



Figure 19. Diagramme d'une boîte de kartman normale (A) et modifiée par addition de grillage (B).

a. compartiments pour l'insecticide, **b.** compartiment pour l'appât, **c.** appât, **d.** grillage fixé aux parois de la boîte mais pas au couvercle. Les flèches indiquent le mouvement des rongeurs.



Figure 20. Tube à appât pour cibler les puces et les tiques de rats sauvages.

Le rongeur est en contact avec le tissu imprégné d'insecticide (Lane et al 1998).

2.2.3. Les insecticides systémiques

L'utilisation d'insecticide systémique fait aussi partie des méthodes ciblant les puces sur leur hôte. Cette méthode a été expérimentée dans des foyers de peste surtout à cause de son coût réduit et de sa précision par rapport à l'épandage d'insecticide en poudre (Gratz et al 1980, Borchert et al 2001, Leirs et al 2001, Rood and Poché 2010). Nous avons étudié la faisabilité d'une telle technique en laboratoire sur *X. cheopis* en utilisant le fipronil (Article 6). Le choix de l'insecticide a été motivé par son accessibilité (utilisé contre les termites), et ses propriétés qui permettent de faire une comparaison de son efficacité par contact et par la voie systémique. C'est un insecticide qui n'a jamais été utilisé contre les puces des rats à Madagascar. Par ailleurs aucune résistance à cette famille d'insecticide (phenylpyrazole) n'a

encore été enregistrée, même si une résistance croisée aux cyclodiènes pourrait exister (Bass et al 2004a, Kristensen 2005). Nos résultats ont montré que cet insecticide est plus toxique par voie orale que par contact, en induisant une mortalité importante chez des populations que nous avons trouvées les plus résistantes à d'autres insecticides (Article 3). La précision des résultats pourrait être améliorée avec un plus grand nombre de rats inclus dans le test. Une partie des puces utilisées au cours des tests a été tuée par le comportement de toilettage du rat. Un dispositif de contention plus adapté aurait évité cette mortalité non liée à l'effet du fipronil (Johnson et al 2014). L'utilisation de produit pur serait une amélioration pour la précision des dosages (Leirs et al 2001).

Pour évaluer l'utilisation opérationnelle de cette technique, un essai sur terrain a aussi été effectué comme une étude pilote visant à développer les méthodologies nécessaires pour mener à bien une lutte anti vectorielle (données non publiées). Lors de cette étude sur terrain, les appâts contenant l'insecticide systémique (Article 5) ont été dispersés dans un village dans des boîtes de kartman (82 boîtes). De la farine de blé a été déposée dans les boîtes de kartman contenant l'appât afin de repérer les traces du passage des rongeurs visitant les boîtes. Cette étude a été menée en saison sèche (août 2015) et les appâts ont été déposés à l'intérieur et à l'extérieur des maisons. Après une semaine, les rongeurs de ce village ont été capturés (pièges Sherman et BTS) puis épucés pour établir l'indice pulicidien entre les rongeurs qui ont consommé ou non l'insecticide systémique. Un colorant incorporé dans l'appât et visualisable sous microscope à fluorescence dans les poils et les vibrisses des rongeurs ont permis d'identifier les rongeurs qui ont consommé l'appât contenant l'insecticide (Rahelinirina et al 2010).

Comme principaux résultats, nous avons trouvé que la grande majorité des appâts a été consommée, ce qui atteste de l'appétence de la nourriture et un bon emplacement des appâts, contrairement à ce qui a été trouvé dans certaines études (Borchert et al 2001, Leirs et al 2001). L'observation de la fluorescence due à la présence de rhodamine sur les poils a montré que 2 puces se trouvaient sur les rongeurs marqués ($n=15$, indice pulicidien $=0,13$), contre 10 puces sur les rongeurs non marqués ($n=11$, indice pulicidien $=0,9$). Malgré les limites de cette étude préliminaire dans le temps et l'espace (absence de village témoin), le faible indice pulicidien observé chez les rats marqués par rapport à ceux non marqués pourrait être attribué à l'effet de l'insecticide systémique. Cette étude a aussi permis d'identifier des problèmes et proposer des solutions pour la mise en œuvre sur terrain de la méthode. Comme perspective, il serait nécessaire d'effectuer des captures préliminaires, d'ajouter des villages témoins, de faire le traitement dans au moins deux villages et enfin, de faire des captures échelonnées pour voir l'effet du traitement dans le temps.

