

THESE DE DOCTORAT

Université de Neuchâtel (Suisse)

Université Paris Est (France)

---

Etude de l'impact de l'anthropisation sur l'écologie évolutive  
des vecteurs de la Maladie de Chagas, cas de trois  
communautés du Tapajós en Amazonie brésilienne

Pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

Marion Quartier

Soutenue à Neuchâtel le 14 décembre 2011

Présentée publiquement à Neuchâtel le 15 mars 2012

---

**Composition du jury:**

Prof. Myriam Harry, co-directrice de thèse, Université Paris Sud, France

Prof. Bruno Betschart, co-directeur de thèse, Université de Neuchâtel, Suisse

Dr Lise Gern, président du jury, Université de Neuchâtel, Suisse

Dr Carole Kerdelhué, rapporteur, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, Montpellier, France

Prof. Christian Lengeler, rapporteur, Institut Suisse de Médecine Tropicale et Santé Publique, Bâle, Suisse

Dr Christine A. Romaña, examinateur, Université Paris Descartes, France

Dr Virginie Roy, examinateur, Université Paris Est, France



## IMPRIMATUR POUR LA THESE

Etude de l'impact de l'anthropisation sur l'écologie  
évolutive des vecteurs de la Maladie de Chagas, cas de trois  
communautés du Tapajós en Amazonie brésilienne

### Marion Quartier

---

REALISEE EN COTUTELLE AVEC  
L'UNIVERSITE DE PARIS EST CRETEIL

et

L' UNIVERSITE DE NEUCHATEL (CH)  
FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,  
sur le rapport des membres du jury

Prof. Myriam Harry, Université de Paris-Sud (co-directrice de thèse),  
Prof. Bruno Betschart, UniNe (co-directeur de thèse),  
Dr Lise Gern (UniNe),  
Dr Carole Kerdelhué, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations,  
Montferrier-sur-Lez, F  
Prof. Christian Lengeler, Institut Tropical et de Santé Publique, Bâle,  
Dr Cristina Romaña, Université Paris 5,  
Dr Virginie Roy, Université Paris Est Créteil,

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 19 mars 2012

  
Le doyen :  
P. Kropf



*Que reste t-il de la vie, excepté d'avoir aimé*

Victor Hugo

A CABRAL et ADRIEN, petits princes aux cœurs si purs, qui nous ont quittés cette année sous la pleine lune et qui galopent ensemble dans les prairies éternelles, au pays des vertes années.

*Avec le soleil et le vent*

*Avec la pluie et le beau temps*

Georges Brassens



## Table des Matières

<b>I. Résumé .....</b>	<b>xi</b>
<b>II. Abstract.....</b>	<b>xiii</b>
<b>III. Resumo .....</b>	<b>xv</b>
<b>IV. Problématique Générale .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1. La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine.....	1
1.1.1. Distribution et prévalence .....	1
1.1.2. Cycle.....	2
1.1.3. Pathologie.....	4
1.1.4. Diagnostic et traitement.....	5
1.2. Trypanosomes .....	5
1.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.2.2. <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	8
1.3. Les Triatomes.....	8
1.3.1. Systématique, distribution et habitat .....	8
1.3.2. Dynamique de population cycle et comportement des Triatomes .....	11
1.3.3. Dispersion.....	12
1.3.4. Colonisation / Domiciliation / Domestication.....	14
1.4. Contexte spécifique de l'étude: la Maladie de Chagas en Amazonie .....	15
1.5. Le projet PLUPH.....	17
1.6. Objectifs et description de l'abordage méthodologique.....	18
<b>2. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>21</b>
2.1. Description du site d'étude.....	21

2.2.	Choix des palmiers .....	23
2.3.	Stratégie des zones d'échantillonnage .....	24
2.4.	Comparaison entre échantillonnages "objectif" et "effectif" .....	25
2.5.	Echantillonnage des triatomes.....	28
2.6.	Traitement des données de terrain.....	30
	2.6.1. Statistiques et calculs d'indices .....	30
	2.6.2. Images satellites .....	30
	2.6.3. Classification du paysage .....	31
2.7.	Identification morphologique des insectes.....	35
2.8.	Détermination visuelle de l'infection par <i>Trypanosoma cruzi</i> et <i>T. rangeli</i> .....	35
2.9.	Extraction ADN des insectes .....	36
2.10.	Amplification ADN mitochondrial Cytochrome b .....	36
2.11.	Détection moléculaire de l'infection par <i>T. cruzi</i> et <i>T. rangeli</i> .....	37
2.12.	Variabilité de <i>T. cruzi</i> .....	37
2.13.	Détection des sources d'alimentation des insectes.....	41
2.14.	Visualisation des produits amplifiés et séquençage .....	41
2.15.	Microsatellites et Génotypage.....	44
	2.15.1. Amplification.....	44
	2.15.2. Génotypage des individus .....	45
2.16.	Détection de <i>Wolbachia</i> .....	45
2.17.	Génétique des populations .....	46
	2.17.1. ADN mitochondrial, <i>cytochrome b</i> .....	46
	2.17.2. Définition des groupes d'analyse .....	47
	2.17.3. Polymorphisme mitochondrial .....	47
	2.17.4. Analyse démographique .....	48
2.18.	Génotypage (marqueurs microsatellites).....	49
	2.18.1. Différenciation génétique entre les populations .....	50
	2.18.2. AMOVA.....	50

2.18.3. Procédures d'assignation .....	51
2.18.4. Autocorrélation spatiale .....	51
2.18.5. Analyse de parenté .....	52
2.19. Autorisations .....	52
<b>3. Résultats.....</b>	<b>55</b>
<b>Article 1.....</b>	<b>57</b>
<b>Article 2.....</b>	<b>97</b>
<b>Article 3.....</b>	<b>131</b>
<b>Article 4.....</b>	<b>137</b>
<b>4. Discussion Générale.....</b>	<b>183</b>
<b>V. Références Bibliographiques.....</b>	<b>193</b>
<b>VI. Remerciements.....</b>	<b>215</b>
<b>VII. Annexes .....</b>	<b>219</b>



## I. Résumé

Les perturbations anthropiques en Amazonie liées au déboisement de la forêt tropicale conduisent à une mosaïque de paysages constituée principalement de forêts secondaires, palmeraies, jachères et pâturages. Ces modifications favorisent la prolifération de grands palmiers héliophiles invasifs du genre *Attalea*, palmiers qui constituent l'écotope principal des espèces de *Rhodnius*, punaises hématophages vectrices de *Trypanosoma cruzi*, l'agent étiologique de la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine en Amérique Latine.

Cette étude a porté sur différentes unités de paysage de trois communautés rurales du moyen Tapajós (Amazonie brésilienne) ayant une époque d'installation différente sur le territoire (25-75 ans). Six unités de paysage ont été définies sur le terrain et appliquées via une classification supervisée à une image SPOT 5, afin d'obtenir une cartographie du risque environnemental associé à la présence de palmiers dans la région.

Sur les cent trente trois palmiers disséqués appartenant aux trois espèces *Attalea maripa*, *A. phalerata* et *A. speciosa*, 73 (54.88%) étaient infestés par *R. robustus* (742 insectes récoltés). Des diminutions significatives de densité de triatomés ont été observées chez *A. maripa*, dans la communauté la plus récemment établie (Araipá) et dans les unités de paysage les plus anthropisées.

L'infection des insectes par *T. cruzi* et *T. rangeli* a été examinée à l'aide de méthodes moléculaires (mini exon SL\_IR and sno-RNA-C11). Respectivement 123 (16.57%) et 69 (9.3%) insectes dans 31 (23.3%) et 17 (13.82%) palmiers ont été identifiés positifs à *T. cruzi* et à *T. rangeli*. Aucune infection n'a été trouvée dans les insectes collectés à Araipá et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différentes unités de paysage. Les souches de *T. cruzi* identifiées à l'aide de 4 marqueurs moléculaires (mini exon SL-IR, GPI, HSP60 et D7-24 $\alpha$ -rRNA) appartiennent à la lignée TcId et 10 (8.13%) individus présentent une infection mixte TcI-TcII.

Vingt espèces d'hôtes réparties en trois classes (mammifères, oiseaux, saurosidés) ont été identifiées comme sources alimentaires à partir du repas sanguin contenu dans le tube digestif des insectes, à l'aide d'amorces cytochrome *b*, spécifiques de vertébrés. Quatre-vingts et un pourcent des repas détectés ont été effectués sur des mammifères, hôtes potentiels de *T.*

*cruzi* dont *Tamandua tetradactyla*, source alimentaire principale. Cet hôte a été clairement identifié comme réservoir de *T. rangeli* ainsi que suggéré pour *T. cruzi*.

L'analyse phylogénique réalisée à l'aide de séquences de cytochrome *b* démontre que les individus de *Rhodnius* identifiés dans la région du Tapajós appartiennent au clade II, ce qui correspond à une extension de l'aire précédemment décrite pour ce clade. L'utilisation du marqueur mitochondrial *cytochrome b* a permis de mettre en évidence une structuration phylogénétique (haplogroupes) non retrouvée à l'aide des marqueurs microsatellites. Ce résultat montre que l'histoire des gènes (génom mitochondrial) ne retrace pas l'histoire des individus (microsatellites, 10 locus). L'analyse de génétique des populations conduite à l'aide des deux types de marqueurs n'a pas révélé de structuration génétique au sein de la zone d'étude entre les communautés ou les unités de paysage.

Cette étude met en évidence des flux géniques importants peu sensibles à la fragmentation du milieu, la dynamique d'invasion des palmiers assurant aux insectes une connectivité fonctionnelle entre les différentes unités de paysages et les communautés. La prédiction du risque environnemental lié à la situation du Tapajós va vers une augmentation du risque de transmission de la Maladie de Chagas dans cette région, du fait de l'abondance des palmiers, de leur forte connectivité, et de la présence de vecteurs et d'hôtes infectés circulant entre les différentes communautés et unités du paysage.

## II. Abstract

Anthropic disturbances from deforestation of Amazon tropical forest leads to a mosaic of landscapes composed of secondary vegetation (secondary forest, palm groves, fallows) and pasture. These changes result in the proliferation of invasive heliophilous palm trees of the family *Attalea spp.*, the principal ecotope of *Rhodnius* species, bloodsucking bug vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease in Latin America.

The present study focuses on different landcover classes of three rural communities of the Tapajós watershed (Brazilian Amazon) with different settlement times (25-75 years). Six different land-cover classes were identified on the field and applied through supervised classification on a SPOT 5 image of the study area in order to cartography environmental risk associated to palm tree presence in the area.

Three hundred and thirty palm trees of three species *Attalea maripa*, *A. phalerata* and *A. speciosa* were dissected of which 73 (54.88%) were infested with *R. robustus* (742 insects collected). The distribution of palm species varied in each community, *A. maripa* was the only species found in the most recently settled community (Araipá). Significant decreases in bug density were observed in *A. maripa*, in the community most recently established (Araipá) and in the two most anthropogenic landcover classes.

Infection of insects by *T. cruzi* and *T. rangeli* was examined using molecular methods (mini exon SL\_IR and sno-RNA-C11). Respectively, 123 (16.57%) and 69 (9.3%) insects in 31 (23.3%) and 17 (13.32%) palms were identified as positive for *T. cruzi* and *T. rangeli*. A lack of infection was detected in Araipá but no differences were observed between the different landcover classes. The strains of *Trypanosoma cruzi* were identified using four distinct molecular markers (mini-exon SL-IR, GPI, HSP60 and D7-24 $\alpha$ -rRNA) as belonging to the lineage TCI specifically TcId and 10 (8.13%) individuals showed a mixed infection TCI-TCII.

Twenty host species divided into three classes were identified (mammals, birds, reptiles) were identified as food source from blood meal from the bug gut with cytochrome b primers, specific for vertebrates (25.74% of meals). Eighty-one percent of meals were conducted on mammals, potential hosts of *T. cruzi*, especially on *Tamandua tetradactyla*,

identified as the main food source. This host was clearly identified as a reservoir for *T. rangeli* and also suggested for *T. cruzi*.

Phylogenetic analysis performed using *cytochrome b* sequences, identified *Rhodnius* individuals in the Tapajós region within clade II, which represent an extension of the range previously described for this clade. The use of the *cytochrome b* marker also revealed a phylogenetic structure (haplogroups) not found using microsatellite markers. This result showed that the history of the genes (mitochondrial genome) does not match the history of individuals (microsatellites, 10 loci). Population genetics analysis conducted using both markers did not reveal genetic structure within the study area between the communities or the land cover classes. The study revealed significant gene flow, which was not restricted by the fragmentation of the environment. The invasive dynamics of *Attalea* palm trees provide a functional connectivity for insects to move between the different landcover classes and communities.

Due to the abundance of palm trees and their high connectivity, the presence of vectors and infected hosts moving between the different communities and landcover classes, the environmental risk constituted by *Attalea* palm tree presence of Chagas disease in Tapajós region will presumably continue to increase.

### III. Resumo

As alterações antrópicas na Amazônia resultantes do desmatamento da floresta tropical resultam em um mosaico de paisagens constituídas principalmente por florestas secundárias de palmeiras, pastagens e capoeiras. Estas modificações favorecem a proliferação de grandes palmeirais do gênero *Attalea*, que constituem ecótopo principal das espécies de *Rhodnius*, insetos hematófagos e vetores do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana na América Latina.

Este estudo se baseia em diferentes unidades de paisagem de três comunidades rurais do meio Tadjapós (Amazônia brasileira) que possuem diferentes tempos de ocupação sobre o território (25-75 anos). Seis unidades de paisagem foram definidas e aplicadas com o auxílio de uma classificação supervisionada de imagem SPOT 5 afim de obter uma cartografia do risco ambiental associada à presença de palmeiras na região.

No total 133 palmeiras foram dissecadas pertencentes a três espécies: *Attalea maripa*, *Attalea phalerata* e *Attalea speciosa*, estando 73 (54,88%) infestadas por *R. robustus* (742 insetos). Diminuições significativas da densidade de triatomíneos foram observadas em *A. maripa* na comunidade com menor tempo de ocupação (Araipá) e na unidade de paisagem mais antropizada.

A infecção dos insetos por *T. cruzi* e por *T. rangeli* foi realizada com o auxílio de métodos moleculares (mini exon SL\_IR e sno-RNA-C11). Respectivamente 123 (16,57%) e 69 (9,3%) triatomíneos estavam infectados e distribuídos em 31 (23,3%) e 17 (13,82%) palmeiras positivas para *T. cruzi* e *T. rangeli*. Não foram encontrados insetos infectados em Arraipá e nenhuma diferença significativa foi observada entre as diferentes unidades de paisagem. Os isolados de *T. cruzi* foram caracterizados com a ajuda de quatro marcadores moleculares (mini exon SL-IR, GPI, HPS60 e D724 $\alpha$ -rRNA) e os resultados demonstraram a presença de TcId (8,13%), além de 10 indivíduos apresentaram infecção mista com TcI e TcII.

Vinte espécies de hospedeiros vertebrados de três classes (mamíferos, aves e répteis) foram identificadas como fonte de alimentação dos triatomíneos a partir do conteúdo do tubo digestivo, utilizando como marcador o citocromo B específico de vertebrados. Os resultados demonstraram que 81% dos repastos sanguíneos foram realizados em mamíferos, hospedeiros

potenciais do *T. cruzi*, sendo o *Tamandua tatradaactyla* a principal fonte alimentar. Este hospedeiro foi claramente identificado como reservatório do *T. rangeli*, sugerindo ser também reservatório para *T. cruzi*.

A análise filogenética realizada a partir de sequências de citocromo b demonstraram que os indivíduos de *Rhodnius* identificados na região do Tajajós pertencem ao clado II, que corresponde a uma extensão da área descrita para este clado. A utilização do marcador mitocondrial citocromo b permitiu evidenciar uma estruturação filogenética (haplogrupos) encontrada a partir de marcadores de microsátélites. Este resultado demonstra que a história dos genes (genoma mitocondrial) não acompanha a história dos indivíduos (microsátélites, 10 *locus*). A análise de genética de população realizada com 10 tipos de marcadores não revelou estruturação genética dentro da área de estudo, entre as comunidades e até mesmo nas unidades de paisagem.

Este estudo evidencia pouca sensibilidade do fluxo gênico à fragmentação do meio e garantindo uma conectividade funcional entre as diferentes unidades de paisagem e entre as comunidades pela dinâmica de invasão das palmeiras pelos insetos. A predição do risco ambiental a partir da situação do Tapajós torna-se um risco de transmissão da doença de Chagas humana nesta região, devido a abundância de palmeiras, a presença de vetores e hospedeiros infectados circulantes entre as diferentes comunidades e unidades de paisagem.

## IV. Problématique Générale

Découverte en 1909 par Carlos Chagas au Brésil, la maladie de Chagas s'est progressivement révélée distribuée dans toute l'Amérique latine. Partout sur le continent latino américain des initiatives nationales et internationales ont été mises en place afin de lutter contre les vecteurs responsables de la transmission de la maladie. Plusieurs grands programmes multinationaux coordonnés par l'organisation panaméricaine de la santé (PAHO) comme l'« initiative du cône sud » (INCOSUR, Argentine, Bolivie, Chili, Paraguay et Uruguay, en 1991), et l'initiative d'Amérique Centrale (IPCA, 1997) ont largement contribué à éliminer les deux espèces principales de vecteurs domiciliés *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* dans certains pays et à diminuer la charge globale de la prévalence de 16-18 millions de personnes infectées dans les années 1990 à 9 millions (Schofield *et al.* 2006, Remme *et al.* 2006, Schmunis 1999). Ainsi, en Uruguay, au Chili, au Brésil et dans certaines régions d'Argentine, de Bolivie, du Paraguay et d'Amérique Centrale (Moncayo & Silveira 2009), la transmission « domestique » par *Triatoma infestans* a officiellement été éradiquée. *Rhodnius prolixus* considéré comme le vecteur le plus important au Venezuela, en Colombie et dans certaines régions d'Amérique Centrale, a été éliminé du Guatemala (Guhl *et al.* 2009) et est en diminution en Amérique Centrale (Schofield *et al.* 2006). Cependant, une dizaine d'espèces de triatomes sont en relation étroite avec l'homme établissant des colonies dans les habitations ou les habitats péri-domestiques. Les populations sauvages de ces espèces domiciliées ainsi que de nombreuses autres espèces sylvatiques sont naturellement répandues sur le continent. Ainsi, même l'élimination des populations domestiques ne saurait être suffisante contre la ré-infestation des habitations (Schofield *et al.* 2006, Guhl *et al.* 2009).

Au Brésil, et particulièrement dans les régions jusqu'alors dites préservées, nous assistons depuis plusieurs années à une transmission sans domiciliation résultant de deux processus, (1) la contamination par des insectes sylvatiques d'aliments comestibles à l'échelle d'une maison ou d'un village provoquant alors des micro-épidémies de cas aigus de la Maladie de Chagas, ou (2) l'invasion accidentelle et sporadique des domiciles par des individus qui n'établissent pas de colonies à l'intérieur des habitations. Ces invasions accidentelles augmentent les risques d'adaptation des espèces sauvages aux habitations humaines.

