, geographical range, myxomatosis, rabbit hemorrhagic disease, RHD, vaccination, insect vector, vaccine vector, introduction, release, biological control, wildlife disease, wildlife management, France.

Introduction

Les populations sauvages de lapin de garenne *Oryctolagus cuniculus* L. ont été considérablement réduites en France après l'introduction des virus de la myxomatose en 1952 et de la maladie hémorragique (VHD) à la fin des années 80.^{1,2} Le phénomène a été aggravé par les pratiques agricoles qui ont transformé le paysage, modifié l'habitat du lapin et fragmenté ses populations.^{3,4} Si la perte de l'habitat est difficilement contrôlable, la lutte contre les maladies est une des actions qui peut être menée dans le cadre d'un programme de gestion et de conservation du lapin de garenne.

Depuis les années 80, les insectes hématophages, comme les puces, sont considérés comme des agents potentiels pour introduire et transmettre des vaccins, afin de contrôler certaines maladies de la faune sauvage. En 1986, Saurat déposa un brevet concernant l'utilisation de puces porteuses d'un virus de la myxomatose faiblement pathogène pour vacciner les lapins contre les formes virulentes de la maladie, permettant d'atteindre les populations sauvages sans avoir à les capturer.⁵ L'utilisation de vecteurs aptères, plutôt qu'ailés comme les moustiques,⁶ permet de minimiser le risque de dispersion incontrôlée. Idéalement, le vecteur utilisé doit accomplir sa fonction (c'est-à-dire transmettre le virus-vaccin au lapin) et disparaître rapidement.

En France, il existe 4 espèces de puces spécifiques du lapin de garenne.^{7,8} Les plus rares sont *Odontopsyllus quirosi* Beaucournu et Gilot et *Caenopsylla laptevi* Beaucournu et al que l'on trouve dans le sud de la France. *Xenopsylla cunicularis* Smit se rencontre dans le sud-ouest de la France, où elle est relativement rare. L'espèce la plus abondante est *Spilopsyllus cuniculi* Dale, qui est largement présente sur tout le territoire Français. Cette dernière espèce est fortement dépendant du cycle hormonal de son hôte: les puces adultes font leur maturation sexuelle sur les lapines gestantes, puis s'accouplent et pondent leurs œufs sur les lapereaux juste après la mise-bas.^{9,10}

Poursuivant le travail de Saurat, nous avons choisi d'utiliser la puce *X. cunicularis* en raison de la simplicité de son cycle biologique¹¹⁻¹³ qui facilite son élevage en laboratoire, et d'une étroite spécificité pour le lapin (sa persistance est impossible sur un autre hôte).¹⁴⁻¹⁶ Nous avons développé une technique de production performante dans l'objectif de lâchers à grande échelle¹⁷ (et Darries-Vallier, données non publiées sur l'optimisation), montré que les puces peuvent transmettre un virus-vaccin atténué chez les lapins sauvages (données non publiées et voir aussi Bárcena et al¹⁸) et construit également un vaccin recombinant myxomatose/VHD pour vacciner contre les 2 maladies.¹⁹ Dans la nature, le virus-vaccin faiblement pathogène que nous avons choisi¹⁹ se transmet difficilement par les insectes vecteurs.²⁰ Ceci est un avantage pour notre objectif, car cela limite la propagation du vaccin et permet le ciblage des populations de lapins que l'on veut vacciner. Mais de ce fait, nous avons dû définir une méthode de lâcher des puces sur le terrain¹⁷ permettant d'atteindre plus de 75% des lapins, ce qui est le niveau requis pour empêcher la maladie de devenir épizootique (Loi de Charles Nicolle²¹).

L'utilisation de la puce *X. cunicularis* doit faire l'objet d'une étude minutieuse, non seulement pour vérifier l'adéquation de cet agent avec l'objectif attendu, mais aussi et surtout pour évaluer son incidence future sur l'écosystème dans lequel il est introduit. Il est important de noter que *X. cunicularis* se trouve uniquement dans l'extrême ouest du bassin méditerranéen et que le sud-ouest de la France représente la limite nord de son aire de répartition naturelle (figure 1). Elle a été observée dans les années 80 au sud de Toulouse (Fauga et Portet-sur-Garonne, Haute-Garonne),^{8,15,22} et plus récemment dans 4 nouveaux sites dans les départements du Gers, Haute-Garonne et Tarn.²³ Il est donc extrêmement important de s'assurer que lâcher des puces-vaccinantes ne conduirait pas à une augmentation incontrôlée

de leur distribution à travers la France avec des effets potentiellement négatifs sur la transmission de maladies virales d'origine naturelle ou la compétition avec une autre espèce de puces.

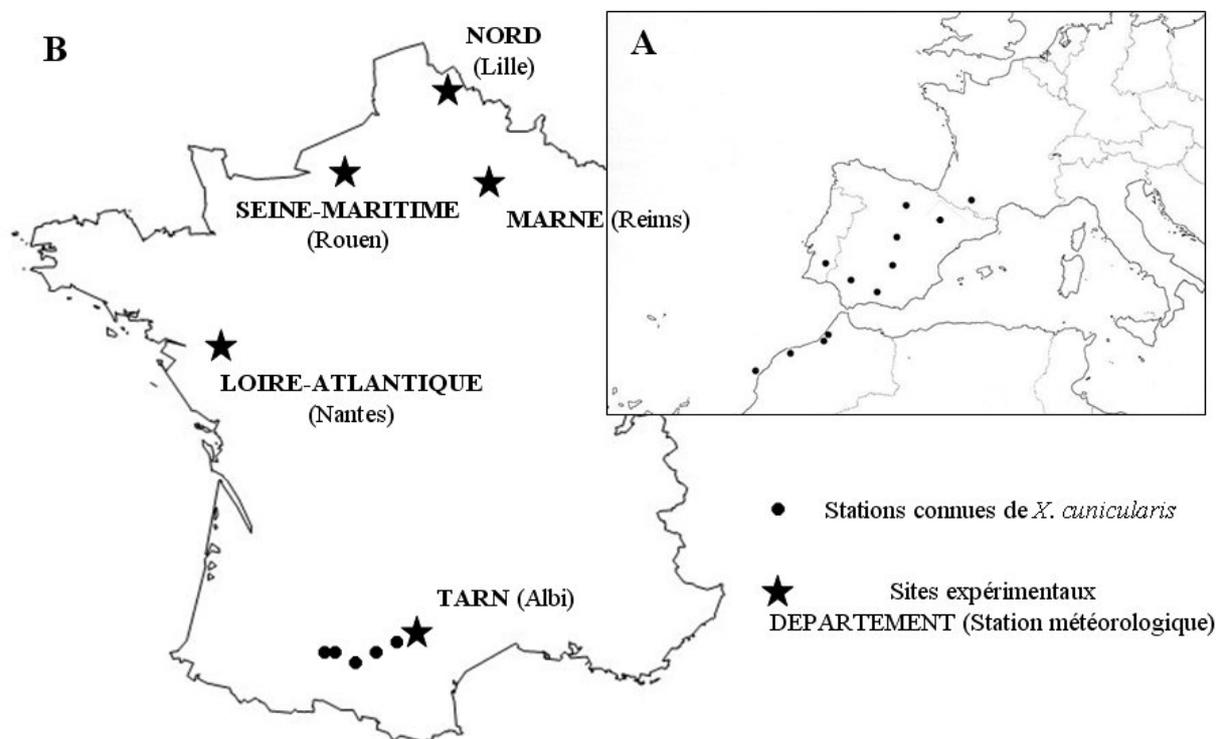


Fig. 1 – **A.** Aire de répartition de *Xenopsylla cunicularis*¹⁵ et **B.** Localisation des sites expérimentaux et des stations connues de *X. cunicularis* en France^{15,21}