D'autres insecticides ayant une propriété systémique ont été testés en laboratoire ou sur terrain. Par exemple, une efficacité sur le terrain au bout de 7 jours a été rapportée avec l'imidacloprid (neonicotinoïde). Cependant l'attractivité de l'appât contenant cet insecticide a été problématique (Borchert et al 2001). Ce même insecticide a permis de réduire de 98% l'indice pulicidien de *R. norvegicus* en seulement 48 heures à Los Angeles, démontrant ainsi un fort effet à court terme (Rood and Poché 2010). Au cours d'une étude sur terrain, un régulateur de croissance, le fluazuron a été utilisé avec succès pour réduire l'indice pulicidien chez les rongeurs (Slowik et al 2001). Ces insecticides ont des modes d'actions différents du fipronil et pourraient être utilisés en alternance pour diminuer la pression insecticide.

Autres insecticides alternatifs pour la lutte contre les puces de rat

Pour contrer les mécanismes de résistance développés par les insectes aux insecticides conventionnels, de nouvelles molécules ayant des structures et des cibles différentes ont été élaborées (Nauen 2007). Ces molécules sont largement utilisées pour contrôler les parasites des animaux domestiques notamment *C. felis*, mais peu d'études ont été faites sur les puces de rat (Rust and Dryden 1997, Rust 2005, Beugnet and Franc 2012). Les IGR (Insect Growth Regulator) empêchent le développement des larves en inhibant la nymphose (méthoprène, pyriproxyfène) ou la synthèse de chitine (diflubenzuron) (Beugnet and Franc 2012). Des tests en laboratoire ont montré l'activité du méthoprène en inhibant l'émergence de *X. cheopis* adulte (Chamberlain and Becker 1977). Le pyriproxyfène et le méthoprène peuvent agir par contact et ont des actions ovicides chez les femelles de *C. felis* (Rust and Dryden 1997). Nous avons vu plus haut que ces IGR peuvent aussi réduire la densité des adultes et agir par la voie systémique (Slowick 2001). Les IGR ont été utilisés en application topique sur les chiens et les chats (Beugnet and Franc 2012), et une adaptation pour contrôler les puces des rats, utilisant un dispositif proche des boîtes à appâts a été mise en œuvre avec succès en Ouganda (Boegler et al 2014).

Concernant les insecticides d'origine biologique, les conidies des champignons de l'espèce *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* réduisent la survie des larves de *X. brasiliensis* (Mnyone et al 2012). L'acide nodulisporique est un insecticide extrait du champignon *Nodulisporium sp* (Ondeyka et al 1997). Ses propriétés systémiques ont été testées avec succès contre *C. felis* en réduisant leur densité de 99% après 48 heures d'administration par voie orale ou cutanée chez les chiens (Shoop et al 2001). La toxine bactérienne dérivée de *Bacillus thuringiensis* avait induit une mortalité chez les larves de *X. cheopis* et différentes malformations chez les adultes (Maciejewska et al 1988). Les insecticides qui agissent en ciblant les stades immatures sont parfois utilisés avec des insecticides qui ciblent les adultes (Rust and

Dryden 1997, Boegler et al 2014). Ces nouvelles molécules constituent des alternatives de plus en plus étudiées en laboratoire et sur terrain afin de contrôler les puces des rats (Borchert et al 2001, Leirs et al 2001, Boegler et al 2014).