En région amazonienne, longtemps considérée comme non endémique par l'absence de cas chagasiques, nous assistons également à un changement radical des paysages. Les pratiques de déforestation, de culture sur brûlis, l'établissement de cultures et de pâturages provoquent un nouvel arrangement dans la structuration du paysage et permettent aux triatomes de circuler depuis leur habitat sauvage/sylvatique (la forêt), aux pâturages, aux cultures, voir même aux maisons. La connectivité entre les différentes unités de paysages (habitat sylvatique, péri-domiciliaire et domiciliaire) est facilitée par le maintien des palmiers (*Attalea spp.*) comme ressource extractive pour les paysans ou par leur établissement invasif naturel après les pratiques de déforestation (résistance au feu). Ainsi, l'ouverture de la canopée permet à certains palmiers héliophiles de prédominer rapidement dans la végétation secondaire. De ce fait, les palmiers constituent un bio-indicateur écologique fiable de la présence des *Rhodnius spp* et du risque épidémiologique associé (Romana *et al.* 1999).

Le travail présenté porte sur la relation *Attalea-Rhodnius* sur un jeune front de déforestation en Amazonie. Il a pour but l'étude de l'impact des perturbations anthropiques en milieu tropical sur la dynamique des populations et la dispersion des triatomes associés aux palmiers *Attalea spp*, au travers de la dynamique d'établissement invasive des palmiers, ainsi que d'inférer, à partir de ces insectes, le cycle épidémiologique de la maladie en déterminant, à partir de leur repas sanguin, les hôtes potentiels et les trypanosomes présents.

Ce travail repose sur différentes méthodes, télédétection, diagnostic moléculaire, génétique de populations, à différentes échelles, du paysage aux gènes, permettant une approche écologique intégrative.

Cette étude a pour objectif final en prenant en compte le risque environnemental, la dispersion des vecteurs et la circulation des parasites et des hôtes, d'établir des scénarios explicatifs de la situation observée dans les trois communautés étudiées et de tenter d'évaluer l'évolution du risque environnemental pour ces communautés soumises à des pressions anthropiques différenciées.

Ce travail est présenté sous la forme d'une introduction générale sur la Maladie de Chagas, ses vecteurs et la situation particulière des vecteurs et de la transmission en Amazonie, suivie de la présentation des objectifs, du matériel et des méthodologies. Les résultats sont présentés sous la forme de 4 articles et sont ensuite commentés ensemble dans la discussion générale.

## 1. Introduction

### 1.1. La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine

---

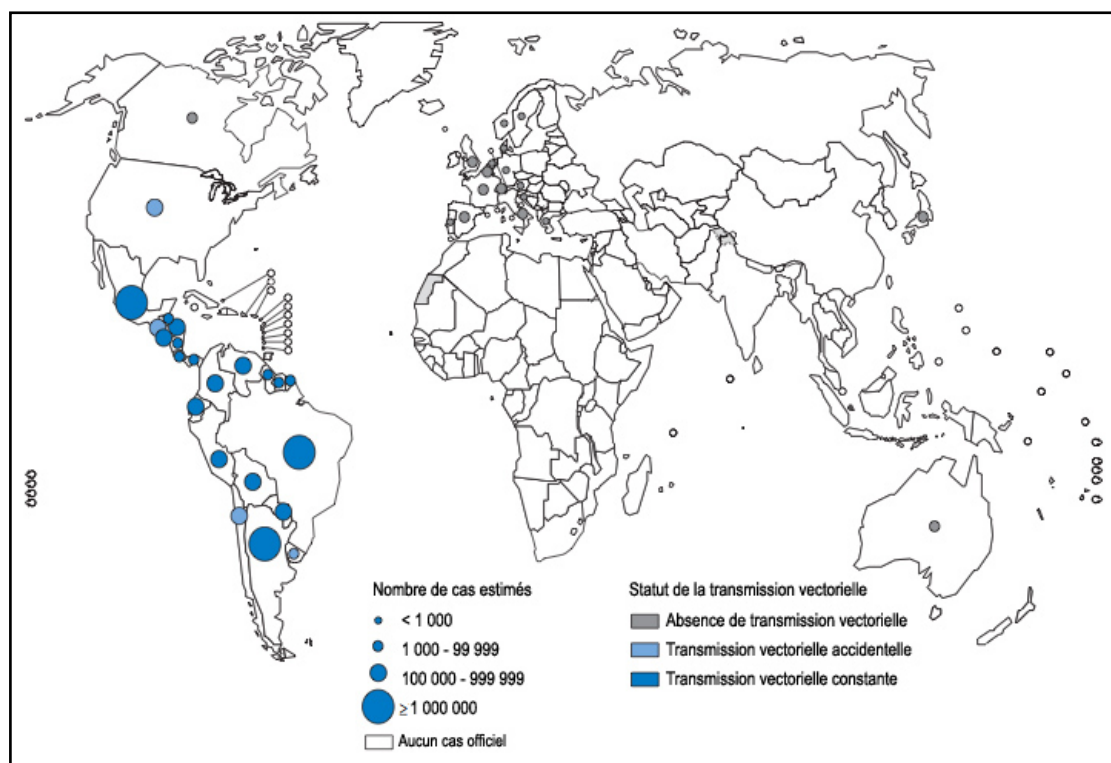
Reconnue par l’OMS (WHO) comme l’une des 17 maladies tropicales négligées (WHO, 2010), la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine est une maladie provoquée par l’agent étiologique *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas 1909. C’est un kinétoplastidé flagellé appartenant à l’ordre des Trypanosomatidae. La contamination se fait principalement au travers du contact avec les déjections des insectes vecteurs (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera) qui défèquent après leur repas sanguin. Le parasite est transmis lorsque les déjections sont mises en contact avec les lésions de la peau (point de piqûre inclus), les muqueuses de l’œil ou de la bouche. D’autres modes de transmission existent: transfusion sanguine, transmission orale via de la nourriture contaminée, transmission verticale ou congénitale ainsi que par la transplantation d’organes infectés.

#### 1.1.1. Distribution et prévalence

La distribution de la maladie est longtemps restée limitée aux régions pauvres et rurales d’Amérique Latine là où la transmission vectorielle a lieu. Considérée comme endémique dans 22 pays d’Amérique centrale et du sud (WHO, 2002, 2010), la maladie s’est peu à peu répandue aux Etats-Unis, Canada, Australie, Japon, Espagne et Portugal où les immigrants latino américains, ne sachant pas qu’ils sont infectés peuvent causer l’infection à d’autres personnes à travers la transfusion sanguine ou d’autres modes de transmission (Schmunis, 2007) (Figure 1.1).

Le nombre estimé de personnes infectées par *T. cruzi* en Amérique Latine décroît régulièrement depuis les années 80, de 16 à 18 millions de cas en 1991 (WHO, 1991) à 7.6 millions en 2006 (OPS, 2006). Il existe de nombreuses disparités entre les différents pays et même entre différentes régions d’un même pays. Ceci est dû aux cycles de transmission présents, et aux programmes de lutte anti-vectorielle mis en place dans chaque pays (Coura & Viñas, 2010). La prévalence dans les pays non endémiques a été estimée à environ 300 000 individus infectés aux Etats-Unis, 5 500 au Canada, 80 000 en Europe, 3000 au Japon et

1'500 en Australie (Schmunis, 2007 ; Schmunis & Yadon, 2010). En Suisse, de 1979 à 2011, 258 personnes ont été diagnostiquées positives à *T. cruzi* (Jackson & Chappuis, 2011) et différents systèmes de contrôles systématiques sur les femmes enceintes et les donneurs de sang d'origine latino-américaines sont en place depuis 2008 (Jackson *et al.* 2008, 2009). En France métropolitaine, depuis 2007, tous les donneurs de sang ayant séjourné en Amérique Centrale ou du Sud sont systématiquement dépistés (Lescure *et al.*, 2008). Entre 2004 et 2006, 9 cas importés y ont été diagnostiqués (Lescure *et al.*, 2008) et le nombre de donneur infecté par an est estimé à 10 pour 1.5 million, portant à 17 le nombre de dons à risque chaque année (Brouard *et al.*, 2007).



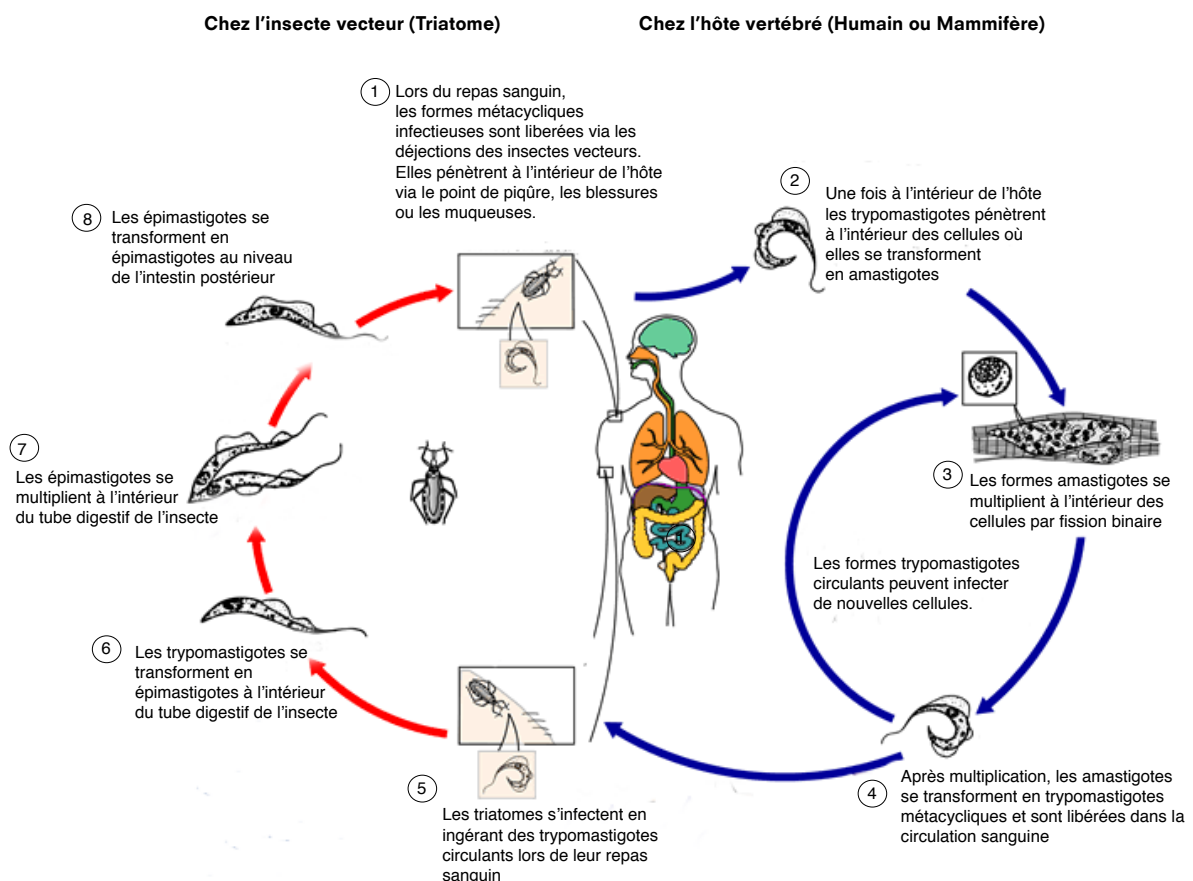
**Figure 1.1. :** Distribution de cas d'infection par *Trypanosoma cruzi* dans le monde, basée sur les rapports officiels et les statuts de transmission vectorielle (d'après WHO, 2010).

### 1.1.2. Cycle

Le cycle de *T. cruzi* est complexe, avec différents stades de développement à l'intérieur de l'insecte et des mammifères hôtes décrits dans la figure 1.2. Les formes trypomastigotes métacycliques infectieuses contenues dans les déjections des triatomes pénètrent l'intérieur de l'hôte par le point de piqûre, les lésions cutanées ou les muqueuses. Elles pénètrent ensuite à l'intérieur de n'importe quelle cellule de l'hôte où elles perdent leur flagelle, se modifient en formes amastigotes et se répliquent par fission binaire protégées à

l'intérieur d'une vacuole. Au bout de quelques temps, la cellule est lysée et des formes trypomastigotes métacycliques sont libérées et vont envahir de nouvelles cellules et recommencent leur cycle de multiplication.

A ce moment, les formes libres peuvent être ingérées par les triatomes, durant leur repas sanguin qui dure une vingtaine de minutes. Une fois ingérés, les trypomastigotes se transforment en épimastigotes, qui se répliquent à l'intérieur du tube digestif de l'insecte. Les épimastigotes migrent ensuite dans la partie terminale du tube digestif où ils se différencient en trypomastigotes métacycliques qui sont ensuite libérés avec les déjections de l'insecte lors des repas sanguins suivants.



**Figure 1.2.** Cycle de *Trypanosoma cruzi* chez l'insecte vecteur et l'hôte vertébré (d'après CDC, Center for Disease Control, Atlanta, USA, <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

### 1.1.3. Pathologie

La maladie de Chagas comporte généralement deux phases, une phase aiguë où le parasite est présent dans le sang du patient et une forme indéterminée ou chronique où le parasite se multiplie à l'intérieur des cellules de l'hôte, en provoquant ou non, une pathologie dite chronique. La phase aiguë, généralement asymptomatique, est due à une charge parasitaire faible. Si des symptômes apparaissent, ce sont des fièvres, malaises, gonflement de la rate et des tissus lymphatiques, ou des signes spécifiques au point d'entrée du parasite au niveau de la peau (chagoma) ou de la muqueuse oculaire (signe de Romaña) qui sans complications majeures disparaissent au bout de deux à trois mois. Cependant, chez les enfants de moins de deux ans, les parasites peuvent migrer vers les méninges et provoquer une méningite aiguë mortelle (Pentreath, 1995). La maladie peut ensuite évoluer d'une forme indéterminée à une pathologie sérieuse dite chronique, pouvant provoquer la mort. Généralement 30 % des malades développent des pathologies chroniques cardiaques (myopathie cardiaque chronique) et 10 % des pathologies chroniques digestives (syndrome du « méga » colon) (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2010.), ou mixtes. Les disparités géographiques du type de pathologie, avec une prédominance des formes digestives au centre du Brésil, au Chili contre une absence de cas digestifs au Venezuela et en Amérique centrale par exemple suggèrent des facteurs inhérents à la fois aux vecteurs présents et aux souches de parasites transmis (Andrade *et al.*, 2002).

Les malades ne développant pas de pathologie déterminées sont dits en phase indéterminée, sans complication ni symptômes, mais peuvent jouer le rôle de réservoir pour les vecteurs ou transmettre le parasite par transfusion sanguine. L'ingestion de boissons ou de nourriture contaminées par les déjections des insectes et/ou des insectes eux-mêmes sont généralement associées avec des infections massives de parasites et provoquent une situation clinique aiguë et des taux de mortalité élevés (Pereira *et al.*, 2009). Les interactions entre certains composés de la muqueuse gastrique et certaines protéines de surface (gp35/50) des parasites semblent protéger les formes métacycliques de la destruction dans l'estomac et la dégradation par la pepsine des gp90 augmente l'infectivité de certaines souches de trypanosomes (Cortez *et al.*, 2006; Covarrubias *et al.*, 2007; Yoshida, 2009 ; Ruiz *et al.*, 1998, Mortara *et al.*, 1992) et de ce fait la sévérité de la pathologie orale.

### 1.1.4. Diagnostic et traitement

La démonstration directe de *Trypanosoma cruzi* dans le sang du patient ne peut se faire que lors de la phase aiguë. L'infection chronique requiert des processus de diagnostic qui impliquent la multiplication du parasite avant d'être visualisé, xénodiagnose ou mise en culture du sang du patient, mais ce sont des procédures longues à mettre en oeuvre. La détection immédiate des cas chroniques passe par la détection d'anticorps spécifiques à *T. cruzi*, par hémagglutination indirecte (HI), immunofluorescence indirecte (IF) ou encore d'immuno-absorbance enzymatique (ELISA). Cependant des réactions croisées peuvent intervenir chez des patients atteints de leishmaniose, malaria, toxoplasmose ou d'infection bactérienne comme la lèpre ou la tuberculose. Ainsi la confirmation du diagnostic passe par au moins deux tests positifs (Teixeira, 2006).

Dans les années 1960, deux traitements ont été mis au point: le **nifurtrimox** (Lampit®, Bayer) et le **benznidazole** (Rochagan® ou Radanil®, Roche) actifs pendant la phase aiguë ou lors des réactivations (en cas d'immunosuppression). Les résultats obtenus varient selon la phase de la maladie, la durée du traitement et les doses, et dépendent également de l'âge et l'origine géographique du patient. Il est obtenu généralement 60 % de guérison. L'efficacité de ces traitements durant la phase chronique reste encore peu documentée, on observe 10 à 20% de succès (Coura & de Castro, 2002). A l'heure actuelle, sans vaccin ou traitements spécifiques disponibles pour l'intervention de santé publique à grande échelle, la stratégie principale de lutte se fonde sur la prévention de la transmission par l'élimination des vecteurs domiciliés dans les habitations humaines en région endémique, ainsi que par le contrôle du sang destiné aux transfusions sanguines (Dias *et al.* 2002, WHO 2010).

## 1.2. Trypanosomes

---

### 1.2.1. *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) l'agent étiologique de la Maladie de Chagas est endémique au Continent latino américain (Stevens *et al.* 1999). Il est principalement transmis d'un hôte naturel à un autre (principalement mammifères) par l'intermédiaire des déjections des triatomes vecteurs ou par ingestion de ces derniers ainsi que de petites proies contaminées (Coura, 2006).

*T. cruzi* est parmi l'un des trypanosomes les plus éclectiques, associé à plus de 25 familles de mammifères américains (WHO, 2002). Ces familles comprennent environ 1150 espèces (Patterson, 1994) dans les tropiques, dont 80 % sont présentes dans le bassin amazonien (Teixeira *et al.*, 2006). L'origine de *T. cruzi* est estimée sur la base de la biogéographie et de la reconstitution phylogénétique des différents clades de trypanosomes (Stevens *et al.*, 1999). Ainsi la séparation entre *T. brucei*, trypanosome africain et *T. cruzi* est associée à la divergence entre les continents de l'Afrique et de l'Amérique du sud, il y a environ 100 millions d'années (Stevens *et al.*, 1999). L'association supposée entre *T. cruzi* et ses hôtes d'origine, les marsupiaux et les xénarthres, mammifères autochtones du "super continent" en place à l'époque (constitué actuellement par l'Antarctique, l'Australie et l'Amérique du Sud) a permis ensuite de dater le clivage entre les trypanosomes associés aux kangourous et *T. cruzi* à 50-80 millions d'années lorsque de la division du "super continent" (Stevens *et al.*, 2001).