La biologie de cette puce est bien connue et fournit ainsi un cadre théorique solide pour étudier ce risque potentiel.^{8,11-13,17,24} On sait en particulier que *X. cunicularis* vit dans les terriers, que les adultes ne vont sur le lapin que le temps de s'alimenter et que leurs œufs sont pondus sur le sol où les larves, détritiphages, se développent.^{8,11} De ce fait, la distribution de *X. cunicularis* répond à des exigences écologiques très strictes liées à l'hôte, le substrat et le climat.²⁴ (i) l'occupation régulière des garennes par le lapin est essentielle pour assurer une source de nourriture aux puces et la ponte des œufs, (ii) le développement larvaire est favorisée par les sols meubles et bien drainé, un substrat sableux étant le plus approprié, et (iii) un temps chaud avec des précipitations comprises entre 280 et 660 mm par an, et un régime de pluie printanier permet le développement optimal des larves. Le climat est le paramètre le plus important pour la survie des puces. Bien que les larves puissent tolérer une faible humidité (HR <60%), ce qui permet à *X. cunicularis* de coloniser les zones arides, le développement optimal se produit à 80-85% HR.^{12,17} Au-delà de ce taux d'humidité, la survie des larves diminue car un substrat humide ne leur convient pas.²⁴ Cooke a montré que lorsque les précipitations annuelles dépassent 600 mm, le sol dans les terriers de lapin reste humide pendant une grande partie de l'année.²⁵ De plus, le régime des pluies est aussi important que la quantité des précipitations et les variations de ces 2 paramètres sont liées à des variations inter- et intra-annuelle importantes des populations de *X. cunicularis*.^{24,12} Dans l'aire de répartition naturelle de la puce, les températures moyennes mensuelles varient entre 5-10°C pour le mois le plus froid à 21-27°C pour le plus chaud, et la température moyenne annuelle se situe entre 12,9 et 15,9°C.²⁴ L'importance du climat a été souligné en Australie, où la distribution potentielle de cette espèce de puce a été étudiée grâce à un modèle informatique;²⁶ modèle qui a également décrit avec précision la répartition naturelle de *X.*

cunicularis en Europe.^{16, 27-29} En outre, Launay a montré qu'il y avait une forte baisse de la productivité de *X. cunicularis* en allant du sud vers le nord de son aire de répartition (du Maroc vers l'Espagne et le sud de la France), qui a été attribuée à la baisse des températures et à l'augmentation des précipitations.²⁴ Darries-Vallier et Beaucournu ont d'ailleurs confirmé la faible abondance et la fragilité de cette espèce en limite nord de sa distribution.²³

Parce que le climat est encore plus froid et plus humide dans le nord de la France,³⁰ il est peu probable que *X. cunicularis* puisse s'y installer définitivement si elle était utilisée comme un vecteur de vaccin temporaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué une première série d'essais sur le terrain dans le nord de la France, bien en dehors de la distribution naturelle de l'espèce. Ces essais ont utilisé des lapins et des puces à l'intérieur de parcs d'où ni les uns ni les autres ne pouvaient s'échapper. Ils ont été réalisés entre 2007 et 2009 sur 5 sites (figure 1B), dans les départements de Seine-Maritime, Marne, Nord, et Loire-Atlantique, et ont été comparés à un site dans le Tarn situé à la limite nord de l'aire de répartition naturelle de *X. cunicularis*. Le but de cette étude était de déterminer si *X. cunicularis* pouvait se développer et survivre dans des endroits où l'espèce n'est pas présente naturellement.

Matériels

Parcs expérimentaux

Les sites d'implantation des parcs ont été choisis en fonction de leur représentativité géographique, climatique et édaphique (source INRA - www.gissol.fr). Les zones situées en altitude ont été écartées à cause du climat trop rigoureux.

Selon les départements, les parcs ont été soit construits de toute pièce, soit des parcs existants ont été modifiés pour l'expérimentation. Ils avaient tous au moins les caractéristiques suivantes: une surface minimum de 300 m², grillagée sur 2 m de haut et 40 cm de profondeur (pour que les lapins ne puissent creuser et s'échapper), et entouré d'un film plastique de 50 cm de haut (base enterrée) pour éviter tout risque de "fuite" de puces ; un filet anti-rapaces, pour supprimer la prédation et la dissémination incontrôlée de puces qui auraient pu se trouver sur des lapins enlevés par un oiseau de proie. Les lapins avaient à leur disposition une mangeoire abritée et une source d'eau. Trois garennes artificielles ont été construites dans chaque parc, permettant aux lapins de bien se répartir et d'avoir suffisamment d'espace pour limiter les conflits territoriaux durant les expérimentations. Chaque garenne était faite de parpaings disposés de manière à former un espace central (1,5 à 2 m²) avec 2 galeries d'entrée de 1 m de long (une de chaque côté). Le tout était fermé par un « couvercle » (fait de planches, tôles...) étanche et amovible, recouvert d'environ 1,5 m³ de terre. Avant la fermeture des garennes, la végétation avait été enlevée pour faciliter le raclage ultérieur du sol, et le sol avait été saupoudré d'un mélange de poudre de daphnies séchées, de levure et de sable (4-1-5 v/v) pour alimenter les larves de puces. Une quantité de 500 cm³ de ce mélange avait été répartie sur le sol de chaque garenne, soit 1500 cm³ pour un parc. Ce mélange de daphnies et de levure était celui utilisé avec succès dans notre élevage en laboratoire.¹⁷ L'alimentation répandue dans les terriers artificiels dépassait largement la quantité nécessaire pour nourrir les larves de puces, mais nous voulions nous assurer que les larves puissent survivre avant la création de sources de nourriture naturelle (fèces de puces, moisissures, déchets organiques divers liés à l'utilisation des garennes par les lapins, etc).

Les caractéristiques des 5 parcs (Nord, Marne, Seine-Maritime, Loire-Atlantique et Tarn) sont données dans le tableau 1. Chaque parc était géré sur place par un technicien de Fédération Départementale de Chasseurs ou un membre d'une association de chasse.

Département (commune)	Date	Coord. GPS	Surface (m ²)	Caractéristiques	Nb initial de lapins
Nord (Beuvry-la-Forêt)	2008 2009	03°17'11"E / 50°27'36"N	300	Herbe rase	10
Marne (Romain)	2008 2009	03°46'18"E / 49°19'49"N	300	Herbe Pente ~10°	13
Seine-Maritime (Belleville-en-Caux)	2007 2008	49°42'22"N / 00°59'20"E	460	Herbe rase Pente ~ 7-8°	13
Loire-Atlantique (Montbert)	2007 2008	01°29'16"W / 48°03'31"N	300	Herbe rase sous une pinède	11
Tarn (Albi)	2007 2008	2°08'47" E / 43°55'44"N	300	Herbe haute	10

Tableau 1. Localisations géographiques et caractéristiques des parcs expérimentaux

Les lapins

Des lapins sauvages issus de reprises ont été utilisés dans tous les parcs, sauf celui de la Seine-Maritime où les lapins étaient domestiques. Pour maintenir les populations stables et éviter les complications causées par l'augmentation du nombre de lapins, seules des femelles ont été utilisées. Les animaux issus de reprise ont été isolés au préalable pour qu'il n'y ait pas de mises-bas en début d'expérimentation. Les lapins ont été vaccinés contre la myxomatose et la VHD (vaccin type Dervaximyo[®] et Cunical[®], Merial Lab, Duluth, GA, USA) et un agent anticoccidien a été ajouté à l'approvisionnement en eau ou intégré directement dans la nourriture. Pour veiller à ce qu'il y ait environ 10 lapins au moment du premier contrôle, 10-13 individus ont été lâchés dans chaque site pour compenser une mortalité naturelle éventuelle (voir le tableau 1).