2.2.5. Lutte intégrée et surveillance

Une stratégie de lutte intégrée considérant les méthodes de lutttes disponibles et une utilisation rationnelle des outils de lutte doit être mise en place. La lutte intégrée vise non seulement à limiter la densité des vecteurs au-dessous d'un seuil tolérable, mais également à prévenir, retarder ou limiter le développement de la résistance (Corbel 2011). L'utilisation d'un seul insecticide jusqu'à ce que la population cible développe les signes d'une résistance à l'insecticide est un facteur qui limite le nombre d'insecticide à utiliser (Hemingway and Ranson 2000). Lors de notre étude sur la sensibilité de *X. cheopis* à la deltaméthrine, la plupart des populations testées présentaient déjà une résistance à cet insecticide alors qu'il était encore utilisé (Ratovonjato 1998, Ratovonjato et al 2000). Cette étude avait permis remplacer la deltaméthrine par le fénitrothion en riposte insecticide lors des épidémies de peste (Organisation Mondiale de la Santé 2016, Rakotoarisoa et al 2016). Cependant il ne faut pas oublier que la résistance des puces à cet insecticide a été déjà signalée auparavant chez quelques populations (Coulanges and Randrianantoanina 1984b) et qu'une résistance généralisée à cet insecticide va se développer rapidement si des mesures de gestion de la résistance ne sont pas appliquées. Une détection précoce du problème permettrait de mettre en œuvre des stratégies pour gérer la résistance, d'où l'intérêt d'une surveillance constante de la sensibilité des puces aux insecticides, en intégrant les aspects biochimique et moléculaire.

Afin de prévenir le développement de la résistance, la gestion par «modération» peut être appliquée, en choisissant un insecticide peu rémanent qui minimise la pression de sélection sur la population (Corbel 2011). Dans notre étude sur terrain (Article 5), l'utilisation du fénitrothion entraînait une diminution de la densité des puces des rats après 48 heures, mais son action disparaissait au bout d'un mois. Donc le fénitrothion peut être considéré comme efficace mais peu rémanent, répondant parfaitement à la gestion par modération.

La gestion par «combinaison ou synergie» d'insecticide et «rotation» d'insecticide est recommandée, dans la mesure où une résistance croisée aux insecticides utilisés n'existe pas chez la population cible. Par exemple une combinaison fipronil–fenoxycarb/méthoprène alliant insecticide à effet résiduel et IGR a donné de bons résultats contre les puces (Dryden et al 1989, Boegler et al 2014).

La rotation d'insecticide repose sur la théorie selon laquelle la fréquence du génotype de résistance pour chaque composé décline rapidement en leur absence, due à une dilution de la résistance par immigration ou par sélection naturelle, ou les deux en même temps (Roush and Mckenzie 1987). Notre étude sur la sensibilité des puces à 12 insecticides offrait au moins 4 insecticides appartenant à deux familles comme alternatives pour la rotation d'insecticide pour chaque population (Article 3). Cependant sans les données concernant les mécanismes impliquées dans la résistance de *X. cheopis* aux insecticides, il sera difficile d'appliquer la stratégie par combinaison d'insecticide.

Il serait intéressant d'adopter deux insecticides différents pour la riposte et la surveillance. Par exemple, les insecticides systémiques pourraient être utilisés lors des campagnes de surveillance, en réduisant la densité pulicidienne avant la saison de transmission ou lors d'une augmentation anormale de l'indice pulicidien dans les zones à risque comme les prisons (Rood and Poché 2010).

La surveillance de la peste est un élément clé qui a permis à certains pays en zone endémique de peste de réduire, voire même d'éradiquer les cas de peste humaine pendant des décennies. Des pays comme l'Inde et le Kazakhstan avaient conduit de façon planifiée et régulière des activités de surveillance entomologique et zoologique et n'ont pas eu de cas de peste déclaré entre 2010 et 2015 (Bertherat 2016). Mais cette surveillance est coûteuse et complexe, et finit trop souvent par être négligée en l'absence de cas humains.

A Madagascar, comme dans la plupart des pays africains, la surveillance est plutôt réactive que proactive, et s'effectue après que des cas de peste aient été déclarés. Elle est encore plus difficile à mettre en œuvre et à pérenniser du fait d'une vaste zone de répartition (Hautes Terres centrales) et une apparition aléatoire des cas de peste, contrairement à d'autres pays comme l'Ouganda où la distribution des cas de peste se cantonne dans une superficie de 1200 km² (Laudisoit et al 2007). Par ailleurs, à Madagascar les districts touchés augmentent annuellement et des cas ont été déclarés récemment en dehors des zones d'endémie habituelle (Andrianaivoarimanana 2013, Rakotoarisoa et al 2016, Organisation Mondiale de la Santé 2016).