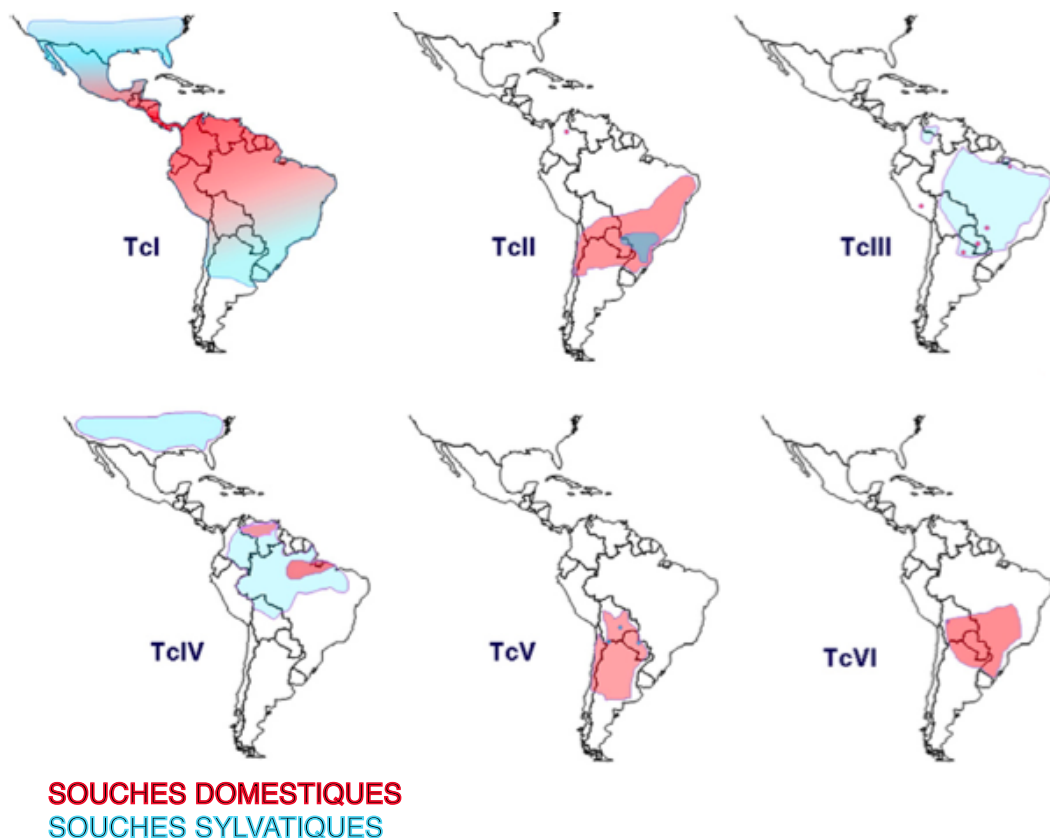
Actuellement, *T. cruzi* circule à la fois dans l'environnement domestique, sylvatique et péri-domestique et implique insectes vecteurs, animaux sauvages et domestiques (Araújo *et al.*, 2009) créant une extrême complexité du cycle de transmission.

Malgré la grande diversité d'hôtes potentiels de *T. cruzi*, ne sont considérées comme réservoirs que les espèces ou les assemblages d'espèces responsables du maintien du cycle à long terme dans un environnement donné (Noireau *et al.*, 2009).

Les oiseaux (Teixeira, 1987) sont réfractaires à l'infection, les trypanosomes sont neutralisés par leur système du complément (Schaub, 2009). Les reptiles sont également considérés comme réfractaires à l'infection par *T. cruzi*, cependant, l'existence d'une relation très proche entre les triatomes, *T. cruzi* et certains lézards a été décrite au Mexique, le cycle complet de *T. cruzi* a été observé chez des lézards se nourrissant d'insectes infectés (Teixeira, 1987, Teixeira *et al.*, 2006), suggérant que les mammifères ne sont pas les hôtes uniques (Schaub, 2009).

A ce jour, six sous-divisions génétiques (DTU, Discrete Typing Unit) ont été reconnues chez *T. cruzi*, de TcI à TcVI (Anonyme, 1999 ; Zingales *et al.*, 2009). Au sein des cycles domestiques, TcI prédomine au nord de l'Amérique du Sud, où il est associé à des pathologies humaines moins sévères tandis que TcIII (TcIIb), TcV (TcIIc), TcVI (TcIIe) sont plus communs dans le cône sud où les mégasyndromes chagasiens sont plus répandus (Lewis *et al.*, 2009). Au Brésil TcI est trouvé essentiellement dans le cycle sauvage tandis que

TcII est associé au cycle domestique (Fernandes *et al.*, 1999). La répartition des différentes souches est décrite dans la Figure 1.3.



**Figure 1.3.** Répartition des différentes DTU's de *Trypanosma cruzi* d'après Llewellyn & Miles, 2010.

Malgré le gradient de distribution au sein des cycles sauvages et domestiques des différentes lignées de *T. cruzi* il est toujours difficile de définir une association précise avec les formes cliniques de la maladie. Il semblerait toutefois que l'infectivité puisse être liée à l'expression des protéines de surfaces gp90, qui est inversement corrélée à la capacité des parasites à envahir les cellules mammaliennes (Ruiz *et al.*, 1998 ; Málaga & Yoshida, 2001). *T. cruzi* ne semble avoir aucun effet négatif sur les triatomés. Les parasites ne traversent pas la membrane digestive et n'envahissent pas le système lymphatique de l'insecte (Schaub, 2009). *T. cruzi* est donc considéré comme faiblement pathogène, pouvant affecter les triatomés uniquement en période de jeûne prolongé (Vallejo *et al.*, 2009).

### 1.2.2. *Trypanosoma rangeli*

Lors de la caractérisation du cycle biologique de *Trypanosoma cruzi*, Carlos Chagas a détecté la présence du trypanosome dans les glandes salivaires et a conclu à une transmission du parasite par la voie salivaire (Chagas, 1909). Il s'agissait en fait d'un autre trypanosome *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, Tejera 1920. *T. rangeli* est le deuxième trypanosome infectant les humains dans les pays d'Amérique Latine (Guhl & Vallejo, 2003). Il est considéré comme apathogène pour les vertébrés et possède une distribution sympatrique avec *T. cruzi*. De nombreuses infections mixtes chez des hôtes réservoirs et des humains ont été décrites (Marcili *et al.*, 2009). Son rôle en épidémiologie de la Maladie Chagas vient du fait qu'il peut provoquer des confusions lors du diagnostic morphologique (Urdaneta-Morales & Tejero, 1992) et provoquer des réactions sérologiques croisées pouvant compliquer le diagnostic sérologique (Guhl & Marinkelle, 1982). On retrouve ce parasite principalement chez les espèces de *Rhodnius* (Guhl & Vallejo, 2003) chez lesquelles il peut provoquer des lésions histopathologiques de par sa migration aux glandes salivaires (Añez *et al.*, 1987), ainsi qu'une diminution des endosymbiontes digestifs, ce qui peut être particulièrement désavantageux pour l'insecte (Vallejo *et al.*, 2009).

## 1.3. Les Triatomes

---

### 1.3.1. Systématique, distribution et habitat

Les insectes vecteurs de *T. cruzi* appartiennent à la sous famille des Triatominae au sein de la famille des Reduviidae (Hemiptera) définie par son hématophagie et les adaptations morphologiques nécessaires à la recherche d'hôtes et à la nutrition (Schofield & Galvão, 2009). Actuellement, il existe 143 espèces décrites réparties en 5 tribus et 15 genres (Galvão *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2006; Galvão & Angulo, 2006; Bérenger & Blanchet, 2007; Costa & Felix, 2007; Martinez *et al.*, 2007; Sandoval *et al.*, 2007; Schofield & Galvão, 2009). Ces insectes occupent diverses niches écologiques, généralement partagées avec leurs hôtes vertébrés sur lesquels ils peuvent se nourrir, principalement oiseaux et mammifères parfois, amphibiens et reptiles. En milieu sauvage (ou exanthropique), les triatomes sont associés aux nids, terriers, creux d'arbres, mais aussi aux pierriers, aux palmiers ou encore aux broméliacées (Gaunt & Miles, 2000). Chacun des trois genres d'importance épidémiologique,

*Triatoma*, *Panstrongylus* et *Rhodnius*, est associé à un type d'habitat (Schofield & Galvão, 2009). Les espèces du genre *Rhodnius* sont majoritairement associées aux palmiers, celles du genre *Panstrongylus* principalement aux terriers et cavités d'arbres, et celles du genre *Triatoma* aux habitats pierreux et terriers de rongeurs.

On distingue généralement deux types de cycles de transmission de la Maladie de Chagas: 1) un cycle domestique impliquant des vecteurs entièrement domiciliés (étant capables de former des colonies à l'intérieur des habitations) ou en voie de domiciliation ; 2) un cycle sylvatique, impliquant des triatomes sauvages associés à des hôtes vertébrés non humains (Macedo *et al.*, 2004). La connexion entre les deux se fait via certains animaux synanthropiques (rats, souris, chauves-souris et opossums) qui migrent vers les environnements humains du fait de la destruction de leur habitat, via des insectes adultes ailés attirés par les lumières artificielles des maisons (Coura *et al.*, 2002) ou via des vecteurs installés en zones péri-domiciliaires rentrant épisodiquement dans les habitations humaines.

A proximité des habitations, les insectes colonisent les structures péri-domiciliaires généralement construites pour les animaux domestiques (poules, cochons) qui peuvent représenter des hôtes potentiels. A l'intérieur des maisons, les insectes préfèrent les coins obscurs, les fissures des murs et les toits de palme.

Parmi les 143 espèces décrites, 5 espèces jouent un rôle important dans la circulation du parasite en milieu domestique, *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus* dans les pays du cône sud et *Rhodnius prolixus* et *Triatoma dimidiata* au Nord et en Amérique Centrale. Les espèces dites sylvatiques (c'est-à-dire non domiciliées) représentent cependant un nouveau défi pour la lutte anti-vectorielle (Guhl *et al.*, 2009; Costa & Lorenzo, 2009).

En effet, certaines espèces ou des populations sauvages d'espèces domiciliées sont capables de coloniser la niche domestique laissée libre par l'élimination des populations de *T. infestans* ou de *R. prolixus* (Costa *et al.*, 2003; Fitzpatrick *et al.*, 2008; Guhl *et al.*, 2005; Noireau *et al.*, 2000). Dans certaines régions, les modifications environnementales conduisent à un contact étroit entre les populations d'espèces sylvatiques et les habitations humaines (Romaña *et al.*, 1999; Abad-Franch & Monteiro, 2007; Abad-Franch *et al.*, 2009). Ainsi, les espèces sylvatiques doivent être l'objet d'études écologiques et comportementales afin de comprendre le processus de domiciliation et d'établir de nouvelles stratégies de veille sanitaire et de lutte anti-vectorielle (Guhl *et al.*, 2009).

Les insectes du genre *Rhodnius* se différencient des autres triatomes par l'insertion apicale des antennes, ainsi que par la présence de callosités particulière derrière les yeux (Lent & Wygodinsky, 1979). Au sein du genre, les espèces sont principalement arboricoles à l'exception de *Rhodnius prolixus*, principalement domiciliée qui est le vecteur principal de la maladie de Chagas au Venezuela, en Colombie et dans certains pays d'Amérique Centrale (Carcavallo *et al.*, 1997). Le Venezuela est le seul pays où des populations sylvatiques de *Rhodnius prolixus* ont été répertoriées (Felicangieli *et al.*, 2003; Fitzpatrick *et al.*, 2008).

Parmi les 27 espèces décrites en Amazonie les espèces du genre *Rhodnius* sont les plus représentées et certainement originaires de la région (Abad-Franch & Monteiro, 2007). Le genre est divisé en deux groupes, « *pictipes* » et « *robustus* » dont les répartitions géographiques et les spécificités sont un peu différentes (Carcavallo *et al.*, 1997 ; Monteiro *et al.*, 2003 ; Abad Franch *et al.*, 2010). Les espèces du groupe « *pictipes* » sont séparées en deux sous-groupes: à l'est (*R. pictipes*, *R. stahli*, *R. brethesi*, *R. amazonicus*, *R. paraensis*) et à l'ouest des Andes (*R. pallescens*, *R. ecuadoriensis*, *R. colombiensis*) tout comme les espèces du groupe « *robustus* » (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, et *R. nasutus*) (Abad-Franch *et al.*, 2009). Au sein du groupe « *robustus* », *R. prolixus* et *R. robustus* sont particulièrement difficiles à différencier du point de vue morphologique et malgré des préférences écologiques et des comportements synanthropiques différents, ils ne présentent pas (Harry *et al.*, 1992; Harry, 1993) ou très peu de différences génétiques du point de vue de marqueurs nucléaires (Monteiro *et al.*, 2000). Cependant les marqueurs mitochondriaux (*cytochrome b*) ont permis de les différencier (Monteiro *et al.*, 2000) et d'identifier, au sein de *R. robustus*, 4 clades géographiquement séparés (Monteiro *et al.*, 2003) (Figure 4).



**Figure 1. 4.** Répartition des différentes clade de *Rhodnius robustus* I-IV et de *Rhodnius prolixus*, d'après Conn *et al.*, 2007.

### 1.3.2. Dynamique de population cycle et comportement des Triatomes

L'adaptation à l'hématophagie chez les punaises a demandé des adaptations morphologiques, physiologiques et comportementales. Cette adaptation est probablement liée aux contacts fréquents d'insectes phytophages voire prédateurs avec des vertébrés.

Le cycle biologique des triatomes se compose de cinq stades larvaires auxquels il faut chaque fois un repas sanguin pour passer au stade suivant puis au stade adulte. Tous les stades et les adultes des deux sexes se nourrissent sur des hôtes vertébrés et sont donc susceptibles d'être infectés par *Trypanosoma cruzi* ou d'autres espèces de trypanosomes. La durée du cycle peut varier de quelques mois (*R. prolixus*, *T. infestans*) à plus d'une année (*T. dimidiata*, *Panstrongylus megistus*, *Dipetalogaster maximus*) en fonction de la fréquence et de l'opportunité des repas sanguins, de la densité de population (Schofield, 1979) mais aussi des conditions de température et d'humidité du milieu (Luz *et al.*, 1999 ; Jimenez & Palacios, 2002 ; Gorla & Schofield, 1989). Les triatomes passent la plus grande partie de leur vie cachés dans leurs abris (terriers, crevasses, nids d'animaux). Leur activité nocturne est caractérisée par deux phases, une à la tombée de la nuit et une à l'aube (Lazzari 1992 dans Lazzari & Lorenzo, 2009). Le premier pic d'activité sert à trouver un hôte vertébré, le deuxième, à trouver un abri pour la journée. Durant la journée, ils sont soumis à une phase d'akinésie, généralement agrégés les uns aux autres et présentent un phototropisme négatif

jusqu'à la tombée de la nuit où ils quittent leur refuge pour se nourrir. Les comportements de reproduction, oviposition et dispersion ont aussi lieu durant ces phases nocturnes (scotophase).

### 1.3.3. Dispersion

La compréhension des capacités de mouvement d'une espèce au niveau du paysage est critique afin de prévoir la persistance des populations dans un écosystème dominé par les activités humaines (Hanski & Simberloff, 1997). La dispersion des triatomes peut être passive ou active. La dispersion passive peut être facilitée par les hôtes vertébrés à petite échelle (Schofield, 1999) ou par les mouvements de populations humaines à plus grande échelle. Les populations domiciliées sont supposées avoir réalisé des migrations passives grâce à leur grande adaptation aux humains et aux hôtes domestiques (Dujardin, 1998). Les populations domiciliées de *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* se sont éloignées géographiquement de leurs populations sauvages d'origine, respectivement l'Argentine et la Bolivie pour *T. infestans* et le Venezuela pour *R. prolixus*. Le mécanisme principal de la dispersion active chez les triatomes est le vol (Vallvé *et al.*, 1996). Il est le principal mécanisme impliqué pour les déplacements de longues distances et s'effectue uniquement par les individus pourvus d'ailes c'est-à-dire les adultes. Chez *Triatoma infestans*, important vecteur domicilié, les variations saisonnières (Schofield *et al.*, 1992), le statut nutritionnel et reproductif (Vazquez-Prokopec *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2005 ; Ekkens, 1981) ainsi que la densité de population (Schofield, 1994) sont importants. Bien que la marche soit un moyen fréquemment utilisé (d'Ascoli & Gomez-Nunez, 1966), la colonisation active d'un nouvel habitat se fait principalement par le vol (Minoli & Lazzari, 2006).

Généralement, la lumière artificielle (Coura *et al.*, 2002 ; Valente *et al.*, 2009 ; Minoli & Lazzari, 2006 ; Miles *et al.* 2003), l'émission de phéromones par les femelles (Zacharias *et al.*, 2010) la chaleur radiante et différents constituants de sueur et/ou d'urine de vertébrés (Taneja & Guerin, 1997 ; Minoli & Lazzari, 2006 ; Guerenstein & Lazzari, 2009 ; Ortiz & Molina, 2009) semblent être de forts attractifs durant les vols nocturnes. Zeledon et Rabinovich (1981) ont reporté que 20 espèces de triatomes présentaient une attractivité à la lumière, dont *R. prolixus*. La comparaison entre différentes espèces montre que pour *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* les adultes ont une tendance naturelle à voler, plus de la moitié des adultes initient le vol en chambre de vol, bien que très peu d'insectes de ces deux espèces sont capturés par pièges lumineux en conditions naturelles (Vazquez-Prokopec

*et al.*, 2006 ; Tonn *et al.*, 1978). D'autres espèces (*T. sordida*, *T. guayasana*) semblent être meilleurs au vol et sont capturés plus fréquemment (Noireau *et al.*, 2000). Toutefois, *R. prolixus* semble avoir une meilleure aptitude au vol que *T. infestans* particulièrement parce qu'en milieu sylvatique, *Rhodnius prolixus* est associé aux nids d'oiseaux ou de vertébrés à l'intérieur des couronnes de palmiers placés en hauteur (Minoli & Lazzari, 2006). Teixeira *et al.* 2001 suggèrent que lors de la saison des pluies, les ressources trophiques diminuent et les insectes se mettent à se disperser et atteignent les habitations, attirés par les lumières artificielles. Cette attraction à la lumière a sans aucun doute une importance épidémiologique et joue un rôle dans les comportements de domiciliation des triatomes sylvatiques notamment en Amazonie (Miles *et al.*, 2003 ; Walter *et al.*, 2005 ; Valente *et al.*, 2009 ; Barghini & de Medeiros, 2010 ; Roux *et al.* 2011). Les pièges lumineux sont fréquemment utilisés pour collecter les triatomes sauvages, cependant ils ne permettent de recenser que les individus adultes ailés et souvent non alimentés (Noireau *et al.*, 2002).

Castro *et al.* (2011) reportent récemment que sur les 11 espèces recensées dans leur zone d'étude (éco région d'Uatumã-Trombetas en Amazonie), 7 espèces ont été capturées par des pièges lumineux placés dans la canopée à 45m d'altitude et que *Panstrongylus geniculatus* était l'espèce la plus piégée tout au long de l'année. Les auteurs ont également mis en relation les pics de densités d'insectes capturés avec les pics de cas de contaminations orales durant les mois d'août à octobre (saison sèche). Les résultats de dispersion selon le sexe sont contradictoires d'une étude à l'autre, certains auteurs ont mis en évidence que les initiations de vols étaient en faveur des femelles chez *T. infestans* (Schofield *et al.*, 1992), d'autres n'observent pas de différences (Minoli & Lazzari, 2006 ; Carbajal de la Fuente *et al.*, 2007) suggérant l'absence de biais de sexe dans l'attractivité par les sources lumineuses tandis que Castro *et al.* (2011) ont, dans leur étude portant sur 7 espèces, piégé 3.4 fois plus de mâles que de femelles.