Nous avons considéré que ces conditions semi-naturelles permettaient aux lapins d'avoir un comportement normal, en minimisant le stress qui pourrait perturber la reproduction des puces. Dans nos expériences, la densité de lapins et leur nombre par garenne étaient équivalents à ceux observés dans la nature (Villafuerte R, Décembre 2012, communication personnelle) et suffisants pour assurer une utilisation régulière des garennes ; l'abondance de l'hôte n'était ainsi pas un facteur limitant pour la survie des puces. En effet, d'après Villafuerte (Décembre 2012, données non publiées), les lapins en parc sont souvent moins stressés que les animaux vivant dans leur environnement normal. Enfin, les lapins mâles et femelles sont connus pour former des hiérarchies de dominance unisexuée et des études antérieures ont montré que dans les colonies unisexes de lapines, des relations sociales stables sont établies en 4 à 7 jours.^{31,32,33,34} L'agression entre femelles est principalement due à la reproduction³⁵ et son absence dans nos expériences minimise les conflits. Le manque de reproduction dans nos colonies a été considérée comme sans importance puisque *X. cunicularis* est élevé avec succès sur des lapines femelles vierges tout au long de l'année dans notre laboratoire.¹⁷

Nous n'avons pas recherché la présence de puces autochtones sur les lapins sauvages avant leur lâcher dans les parcs car nous avons supposé que les espèces qui pouvaient être présentes n'auraient pas perturbé notre expérience. *Odontopsyllus quirosi* et *Caenopsylla laptevi* ne sont pas présentes dans les zones testées. *Spilopsyllus cuniculi* est largement répartie dans toute la France, mais sa biologie et sa niche écologique sont très différentes de celles de *X. cunicularis*, et sa multiplication n'était pas possible dans les sites étudiés puisque la reproduction des lapins n'était pas possible dans notre protocole. Dans le Tarn, les lapins sauvages ont été repris dans une zone où *X. cunicularis* n'était pas présente.²³

Les puces

Elles provenaient de notre élevage, situé à Murviel-les - Montpellier (Hérault -France), où la colonie est maintenue sur des lapins blancs Néo-Zélandais depuis 1994. Les conditions de reproduction (80-85 % HR, 22-23°C pour la ponte et 21°C pour le développement) sont un compromis entre la qualité des adultes obtenus et le rendement, de manière à obtenir des insectes de très bonne qualité physiologique en termes de fécondité, longévité et capacité à supporter le stockage au froid (8°C -85 % HR). Pour les expérimentations, les puces mâles et femelles étaient à jeun, vierges et âgées de 2-3 jours au moment où elles ont été lâchées dans nos parcs expérimentaux. Les insectes ont été placés dans des tubes en plastique aérés (8 cm de haut et 2 cm de diamètre) avec 50 puces dans chaque tube. Pour le transport, les flacons ont été mis dans des sacs en plastique avec du papier humide pour maintenir une bonne humidité et réduire ainsi le risque de mortalité durant la livraison-express de nuit jusqu'aux sites expérimentaux. Les puces ne portaient pas de vaccin puisque nous n'étions intéressés que par leur capacité à se reproduire et à persister.

Méthodes

Le principe général a consisté à lâcher des puces à l'intérieur de parcs expérimentaux peuplés en lapins, et de voir si l'on retrouvait encore des insectes l'année suivante. Un échantillonnage a été réalisé la 1^{ère} année (environ 3 mois après le premier lâcher de puces). L'année suivante, au début de l'été, les lapins ont tous été capturés et peignés pour dénombrer les puces dont ils étaient porteurs. Le sol des garennes a été raclé pour récupérer les éventuels stades adultes et larvaires de *X. cunicularis* présents.

Lâcher de puces

Si les puces devaient être utilisées pour la vaccination sur le terrain, nous préconiserions de faire plusieurs lâchers successifs pour couvrir l'étalement des naissances des lapereaux. Trois lâchers de puces ont donc été réalisés par parc (avril-mai-juin). Cette période correspond, en nature, à la reprise d'activité de *X. cunicularis*.⁸ Le nombre de puces introduites à chaque lâcher était de 300 (sex-ratio 50 %), soit environ 30 puces/lapin/mois ou 900 au total par parc. Cette quantité est très supérieure à celle qui serait préconisée pour un lâcher en nature de puces porteuses de vaccin (10/lapin)¹⁷ pour favoriser l'établissement des puces. Le nombre d'insectes lâchés correspond au nombre moyen de puces que l'on peut trouver sur le dos des lapins à l'état sauvage,^{8,13,36} sans tenir compte des adultes ou des individus immatures déjà présents dans les terriers sauvages et absents dans nos garennes artificielles au début de l'étude. En outre, comme décrit précédemment, il y avait suffisamment d'alimentation pour les larves dans les garennes pour assurer le développement de puces immatures. Le premier lâcher a été effectué 1 à 2 semaines après celui des lapins, pour laisser à ces derniers le temps de s'adapter à leur nouveau milieu et se comporter normalement. Les insectes ont été placés à l'entrée de chacune des 6 galeries, en fin de journée, pour favoriser le contact hôte-parasite, les lapins ayant des mœurs nocturnes et crépusculaires.³⁷

Echantillonnage initial pour confirmer la survie et la reproduction des puces

En France, *X. cunicularis* se développe durant le printemps et l'explosion démographique des populations a lieu au début de l'été. Le contrôle a donc eu lieu fin juillet, environ 3 mois après le premier lâcher de puces. Sur chaque site, nous avons voulu vérifier si la puce s'était établie en déterminant le nombre de puces adultes portées par les lapins (indice pulicidien). Nous avons également cherché des preuves de reproduction (nombre d'adultes et de stades immatures dans des échantillons de substrat de terrier).

Comme il était important de ne pas perturber le dispositif expérimental (en minimisant le stress des lapins et le nombre de puces collectées), seuls trois lapins ont été capturés au hasard avec des filets, des filets, ou des boîtes- pièges. Le nombre d'animaux présents au moment de l'échantillonnage a été estimé d'après les observations visuelles faites au cours de l'expérience par les techniciens. Les trois lapins capturés ont été immédiatement placés dans des boîtes en plastique séparées (avec couvercle) pour éviter la perte de puces, qui fuient rapidement les animaux stressés (Cooke B, communication personnelle et observations personnelles faites lors de la manipulation des lapins dans notre élevage de puces), probablement en raison de l'augmentation de leur température corporelle³⁸ (Bigler L, Avril 2012, communication personnelle). Les lapins ont ensuite été intensivement peignés pendant 10-15 minutes, puis libérés. Toutes les puces ont été recueillies à l'aide d'un aspirateur à insectes. Les puces de chaque lapin ont été placées dans un tube référencé contenant 70 % d'alcool. Les puces ont ensuite été comptées et observées un peu plus tard en laboratoire. Les éventuelles autres espèces de puces ont été notées. Les mâles de *X. cunicularis* ont été disséqués pour séparer les individus nourris (sang dans l'appareil digestif) de ceux à jeun. Les femelles ont été disséquées pour déterminer leur statut reproductif basé sur la méthode de Launay comme suit: femelles à jeun, femelles alimentées en cours de maturation (diamètre oocytes < 330 µm), femelles ovigères (oocytes > 240 × 330 µm), et femelles âgées.⁸

Comme *X. cunicularis* vit dans le sol des garennes, généralement entre 50 et 75 cm de l'entrée du terrier, nous avons raclé le premier mètre du sol de 2 galeries dans chaque parc avec une spatule à long manche.^{8,11} Nous avons choisi de n'échantillonner que 2 galeries (sur 6) afin de ne pas perturber l'expérience en enlevant trop de puces. Lorsque des terriers naturels étaient présents, des échantillons supplémentaires ont été prélevés. Chaque échantillon de sol a été placé dans un sac en plastique de 20 L avec un morceau de papier humide pour éviter la dessiccation et transporté au laboratoire en véhicule climatisé (21°C).

Au laboratoire, le substrat de chaque sac a été délicatement réparti dans des boîtes en aluminium de 2 L sur une épaisseur de 3-4 cm. Toutes les puces adultes présentes ont été recueillies et placées dans des tubes avec de l'alcool à 70 % pour sexage et dissection. Les boîtes ont ensuite été placées dans une pièce maintenue à 23°C et les échantillons ont été observés deux fois par semaine pendant 2 mois pour récupérer les *Xenopsylla* qui émergeaient. Une boule de papier humide (changée régulièrement) a maintenu le niveau d'humidité entre 75 et 85 %. Pour récupérer les adultes, chaque boîte a été placée séparément avant ouverture dans un grand récipient en plastique pour éviter de perdre des puces. L'émergence des puces adultes a été stimulée en soufflant et en agitant doucement sur le substrat. Les puces recueillies avec un aspirateur ont été transférées dans un tube référencé contenant de l'alcool à 70% pour sexage ultérieur. Ces individus étaient au stade immature (œufs, larves ou nymphes) au moment de l'échantillonnage.

Contrôle final pour confirmer la persistance des puces au bout d'un an

A la fin des essais (soit le deuxième été), tous les lapins survivants dans les parcs ont été capturés et soigneusement peignés pour recueillir toutes les puces qu'ils portaient. Les puces de chaque lapin ont été placées dans de l'alcool à 70 % et observées de la manière décrite précédemment de retour au laboratoire.