Les campagnes de surveillance dans la capitale de Madagascar ont été arrêtées faute de financement, et ont probablement contribué à la réapparition des cas de peste dans les environs (Andrianaivoarimanana et al 2013). Ces campagnes de surveillance entrepris vers les années 90 avaient abouti à des traitements insecticides préventifs (voir 1.2.) considérés comme responsables de la sélection de puces résistantes aux insecticides. Ainsi, la surveillance ne peut être maintenue que dans les zones qui accumulent les

facteurs de risque, comme dans les grands marchés, les quartiers inondables et les prisons (Raharimanga et al 2001, Guis 2003).

Il serait recommandé de poursuivre la surveillance murine et entomologique : l'objectif de la surveillance étant d'obtenir les indicateurs de risque de peste utiles à la prise de décisions et à l'adaptation des mesures de lutte contre la peste, de signaler précocement le risque de survenue de la maladie chez les humains et d'évaluer l'extension géographique de ce risque. Cependant, les traitements préventifs ne sont préconisés que si les risques sont avérés et que si les traitements sont efficaces (réduit effectivement l'indice pulcidien). Ils doivent être mis en œuvre en respectant les mesures de lutte intégrée comme l'utilisation raisonnée des insecticides, la rotation d'insecticide, l'intégration de différentes stratégies de lutte à l'instar des insecticides systémiques, les boîtes de kartman et surtout la prise en compte du statut de sensibilité des puces dans le choix des insecticides.

2.3. Conclusion

Les stratégies de lutte anti-vectorielle contre les puces vectrices à Madagascar n'avaient pas vraiment changé depuis l'utilisation du DDT en 1947. L'utilisation d'un seul produit insecticide jusqu'à ce que les puces développent une résistance doit être abandonnée, au profit d'une lutte plus variée en intégrant de nouvelles techniques et de nouvelles approches dans la lutte. Les stratégies de lutte doivent aussi prendre en compte le contrôle de la qualité des produits insecticides, une gestion rationnelle des stocks et choisir le moyen opérationnel le plus adapté aux contraintes des épidémies. La boîte de kartman semble être un outil prometteur, mais il faut encore continuer son évaluation en intégrant d'autres paramètres discutés dans cette étude. Il est essentiel de préciser que toutes les stratégies utilisant un ou plusieurs insecticides doivent prendre en compte le statut de sensibilité de populations visées. Ainsi, la surveillance de la sensibilité des puces aux insecticides doit être continue

3. Evaluation de la sensibilité des puces aux insecticides: limites et perspectives

3.1. Perspectives pour la dose diagnostique et le support d'exposition

3.1.1. La dose diagnostique

Dans tous nos tests insecticides, nous avons utilisé le protocole préconisé par l'OMS pour tester la sensibilité des puces aux insecticides. Ce protocole implique l'utilisation d'une dose diagnostique pour chaque insecticide (World Health Organization 1970). L'utilisation de papiers avec des concentrations standardisées peut avoir quelques inconvénients. Les concentrations utilisées sont les mêmes que pour les moustiques (World Health Organization 2016). D'ailleurs, les protocoles de tests développés pour les puces de rat et les autres insectes d'intérêt médical ont été développés à partir du test de sensibilité des moustiques (Patel et al 1960, Busvine and Lien 1961). Il est peu probable qu'une concentration unique pour un insecticide donné puisse être discriminante pour des insectes appartenant à des ordres différents, avec toutes les différences biologiques et physiologiques que cela implique. Lors du développement du test en bouteille (CDC bottle bioassays) il a été mentionné que le principal inconvénient de la méthode OMS était l'impossibilité de tester plusieurs concentrations, alors qu'une seule dose diagnostique n'est pas applicable pour tous les vecteurs (Brogdon and McAllister 1998b). Dès lors, ce protocole propose des temps et doses diagnostiques différents pour *Anopheles sp* et *Aedes sp* (Brogdon and Chan 2010). Une étude sur l'efficacité de l'étofenprox permet de mettre en évidence deux doses diagnostiques différentes pour *Anopheles sp* et *Culex sp*. (Hemingway 1995). Plus tard, le protocole développé par l'OMS pour tester la sensibilité d'*Aedes sp* aux insecticides implique des doses diagnostiques autres que pour *Anopheles sp* alors que ces deux espèces appartiennent à une même famille (World Health Organization 2016).