La différence de stratégie de dispersion selon le sexe a été examinée également par Perez de Rosas *et al.*, 2007 à l'aide de marqueurs génétiques chez *Triatoma infestans*. Les résultats sont contradictoires selon l'échelle d'étude macrogéographique ou microgéographique. Bien qu'au niveau microgéographique (entre maisons distantes de 140 m à 1220 m) la dispersion semble biaisée en faveur des mâles, cette conclusion ne peut être supportée par les calculs de coefficient de parenté pour une échelle d'analyse plus grande. Ces incohérences peuvent être liées à des différences de dispersion pré-copulatoire ou post-copulatoire, les mâles cherchant à se reproduire avec des femelles, et les femelles fécondées

cherchant de nouveaux écotopes à coloniser. Les contradictions des auteurs quant à la saison de dispersion (sèche/humide) et le biais en faveur des mâles/femelles démontrent le manque de connaissance globale sur les mécanismes de dispersion des vecteurs ainsi que l'hétérogénéité des différents systèmes épidémiologiques constituant le patron global de la Maladie de Chagas.

### 1.3.4. Colonisation / Domiciliation / Domestication

Dans les zones de très haute endémie, les vecteurs de la maladie de Chagas tels que *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* sont considérés comme domiciliés, c'est-à-dire qu'ils se sont principalement adaptés à l'habitat humain et de rares colonies sylvatiques/sauvages ont été détectées pour ces espèces (Fitzpatrick *et al.*, 2008 ; Noireau, 2000 ; Rolón *et al.*, 2011). Cette capacité à se domicilier vient probablement du fait que durant les deux dernières décennies, en Amérique Latine, les pratiques d'agriculture extensive ont déplacé les populations d'hôtes et les triatomés ont trouvé dans les habitations humaines des ressources alimentaires (Coura, 2007). Pour les espèces de *Rhodnius* qui sont parvenues à coloniser l'habitat humain (*R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. stali*, *R. pallescens* et *R. ecuadoriensis*) il est suggéré que toutes ces populations dérivent de populations ancestrales s'étant adaptées à des climats arides et semi-arides bien avant l'arrivée des premiers humains sur le continent américain (Abad Franch *et al.*, 2007). En Amazonie, les foyers de domiciliation particulièrement pour *Rhodnius stali* sont localisés dans les régions présentant les moyennes annuelles de pluies les plus basses ou de longues périodes sans pluie (Abad Franch *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent que les populations de vecteurs adaptées à de micro-environnements extrêmement humides (comme les couronnes de palmiers de forêt tropicale) ne pourraient avoir qu'un potentiel dans la colonisation d'habitats artificiels, peut-être dû à une faible tolérance des conditions plus sèches des microclimats des habitations humaines. Les conditions microclimatiques stables à l'intérieur de la couronne des palmiers du genre *Attalea* (Romana *et al.* 1999, Luz *et al.* 1994) peuvent être également un facteur limitant la domiciliation. Cependant l'utilisation de feuilles de palmiers pour la construction des toits en région tropicale peut favoriser le transport passif des triatomés sylvatiques aux habitations humaines (Gamboa 1973).

### 1.4. Contexte spécifique de l'étude: la Maladie de Chagas en Amazonie

---

Longtemps considérée comme non endémique par les organisations mondiales (OMS) et panaméricaines de la santé publique (PAHO), l'Amazonie a assisté depuis les années 60 à l'apparition de nombreux cas autochtones de trypanosomiase américaine (Teixeira *et al.*, 2001 ; Coura *et al.*, 2002 ; Aguilar *et al.* 2007 ; Miles *et al.* 2003, 2009). En 2005, l'Office panaméricain de la santé publique a dressé un bilan de la situation en réunissant tous les acteurs concernés (AMCHA, 2005). Effectivement, des cas d'infection humaine ainsi que des hôtes réservoirs ont été décrits dans tous les pays de la région amazonienne (Colombie, Pérou, Venezuela, Guyane française, Brésil). Le rapport met en évidence le peu de connaissances des situations d'occurrence de la maladie de Chagas ainsi que les particularités des routes de transmission, liées aux pratiques locales (culinaires, artisanales et agricoles). Les premiers cas de transmission orale (Coura *et al.*, 2002 ; Nobrega *et al.*, 2009) ont été décrits au Brésil en 1969 (Shaw *et al.*, 1969) et sont en constante augmentation (Valente *et al.*, 1999 ; Coura *et al.* 2002 ; Monteiro *et al.* 2010). Ils ont lieu lorsque les insectes interfèrent avec la chaîne alimentaire, production artisanale de jus de fruits, açaí (*Euterpe olacea*), jus de palme, ou même d'eau. Depuis le succès des campagnes d'élimination des populations de *Triatoma infestans* et le contrôle des banques de sang, la contamination par voie orale est devenue le mode de transmission le plus courant au Brésil (Coura *et al.*, 2002 ; Toso *et al.*, 2011). Depuis 1998, dans l'état du Pará, Amapa et Acre, 17 épidémies aiguës ont eu lieu impliquant au total 85 personnes (1998 – 2005) (Valente *et al.*, 1999, 2002, 2005) et entre 2005 et 2009, 455 nouveaux cas ont été décrits, dont 85.5 % dans le Nord du Brésil (Monteiro *et al.*, 2010). Les deux états avec le plus grand nombre de cas sont le Pará avec 310 cas (68.1%) et l'Amazonas avec 29 (6.4%), tous les deux situés en Amazonie (Briceño-Leon, 2007). Depuis le début de l'année 2011, 85 cas ont été enregistrés dans l'état du Pará, dont 10 mortels (SESPA 2011).

Cette évolution et la spécificité de mode de contamination orale de la Maladie de Chagas en Amazonie, résume à elle seule toute l'histoire de la maladie, par la transformation d'une enzootie en zone d'endémie, les modifications environnementales créées par les activités humaines modifient les comportements des vecteurs sylvatiques (Béranger & Pages, 2007).

Bien que plusieurs types de boissons artisanales soient associées à des cas de contamination orale sur le territoire brésilien (Tatto *et al.*, 2007 ; Dias *et al.* 2008 ; Shikane Yasuda *et al.*, 2009 ; Bastos *et al.*, 2010), en Amazonie, une association très forte est faite

entre les cas de contaminations orale et l'açaí (Pinto *et al.*, 2001 ; 2009 ; Nóbrega *et al.*, 2009 ; ). L'açaí est un palmier de la famille des *Arecaceae*, *Euterpe oleacea*, le fruit est écrasé pour produire une pâte ou une boisson. La plupart de la population amazonienne en consomme quotidiennement (Nóbrega *et al.*, 2009). La contamination de la pâte d'açaí par les déjections des triatomés est certainement provoquée par des déjections d'insectes sur les fruits ou par des insectes eux-même écrasés par inadvertance lors du processus de fabrication (Valente *et al.*, 1999). Au vu de l'architecture des palmiers *Euterpe oleacea*, il n'est pas considéré que les triatomés puissent vivre à l'intérieur de la couronne (Romaña, communication personnelle) mais que la contamination des fruits se fait réellement lors du processus de fabrication, les insectes attirés par la lumière des maisons tombent dans les machines de fabrication ou, dans les bateaux lors du transport et du stockage des fruits (SESPA, 2011).

Le bassin amazonien occupe une aire d'environ 6 600 000 km<sup>2</sup> appartenant au Brésil, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie, Venezuela et Guyane française. Bien que la déforestation ait lieu dans tous, les pays, c'est au Brésil qu'elle est la plus intensive. Toutefois, ce déboisement n'est pas homogène, mais plutôt concentré dans certaines régions, surtout dans ce que l'on appelle l'arc de déforestation, qui comprend, entre autres, le sud de l'État du Pará (Fearnside, 2005). Les principales aires de déforestations sont les frontières agricoles qui montent vers le nord des états du Pará, du Tocantins, du Mato Grosso et d'Acre (Castro *et al.*, 2006). La cause principale de la déforestation en Amazonie est le développement de l'agriculture. Les coupes sélectives de bois, les feux de clairières associés, la construction de routes et l'exploitation minière sont des contributeurs de moindre importance (Fearnside, 2005).

En milieu déforesté, les palmiers du genre *Attalea* prolifèrent rapidement et envahissent les milieux ouverts et deviennent même un fléau pour les pâturage et les cultures (Mitja & Ferraz, 2001, Kahn *et al.* 2003). Dans certaines régions du Brésil, les palmiers *Attalea* particulièrement *Attalea speciosa* (Babaçu) représentent une ressource extractiviste importante et leur abattage est même interdit par le gouvernement.

Vingt-sept espèces de triatomines ont été décrites en Amazonie, et à part quelques foyers limités de quelques populations domiciliées, les triatomés amazoniens sont essentiellement sylvatiques (Abad-Franch & Monteiro 2007, Aguilar *et al.* 2007). Les grands palmiers bordants les zones péri-domestiques sont vus comme la principale source

d'individus de *Rhodnius spp.* (Romaña *et al.* 1999, Fitzpatrick *et al.* 2008, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2008, Abad-Franch *et al.* 2010, Calzada *et al.* 2010). Bien que la maladie de Chagas, ne soit pas nouvelle en Amazonie, en 1924 Carlos Chagas décrivait l'infection naturelle de singe par *T. cruzi* et plus d'une centaine d'espèces de mammifères naturellement infectées ont été identifiées (Deane 1964), les pratiques de dégradation forestière provoquent la prolifération des habitats de prédilection des *Rhodnius spp.* et peuvent donc influencer sur les dynamiques de population des insectes. Si au 20<sup>ème</sup> siècle il s'agissait de lutter contre une zoonose installée dans les habitations humaines, aujourd'hui, il s'agit d'identifier, de caractériser, et de gérer le risque de transmission d'une enzootie qui circule dans un environnement sans cesse en modifications (Romaña 2007).

### 1.5 Le projet PLUPH

---

Ce travail ici présent fait partie d'un large projet international (Brésil, Canada, France) et interdisciplinaire (sciences sociales, environnementales, santé publique), le PLUPH né de la longue expérience des équipes Canado-Brésilienne dans la région du Tapajós lors des projets Caruso I et II étudiant l'impact de la déforestation sur la contamination des populations humaines par le mercure et de la rencontre des leaders du projet CARUSO, Marc Lucotte, Robert Davidson (CARUSO, 2011) avec la chercheuse française Christina A Romaña qui a consacré sa carrière de chercheur à l'étude de la maladie de Chagas, la lutte biologique contre les triatomes et les relations palmiers-triatomes dans différents pays d'Amérique latine (Romaña *et al.*, 1999, 2003 ; Romaña, 2007). La prise en compte de deux problèmes de santé publique émergents dus à la déforestation, ont conduit à la réalisation du projet PLUPH (PLUPH, 2011), qui vise à mettre en évidence l'apparition d'un risque accru de transmission de la trypanosomiase américaine et de l'exposition au mercure, lorsque la canopée de la forêt primaire est ouverte, pour les populations locales du bassin amazonien.

Les deux processus majeurs en action lors de la déforestation, sont d'une part l'érosion du sol, conduisant à la solubilisation du mercure des sols amazoniens dans les bassins versants, les lacs et les rivières ainsi qu'à la prolifération des palmiers héliophiles et résistants aux techniques de brûlis (*Attalea spp.*). Ces deux processus augmentent les risques d'exposition d'une part au mercure, d'autre part à la maladie de Chagas, pour des populations déjà vulnérables. L'objectif du projet PLUPH est d'assurer la santé des petits agriculteurs des tropiques humides au travers de la prévention primaire (c'est-à-dire avant même que les

pathologies apparaissent dans la population) face aux à ces deux problèmes émergents, en proposant des systèmes de cultures alternatives (agro-forestiers) adaptés aux besoins des agriculteurs et à la mosaïque de paysage en place. Le but recherché est à la fois de réduire (1) l'érosion des sols et la solubilisation du mercure, (2) la prolifération des palmiers propices aux vecteurs de la Maladie de Chagas et (3) la destruction du couvert forestier par les techniques traditionnelles de culture sur brûlis.

### 1.6 Objectifs et description de l'abordage méthodologique

---

Dans le contexte amazonien et plus précisément au sein du projet PLUPH, l'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'impact des perturbations anthropiques liées à l'utilisation du sol sur la dynamique des palmiers du genre *Attalea*, des populations de triatomes associées, des parasites associées aux triatomes et des hôtes / réservoirs potentiels dans la région d'étude et plus précisément au sein de trois communautés choisies par le projet PLUPH.

Pour ceci nous avons tenté de développer une approche intégrée, combinant les données du paysage (écologiques et spatiales) et les données génétiques afin de comprendre les mécanismes de colonisation des palmiers, de dispersion, et de structuration des populations de triatomes, mécanismes à la base de l'émergence de la maladie de Chagas en Amazonie.

Le diagramme de flux (Figure 1.5) décrit la séquence méthodologique et les objectifs spécifiques de chaque étape.

Premièrement, l'approche géospatiale nous a permis de déterminer *a priori* des zones d'échantillonnage afin de pouvoir travailler rapidement sur le terrain au sein des trois communautés (I). La dissection des palmiers afin de récolter les insectes dans les différentes unités de paysage, s'est faite parallèlement à la classification *in situ* de ces différentes unités de paysage ou d'utilisation du sol.

De retour au laboratoire un travail de cartographie supervisée du sol, à partir de la classification faite sur le terrain à été effectué sur les images satellites disponibles ( SPOT 5 ), afin d'obtenir une carte de classification du sol de la zone d'étude et de l'intégrer à un Système d'Information Géographique (SIG) puis de l'utiliser comme outil de travail dans la

compréhension des phénomènes écologiques et épidémiologiques mis en jeu lors de la fragmentation du couvert forestier dans la région d'étude.

En ce qui concerne l'analyse génétique des insectes, ils ont été groupés et identifiés selon le palmier sur lequel ils ont été prélevés. L'ADN des insectes a été extrait à partir des pattes des nymphes et du muscle alaire des adultes, afin, d'une part d'identifier les espèces de triatomes échantillonnés en utilisant le gène mitochondrial du cytochrome b et de préciser leurs clades phylogéographiques et, d'autre part, de génotyper tous les individus à l'aide de loci microsatellites afin de conduire des analyses de génétique de populations et d'examiner l'effet de la fragmentation du milieu sur la structure génétique des populations d'insectes associées aux palmiers et d'estimer leur dispersion.

L'ADN contenu dans le tube digestif des insectes a également été amplifié afin d'une part, d'identifier la présence de trypanosomes et d'en caractériser la/les souche(s), et d'autre part, d'identifier les potentielles ressources alimentaires des insectes par séquençage direct d'un fragment de cytochrome b amplifié, spécifique de vertébrés.

Les résultats sont présentés sous forme de 4 articles dont les objectifs spécifiques sont les suivants :

Article 1 : Identifier les différentes formes d'occupation du sol par les communautés humaines locales et étudier les aspects écologiques des populations de *Rhodnius robustus* dans les palmiers *Attalea spp.* avec une approche de cartographie du risque environnemental

Article 2 & 3 : Identifier, via des caractérisations moléculaires, les sources alimentaires des insectes et les souches de trypanosomes *T. cruzi* et *T. rangeli* impliquées dans le système épidémiologique local et décrire les interactions vecteurs–pathogènes–hôtes

Article 4 : Identifier la structure génétique et les flux géniques des *Rhodnius spp* dans la mosaïque de paysage afin d'en extraire des informations sur la dispersion des insectes en milieu fragmenté

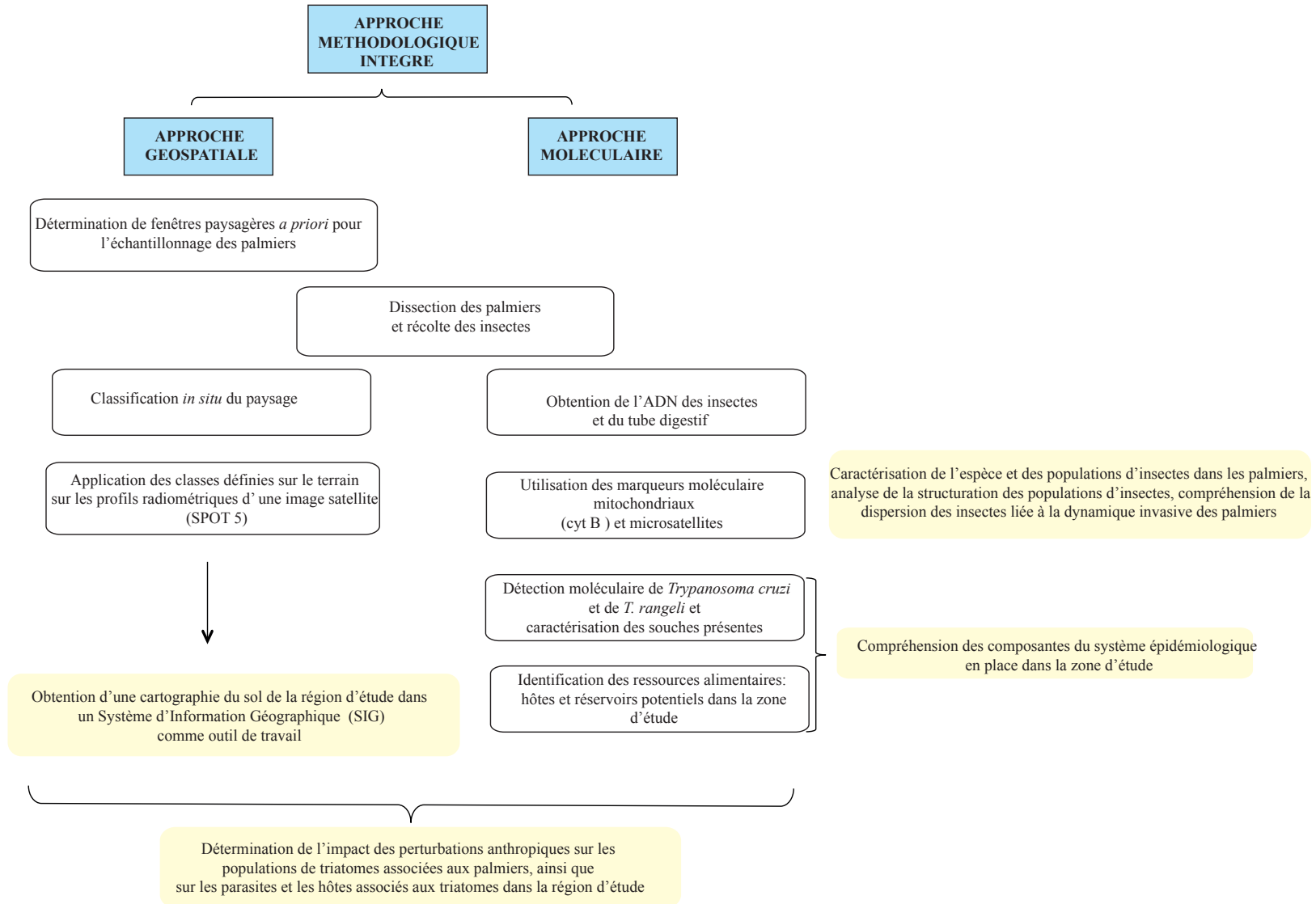


Figure 1. 5. : Diagramme de flux de la séquence méthodologique retenue dans ce travail de thèse.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Description du site d'étude

---

La région d'étude comprend trois communautés agricoles de la région du Tapajós (état du Pará, Brésil), à 400 kilomètres au sud du fleuve Amazone, localisées dans les districts d'Aveiro et de Ruropolis (Figure 2.1). Ces trois communautés ont été choisies selon les buts plus globaux du projet interdisciplinaire, le PLUPH (Poor Land Use Poor Health, <http://www.pluph.uqam.ca>) dont ce projet de thèse fait partie.