Les garennes artificielles ont été ouvertes pour récupérer le substrat. La surface du sol a été quadrillée en petites unités d'environ 400 cm². Le premier centimètre de chaque unité a été récupéré à l'aide de truelles et placé dans un sac en plastique référencé aussi délicatement que possible pour préserver les œufs de puces fragiles. Le substrat a été transporté au laboratoire et réparti dans des boîtes, comme décrit précédemment, pour connaître le nombre d'adultes et de stades immatures présents. Dans certains sites, les lapins avaient creusé des galeries naturelles dont le sol a également été échantillonné sur 1 m de longueur pour déterminer la présence de populations importantes de puces. Il a été récupéré environ 90 à 100 boîtes par parc.

Pour des raisons logistiques, le sol du Tarn n'a pas pu être traité avec la même méthode que les autres sites. Le substrat dans chaque sac en plastique a été délicatement réparti dans des boîtes en plastique et les puces adultes présentes ont été placées dans des tubes avec de l'alcool à 70% pour un examen ultérieur tel que décrit précédemment. Le substrat a ensuite été recouvert d'alcool à 70%, afin de préserver tous les stades immatures, pour observation ultérieure sous loupe binoculaire. Comme il n'était pas possible d'examiner la totalité du substrat de cette manière, des essais ont été effectués et 20 % du total a été considéré comme représentatif. Cet échantillon a ensuite été délicatement lavé et filtré (maille de 200 µm) pour éliminer le plus de sédiments possible. Le nombre total de puces immatures recueillies dans le substrat du Tarn a été estimée à 5 fois le nombre de stades comptés. Les larves de puces et les nymphes étaient facilement identifiables, mais les œufs de puces étaient difficilement détectables à la loupe binoculaire, ce qui a entraîné une sous-estimation du nombre total des stades immatures.

La population totale de puces (adultes et immatures) sur chaque site a été rapportée au nombre initial d'adultes introduits (900) pour calculer le taux de multiplication (R). Ce paramètre ne reflète pas une évolution naturelle de la population puisque l'on est parti d'une population totalement déséquilibrée (adultes néonates uniquement) pour arriver à une population qui s'est structurée dans le temps avec l'apparition de toutes les catégories d'âge. Cependant, ce paramètre calculé va permettre d'établir une comparaison entre les différentes expérimentations, même si les valeurs n'ont pas de représentativité d'un point de vue purement écologique.

Données climatiques

Durant toutes les expérimentations, la température et l'humidité ont été enregistrées chaque semaine le même jour et à peu près à la même heure pour chaque site. Les mesures ont été prises à l'intérieur de la même garenne et à l'extérieur (sous abri) en utilisant un thermo-hygromètre. Ces mesures n'ayant pas été prises en même temps pour tous les parcs, elles ne sont pas strictement comparables. Nous avons donc recueilli des données climatiques supplémentaires provenant des stations météorologiques les plus proches : température, humidité relative et le total des précipitations observées au cours de la période d'étude (meteofrance.com, www.infoclimat.fr, Novembre 2010 et figure 1). Pour le premier contrôle sur la survie et la productivité des puces, nous avons utilisé (i) la moyenne des températures

hebdomadaires et le taux d'humidité relative à l'intérieur et à l'extérieur des terriers, (ii) le cumul des précipitations, et (iii) la moyenne des températures et du taux d'humidité relative donnée par la station météorologique. Pour le contrôle final, nous avons utilisé les mêmes paramètres calculés sur l'année entière, ainsi que les températures moyennes correspondant à la période de reproduction de la puce (d'Avril à Juillet).

Analyse du substrat

La texture du sol est un élément important pour la survie de *X. cunicularis*, un sol sableux étant un milieu optimal pour le développement de puces.²⁴ Une analyse granulométrique a été effectuée dans chaque site à partir d'échantillons de substrat des terriers par un laboratoire agronomique indépendant (Eurofins Lara-Toulouse, France) en utilisant la technique de sédimentation.

Analyses statistiques

Pour chaque parc, le nombre moyen de puces par lapin (indice pulicidien), le nombre moyen de stades préimaginaux et d'adultes par terrier ont été comparés en utilisant une analyse de variance (ANOVA). L'homogénéité des variances a été testée auparavant avec le test de Bartlett.³⁹ Parce que les échantillons étaient de petite taille et que les variances étaient considérées égales, les intervalles de confiance à 95 % ont été établis pour toutes les comparaisons de moyennes prises deux à deux, afin de déterminer les moyennes significativement différentes. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel Nemrodw (Marseille, France).⁴⁰

Résultats

Echantillonnage initial de *Xenopsylla cunicularis*

Puces sur les lapins

Très peu de puces ont été récupérées sur les lapins dans les sites du nord de la France par rapport à celui du Tarn (tableau 2): 2 en Loire-Atlantique (les trois lapins portaient respectivement 0, 1, et 1 puce), 3 dans le Nord (2-1-0), 5 dans la Marne (0-5-0), 6 en Seine-Maritime (3-0-0-3), et 21 dans le Tarn (8-5-8). Les lapins dans le parc de Seine-Maritime ayant très bien survécu, 4 animaux ont été échantillonnés au lieu des 3 prévus. L'indice pulicidien était significativement plus élevée dans le Tarn (ANOVA, $F = 7,38$, $df = 4$, $p < 0,004$). Les puces étaient toutes alimentées et dans le Tarn, les femelles étaient principalement ovigères. En Seine-Maritime, les trois *Xenopsylla* femelles récupérées étaient âgées. Quelques *S. cuniculi* ont été trouvées sur les lapins échantillonnés, mais moins de 10 partout, sauf pour la Marne où 51 individus ont été identifiés. Dans ce parc, des lapines avaient mis bas avant d'être relâchées (et étaient donc attractives pour *S. cuniculi*).

Puces dans le substrat des garennes

Quelques rares puces ont été récupérées dans les échantillons de sol au moment du prélèvement. Dans le Nord, 3 puces femelles (2 en maturation ovarienne et 1 ovigère) et dans la Marne, 1 mâle (néonate) et 2 femelles (1 en maturation et 1 ovigère). Dans ces 2 cas, les

Départements (Station météorologique)	Données de la station météo.			INT		EXT		Lap.	Index pulicidien ± e.t.	MALES			FEMELLES				TOTAL PUCES Éch.
	T°	HR	P°	T°	HR	T°	HR			neo	alim	total M	neo	mat	ovi	âgée	
Nord (Lille)	17.2	71	210	21.5	71	19.2	66	9	1.0 ± 1.0 ^a	2	2		1	0	0	1	3
Marne (Reims)	17	76	179.4	16.8	72	21	63	11	1.7 ± 2.9 ^a	1	1		2	2	0	4	5
S.-Maritime (Rouen)	15.5	81	285.4	16.5	87	17.9	81	13	*1.5 ± 1.7 ^a	3	3		0	0	3	3	6*
L.-Atlantique (Nantes)	16.7	83	278.6	16.1	93	19.9	71	9	0.7 ± 0.6 ^a	0	0		0	2	0	2	2
Tarn (Albi)	19	72	238.2	20.6	71	23	63	10	7.0 ± 1.7 ^b	11	11		1	9	0	10	21

Tableau 2. Echantillonnage initial - Quantité et répartition des âges physiologiques des adultes de *Xenopsylla cunicularis* présents sur un échantillon de 3 lapins, et données climatiques moyennes jusqu'au prélèvement. (*) échantillonnage réalisé sur 4 lapins (voir dans le texte) [T°=température (°C) ; RH=humidité relative (%) ; P°=cumul des précipitations (mm), INT-EXT=intérieur-extérieur des garennes ; Lap=nombre de lapins estimés au moment du prélèvement ; e.t.=écart-type ; néo=néonate ; alim=alimenté ; mat=en maturation ; ovi=ovigère ; M=mâle ; F=femelle ; ech=échantillon]

Départements	Lap	Indice pulicidien ± e.t.	MALES			FEMELLES					Total puces sur les lapins	Sex-ratio (% femelles)
			neo	alim	total	neo	mat	ovi	âgées	total		
Nord	4	0.3 ± 0.5 ^a	0	1	1	0	0	0	0	0	1	-
Marne	8	10.6 ± 6.0 ^b	0	30	30	0	10	41	4	55	85	65
Seine-Maritime	13	0.8 ± 0.7 ^a	0	0	0	1	2	7	1	11	11	100
Loire-Atlantique	5	0.6 ± 0.9 ^a	0	0	0	0	0	3	0	3	3	100
Tarn	8	12.4 ± 5.3 ^b	0	64	64	0	3	31	1	35	99	35

Tableau 3. Contrôle final - Nombres, sex-ratio et état physiologique de *Xenopsylla cunicularis* adultes récupérées sur tous les lapins. Les indices pulicidiens non associés avec la même lettre diffèrent à $P < 0.05$. [Lap=nombre de lapins au moment du prélèvement; e.t. = écart-type; neo = néonate; mat = en maturation; ovi = ovigère; M = male; F = femelle]

adultes se trouvaient dans la galerie de la garenne la plus ensoleillée. En Seine-Maritime, une femelle en maturation ovarienne a été récupérée, mais aucun individu en Loire-Atlantique. Aucun adulte n'a éclos des échantillons de sol par la suite. En revanche, dans le Tarn aucun adultes n'était présent au moment de l'échantillonnage, mais 5 (2 mâles, 3 femelles) ont éclos plus tard à partir du substrat.