Ce protocole a été pourtant utilisé depuis des années et dans différents pays pour tester la sensibilité des puces de rat aux insecticides (Patel et al 1960, Sharma and Joshi 1961, Chow 1970, Coulange et al 1982, Coulanges and Randrianantoanina 1984a, 1984b, Renapurkar 1990, Mourya et al 1998, Ratovonjato 1998, Ratovonjato et al 2000, Shelly et al 2014, Biswas et al 2015, Soliman et al 2015). Les résultats de ces tests démontrant la résistance de certaines populations aux insecticides ont pu être corrélés à une défaillance opérationnelle du produit testé sur le terrain, (Gratz 1980, Liat et al 1987, Ratovonjato 1998, Laventure et al 1998). Donc cet aspect du protocole est à revoir. Il serait conseillé de vérifier avec une population sensible de référence les doses diagnostiques pour chaque insecticide (voir 3.2.4).

3.1.2. Le support du test

Face aux nombreux problèmes posés par l'utilisation des papiers imprégnés d'insecticides aux doses fournies par l'OMS, y compris son coût élevé, d'autres supports imprégnés ont été développés (Brogdon and McAllister 1998b). Les tests en bouteille mis au point par le CDC semblent mieux répondre aux

besoins opérationnels des tests insecticides sur les moustiques en permettant de tester un grand nombre de concentrations et de molécules (Brogdon and McAllister 1998b, Aïzoun et al 2013). Le protocole fut élaboré pour tester des insectes volants, mais une adaptation pour les insectes rampants comme les puces est nécessaire (Ames 2011). Ce type de test a été adapté pour tester la sensibilité d'insectes d'intérêt économique en utilisant des flacons en verre imprégnés (Plapp et al 1987, 1990, Graves et al 1988, Xu et al 2001, Ribeiro et al 2003, Steelman et al 2008, Miller et al 2010). Ainsi, l'application de cette technique pour tester la sensibilité des puces aux insecticides mériterait d'être explorée. Des essais ont été entrepris en exposant des *X. cheopis* adultes dans des boîtes de pétri en verre imprégnées d'insecticide (Ames 2011). Cette méthode fut inspirée par celle du CDC et utilisant des souches sensibles de référence pour sa mise en place.

L'application topique d'insecticide sur chaque individu serait la meilleure approche pour évaluer la toxicité d'un produit sur les puces de chat, éliminant les facteurs liés aux supports d'exposition (Rust et al 2015, Rust 2016). Pourtant cette technique requiert une immobilisation de la puce, obtenue par refroidissement ou exposition au gaz carbonique. Néanmoins l'immobilisation au CO₂ a été rapportée comme pouvant augmenter la mortalité des puces (Bossard et al 2000). L'exposition au froid ne semblait pas induire une mortalité chez les puces non exposées, mais une corrélation a été trouvée entre la mortalité liée à l'insecticide étudié (chlorpyrifos) et la durée d'exposition au froid (El-Gazzar, et al 1988). Cette méthode pourrait être envisageable pour tester les puces de rat, mais elle est plus difficile à mettre en œuvre.