Les caractéristiques principales de ces trois communautés sont 1) leur localisation par rapport à la rivière Tapajós, 2) la différence d'époque d'installation de chaque communauté et 3) la différence de stratégie d'occupation du sol de chaque communauté.

La première communauté, Saõ Tomé (S03.9918, W55.56718), est située directement au bord du fleuve, à l'entrée d'un lac intérieur (La Bocca). Elle est constituée par une association de 25 familles, principalement originaires de l'état du Pará (caboclos) (95%). Ce fut la première des trois communautés créée il y a environ 75 ans. Cette communauté est caractéristique de ce qu'on appelle l'Amazonie des rivières (Valbuena 2008).

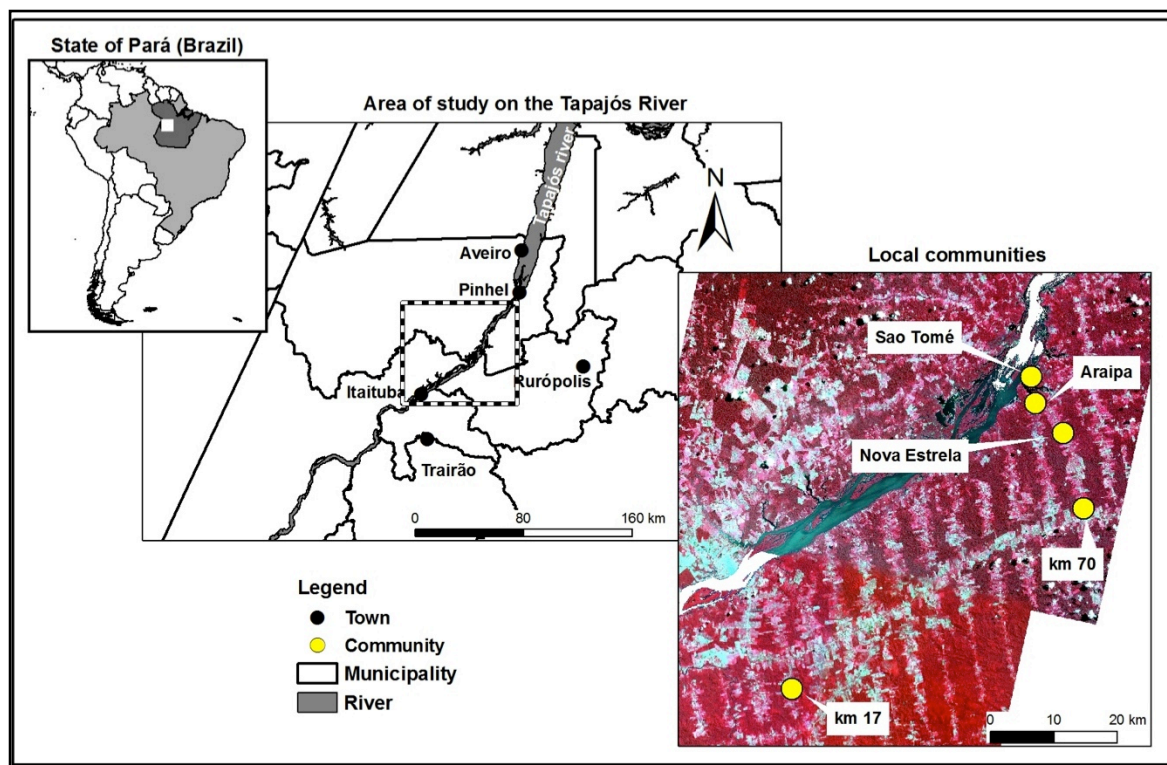
La deuxième communauté, Nova Estrela, située à une douzaine de kilomètres de la rivière, fut constituée il y a environ 30 ans lors de l'ouverture de la transamazonienne (BR136). Elle est constituée de 138 habitants, principalement immigrants nordestins (colons) (67 %) venus s'installer lors de la distribution des lots agricoles organisée par l'INCRA (Institut National de Colonisation et de Réforme Agraire). Cette communauté reflète typiquement ce qu'on appelle l'Amazonie des routes. Les processus d'appropriation du sol par ce type de communauté sont plus rapides, se produisant par la conversion directe des espaces forestiers en espaces pâturés.

La troisième communauté, fondée il y a une vingtaine d'années, Araipá Lago, située au bord du lac intérieur, possède des caractéristiques historiques et sociales intermédiaires aux deux précédentes. Elle est constituée de la population riveraine qui s'est établie de manière disséminée au bord du lac et d'une partie de la population de Nova Estrela qui a migré plus en

direction de la rivière, formant une communauté centrale à l'intersection du lac Araipá et de la route (*vicinal*) menant jusqu'à la transamazonienne (KM 70, Divinópolis). Elle représente la communauté avec le plus d'habitants, soit 184 résidents.

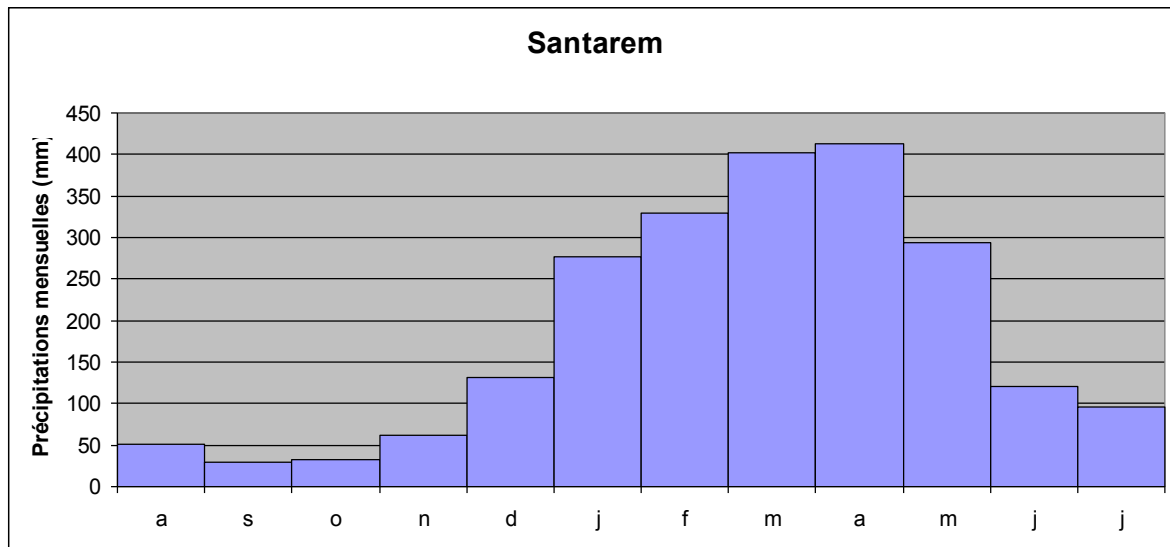
Dans une perspective de régionalisation du projet PLUPH, deux communautés le long de la transamazonienne (BR163) ont été ajoutées à l'étude locale des trois communautés. La première communauté se situe à l'intersection du vicinal terminant au Lac Araipá et de la transamazonienne: KM70 "Divinópolis" (S04,17922,W55.48920), c'est une communauté caractéristique de bord de route, entourée principalement de pâturages gérés par de grands exploitants (*fazendeiros*). Au km 17 de la transamazonienne, nous avons travaillé dans une petite communauté du vicinal (S04.43482, W55.90239), réunissant à nouveaux les caractéristiques d'agriculture de subsistance du type Nova Estrela.

L'échantillonnage effectué dans ces deux communautés étant très réduit, les données ne sont utilisées que pour effectuer certaines comparaisons avec les 3 communautés initiales qui sont vraiment au cœur du projet.



**Figure 2.1.** Localisation des cinq communautés de la région d'étude, situées entre le fleuve Tapajós (affluent de l'Amazone) et la transamazonienne BR-163 (Cuiaba-Santarem).

La région présente un climat chaud et humide, avec une température moyenne variant de 25 °C à 27 °C, des températures maximales et minimales comprises entre 31°C - 33°C et 24°C- 25 °C et une claire différenciation entre une saison humide de janvier à juillet et sèche d'août à octobre (Figure 2.2)



**Figure 2.2.** Moyennes mensuelles des précipitations en mm, dans la région de Santarem, à l'endroit où le fleuve Tapajós rejoint l'Amazone (d'après J.Ronchall, Hybam).

La végétation est dominée par une forêt ombrophile dense (forêt tropicale amazonienne), cependant les récentes perturbations humaines de culture sur brûlis et d'élevage de bétail ont provoqué une transformation du couvert végétal en formations de végétations secondaires, jachères (*capoeira*), palmeraies (forêts secondaires mono-spécifiques) et pâturages (*pasto*), ainsi qu'en parcelles de culture (*roças*). Les activités principales des 3 communautés sont l'agriculture de subsistance, essentiellement de riz et de manioc, ainsi que la pêche et l'élevage de bétail à petite échelle.

## 2.2. Choix des palmiers

---

Divers palmiers ont été identifiés dans la zone d'étude, dont les noms communs sont donnés entre parenthèse: *Attalea maripa* (Aubl.) Mart. 1845 (inajá), *A. speciosa* (babaçu), *A. phalerata* Mart. ex Spreng. 1825 (urucuri), *Oenocarpus distichus* Martius 1823 (bacaba), *Mauritia flexuosa* L. f. 1782 (buriti), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1824

(macaúba) et *Astrocaryum vulgare* Mart. 1824 (tucumã) (Glassman, 1978 ; Balick *et al.*, 1987 ; Henderson *et al.*, 1995 ; Glassman, 1999 ; Pintaud, 2008). Cependant, seules les trois premières espèces, appartenant au genre *Attalea* sont considérées comme des indicateurs fiables de la présence de triatomes (Romaña *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2005 ; 2010). L'échantillonnage n'a donc porté que sur les trois palmiers de ce genre.

### 2.3. Stratégie des zones d'échantillonnage

---

Un choix de méthode d'échantillonnage *a priori* a été défini avant la première mission de terrain à partir d'une classification de paysage non supervisée (Kenji Ose, IRD US ESPACE), effectuée sur des images satellites (SPOT 5) prises sur la région d'étude le 22.06.2006.

Afin de pouvoir détecter les éléments paysagers occupant une surface importante tout en fournissant une précision suffisante sur les palmiers, des fenêtres d'échantillonnage d'1km<sup>2</sup> ont été choisies comme échelle de travail, ce qui représente une échelle de travail couramment utilisée en écologie du paysage.

Ces fenêtres paysagères ont été déterminées *a priori*, en fonction du calcul d'hétérogénéité du paysage. Les zones ont été choisies selon 1) la représentativité de toutes les classes d'utilisation du sol au sein de la fenêtre<sup>1</sup>, et 2) le degré de division ou la fragmentation du paysage maximale: soit que la probabilité que deux points choisis au hasard dans le paysage ne soient pas situés dans la même unité de paysage non fragmentée. Cet indice D est calculé  $D=1-\sum_i(A_i/A)^2$ , avec  $A_i$  l'aire de l'unité du ième paysage et A l'aire totale de la région étudiée (Jaeger, 2000) (Figure 2.3). Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel (r.le) (Baker, 2001).

Ce travail s'est fait en étroite collaboration avec l'équipe IRD de l'unité US Espace, Emmanuel Roux, Kenji Ose et Christina Romana et fera l'objet d'une note technique dans la revue Geospatial Health.

---

<sup>1</sup> d<sup>RMS</sup>: différence entre les proportions de chaque classe dans toute la région considérée et les proportions au sein de chaque fenêtre d'1km<sup>2</sup> possible.

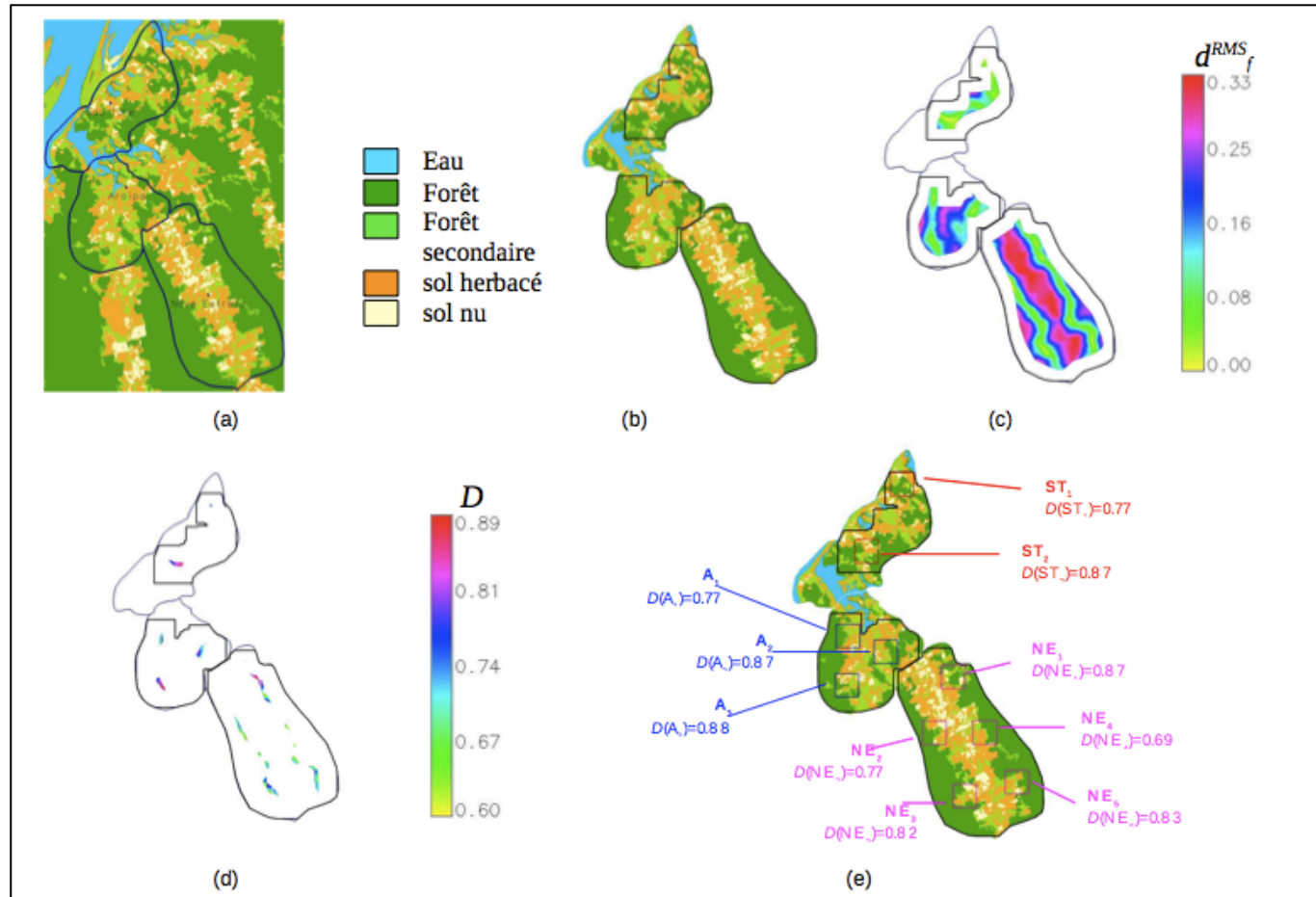
#### 2.4. Comparaison entre échantillonnages "objectif" et "effectif"

---

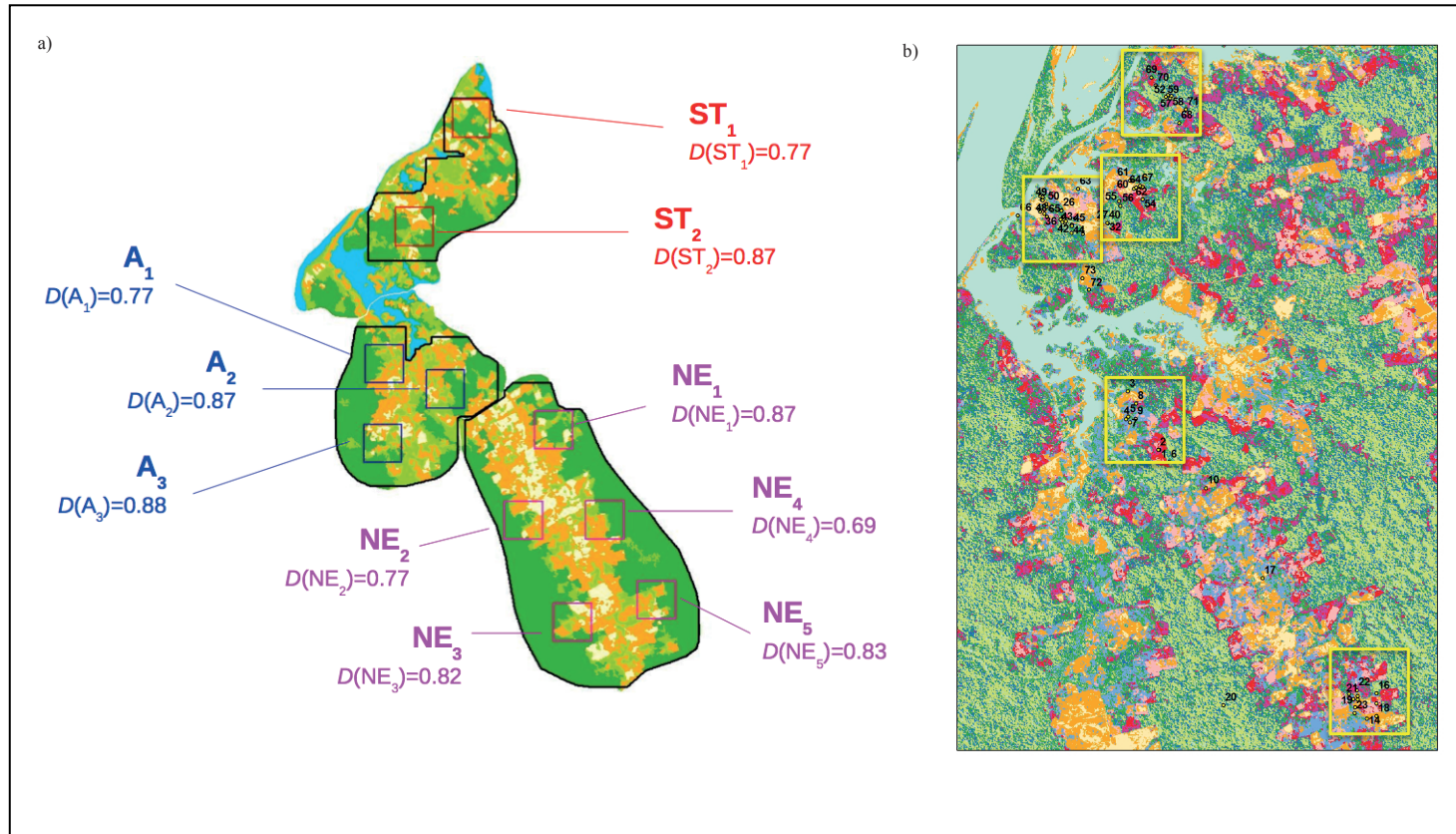
La figure 2.4 montre la comparaison entre les fenêtres paysagères délimitées *a priori* et l'échantillonnage effectivement réalisé dans les trois communautés en 2008 et 2009. En 2008, une fenêtre par communauté a été réalisée et en 2009 quelques palmiers ont été disséqués à Araipá, et deux nouvelles fenêtres ont été échantillonnées à Saõ Tomé.