Climat

Le Tarn se détachait des autres sites avec la température moyenne la plus élevée (19°C) (Tableau 2). Les quatre sites du nord de la France étaient plus froids, entre 17,2 et 15,5°C. Au cours de la période entre le lâcher et l'échantillonnage, les précipitations ont été plus élevées en Seine-Maritime (285,4 mm avec 167 mm en Juillet), suivi de près par la Loire-Atlantique (278,6 mm avec 124 mm en mai). Les pluies ont été régulièrement réparties dans les 3 autres sites. A l'intérieur des terriers, l'humidité était généralement plus élevée et les températures plus basses par rapport à l'extérieur de la garenne.

Contrôle final

Puces sur les lapins

Les lapins ont bien survécu dans les parcs de Seine-Maritime (13), de la Marne (8) et du Tarn (8), mais seulement 4 et 5 ont survécu ailleurs (tableau 3). Par rapport aux résultats du premier échantillonnage, l'indice pulicidien final du Nord, de la Seine-Maritime et de la Loire-Atlantique a chuté à près de zéro, alors qu'à l'inverse, l'indice de la Marne et du Tarn a augmenté de manière significative. Le nombre de puces sur les lapins était significativement plus élevé dans ces sites (ANOVA, $F = 19,82$, $df = 4$, $p < 10^{-6}$).

Puces dans le substrat des garennes

Les adultes trouvés dans le substrat (tableau 4) confirment les résultats obtenus par peignage des lapins. Il y avait une différence significative entre le Nord, la Seine-Maritime, la Loire-Atlantique avec de rares adultes et la Marne et le Tarn avec 161 et 159 adultes, respectivement (ANOVA, $F = 19,39$, $df = 4$, $p < 10^{-4}$). La même différence importante a été observée pour les stades immatures (tableau 5) (ANOVA, $F = 3,85$, $df = 4$, $p < 0,04$), mais en plus, le Tarn (malgré une sous-estimation) était significativement plus élevé que la Marne ($P < 0,05$), avec 937 contre 264 stades immatures. La sex-ratio était de 50 à 53% de femelles. Dans la Marne, la distribution des stades immatures et des adultes entre les trois terriers artificiels était hétérogène. En effet, la plupart des puces ont été trouvées dans la garenne située dans la partie haute du parc : 75% des adultes et 83 % des stades immatures. Dans tous les parcs en général, les terriers les plus secs et/ou les plus hauts contenaient le plus grand nombre d'individus. Ces terriers étaient également plus fréquentés par les lapins. Dans le Tarn, les garennes les plus utilisées contenaient également le plus de puces.

Terriers naturels

Trois mois après le début des expérimentations, les galeries naturelles étaient rares dans les parcs et aucune puce n'a été retrouvée (tableau 6). A la fin de l'étude cependant, tous les enclos (sauf le Nord) avaient un petit réseau de galeries. Mais des puces n'ont été récupérées dans les terriers naturels que dans la Marne et le Tarn. Dans la Marne, 12 puces adultes ont été trouvées dans trois des sept galeries naturelles, principalement dans le point le plus élevé du parc (et reliées à la garenne artificielle la plus élevée), mais aucun individu n'a éclos des

Départements	Adultes dans le substrat des garennes artificielles				Physiological status									Total Adultes	SR
	A	B	C	Moy ± e.t.	Males			Femelles							
					neo	alim	total	neo	mat	ovi	âgé	total			
Nord	1	0	5	2.0 ± 2.6 ^a	0	1	1	0	1	1	2	5	6	83	
Marne	25	15	121	53.7 ± 58.5 ^b	14	21	35	9	34	52	31	126	161	78	
Seine-Maritime	1	0	2	1.0 ± 1.0 ^a	1	0	1	0	2	0	0	2	3	67	
Loire-Atlantique	3	3	3	3.0 ± 0.0 ^a	0	0	0	0	6	3	0	9	9	100	
Tarn	71	58	30	53.0 ± 20.9 ^b	14	19	33	10	28	61	27	126	159	79	

Tableau 4. Contrôle final – Nombre et état physiologique des *Xenopsylla cunicularis* adultes trouvés dans le substrat des 3 garennes artificielles (A-B-C). Dans une même colonne, les moyennes non associées de la même lettre diffèrent à $P < 0.05$. [neo = néonate; mat = en maturation; ovi = ovigère; e.t. = écart-type; SR = sex-ratio en % de femelles]

Départements	Garennes artif.			Mean ± sd	Total	SR
	A	B	C			
Nord	0	0	0	0 ^a	0	-
Marne	15	31	218	88 ± 112.9 ^b	264	53
Seine-Maritime	5	7	2	4.7 ± 2.5 ^a	14	50
Loire-Atlantique	15	1	10	8.7 ± 7.1 ^a	26	50
Tarn	585	151	201	312.3 ± 237.5 ^c	937	no data see text

Tableau 5. Contrôle final - Nombres de stades immatures trouvés dans le substrat des 3 garennes artificielles (A-B-C). Dans une même colonne, les moyennes non associées de la même lettre diffèrent à $P < 0.05$. [neo = néonate; mat = en maturation; ovi = ovigère; e.t. = écart-type; SR = sex-ratio en % de femelles]

Départements	N	Np	Total Stades immatures	Etat physiologique des adultes							Total adultes	Total puces	
				Males			Femelles						
				neo	alim	total	neo	mat	ovi	âgé			total
Nord	0	-	-			-				-	-	-	
Marne	7	3	0	1	4	5	0	3	1	3	5	12 (2-3-7)*	12
Seine-Maritime	3	0	0			-					-	0	0
Loire-Atlantique	4	0	0			-					-	0	0
Tarn	3	2	81 (31-50)*	0	0	0	0	0	10	0	10	10 (0-10)*	91

()* = Détails du nombre d'adultes ou de stades immatures trouvés dans les galeries infestées

Tableau 6. Contrôle final – Nombres de stades immatures, état physiologique et nombres d'adultes de *Xenopsylla cucicularis* trouvés dans le substrat des galeries naturelles. [N = nombre de galeries naturelles dans le parc; Np = nombre de galeries naturelles avec des puces; neo = néonate; mat = en maturation; ovi = ovigère]

Départements	Stades immatures dans le substrat			Adultes					Total puces (parc)	R
	Artif	Nat	TOTAL	Dans le substrat			Sur les lapins	TOTAL		
				Artif	Nat	Total				
Nord	0	-	0	6	-	6	1	7	7	0.01
Marne	264	0	264	161	12	173	85	258	522	0.6
Seine-Maritime	14	0	14	3	0	3	11	14	28	0.03
Loire-Atlantique	26	0	26	9	0	9	3	12	38	0.04
Tarn	937	81	1018	159	10	169	99	268	1286	1.4

Tableau 7. Contrôle final – Nombre total de *Xenopsylla cucicularis* (stades immatures et adultes) récupérés dans chaque parc (garences+lapins), et taux de multiplication (R). [Artif = artificiel; nat = naturel]

échantillons de sol. Au moment de l'échantillonnage, le sol était plus humide que celui à l'intérieur des terriers artificiels. Dans le Tarn, 10 adultes (femelles ovigères seulement) et 81 stades immatures (7% du total des stades préimaginaux) étaient présents dans 2 galeries (les plus utilisées par les lapins).