3.2. Recommandations pour les populations testées

3.2.1. Amélioration de l'échantillonnage

La plupart du temps, les collectes de puces en vue d'effectuer les tests insecticides se sont déroulées à la suite d'une campagne de dératisation et de désinsectisation dans les prisons, les quartiers vulnérables, mais également lors des investigations post-épidémiques (Ratovonjato 1998, Ratovonjato, et al 2000, Rakotoarisoa et al 2016). Par exemple, dans notre étude sur la sensibilité des puces des prisons, pour les populations de puce de la prison d'Antanimora, même si la pression insecticide semble plus conséquente dans une prison de la capitale, cette population a été collectée dans la prison juste après une campagne de désinsectisation, ce qui pourrait expliquer le faible taux de mortalité observé lors du test. Les tests insecticides ont donc été effectués sur les puces déjà sélectionnées par les traitements insecticides, ce qui peut constituer un biais en faveur de la résistance. Par ailleurs il a déjà été constaté que les

populations de puces montraient plus de résistance dans les localités où la collecte a été faite après une campagne de traitement insecticide (Ratovonjato 1998, Ratovonjato et al 2000).

Il serait alors recommandé de faire des collectes dans les zones non traitées lors des épidémies ou lors des programmes de surveillance de la population murine. Une autre approche qui aurait pu confirmer une sélection par traitement insecticide, aurait été de faire une comparaison de la sensibilité des puces aux insecticides avant et après traitement. Il a été trouvé par ailleurs avec une étude sur terrain que les puces collectées après traitement avaient un CL50 trois fois élevé que celles collectées avant traitement et dans les villages témoins (Liat et al 1982).

3.2.2. L'effet élevage et générations testés

Au cours de nos tests insecticides, il a été essentiel de mettre en élevage les puces collectées sur le terrain pour pouvoir obtenir le nombre requis d'individus pour réaliser les différents tests (Article 1). Cependant lors des collectes sur terrain, un échantillonnage non exhaustif des génotypes de la résistance a pu s'opérer. Lors de la colonisation en laboratoire, un goulot d'étranglement génétique a pu avoir lieu et ainsi, la souche d'élevage n'arriverait plus à représenter la diversité génétique de départ car les allèles majeurs conférant la résistance ne sont plus présents, ou inversement (Hamon and Mouchet 1961, Roushe and Mckenzie 1987). La taille de l'échantillonnage initiale sur terrain a été trouvée décisive pour avoir une bonne représentation de la variabilité génétique de la population étudiée (World Health Organization 2016). Chez les puces de chat, des tests ont été faits sur une colonie élevée en laboratoire depuis 9 à 12 mois; ensuite le même test a été répété 4 ans plus tard, ayant comme résultat une diminution de la résistance aux organophosphorés (El-Gazzar et al 1988). Dans notre étude, la durée du temps passé à l'insectarium, et proportionnellement au nombre de générations successives au cours du temps d'élevage n'influaient pas sur la sensibilité aux insecticides (Article 2).

Néanmoins, l'idéal aurait été de tester directement les puces collectées sur terrains mais les contraintes de collecte et de survie des F0 ne le permettent pas dans la majorité des cas (Article 1). Il serait recommandé de planifier les tests insecticides dès qu'un nombre suffisant de puce est atteint. Ceci pourrait être réalisable avec les améliorations des techniques d'élevage (Article 1). Comme perspective, il serait intéressant de faire une étude qui vise à tester s'il y a un «effet génération» en séparant les générations et en comparant la sensibilité des puces à chaque génération.

3.2.3. Effet de l'âge et du sexe

Nous avons testé les puces de tout âge et sexe confondus. Pourtant l'âge semble être un facteur qui détermine la résistance au chlorpyrifos chez les puces du chat : les adultes âgés de plus de 48 heures étaient plus sensibles que les puces nouvellement émergées (El-Gazzar, et al 1988). Busvine et Lien ont trouvé que les femelles sont plus sensibles après une heure d'exposition (aux DDT et dieldrine). Néanmoins, cette différence ne semble plus être significative après 24 heures d'exposition (Busvine and Lien 1961). Une différence de mortalité entre les sexes n'a pas été mise en évidence chez les puces du chat exposées aux insecticides dans les mêmes conditions (Bossard et al 2000). Pour les moustiques, il n'est pas recommandé d'effectuer des tests sur les mâles à cause de leur durée de vie plus courte que chez les femelles ; et l'âge est un facteur qui influence le test avec une plus grande sensibilité chez les femelles âgées (World Health Organization 2016).