L'échantillonnage de 2009 s'écarte de celui de 2008, pour les raisons principales suivantes:

- (1) l'inaccessibilité physique à certaines fenêtres: les routes impraticables nous ont forcé à rester proche de l'eau et à recentrer nos activités au centre des communautés ce qui a conduit à de plus petits échantillonnages à Araipá et Nova Estrela.
- (2) l'autorisation d'un nombre limité de palmiers à disséquer chez certains propriétaires: ceci nous a conduit à explorer plus loin l'échantillonnage (troisième fenêtre à Saõ Tomé).
- (3) Il n'a pas été possible d'échantillonner à l'intérieur d'une fenêtre homogène, de forêt non perturbée pour des questions d'accessibilité.



**Figure 2.3.** Détail du processus de choix des zones d'échantillonnage: a) délimitation manuelle des zones des trois communautés sur la classification; b) élimination des zones, dans lesquelles des zones d'1km<sup>2</sup> ne peuvent être définies à cause de la présence d'eau; c) résultats des calculs d'indice  $d^{RMS}$  entre les proportions de classes dans la zone et les proportions de classes dans les fenêtres possibles, d) résultats du calcul de D; e) sélection des fenêtres ayant les plus grandes valeur de D (Roux, E, Ose, K, Quartier, M. Romana C. workshop PLUPH 1-5 septembre 2008).



**Figure 2.4.** Comparaison entre a) échantillonnage « objectif » et b) échantillonnage effectué dans les trois communautés. ST: Saõ Tomé, A. Araipá, NE: Nova Estrela.  $D(X_i)$  sont les valeurs de l'indice de fragmentation des unités de paysage calculées à l'intérieur de chaque fenêtre (Jaeger, 2000).

## 2.5. Echantillonnage des triatomes

---

La dissection des palmiers s'est déroulée dans les trois communautés durant deux missions de terrain du projet PLUPH, du 8 septembre au 18 octobre 2008 (saison sèche) et du 7 au 24 mai 2009 (saison des pluies). Du 25 au 27 mai 2009, les échantillonnages se sont déroulés dans les deux communautés de la transamazonienne (KM70 et KM17).

En 2009, aucun échantillonnage n'a pu être réalisé à Nova Estrela en raison des pluies qui ont rendu impossible l'accès en voiture à cette communauté.

Les palmiers ont été morphologiquement identifiés en fonction de la forme de la feuille, des folioles, du pétiole, des inflorescences et des fruits selon Henderson *et al* (1995). La taille des palmiers échantillonnés variait de 2,5 m à 23 m. Ils ont été abattus à l'aide d'une tronçonneuse puis disséqués feuille par feuille en examinant précautionneusement la matière organique contenue entre chaque pétiole, sur un drap blanc (fig.2.5) (Diotauti & Dias, 1984). Pour éviter la lumière, les triatomes se déplacent très rapidement, il est donc possible de les attraper avec une pince.

Certains paramètres botaniques relatifs aux palmiers tels que la taille, le nombre de feuilles, la présence et la taille du stipe, ainsi que les indices de présence d'animaux, de plumes, de nids, d'épines, ou de déjections ont été relevés.

Les insectes collectés par palmiers, ont été transférés dans des tubes eppendorf® fermés avec de la gaze afin de laisser pénétrer l'oxygène et l'humidité. Les conditions de détention sur le bateau du projet n'ont pas permis la survie de tous les individus, certains individus vivants ont été nourris sur des poules fournies par les habitants tandis que les insectes morts ont été directement stockés dans de l'éthanol absolu. Tous les insectes ont été ensuite emmenés au laboratoire de la Fiocruz René Rachou de Belo Horizonte au Brésil, puis envoyés au Laboratoire Evolution Génétique et Spéciation (LEGS, CNRS) à Gif sur Yvette en France.

Chaque palmier échantillonné a été géoréférencé à l'aide d'un GPS (Garmin etrex, Garmin®)



**Figure 2.5.** Espèces de palmiers et échantillonnage: a) *Attalea speciosa* (Babaçu); b) *Attalea maripa* (Inaja); c) *Attalea phalerata* (Urucuri); d) dissection feuille par feuille du palmier abattu; e) stades adultes de *Rhodnius robustus* dans les fibres du palmier; f) fouille minutieuse de toute la matière organique contenue à l'intérieur de la couronne des palmiers; g) 1<sup>er</sup> stade larvaire de *R. robustus*.

## 2.6. Traitement des données de terrain

---

### 2.6.1. Statistiques et calculs d'indices

Les comparaisons d'infestations (presence et desité d'insectes) et d'infections (présence d'insectes infectés et densité d'insectes infectés) par palmiers entre les différents groupes de palmiers (espèces, communautés, unités de paysage, altitude) ont été faites via des statistiques non paramétriques. Les tests exacts de Fisher et les tests de Kruskal-Wallis ont été effectués sous R (R Development Core Team, 2010). L'indice de biodiversité (indice de Shannon,  $H_s$ ) pour les sources alimentaires identifiées a été calculé selon la formule:

$$H_s(p) = - \sum_{k=1}^s p_k * \ln(p_k)$$

où  $p_k$  est la fréquence de l'hôte au sein d'un habitat, calculé pour tous les hôtes (i) au sein de chaque communauté et unité de paysage (Shannon, 1948 ; Shannon & Weaver, 1963). Cet indice peut varier de 0 à 1, il est maximal quand les espèces ont des abondances identiques dans le peuplement et il est minimal quand une seule espèce domine tout le peuplement.

L'indice de Gini-Simpson ( $H_{S-G}$ ) a également été calculé

$$H_{G-S}(p) = 1 - \sum_{k=1}^s p_k^2$$

où  $p_k$  est la fréquence de l'hôte. Sa valeur peut être interprétée comme la probabilité qu'une paire d'espèces choisie au hasard soit de deux espèces différentes (Gini, 1912; Simpson, 1949). L'indice de Gini-Simpson donne moins d'importance aux espèces rares. Il comptabilise les interactions possibles entre paires d'individus : les espèces rares interviennent dans peu de paires, et influent peu sur l'indice. En conséquence, le biais d'échantillonnage est très petit (Marcon, 2011).

### 2.6.2. Images satellites

Plusieurs images satellites de type SPOT 5 de résolution 2,5 mètres de la région ont été obtenues durant les périodes de terrain (septembre 2008 et mai 2009), fournies par

Le projet SEAS GUYANE sous l'égide de l'Unité ESPACE, IRD-Cayenne (<https://www.seas-guyane.org/seasguyane/index.htm>) partenaire du projet PLUPH.

### 2.6.3. Classification du paysage

Sans traitement supplémentaire, les images satellites sont inutilisables, c'est pourquoi la classification des images consiste à attribuer à chaque point de l'image (pixel) une étiquette parmi un ensemble de classes définies auparavant. La classification supervisée se base sur une bonne connaissance du terrain observé. Cette connaissance s'est faite lors des missions d'échantillonnage: à chaque palmier est associé une unité de classification du sol et certains points additionnels à l'échantillonnage ont servi de repères (routes, maisons, formations végétales particulières).

Un front pionnier peut être défini comme une forme spatiale témoignant d'un processus d'appropriation de nouveaux territoires, considérés comme un milieu vierge de toute intervention humaine. L'action principale est souvent le défrichage et des feux opérés, dans des savanes et des forêts (Hypergé, 2004). Généralement les agriculteurs utilisent la technique de la coupe et brûlis pour dégager leurs futures aires de culture et de pâture. Ces aires de cultures sont exploitées pendant une brève période puis laissées en jachère pendant plusieurs années, à la suite de quoi, la jachère est à nouveau coupée et brûlée afin de fertiliser le cycle de culture qui s'ensuit (Camarão *et al.*, 2000). Après plusieurs séquences de cultures et jachères, les aires déboisées sont abandonnées, donnant lieu à des formations de forêts secondaires ou transformées en pâturage.

En partant de l'occupation initiale, essentiellement forestière, les différentes classes d'utilisation du sol ont été définies ainsi *in situ*, en s'inspirant de la classification faite par Oszwald *et al.* 2010 (Figures 2.6 et 2.7).

La forêt exploitée représente un peuplement fermé, multi-stratifié, constitué d'une strate de grands arbres supérieurs à 50m, dont les essences forestières à valeur marchande ont été prélevées. On y trouve les palmiers du genre *Attalea* en faible densité d'une hauteur variant de 9 à 22m.

Les forêts fragmentées représentent des reliquats forestiers entre deux parcelles défrichées, ou au bord de l'eau (galeries), les effets de bord y sont importants.

Les forêts de palmiers sont des formations secondaires mono-spécifiques principalement issues de cultures, jachères ou pâturages laissés à l'abandon. La végétation secondaire est principalement représentée par les palmiers du genre *Attalea* en grande densité, mais néanmoins de taille un peu plus réduite (6-13m).

Comme l'ouverture de la forêt et le brûlis favorisent la prolifération des palmiers *Attalea*, le maintien des espaces pâturés demande de l'entretien et souvent les pâturages sont parsemés de groupements de palmiers de différentes densités. Nous avons essayé d'identifier les bosquets de palmiers dans les espaces pâturés.

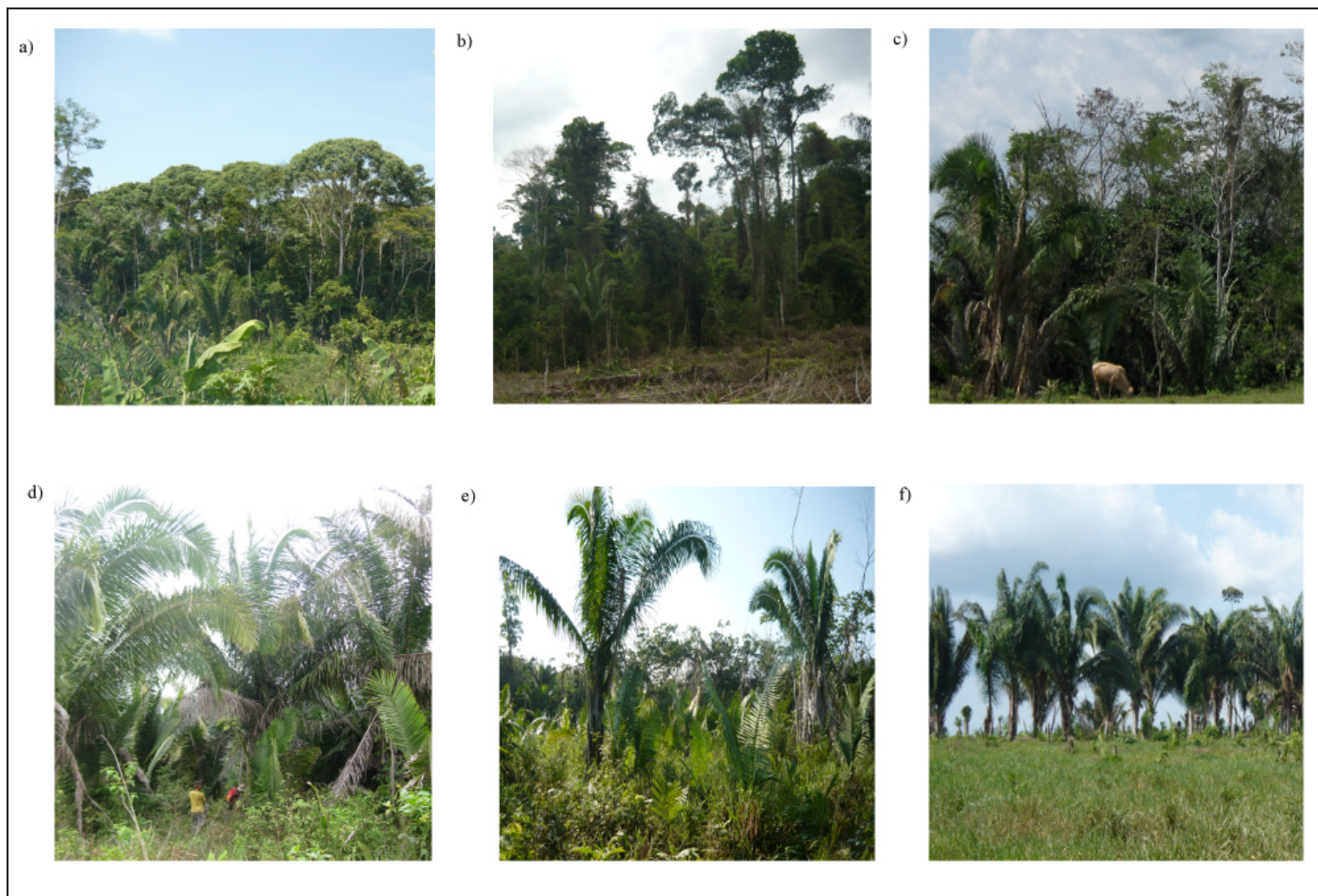
Lorsque les cultures sont laissées à l'abandon, une végétation broussailleuse prend le dessus, au sein de laquelle émergent les palmiers en densité élevée. Ces jeunes jachères sont ensuite à nouveau défrichées ou continuent leur cycle de croissance pour former des jachères plus anciennes où les palmiers sont souvent représentés en grande densité et en tailles variées.

Les parcelles de cultures sont les parcelles cultivées de manioc, riz, haricots et maïs, les palmiers y sont généralement éliminés.

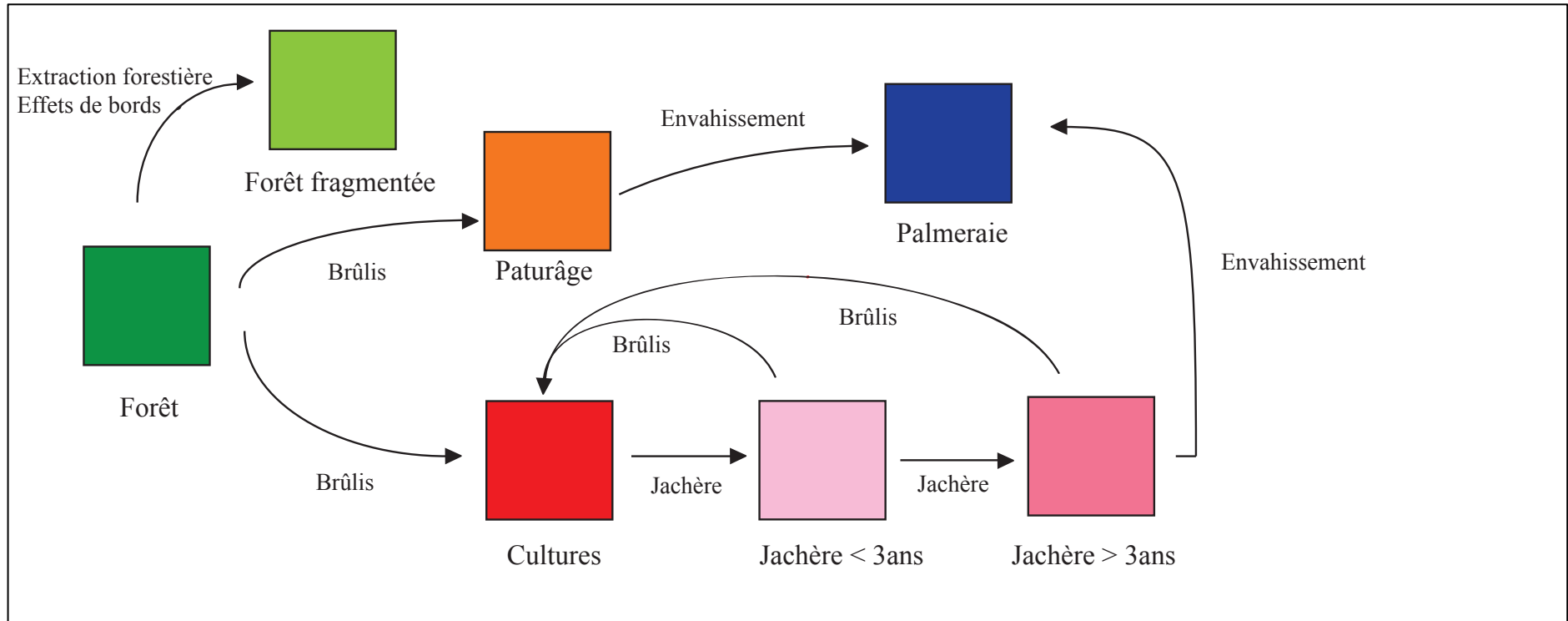
Finalement le pâturage, vaste espace ouvert planté de graminées fourragères (*Braccharia spp.*) constitue le dernier cycle d'appropriation des espaces forestiers. Les palmiers y sont représentés en densités variées, souvent par groupes de plusieurs palmiers, rarement isolés.

Cette classification est ensuite appliquées aux régions ou aux pixels correspondant sur l'image satellite et le logiciel ENVI (Environment for Visualizing Images) calcule par la méthode de calcul de distance minimum, la distance entre les différentes classes radiométriques identifiées sur le terrain. Quatre bandes spectrales sont utilisées, Vert, Rouge, PIR (Proche Infra Rouge) et le NDVI (Normalized Difference Vegetation Index).

Finalement, le modèle numérique de terrain (MNT) de 90 mètres de résolution a été utilisé pour estimer la topographie du site d'étude et les altitudes où se situaient les palmiers (source: <http://www.landcover.org/data/srtm>).



**Figure 2.6.** Illustration des six classes de paysage identifiées *in situ* avec présence de palmiers du genre *Attalea*: a) forêt exploitée; b) fragment forestier; c) palmeraie ou bosquet de palmiers; d) jachère de plus de 3 ans; e) jachère de moins de 3 ans et f) pâturage avec palmie



**Figure 2.7.** Dynamique de succession paysagère typique de culture sur brûlis, la fertilisation des parcelles est basée sur le potentiel de régénération de la végétation secondaire. La fréquence des défrichements et brûlis ainsi que la période de jachère peut varier d'un cultivateur à un autre. La période de jachère est généralement longue et la fréquence de défrichement faible pour les populations indigènes (caboclos), la période de jachère est raccourcie et la fréquence de défrichement plus grande pour les populations immigrantes (colons).