Nombre total de puces récupérées et taux de multiplication

Dans la Marne et le Tarn, un tiers des puces se trouvaient sur les lapins et deux tiers étaient dans les terriers (tableau 7). Il est important de noter que si le nombre de puces adultes était statistiquement le même dans ces 2 sites (voir ci-dessus), les stades préimaginaux étaient (au moins) quatre fois plus nombreux dans le Tarn. C'est ce qui explique la légère augmentation de la population de *X. cunicularis* ($R = 1,4$). Même si le site de la Marne semblait être favorable à un développement limité de *X. cunicularis*, le taux de multiplication était inférieur à 1 ($R = 0.6$). Pour le Nord, la Seine-Maritime et la Loire-Atlantique, les valeurs étaient proches de zéro.

Etat reproductif et structure de la population de puces

La sex-ratio des puces sur les lapins et dans les garennes était en faveur des femelles (sauf dans le Tarn, où les lapins portaient plus de mâles) et la plupart étaient ovigères (tableaux 3 et 4). Les néonates ont été trouvés exclusivement dans les terriers (avec une exception en Seine-Maritime). La sex-ratio des stades préimaginaux était de 53% dans la Marne et 50 % en Seine-Maritime et Loire-Atlantique (pas de données pour le Tarn, voir le protocole).

Climat

Au cours de l'année qui a suivi le premier prélèvement, la température moyenne était presque identique pour les trois parcs les plus au nord (10.3 à 10.7°C), tandis que la moyenne pour la Loire-Atlantique était de 12,3 °C (tableau 8). La température moyenne entre Avril et Juillet, période correspondant à la saison de reproduction de *X. cunicularis*, a varié de 14,2 à 15,7°C. Dans ces quatre départements, les nuits d'hiver étaient régulièrement en dessous de zéro, avec des températures minimales moyennes mensuelles entre 6 et 8°C. Les températures maximales moyennes mensuelles se situaient entre 21,5 et 24°C. Dans le Tarn, le site le plus au sud, ces paramètres étaient plus élevés : 13,3°C au cours de l'année, 17,4 °C d'Avril à Juillet, la moyenne minimale mensuelle était de 9,3 °C et la moyenne maximale de 28,4°C. Les précipitations ont été les plus élevées en Seine-Maritime (881 mm) et les plus faibles dans la Marne (660 mm). Elles ont été régulièrement réparties, sauf dans le Tarn où Avril et Mai (début de la saison de reproduction des puces) ont été très pluvieux (environ 140 mm au cours de chaque mois).

Départements	Données station météo.				INT		EXT	
	t°	T°	P°	HR	T°	HR	T°	HR
Nord	15.7	10.7	765.4	80	13.9	70	14.9	67
Marne	15.5	10.3	660	81	9.8	80	12.7	78
Seine-Maritime	14.2	10.5	881.1	81	11.3	86	12.6	78
Loire-Atlantique	15.7	12.3	785.2	81	13.1	86	16.2	69
Tarn	17.4	13.3	714.4	73	17.8	53	19.4	51

Tableau 8. Contrôle final – Données climatiques moyennes entre le 1^{er} contrôle et la fin de l'étude (12 mois). [t° = températures d'aveil à juillet (°C); T° = température sur toute l'année (°C); HR = humidité relative (%); P° = précipitations totales (mm); INT-EXT = intérieur-extérieur du terrier]

Texture des substrats

La proportion d'argile était similaire pour les 5 sites (tableau 9), mais la proportion de sable était plus importante dans le substrat de la Marne (54,9 %). Son sol était un sable limono-argileux, tandis que les autres étaient des limons sablo-argileux. Quand le sol a été échantillonné en été, le substrat de ces derniers parcs était humide et, pour le Nord et la Loire-Atlantique, il l'est resté pendant toute la période d'observation au laboratoire.

Départements	Texture	Argiles	Sables	Limons
Nord	limon sablo-argileux	17,7	40	42,3
Marne	sable limono-argileux	15,4	54,9	29,7
Seine-Maritime	limon sablo-argileux	16,9	25,4	57,7
Loire-Atlantique	limon sablo-argileux	13,3	45,5	41,1

Tableau 9. Texture des sols des 4 sites expérimentaux : pourcentages de sables, d'argiles et de limons

Discussion

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les sites expérimentés dans le nord de la France, qui sont représentatifs de la région considérée, ne sont pas adaptés au maintien des populations de *X. cunicularis*. Dès le premier échantillonnage, la survie des puces était plus faible par rapport au Tarn (témoin). Très peu de puces ont été récupérées sur les lapins ou dans les terriers, même si 900 insectes ont été lâchés dans chaque site 2-3 mois plus tôt. A la fin des expériences, dans les garennes artificielles étanches, le taux de multiplication (R) était

proche de zéro dans le Nord, la Seine-Maritime et la Loire-Atlantique, reflétant un taux de mortalité élevé. Dans la Marne, une reproduction de puces a été observée, mais le taux de multiplication est inférieur à 1. Seul le Tarn a montré une légère augmentation de la population pulicidienne.

Dans des études antérieures, Launay avait décrit les exigences écologiques de ces puces, liées à leur comportement et leurs besoins pour se développer.^{8,24} Les adultes ne se nourrissent que brièvement sur les lapins et vivent principalement dans les terriers, se déplaçant dans la partie supérieure du sol des garennes où ils s'accouplent et pondent leurs œufs. Ainsi, un substrat bien drainé est essentiel pour les adultes et les larves en développement. Les sols sablonneux offrent généralement un environnement adéquat, sauf dans les zones de fortes pluies et aux températures basses, qui réduisent l'évaporation et maintiennent le sol humide pendant des périodes excessives, même en été, quand le sol est assez chaud pour le développement larvaire. Selon Launay,²⁴ *Xenopsylla cunicularis* est présente dans les régions où la température moyenne annuelle se situe entre 12,9 et 15,9 °C et où les précipitations sont comprises entre 280 et 660 mm par an, essentiellement à la fin du printemps et au début de l'été. En effet, la pluviométrie est très importante puisque les pluies continues empêchent le sol de sécher. Même au sein de son aire de répartition naturelle, les populations de *X. cunicularis* fluctuent considérablement d'une année à l'autre selon la quantité et le régime des pluies.^{24,36} Les basses températures et les substrats inadéquats (en raison de la texture et/ou de l'humidité du sol) ralentissent la ponte et augmentent la durée du développement et la mortalité¹⁷, limitant l'augmentation des populations. L'occupation des garennes par les lapins est le troisième paramètre important pour la survie de puces, car elle assure l'apport d'alimentation pour les puces en train de pondre.^{8,24} L'adéquation plus ou moins grande de ces trois facteurs (climat - substrat - hôte) déterminera la capacité de *X. cunicularis* à se reproduire et perdurer.

Dans notre étude, le microclimat (humidité et températures) rencontré par *X. cunicularis* à l'intérieur des terriers situés dans les sites du nord de la France, ne permet pas un bon développement des larves. Tout d'abord, le temps est trop humide : les précipitations sont élevées (765 à 881 mm), sauf dans la Marne où la moyenne annuelle de 660 mm par an correspond à la limite supérieure suggérée par Launay, et la pluie est aussi uniformément répartie sur l'année, même dans la Marne. Deuxièmement, la température moyenne annuelle est trop basse (entre 10,3 et 12,3 °C), réduisant la ponte et augmentant la durée du développement. C'est probablement pour cette raison qu'en Seine-Maritime, les puces femelles trouvées dans le premier contrôle étaient âgées. Ces puces provenaient probablement du dernier lâcher en Juin, en raison de la faible température moyenne observée au cours de cette première phase (15,5 °C). Elles ne pouvaient ni avoir appartenu à une première génération ni avoir terminé leur cycle de reproduction. Les basses températures expliquent aussi pourquoi dans la Marne, les stades immatures dans le sol des terriers étaient 4 fois moins nombreux que dans le Tarn.