Il est donc envisageable de faire une étude de l'effet de l'âge et du sexe sur la sensibilité aux insecticides pour évaluer si ces facteurs peuvent biaiser les résultats des tests insecticides chez *X. cheopis*. Dans un premier temps, l'effet âge sera évalué en testant des puces avec des séries d'âge connues, puis l'effet du sexe sera évalué en séparant les mâles et les femelles.

3.2.4. Une souche sensible de référence

Dans les tests effectués, les témoins étaient des puces non exposées à l'insecticide mais exposées aux solvants de l'insecticide (World Health Organization 1970). Le but est de déterminer si la mortalité observée n'est pas due à d'autres paramètres inhérents aux conditions du test, comme la toxicité du solvant, la température et l'humidité relative. Le test est non valide s'il y a une forte mortalité chez ces témoins. Or dans le cas où il n'y a pas de mortalité après exposition sur papier traité, la survie des insectes exposés peut être attribuée à la résistance à l'insecticide testée ou à l'innocuité du produit, à une dose trop faible n'induisant pas de mortalité, à une mauvaise imprégnation ou conservation du support. De plus, la variabilité au sein d'une même espèce pourrait donner lieu à des réactions différentes vis-à-vis de l'exposition à un insecticide, indépendamment du phénomène de résistance (Bossard et al 1998).

Tester des puces sensibles de référence en même temps que les souches de terrains permettrait de donner plus de précision aux résultats des tests. Cette souche sensible servira aussi à mettre en place de nouvelles techniques d'exposition des puces aux insecticides (Bossard et al 1998). L'obtention d'une souche sensible de référence permettrait aussi d'évaluer la « *resistance ratio* » qui est la comparaison du CL50 ou DL50 entre souche testée et la souche sensible de référence (Hemingway 1995, Bossard et al

1998, Picollo et Vassena 2000). Ainsi il faut caractériser au moins une population n'ayant jamais subi de pression insecticide, par l'étude des mécanismes qui confèrent la résistance aux insecticides. Des tests effectués sur des puces collectées en dehors de la zone d'endémie de peste montraient quand même une résistance à quelques insecticides (Article 4). Des données issues de *X. cheopis* sensibles élevées dans le laboratoire du CDC (Fort Collins, Colorado, USA) ont été utilisées pour établir une ligne de base pour les tests effectués sur des souches collectées en Uganda (Ames 2011). Une autre possibilité serait de caractériser les populations maintenues en laboratoire depuis au moins une décennie sans pression insecticide intentionnelle, à condition que les gènes responsables de la résistance ne soient pas maintenues (Hamon and Mouchet 1961). Pour cela la description phénotypique de la sensibilité doit être appuyée par des études biochimiques et moléculaires.

3.3. Nouvelle perspective pour l'étude de la sensibilité de *X. cheopis* : étude biochimique et moléculaire de la résistance

Les études relatives aux mécanismes de résistance chez *X. cheopis* sont rares (Ames 2011). Une mesure des activités enzymatiques de *X. cheopis* avec la technique de chromatographie (en adaptant un protocole qui sert pour les moustiques) avait démontré pour la première fois l'évidence d'une résistance métabolique chez cette espèce (Ames 2011). Dans cette même étude, une mutation ponctuelle *kdr* a été détectée.

Néanmoins, plusieurs études effectuées sur *C. felis* constituent des pistes à explorer. Un test rapide sur papier a été développé afin d'analyser la production d'estérases chez les puces de chat. Cette technique simple avait permis d'évaluer le profil de résistance. L'examen de l'intensité de la couleur obtenue sur les papiers était consistant avec les résultats de migration sur gel des protéines (Kambhampati et al 1997)