## 2.7. Identification morphologique des insectes

---

Les insectes ont été identifiés selon leurs caractéristiques morphologiques et chromatiques (Lent & Wigodinsky, 1979). Les adultes ont été différenciés selon leur sexe et les différents stades larvaires ont été identifiés. L'état nutritionnel (alimenté, non alimenté) de chaque individu a été déterminé visuellement par examen morphologique de l'abdomen, puis confirmé par dissection par la recherche de sang dans le tube digestif.

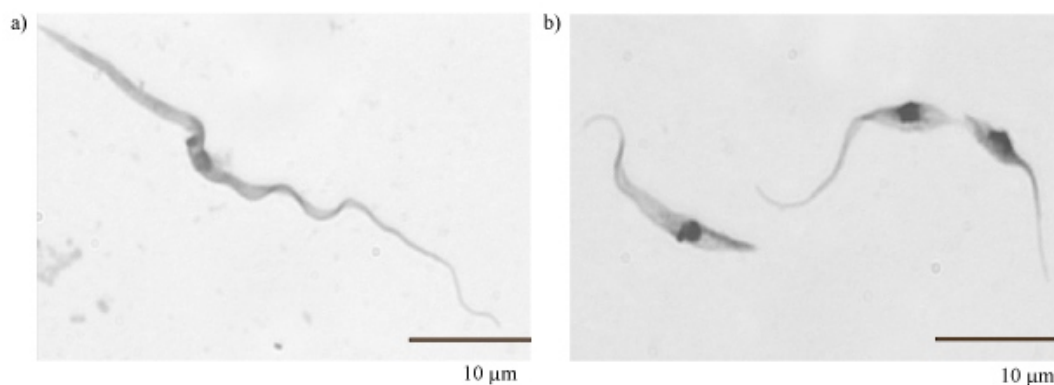
## 2.8. Détermination visuelle de l'infection par *Trypanosoma cruzi* et *T. rangeli*

---

Tous les insectes arrivés vivants au laboratoire de la Fiocruz (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brésil) ont été soumis à un examen direct des déjections pour identification morphologique de *Trypanosoma cruzi* et de *T. rangeli*. Les trypanosomes étant identifiés grâce à leur mouvement dans les déjections, cet examen n'est pas possible chez les spécimens morts.

Une goutte de sérum physiologique 0.9% est mise sur une lame de microscopie, l'abdomen du triatome est ensuite comprimé avec une pince de dissection afin de provoquer l'élimination des fèces qui sont ensuite homogénéisées avec le sérum physiologique.

La lame est ensuite observée au microscope (160x) afin de détecter la présence des stades évolutifs de trypanosome (Cuba, 1998) (Figure 2.8).



**Figure 2.8.** Photographies au microscope optique (600X) de a) *Trypanosoma rangeli* et b) *T. cruzi* métacycliques circulants (photos: Fernando Braga Stehling Dias, LATEC).

## 2.9. Extraction ADN des insectes

---

L'extraction d'ADN génomique des triatomés a été effectuée soit à partir du muscle alaire et de deux pattes (adultes, L5, L4), soit de l'insecte entier (L3, L2, L1) en utilisant le DNeasy Tissue Kit® de Qiagen selon les instructions du fabricant. De plus, pour les adultes, les L5 et les L4, le contenu du tube digestif a été extrait de manière indépendante afin de procéder à l'identification moléculaire du dernier repas sanguin et des parasites en utilisant l'ADN contenu dans le repas sanguin. Pour les insectes de petite taille (L1, L2, L3), la détection des hôtes et des parasites a été faite à partir de l'ADN extrait de l'insecte entier.

## 2.10. Amplification ADN mitochondrial Cytochrome b

---

Afin de confirmer moléculairement le statut taxinomique des insectes et de procéder à des reconstructions phylogénétiques, un fragment de 458 paire de bases du gène *cytochrome b* a été amplifié à l'aide des amorces CYTB7432F, 5'- GGACG(AT)GG (AT)ATTTATTATGGATC, et CYTB7433R, 5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA (Monteiro *et al.*, 2003).

Les PCR ont été effectuées dans un volume final de 25µl (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) contenant: 5µl de Tampon 5X ; 1µl de dNTP (10µM chacun); 3µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 1µl de chaque amorce (10µM); 0,2µl de Taq Polymérase (5U/µl) et 1µl d'ADN (10 ng ADN). Les conditions PCR d'amplification sont décrites dans la table 2.1. et les méthodes de séquençage au point 2.14.

Un seul individu par palmier ainsi que tous les adultes ont été séquencés avec le marqueur mitochondrial *cytochrome b*, pour un total de 134 insectes.

### 2.11. Détection moléculaire de l'infection par *T. cruzi* et *T. rangeli*

---

La détection moléculaire de l'infection par *T. cruzi* a été effectuée en utilisant comme marqueur une région inter-génique du gène mini-exon (Souto *et al.*, 1996). Le fragment amplifié est de 350pb pour les isolats de *T. cruzi* TcI et 300pb pour *T. cruzi* TcII, selon la classification ancienne du parasite (Anonyme, 1999). Trois amorces ont été utilisées TCI - 5'- CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3' (spécifique pour *T. cruzi* I, Anonyme, 1999), TC2 - 5'- GTG TCC GCC ACC TCC TCC GGC CC-3' (spécifique pour *T. cruzi* II, Anonyme, 1999) et TC - 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3' (commun aux deux groupes) (Souto *et al.*, 1996).

Pour *Trypanosoma rangeli*, l'identification moléculaire s'est faite à partir de l'amplification d'un fragment de 620 bp d'un gène répétitif d'ARN nucléaire C11 (sno-RNA-C11) qui amplifie un fragment de 620 bp (Morales *et al.*, 2002; Pavia *et al.*, 2007). Les amorces TrF (5'-CGCCCCGTCTTGCCCTGT-3') e TrR2 (5'- CGCAGCAAGGACAG GAGGGA-3') ont été utilisées.

Les amplifications ont été réalisées dans un volume total de 10µl contenant 1µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 3µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µl de dNTP (10µM chacun), 1µl de chaque amorce (10µM), 0,1µl de GoTaq DNA polymérase (5U/µl) et 1µl d'ADN (10 ng). Les produits PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1% (TBE 0,5X), après migration pendant 30 minutes à 100V, en utilisant un marqueur de taille Ladder 100pb (Invitrogen). Les conditions PCR et les longueurs de fragments attendues sont décrites dans les tables 2.2 et 2.3.

### 2.12. Variabilité de *T. cruzi*

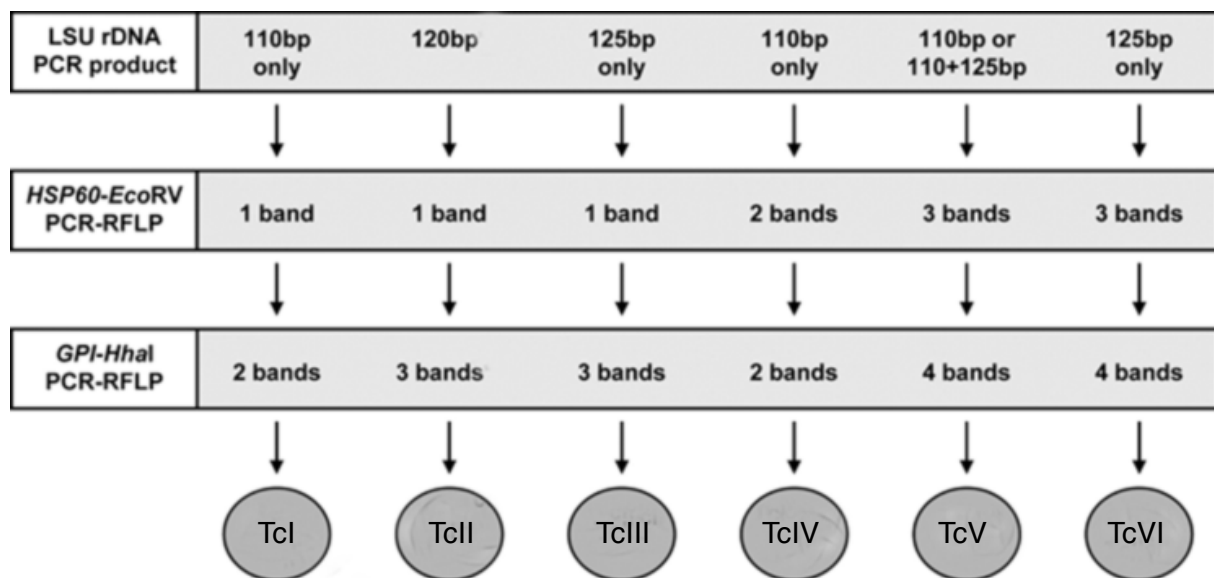
---

Il a été démontré que *T. cruzi* est essentiellement constitué de six unités distinctes (DTUs, Discrete Typing Unit) TcI, TcIIa (TcII), TcIIb (TcIII), TcIIc (TcIV), TcIIId (TcV), and TcIIe (TcVI) (Brisse *et al.*, 2000, 2001) ayant chacune différents aspects épidémiologiques et évolutifs (Lewis *et al.*, 2009). La variabilité des différentes souches de *Trypanosoma cruzi* a été évaluée à l'aide de différents marqueurs situés sur des génomes différents. Chez les kinétoplastes, il existe un génome d'origine bactérienne (kinétoplaste) qui contient une grande quantité d'ADN extra nucléaire ou kDNA. Le kDN est organisé en

réseaux de molécules d'ADN circulaires de deux types, des structures maxicercles qui contiennent les gènes codant les enzymes nécessaires à la respiration oxydative et les minicercles impliqués dans les phénomènes d'édition permettant d'exprimer les transcrits des maxicercles. Les mini-cercles présentent une grande variabilité génétique et semblent impliqués dans la pathogénicité de *T. cruzi*.

Quatre marqueurs ont été utilisés, un marqueur kinétoplastique, le gène mini-exon (1) (Souto *et al.*, 1996), un marqueur nucléaire non codant, le domaine divergent D7 du locus 24S $\alpha$  rRNA (LSU rDNA) (2), et deux marqueurs nucléaires codants, le gène glucose-6-phosphate (GPI) (3), et le gène hsp60 (Heat Shock Protein, HSP) (4).

La simple visualisation des produits amplifiés avec les marqueurs (1) et (2) sur un gel d'agarose permet de discriminer certaines lignées (TcI/IV et TcIII/V) (Brisse *et al.*, 2000, 2001; Kawashita *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2009). Ensuite, la combinaison de l'amplification du LSU rDNA avec deux méthodes de PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) après digestion enzymatique des deux gènes amplifiés (3) et (4) permet de différencier les différents DTU connus (Lewis *et al.*, 2009) selon la séquence méthodologique décrite dans la Figure 2.9.



**Figure 2.9.** Diagramme méthodologique des trois techniques de PCR et PCR-RFLP pour la discrimination des différentes souches de *Trypanosoma cruzi* d'après Lewis *et al.*, 2009.

Les amplifications ont été réalisées dans un volume total de 25µl contenant 5 µL de 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µL dNTP (10 µL chacun), 1µl de chaque amorce (10µM) 1U de GoTaq DNA polymérase (Promega) et 2,5µl d'ADN (25ng), selon les protocoles d'amplification décrits dans la table 2.2 pour (1) et (2) et la table 2.3 pour (3) et (4).

Les produits PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1% (TBE 0,5X), après migration pendant 30 minutes à 100V, en utilisant un marqueur de taille Ladder 25pb (Invitrogen).

Les produits amplifiés grâce aux marqueurs GPI et HSP ont ensuite été soumis à une digestion enzymatique: 10 µl de chaque produit PCR sont digérés dans une réaction contenant 0.25 U/ µl des enzymes de restriction appropriées, soit *HhaI* (NEB, Hitchin, UK) pour GPI et *EcoRV* (Promega) pour HSP, ajoutés de tampon de réaction 1X selon les instructions du fabricant afin d'obtenir 20 µl de volume total de réaction. Les échantillons sont ensuite incubés 4h à 37 °C, puis visualisés sur gel d'agarose 1,5%. Les tailles de fragments attendues sont décrites dans la table 2.1

Toutes les séquences amplifiées de *T. cruzi* ont ensuite été soumises au séquençage selon le protocole décrit sous le point 2.14.

## Matériel et Méthodes

Gène cible	<i>TcI</i>	<i>TcII</i>	<i>TcIII</i>	<i>TcIV</i>	<i>TcV</i>	<i>TcVI</i>
mini exon (SL)	350	300 ou pas d'amplification	300	300 ou pas d'amplification	300	300
LSU rDNA	110	117 ou 120 ou 125 ou 130	125	110	110 ou 110+125	125
HSP/Eco RV	432-462	432-462	432-462	432-462 ou 314+148-118	432-462 432-462+314+148-118	432-462 ou 432-462+314+148-118
GPI/HhaI	817-447	490+447+253	490+447+253	817+447	817+490+447+253	817+490+447+253

**Table 2.1:** Assignement des génotypes (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* selon les tailles de produits amplifiés ou après digestion enzymatique, adapté de Lewis *et al.* 2009 et de Brisse *et al.* 2001

### 2.13. Détection des sources d'alimentation des insectes

---

Afin d'identifier les hôtes sur lesquels les triatomes se sont nourris, les ADN extraits du contenu du tube digestif ainsi que l'ADN entier des stades L3, L2, L1 ont été soumis à l'amplification du gène *cytochrome b* à l'aide d'amorces spécifiques aux vertébrés: L148415'AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA3' et H151495'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3', (Kocher *et al.*, 1989).

Les amplifications ont été réalisées dans un volume total de 25µl contenant 5µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µL dNTP (10 µL chacun), 1µl de chaque amorce (10µM), 1U de GoTaq DNA polymérase (Promega) et 2,5µl d'ADN (25ng). Les conditions PCR sont décrites dans la table 2.2.

Après visualisation des produits PCR sur gel d'agarose et séquençage (voir 2.14), les séquences obtenues ont été comparées avec des séquences de références déposées sur GenBank avec le programme BLAST (*Basic local alignment search tool*: Altschul *et al.*, 1997) afin d'identifier les espèces d'hôtes ou les espèces les plus apparentées.

### 2.14. Visualisation des produits amplifiés et séquençage

---

Les produits PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1% (TBE 0,5X), après migration pendant 30 minutes à 100V puis purifiés à l'aide du kit de purification Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega selon les instructions du fabricant. Les produits purifiés ont ensuite été soumis à une réaction de séquence à l'aide du kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction System, version 1.1. Chaque réaction contient: 1µl du mix BigDye, 3,5µl de tampon à 5X, 1µl d'une des deux amorces à 3,2µM et entre 20 et 50ng d'ADN.

Les conditions d'amplification de séquence sont les suivantes: dénaturation initiale d'1 min à 96°C, suivie de 24 cycles (1) d'une dénaturation de 10 s à 96°C (2) d'une hybridation de 5 s à 50°C (3) d'une extension de 4 min à 60°C et d'une extension finale de 20 min à 72 °C. La rampe thermique utilisée est de 1°C/s.

L'ADN a ensuite été précipité en vue du séquençage en ajoutant: 50µl d'éthanol 95°, 2µl d'acétate de sodium à 3M et 2µl d'EDTA à 125mM au produit de la réaction de séquence. L'ensemble a été centrifugé à 13000rpm pendant 20 minutes. 150µl d'éthanol 70° ont ensuite été ajoutés au culot d'ADN. Le tout a été centrifugé à 13000rpm pendant 10 minutes. Le culot a ensuite été séché. L'ADN est ensuite suspendu dans 12,5 µl de formamide et séquencé à l'aide d'un séquenceur type ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

Les séquences ont été acquises grâce au logiciel Sequencing Data (Applied Biosystems) et les pics ambigus corrigés manuellement (hétérozygotes, pics masqués par les fluorophores non incorporés ou non éliminés lors de la purification) en utilisant le logiciel Bioedit (Hall, 1999). Toutes les séquences ont été séquencées en "forward" et en "reverse", les deux brins inverses complémentaires d'une même séquence ont ensuite été rassemblés manuellement.

## Matériel et Méthodes

	Amplification <i>cytB</i>	Amplification <i>msat</i>	Amplification <i>T.cruzi</i> <i>mini exon</i>	Amplification <i>T.cruzi</i> <i>24Sa rRNA</i>	Amplification contenu tube digestif	Détection Wolbachia <i>wsp</i>	Détection Wolbachia <i>coxA</i>
Dénaturation initiale	2mn à 92°C	30s à 94°C	4 mn à 94 °C	4 mn à 94 °C	3mn à 93°C	3mn à 94 °C	3mn à 94 °C
Nombre de cycles	34	30-40	15	27	25	35	40
Dénaturation	30s à 92°C	30s à 94°C	1mn à 94 °C	1mn à 94 °C	1mn à 93°C	30s à 94 °C	30s à 94 °C
Hybridation	45s à 48 °C	30s à 42-55°C	30s à 61 °C	1mn à 60 °C	1mn à 50 °C	30s à 45 °C	30s à 48 °C
Elongation	1mn30 à 72°C	30s à 94°C	30s à 72 °C	1mn à 72°C	2mn 72 °C	1mn30 à 72°C	1mn30 à 72°C
Elongation finale	10mn à 72 °C	10mn à 72 °C	10mn à 72 °C	10mn à 72 °C	10mn à 72 °C	10mn à 72 °C	10mn à 72 °C
Longueur attendue	660 pb	NA	300 ou 350 pb	110 à 135 pb	NA	600 pb	400 pb
Références	(Monteiro <i>et al.</i> , 2003)	(Harry <i>et al.</i> , 2008; Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009)	(Souto <i>et al.</i> , 1996)	(Souto <i>et al.</i> , 1996; Brisse <i>et al.</i> , 2001)	(Kocher <i>et al.</i> , 1989)	(Braig <i>et al.</i> , 1998)	(Baldo <i>et al.</i> , 2006)

**Table 2.2.** Description des conditions d'amplification pour les différentes séquences et loci microsatellites étudiés.

	Amplification <i>T.rangeli</i>	Amplification <i>T.cruzi</i> GPI & HSP60
Dénaturation initiale	5mn à 94 °C	3mn à 94°C
Nombre de cycles I	15	4
Dénaturation I	30s à 94 °C	30s à 94°C
Hybridation I	1mn à 63°C	30s à 60°C
Elongation I	30s à 72°C	1mn à 72°C
Nombre de cycles II	20	28
Hybridation II	1mn à 60°C	30s à 60°C
Elongation II	30s à 72°C	1mn à 72°C
Elongation finale	5mn à 72°C	10mn à 72°C
Longueur attendue	620 pb	432-462 pb (Gaunt <i>et al.</i> , 2003; Sturm <i>et al.</i> , 2003; Lewis <i>et al.</i> , 2009)
Références	(Morales <i>et al.</i> , 2002; Pavia <i>et al.</i> , 2007)	(Gaunt <i>et al.</i> , 2003; Sturm <i>et al.</i> , 2003; Lewis <i>et al.</i> , 2009)

**Table 2.3.** Description des conditions de réaction de PCR en chaîne pour la détection de *Trypanosoma rangeli* et l'amplification du gène HSP60 de *T. cruzi*.