Le substrat des garennes n'était également pas approprié. La proportion de limon et d'argile était trop élevée pour former un sol bien drainé. Cela est particulièrement important dans le Nord et la Loire-Atlantique où le sol était très humide même en été. Cette observation est en accord avec le rapport de Cooke qui montre que le substrat des terriers reste humide tout au long de l'année quand la pluviométrie moyenne annuelle est supérieure à 600 mm.²⁵ L'exception était dans la Marne où le sable et les faibles précipitations prédominaient, expliquant une meilleure reproduction des puces. Dans ce parc, il est important de tenir compte de la configuration inclinée du terrain, et qu'environ 80 % des adultes et des stades immatures se trouvaient dans le terrier artificiel de la zone la plus élevée et la mieux drainée. Ceci n'était néanmoins pas suffisant pour assurer un bon développement de *X. cunicularis* si l'on considère qu'aucune puce n'a émergé des échantillons de sol prélevés dans les trous naturels humides associés à la garenne la mieux drainée, alors que quelques puces ovigères

étaient présentes au moment de l'échantillonnage. Ces dernières provenaient probablement de la garenne artificielle, étanche, qui a permis une meilleure survie des puces grâce à une meilleure protection contre la pluie. C'est probablement pour les mêmes raisons que le développement des puces a été important dans les terriers artificiels du Tarn. Car la petite population trouvée dans les galeries naturelles creusées par les lapins montre que les conditions environnementales ne sont pas les plus appropriées (substrat limoneux, sol trop humide). Il semble plus probable que ces terriers naturels aient été réinfestés au printemps avec des puces provenant des terriers artificiels plutôt que la population de puces ait passé l'hiver dans les galeries.

La présence de l'hôte n'était pas un facteur limitant dans notre protocole. Cependant, la mortalité de lapins observée dans les sites du Nord et de la Loire-Atlantique à la fin de l'expérience aurait pu être défavorable en raison de l'utilisation réduite des terriers. Néanmoins, compte tenu du climat et du substrat, un plus grand nombre d'hôtes n'aurait probablement pas changé les résultats, comme en Seine-Maritime où il y avait 13 lapins présents tout au long de l'étude.

Le statut reproductif de la population de puces dans toutes les expérimentations correspond aux valeurs observées dans la nature pour la majorité des espèces de puces.¹⁵ La proportion des femelles est importante, en particulier dans les terriers. Cela est probablement dû à une mortalité plus rapide des mâles, comme on l'observe dans nos élevages en laboratoire. Il est vrai aussi qu'ils se développent plus lentement que les femelles¹⁷ et ils auraient pu être sous forme de larves ou de nymphes dans les terriers. Or la sex-ratio des adultes trouvée dans les substrats est équilibrée (50-53 %) et non en leur faveur. En plus d'être plus nombreuses, les puces femelles sont aussi le plus souvent ovigères, ce qui est caractéristique des populations en croissance.⁸ De plus, un tiers des puces a été trouvé sur les lapins et deux tiers dans les garennes : ces chiffres sont cohérents avec les données de Cooke¹² et les observations faites dans notre élevage en laboratoire. L'écart type assez important de l'indice pulicidien observé dans toutes les expériences est probablement lié au fait que les lapins vivant dans des terriers peu infestés par les puces peuvent être moins parasités que les autres.

Dans les 4 parcs du nord de la France, nos résultats ont montré que les populations de puces sont vouées à disparaître plus ou moins rapidement. Des puces n'ont été récupérées que dans les garennes artificielles qui étaient bien mieux protégées de la pluie que les garennes naturelles; aucun adulte de *Xenopsylla* n'a émergé des substrats prélevés dans les terriers naturels. Dans la nature, sans cette protection, nous soutenons que leur disparition serait plus rapide. En outre, le protocole de cette étude avait délibérément favorisé les puces, au moins en termes de ressources alimentaires (densité de lapins élevée, nourriture en poudre pour les larves) et par le grand nombre de puces adultes initialement lâchées (par rapport à la quantité qui serait recommandée pour la vaccination des lapins, non par rapport au nombre de puces présentes sur les animaux à l'état sauvage^{8,13,17,36}).

Il n'a pas été possible de répéter ces expériences sur plusieurs années pour évaluer l'impact des variations climatiques, mais les données climatiques existantes³⁰ (et meteofrance.com) confirment que le climat est généralement impropre au développement de *X. cunicularis*. Ces résultats indiquent clairement que le risque de développement de *X. cunicularis* dans toute la moitié nord de la France est extrêmement faible en raison principalement des basses températures et des précipitations élevées réparties uniformément sur toute l'année.³⁰ Dans la partie nord-est de la France, *X. cunicularis* rencontrerait un climat encore plus froid et plus humide que dans les sites testés, ce qui rend l'installation des puces peu probable. Dans la région centrale, les conditions climatiques sont tempérées comme dans la Marne, mais nous avons vu que même avec un substrat sableux le développement des puces n'a pas été possible dans les terriers naturels. Dans la partie Ouest, les températures sont plus chaudes en raison des influences océaniques, mais les précipitations sont aussi plus importantes, comme en Loire-Atlantique. Même avec un substrat sableux, souvent rencontré dans les zones côtières,

ces caractéristiques ne pourraient pas permettre le développement des puces et leur installation durable.

Des garennes naturelles étanches semblables à celles de la Marne pourraient être trouvées dans le nord de la France uniquement si, localement, la topographie et le substrat permettaient un bon drainage du sol et surtout si elles étaient creusées sous des structures qui empêcheraient la pluie de pénétrer dans le sol (construction, tôle abandonnée, etc). Ces conditions sont rares mais, néanmoins, qu'arriverait-il si quelques puces persistaient temporairement dans le nord de la France? Le risque de dispersion semble faible car des puces transportées par des lapins, des hôtes accidentels tels que prédateurs ou autres mammifères fouisseurs¹⁵ ne pourraient survivre et s'établir que si elles étaient déposés dans un terrier de lapin approprié pour les raisons observées dans cette étude. Du fait de sa grande spécificité et de ses exigences écologiques strictes, la propagation de *X. cunicularis* serait beaucoup plus difficile que celle observée depuis les années 2000 pour les tiques *Ixodes ricinus* et *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae) en Europe.⁴¹ Une compétition avec d'autres espèces de puces de lapin (par exemple l'espèce très répandue et bien adaptée *Spilopsyllus cuniculi*) est peu probable car elles ne partagent pas la même niche écologique. En ce qui concerne la transmission de maladies, on pourrait penser que lâcher des *X. cunicularis* pourrait augmenter la transmission d'agents pathogènes déjà existants dans les populations de lapins. La maladie la plus importante transmise par les insectes chez le lapin est la myxomatose. Il est important ici de revenir à la raison initiale de ce travail, à savoir l'utilisation de *X. cunicularis* comme vecteur potentiel d'un vaccin contre le virus de la myxomatose (et de la VHD). Le risque de transmission de cette maladie mortelle est peu probable dans les populations vaccinées dans lesquelles cette puce serait présente. Selon nos observations, les avantages liés à la vaccination dans les programmes de gestion et de conservation du lapin l'emportent largement sur les risques d'un établissement improbable de *X. cunicularis*.

Ainsi, nos essais d'implantation suggèrent que cette puce peut être lâchée dans le nord de la France avec un risque d'impact négatif minime. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés dans des conditions plus chaudes et plus sèches dans le sud de la France, où cette espèce peut trouver des zones potentiellement favorables.

Remerciements

Nous remercions la Fédération Départementale des Chasseurs de Seine-Maritime, la Société de chasse de Saint-Hubert dans le Nord, et les associations ANCLATRA de la Marne et de Loire-Atlantique, pour leur implication dans toutes les expérimentations. Nous sommes également reconnaissants à Magalie Claeys-Bruno pour les analyses statistiques, et le Dr Brian Cooke, le professeur Jean-Claude Beaucournu, et le Dr Elisabeth Tabone pour leurs commentaires dans les versions antérieures de ce manuscrit.

Financement

Nous sommes reconnaissants à la Fédération Nationale des Chasseurs de France pour leur soutien financier.

Contributions des auteurs

Conception et développement des expériences: ADV. Analyse des données: ADV. Ecriture de la première version du manuscrit: ADV. Contribution à la rédaction du manuscrit: AA.

Accord avec les résultats et les conclusions du manuscrit: ADV, AA, PB. Tous les auteurs ont relu et approuvé le manuscrit final.