Une autre approche pour détecter les mécanismes enzymatiques mis en jeu serait l'utilisation des synergistes. L'exposition préalable de poux de tête (*Pediculus capitis*) résistantes aux pyréthrinoïdes à des papiers imprégnés de piperonyl butoxide (PBO) et triphenyl phosphate (TPP) avait permis de faire diminuer significativement la CL50 lors d'expositions aux pyréthrinoïdes (Picollo and Vassena 2000). Ils en conclurent que les mono-oxygénases à cytochrome P-450s et les estérases étaient responsables, au moins en partie, de la résistance aux pyréthrinoïdes observée chez les populations de poux de tête. Une combinaison PBO-perméthrine avait permis de réduire le TL50 chez des *An. dirus* résistants à cet insecticide et d'en conclure à l'intervention des oxydases comme mécanisme de résistance. Ce résultat fut confirmé par les résultats de dosage enzymatique sur la même population (Brogdon et McAllister 1998).

Des tests PCR en laboratoire ont été mis en place pour cibler les gènes associés à la résistance aux pyréthrinoides et aux cyclodiènes chez *C. felis* (Bass et al 2004a, Brunet et al 2009, Coles and Dryden 2014). Une mutation *kdr* a été découverte ainsi qu'une autre variante conférant une résistance plus élevée (*Super-kdr*) (Bass et al 2004b).

Une étude des mutations ponctuelles (Single Nucleotide Polymorphisms ou SNPs) du gène codant pour une protéine des canaux sodium chez les tiques de bovidés avait permis de faire une corrélation entre l'occurrence des mutations et la résistance aux insecticide en laboratoire (Stone et al 2014). Ces recherches permettent de faire le suivi du développement de la résistance chez une population d'insecte et réduirait le recours aux « bioessais » et les contraintes.

Comme perspective pour les puces de Madagascar, les techniques précédemment citées peuvent être appliquées pour étudier la résistance de *X. cheopis* aux insecticides. Ces études nécessitent la disponibilité d'une souche sensible de référence. Les études citées ci-dessus sont autant de pistes à explorer pour la mise en place du dosage enzymatique chez les puces résistantes aux insecticides. Cette technique requiert la disponibilité d'un spectrophotomètre qui est un matériel coûteux. Cependant l'étude des effets des synergistes pourraient être mis en œuvre en développant les techniques adaptées. Par exemple pour étudier l'effet des synergistes, il sera essentiel de mener des études préliminaires pour déterminer une dose de synergiste non létale (Brogdon et McAllister 1998). Ensuite un protocole de test de type CDC utilisant des boîtes de pétri pourrait être développé pour être plus pratique dans l'utilisation simultanée des combinaisons synergistes-insecticides (Ames 2011). On pourrait alors partir des résultats de la résistance phénotypique pour le choix des populations et les insecticides à tester, en fonction des mécanismes enzymatiques attendus.

La détection du gène *kdr* par PCR serait envisageable chez les populations qui ont développé une résistance croisée à la deltaméthrine et au DDT. Cette technique est faisable en utilisant les amorces disponibles dans la littérature (Ames 2011, Bass et al 2004b). La même approche pourrait être envisagée pour la détection des autres gènes conférant la résistance aux insecticides comme *Rdl* et *Ace 1*.

3.4. Conclusion

Le protocole développé par l'OMS qui reste toujours le standard mondialement accepté pour tester la sensibilité des puces de rat aux insecticides s'avère obsolète. Il doit être complètement repensé et adapté aux puces, et non pas seulement calqué sur les tests de sensibilité des moustiques vecteurs de plasmodium. Au cours de nos études de la sensibilité des puces aux insecticides, nous avons pu identifier

des facteurs liés au protocole qui pourraient influencer les résultats. Entre autre une réactualisation des doses diagnostiques utilisées sur une population sensible est indispensable. La conception du protocole de test pour les puces doit prendre exemple sur ce qui se fait sur les autres vecteurs en donnant le plus de précisions possibles sur l'échantillonnage, la génération et l'état physiologique des puces testées. Des études doivent être menées pour analyser l'impact de ces paramètres sur le résultat des tests de sensibilité aux insecticides. Par ailleurs l'étude des mécanismes de résistance des puces aux insecticides peut apporter plus de pertinence aux descriptions phénotypiques de la résistance, qui reste le seul outil disponible.