Intérêts concurrents

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts potentiels.

Références

1. Joubert L, Lephteriotis E, Mouchet J. *Les Maladies Animales à Virus: la Myxomatose*, Paris: Expansion Scientifique Française; 1973.
2. Morisse JP, Le Gall G, Boilletot E. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1991;10:283-295.
3. Devillard S, Aubineau J, Berger F, Léonard Y, Roobrouk A, Marchandeau S. Home range of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in three contrasting French populations. *Mammal Biology*. 2008;73:128-137.
4. Delibes-Mateos M, Ferreras P, Villafuerte R. European rabbit population trends and associated factors: a review of the situation in the Iberian Peninsula. *Mammal Review*. 2009;39:124-140.
5. Saurat P. *Procédé de vaccination de lapins sauvages (Oryctolagus cuniculus L.) contre la myxomatose à l'aide d'insectes vecteurs porteurs d'un virus-vaccin non pathogène [Patent]*. FR 2593397 (A1); 1987.
6. Yamamoto DS, Nagumo H, Yoshida S. Flying vaccinator; a transgenic mosquito delivers a *Leishmania* vaccine via blood feeding. *Insect Molecular Biology*. 2010;19:391-398.
7. Beaucournu J-C. Les puces du Lapin de Garenne, *Oryctolagus cuniculus* (L.). In: Traub R, Starcke H, eds. *Fleas - Proceedings of the International Conference on Fleas*. Ashton Wold, Peterborough, UK; 1980:383-389.
8. Launay H. Approche d'une prophylaxie de la myxomatose: écologie des puces du lapin de garenne. *Bulletin mensuel de l'Office National de la Chasse*. 1980:213-241.
9. Mead-Briggs AR, Rudge AJB. Breeding of the rabbit flea, *Spilopsyllus cuniculi* (Dale): requirement of a 'factor' from a pregnant rabbit for ovarian maturation. *Nature*. 1960;187:1136-1137.
10. Mead-Briggs AR, Vaughan JA. Some requirements for mating in the rabbit flea, *Spilopsyllus cuniculi* (Dale). *Journal of Experimental Biology*. 1969;51:495-511.
11. Launay H. Données préliminaires sur l'écologie de *Xenopsylla cunicularis* (Siphonaptera: Pulicidae), parasite du lapin de garenne. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 1982;57:145-163.
12. Cooke BD. Notes on the comparative reproductive biology and the laboratory breeding of the rabbit flea *Xenopsylla cunicularis* Smit (Siphonaptera: Pulicidae). *Australian Journal of Zoology*. 1990;38:527-534.
13. Osácar-Jimenez J-J, Lucientes-Curdi J, Calvete-Margolle C. Abiotic factors influencing the ecology of wild rabbit fleas in north-eastern Spain. *Medical and Veterinary Entomology*. 2001;15:157-166.
14. Launay H, Beaucournu J-C. Critères taxinomiques et essai de paléobiogéographie de 2 espèces jumelles, *Xenopsylla ramesis* Roth. 1904 et *X. cunicularis* Smit 1957

- (Siphonaptera: Pulicidae): approche biométrique. *Annales de la Société Entomologique de France*. 1982;18:43-54.
15. Beaucournu J-C, Launay H. *Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin Méditerranéen Occidental - Faune de France 76*. Paris: Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles; 1990.
 16. Cooke BD, Bartholomaeus FW. *Application to release the Spanish Rabbit Flea Xenopsylla cunicularis Smit 1957 as a vector of myxomatosis for the control of wild rabbits Oryctolagus cuniculus (L.)* [Report]. Adelaide: Animal and Plant Control Commission; 1992.
 17. Vallier A. *Bio-écologie de 2 espèces de puces, Spilopsyllus cuniculi Dale 1878 et Xenopsylla cunicularis Smit 1957 ectoparasites spécifiques d'Oryctolagus cuniculus L. 1758 – Applications à la mise au point de leur élevage et d'une méthode de lâcher sur le terrain* [dissertation]. Aix-Marseille I; 1997.
 18. Bárcena J, Morales M, Vázquez B, et al. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *Journal of Virology*. 2000;74:1114-1123.
 19. Guo Z, Yu Q, Wang Yu, et al. Construction of recombinant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) vaccine using myxoma virus (MV) as a vector. Paper presented at: 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering; May 10-12, 2011; Wuhan, China.
 20. Fenner F, Marshall ID. A comparison of the virulence of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *Journal of Hygiene*. 1957;55:149-191.
 21. Toma B, Dufour B, Sanaa M, et al. *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. Maisons-Alfort: Association pour l'Étude de l'Épidémiologie des Maladies Animales; 1996.
 22. Beaucournu J-C, Launay H. Présence en France d'une *Xenopsylla* selvatique *X. cunicularis* Smit 1957 (Siphonaptera: Pulicidae), parasite du lapin de garenne. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 1977;70:299-301.
 23. Darries-Vallier A, Beaucournu J-C. Contribution à l'étude de l'aire de répartition de *Xenopsylla cunicularis* Smit 1957 (Siphonaptera: Pulicidae), ectoparasite spécifique du lapin de garenne *Oryctolagus cuniculus* L. 1758 (Lagomorpha): nouvelles stations dans le sud-ouest de la France. *Bulletin de la Société Entomologique de France*. 2010;115:159-165.
 24. Launay H. Facteurs écologiques influençant la répartition et la dynamique des populations de *Xenopsylla cunicularis* Smit 1957 (Insecta: Siphonaptera), puce inféodée au lapin de garenne *Oryctolagus cuniculus* L. *Vie et Milieu*. 1989;39:111-119.
 25. Cooke BD. Rabbit burrows as environments for European rabbit flea, *Spilopsyllus cuniculi* (Dale), in Arid South Australia. *Australian Journal of Zoology*. 1990;38:317-325.
 26. Sutherst RW, Maywald GF. Climate modelling and pest establishment. Climate-matching for quarantine, using CLIMEX. *Plant Protection Quarterly*. 1991;6:3-7.
 27. Cooke BD. Computer modelling for the biological control of wild rabbits. *Australian Rural Science Annual*. 1992;20-23.
 28. Cooke BD. Spanish rabbit fleas *Xenopsylla cunicularis* in arid Australia: a progress report. *Proceedings of the 10th Australian Vertebrate Pests Conference*, Hobart. 1995:399-401.

29. Mutze GJ. *Release of Spanish rabbit fleas as vectors of myxomatosis in inland Australia* [Report]. Adelaide: Animal and Plant Control Commission; 1996.
30. Kessler J, Chambraud A. *La météo de la France: tous les Climats Localité par Localité*. Paris: Lattès JC; 1990.
31. Myers K, Poole WE. A study of the biology of the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* L., in confined populations. III: Reproduction. *Australian Journal of Zoology*. 1961;10:1-41.
32. Farabollini F. Social organization of experimental unisex colonies of male and female rabbits. In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigiani S, eds. *Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher; 1989:399-410.
33. Albonetti ME, Dessí-Fulgheri F, Farabollini F. Intrafemale agonistic interactions in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Aggressive Behavior*. 1990;16:77-86.
34. Albonetti ME, Dessí-Fulgheri F, Farabollini F. Organization of behavior in unfamiliar female rabbits. *Aggressive Behavior*. 1991;17:171-178.
35. Cowan DP, Bell DJ. Leporid social behaviour and social organization. *Mammal Review*. 1986;16:169-179.
36. Osácar J-J, Lucientes J, Peribañez MA, Gracia MJ, Castillo JA. Seasonal abundance of fleas (Siphonaptera: Pulicidae, Ceratophyllidae) on wild rabbits in a semiarid area of northeastern Spain. *Journal of Medical Entomology*. 2001;38:405-410.
37. Mykytowycz R, Rowley I. Continuous observations of the activity of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.), during 24 hour periods. *CSIRO Wildlife Research*. 1958;3:26-31.
38. Snow AE, Horita A. Interaction of apomorphine and stressors in the production of hyperthermia in the rabbit. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1982;220:335-339.
39. Bartlett MS. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Statistical Society, London, Series A*. 1937;160:268-282.
40. Mathieu D, Nony J, Phan-Tan-Luu R. *Logiciel NEMRODW*. Marseille: LPRAI; 2009.
41. Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009;2009:5932