## 2.15. Microsatellites et Génotypage

### 2.15.1. Amplification

Vingt marqueurs microsatellites ont été décrits précédemment pour *Rhodnius prolixus* (Harry *et al.*, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009). Du fait de la très grande proximité phylogénétique des deux espèces *R. prolixus* et *R. robustus*, les marqueurs isolés sur *R. prolixus* ont été testés sur les échantillons de *Rhodnius robustus*. Sur les vingt marqueurs testés, dix ont été retenus pour leur polymorphisme démontré chez les individus de *R. robustus*. Les températures d'hybridation ont été adaptées (table 2.4).

Nom du locus réf. genebank	Séquence de l'amorce	Motif de répétition	T ( C°)	Tailles
<b>LIST14-037</b> EU622032	F: GGCGACACCCCATAGAAACC R: ATTAAGAAGAACGGAAACCCACC	[GT]8	55	235-249
<b>LIST14-079</b> EU622034	F: TAGAGTTTTTGCTCCTGTTAGC R: TCCTATCTTTTCGGTAAGTCCG	[CA] 9 N2 [CA]10	42	245-312
<b>LIST14-010</b> EU622026	F: AATGATGACTGTATTGATGGGC R: TTCGACCAACAACAACCTTCCC	[CA]9	52	308-327
<b>R4</b> DQ364967	F: AAGTGGTTAAAATGAAAATATTCC R: CCGTAAGACGCAGAGTAC	(GT)2T2(GT)17	50	231-270
<b>R11</b> DQ364969	F: CTCCAAGCATCCAGCTTCTC R: CAATGACCACCTGGTCACG	(GA)15	48	204-243
<b>R13</b> DQ364970	F: TACATCTTCAATAATCATCACACAC R: AAGTAAATTGAATGAATGCCC	(AC)5GC(AC)	48	175-182
<b>R26</b> DQ364972	F: AGAAGGAATCTATCCACTTTTCGC R: CCTCGTATCAGCTGCTACG	(CA)3CT(CA)2	54	114-126
<b>R30</b> DQ364974	F: GATCCAGGCAGTTTTCTTAAAGTG R: CAATGGAACAAGAATTTAGTGAGG	(GT)8	54	215-225
<b>R31</b> DQ364975	F: TGTGGTAAGTCCTGTGTAGAAGG R: TCTGTTGGTCCAGACACGG	(GT)11	52	115-138
<b>R32</b> DQ364976	F: TGAGCTTATCCACTGGCTTCAG R: CAGGAGTGGGCCATTTC	(GT)10	52	202-218

**Table 2.4.** Description des amorces utilisées pour l'amplification des loci microsatellites pour *Rhodnius robustus* adaptées de marqueurs précédemment décrits pour *Rhodnius prolixus* (R4-R32: Harry *et al.*, 2008; LIST: Fitzpatrick *et al.*, 2008).

Les amplifications ont été réalisées à partir de l'ADN génomique dilué 10x en utilisant un marqueur fluorescent Dye labelled primer (Applied Biosystem) et la polymérase GoTaq® Flexi (Promega) dans un volume final de 12µl, contenant entre 2 et 5 ng d'ADN, 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2,5µl de tampon 5X, 0,5µl de dNTP (10µM chacun), 0,5µl de chaque amorce (10µM) et 0,05µl de Polymérase (5U/µl). Les PCR ont été effectuées avec 30-40 cycles, les températures

d'hybridation sont décrites pour chaque locus dans la table 2.4 et les conditions d'amplification dans la table 2.2.

Ensuite, 1µl de chaque amplification a été mélangé à 12,5 µl de formamide et 1µl de marqueur de taille (GeneScan™ 500 LIZ™, Applied Biosystem).

### 2.15.2. Génotypage des individus

L'acquisition des données d'analyse des fragments microsatellites a été effectuée avec le logiciel GeneScan ® (Applied Biosystem) permettant d'obtenir les tailles brutes des fragments microsatellites amplifiés pour chaque échantillon et donc le polymorphisme de longueur des fragments.

La séparation et la détection des microsatellites amplifiés se fait par une électrophorèse capillaire réalisée sur un séquenceur automatique (ABI 3100 Genetic Analyzer). Les fragments amplifiés sont injectés dans des capillaires de 36 cm remplis d'un polymère qui sous l'influence d'un champ électrique, va séparer les fragments d'ADN. La taille de ces fragments est déterminée par leur vitesse de migration dans les capillaires.

Les données brutes ont ensuite été transférées au logiciel GeneMapper ® (Applied Biosystem), afin d'assigner à chaque pic une étiquette de taille brute, le nom du marqueur microsatellite analysé et les allèles correspondant aux tailles détectées.

Un total de 743 specimens de *Rhodnius robustus* (espèce majoritaire à 99.60%) a été soumis au génotypage tandis qu'un seul individu par palmier ainsi que tous les adultes de *Rhodnius robustus* et de *Rhodnius pictipes* ont été séquencés avec le marqueur mitochondrial cytochrome b.

### 2.16. Détection de *Wolbachia*

---

Afin de vérifier que la structuration génétique observée n'est pas due à des processus de manipulation reproductive dus à des endo-symbiontes, toutes les femelles ont été testées pour l'infection par *Wolbachia spp* via l'amplification des gènes *wsp* (Braig *et al.*, 1998) et *coxA* (Baldo *et al.*, 2006), selon les protocoles d'amplification décrits dans la table 2.2.

Toutes les PCR ont été réalisées dans un volume final de 25µl (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) contenant: 5µl de Tampon 5X, 1µl de dNTP (40µM chacun), 3µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µl de chaque amorce (10µM), 0,2µl de Taq Polymérase (5U/µl) et 2µl d'ADN (40-100 ng). Des extraits d'ADN d'insectes précédemment identifiés positifs à *Wolbachia* dans notre laboratoire ont été utilisés comme témoin positifs : *Rhodnius robustus* (GenBank numéro d'accession : EU444069).

### 2.17. Génétique des populations

---

#### 2.17.1. ADN mitochondrial, *cytochrome b*

Les consensus des séquences obtenues pour chaque individu ont ensuite été alignés via le logiciel ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), avec les options par défaut d'alignement multiple.

Dans un premier temps, nous avons étudié les relations généalogiques entre les haplotypes mitochondriaux des insectes échantillonnés à l'aide de construction de réseaux via le logiciel TCS version 1.21 (Clément *et al.*, 2000). Les résultats obtenus nous ont permis de détecter 18 haplotypes uniques qui ont ensuite été soumis aux méthodes de reconstitution phylogénétiques

La confirmation du statut spécifique de *Rhodnius robustus* s'est faite en comparant les 18 haplotypes obtenus avec les séquences publiées du complexe "*robustus*" (Lyman *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2003; Maia da Silva *et al.*, 2007; Pavan & Monteiro, 2007; Harry *et al.*, 2008; Justi *et al.*, 2010). Afin de reconstruire les relations phylogéniques, nous avons utilisé l'inférence bayésienne sous MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

jModelTest 0.1.1 (Posada, 2005) a été utilisé *a priori* afin de déterminer le meilleur modèle de substitution des données en inférence bayésienne à l'aide de l'AIC (Akaike information criterion). Les analyses bayésiennes ont été effectuées avec 3 000 000 itérations consécutives via la méthode MCMC (Markov Chain Monte Carlo).

Les cartes de distribution spatiale des haplotypes par communauté ont été construites à l'aide du logiciel Adobe Illustrator CS5 afin de mettre en évidence la structure spatiale des populations de triatomes récoltées sur les palmiers.

### 2.17.2. Définition des groupes d'analyse

Premièrement, afin de nous affranchir du biais de consanguinité qui peut exister au sein d'une population issue d'un même palmier, nous avons considéré uniquement tous les adultes et un individu par palmier dans les palmiers où aucun adulte n'a été trouvé.

Deuxièmement, pour tester la différenciation génétique entre populations nous avons considéré divers jeux de données: 1) Les phylogroupes qui ont été déterminés par les analyses généalogiques (réseau) et phylogénétiques (bayésien), 2) les communautés dans lesquelles les palmiers ont été disséqués, 3) les unités d'utilisation du sol dans lesquelles les palmiers ont été disséqués et 4) les ensembles d'unité d'utilisation du sol (patches) au sein des communautés.

### 2.17.3. Polymorphisme mitochondrial

Afin de déterminer la variation haplotypique au sein et entre les palmiers, certaines mesures de diversité haplotypique ont été calculées. Le nombre d'haplotypes,  $N_h$  (Nei, 1987), la diversité haplotypique,  $H_d^2$  (Nei, 1987), la diversité nucléotidique,  $P_i^3$  ( $\pi$ ) (Tajima, 1983), l'estimateur theta<sup>4</sup> ( $\theta_s$ ) (Tajima, 1983) et le nombre moyen de différences nucléotidiques  $k$  (Tajima, 1983).

La différenciation génétique et les flux géniques ont été calculés avec les estimateurs  $N_{st}^5$  et  $N_m^6$  (Lynch & Crease, 1990), le nombre moyen de différences nucléotidiques avec  $K_{xy}$  (Tajima, 1983) et le nombre moyen de substitutions nucléotidiques par site avec  $D_{xy}$  (Nei, 1987). Tous les indices ont été calculés avec le logiciel DNAsp v5 (Librado & Rozas, 2009).

---

<sup>2</sup> Diversité haplotypique  $H_d$ : probabilité que deux haplotypes tirés d'une population soient semblables

<sup>3</sup> Diversité nucléotidique  $P_i$  ( $\pi$ ): nombre moyen de différences entre deux séquences.

<sup>4</sup> Theta( $\theta_s$ ): nombre moyen de différences attendues entre deux séquences échantillonnées au hasard dans la population, paramètre populationnel permettant d'estimer  $N_e$  (taille efficace de la population) et  $\mu$  (taux de mutations par site (S) et par génération).

<sup>5</sup>  $N_{st}$  est une mesure de différenciation génétique basée sur la comparaison des différences moyennes entre les séquences au sein de la sous-population et dans les sous-populations que l'on compare.

<sup>6</sup>  $N_m$  est une estimation des taux de migration, l'indice compare les temps moyens de divergence entre les paires de gènes/séquences au sein d'une population et entre les sous-populations comparées.

#### 2.17.4. Analyse démographique

Nous avons examiné la distribution du nombre de différences par paire de séquences (distribution "mismatch") avec le logiciel DNAsp v5 (Librado & Rozas, 2009). La distribution "mismatch" est théoriquement lisse et unimodale pour les populations qui ont récemment subi une expansion démographique (Rogers & Harpending, 1992).

Les indices  $F_u$ ' $F_s$  (Fu, 1997) et  $D^*$  (Fu & Li, 1993) permettent de tester pour chaque population l'hypothèse d'expansion démographique. Les statistiques  $F_s$  permettent de calculer la distribution des différences par paire de sites nucléotidiques (Rogers & Harpending, 1992) et détectent un excès d'allèles rares dans une population en croissance, par comparaison aux valeurs attendues sous une stabilité démographique. Le test de  $D^*$  est basé sur la comparaison des différences du nombre de mutations uniques ("singletons" ou variants rares) par rapport aux mutations totales (Fu & Li, 1993). Une valeur significativement négative de  $F_s$  associée à une valeur non significative de  $D^*$  marque une expansion démographique, tandis qu'une valeur  $F_s$  non significative associée à une valeur de  $D^*$  significative indique des phénomènes de sélection. La significativité des indices est testée à partir de 10'000 simulations de coalescence effectuées avec DNAsp v5 (Librado & Rozas, 2009).

Le test de neutralité (Tajima's  $D$ ) permet de tester si les mutations observées sont sélectivement neutres. Le test est basé sur les fréquences des mutations qui affectent de manière différente le nombre de sites polymorphes ( $S$ ) et le nombre moyen de différences entre les séquences ( $\pi$ ). Comme  $S$  est plus sensible aux allèles rares que  $\pi$ , un  $D$  négatif signifiera un excès de mutations rares pouvant être un signal de balayage sélectif ou d'expansion de population. Réciproquement  $\pi$  étant plus sensible aux mutations de fréquences intermédiaires, un  $D$  positif, signifiera un excès de mutations de fréquences intermédiaires pouvant être liées à un phénomène de sélection balancée ou de goulot d'étranglement (bottleneck).

Le test  $R^2$  (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) est utilisé pour calculer la différence entre le nombre de mutations uniques par rapport à la moyenne du nombre de différences partagées par deux individus. Les expansions récentes sont généralement associées à des estimations faibles du paramètre  $R^2$ .

La validité générale du modèle démographique a ensuite été évaluée à l'aide de l'"*Harpending Raggedness Index*" de la distribution observée:  $H_{ri}$  (Harpending, 1994) et de la somme des différences au carré entre les valeurs observées et attendues,  $SSD$  (Schneider *et al.*,

2000) à l'aide d'ARLEQUIN 3.5.1 (Excoffier *et al.*, 2005). La distribution "mismatch " décrit les différences par paire d'haplotypes, alors que l'indice de Harpending (Hri) décrit la variation autour de cette courbe. Il est attendu des populations stationnaires une courbe de distribution erratique et irrégulière tandis que les populations ayant subi une expansion démographique démontrent des courbes régulières avec l'existence d'un pic (Rogers & Harpending, 1992). Une valeur non significative de Hri signifie une distribution conforme à l'hypothèse d'expansion (Harpending, 1994).

La significativité des indices  $F_s$ ,  $R_2$ , Hri et SSD a été testée avec une approche de bootstraps entre les valeurs attendues et observées (10 000 réplicats, selon Schneider *et al.* 2000).

Les temps de divergence entre les phylogroupes ont été calculés avec la formule  $\tau = 2ut$ ,  $\tau$  est le paramètre de temps d'expansion en unité de mutation et  $u$  est le taux de mutation par génération. Nous avons utilisé un taux de mutation de 2.3% par million d'années (My), qui est généralement le taux de polymorphisme du gène mitochondrial chez les insectes (Bower, 1994) également utilisé par Monteiro *et al.* 2003 pour l'estimation des divergences au sein du clade "robustus" (Monteiro *et al.*, 2003). Avec un temps moyen de génération en conditions de laboratoire de 6 mois (Rabinovich & Nieves, 2011), le nombre de générations par année a été estimé à deux pour *Rhodnius spp.* Le paramètre  $\tau$  est estimé avec ARLEQUIN 3.5.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

### 2.18. Génotypage (marqueurs microsatellites)

---

La présence d'erreurs de génotypage susceptibles d'affecter les données moléculaires: la présence d'allèles nuls<sup>7</sup>, les "dropout"<sup>8</sup> alléliques et le "stuttering"<sup>9</sup> (Pompanon *et al.*, 2005) a été testée à l'aide de MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Le déséquilibre de

---

<sup>7</sup> Allèle nul: allèle non amplifié à cause d'une mutation au niveau du site de fixation de l'amorce.

<sup>8</sup> Dropout: allèle faux dus à une faible quantité d'ADN cible ou à une amplification préférentielle des allèles de petite taille.

<sup>9</sup> Stuttering: "dérapiage" de la polymérase qui produit des bases supplémentaires différentes du modèle d'origine.

liaison<sup>10</sup> entre les différents loci globalement et à l'intérieur de toutes les populations considérées a été testé avec FSTATS (Goudet, 2001).

Les paramètres de variabilité génétique tels que le nombre d'allèles par locus et les hétérozygoties observées et attendues ainsi que l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE: Hardy, 1908; Weinberg, 1908) ont été respectivement calculés et testée par locus, et par jeu de données sur l'ensemble des loci à l'aide d'Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005).

### 2.18.1. Différenciation génétique entre les populations

La différenciation génétique entre les différentes populations de *Rhodnius* a été étudiée à l'aide de paramètres statistiques appelés F-statistiques de Wright (1951), estimés avec la méthode de Weir et Cockerham (1977) via le logiciel Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005).

Les  $F_{st}$  sont une mesure de différenciation génétique donnant une indication sur le niveau de structure génétique des données par estimation des flux de gènes ( $Nm$ , nombre de migrants par génération). La significativité des valeurs  $F_{st}$  est estimée par des tests de permutations au hasard entre toutes les populations, la *pvalue* donnée par ces tests reflète la proportion de permutations conduisant à une valeur  $F_{st}$  plus grande ou égale à celle observée.

### 2.18.2. AMOVA

Les analyses de variance moléculaire (AMOVA) permettent de tester la structure génétique et le niveau hiérarchique (entre groupes, intra ou inter-populationnel et inter-individuel) auquel elle intervient (Excoffier, 2003; Excoffier *et al.*, 1992). Tous les niveaux hiérarchiques d'analyse (phylogroupes, communautés, unités de paysage, patches de paysage) ont été testés individuellement et combinés.

---

<sup>10</sup> Déséquilibre de liaison: la proximité physique de deux locus sur un même chromosome par exemple peut induire une association plus fréquente entre certains locus.

### 2.18.3. Procédures d'assignation

Les populations définies *a priori* par la méthode d'échantillonnage (par palmier, par communauté, par unité de paysage) ne reflètent pas forcément les discontinuités entre les populations « réelles ». Ainsi, les méthodes d'assignation permettent de grouper des individus dans des unités populationnelles et de détecter des migrants entre ces unités, sans hypothèse *a priori* sur les limites populationnelles.

L'assignation des individus à des populations permet de déterminer le nombre le plus probable (K) de populations présentes dans le jeu de données. Nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), en estimant une probabilité Q d'appartenance à chacune des K populations, en calculant des K de 1 à 10. Les analyses ont été répétées 10 fois pour chaque valeur de K avec une période de "burn in"<sup>11</sup> de 500 000 chaînes de Monte Carlo suivie de 1000 000 d'itérations successives, sous les deux modèles, avec et sans "admixture" (mélange de populations), et de fréquences alléliques corrélées. Pour identifier la valeur la plus probable de K nous avons utilisé la méthode statistique du  $\Delta K$  (Evanno *et al.*, 2005).

Alors que les calculs d'inférence de STRUCTURE ne se basent que sur les données génétiques, il existe des logiciels qui incorporent l'information spatiale des individus génotypés: TESS (François *et al.*, 2006), basés sur le concept que les individus ont plus de chance d'appartenir à une même population s'ils sont proches géographiquement.

### 2.18.4. Autocorrélation spatiale

Aucune de ces analyses d'assignation (spatiale ou non) n'ayant réussi à détecter une quelconque structuration des individus génotypés nous avons également utilisé l'autocorrélation spatiale qui permet essentiellement d'estimer la ressemblance entre voisins, c'est-à-dire la différenciation génétique entre populations ou individus en fonction de la distance géographique qui les sépare. L'autocorrélation s'est faite à l'aide du logiciel GENEALX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006).

---

<sup>11</sup> Burn in: période "d'allumage": un nombre défini d'itérations est déterminé en début d'analyse jusqu'à ce que la chaîne de Markov ait atteint sa phase stationnaire.

### 2.18.5. Analyse de parenté

Afin de réaliser les études classiques de génétique de populations, il a fallu nous affranchir du biais de consanguinité au sein des palmiers en n'utilisant comme données que les individus adultes non apparentés. Cependant, il nous a paru intéressant de reconstituer les fratries au sein des palmiers.

Le logiciel COLONY (Wang, 2004) calcule, grâce à un algorithme de maximisation de la vraisemblance, la configuration d'apparement d'une population la plus probable étant donné les génotypes des individus analysés. En premier lieu, chacun des  $n$  individus de la population échantillonnée forme une famille et la vraisemblance  $L$  de cette configuration est calculée. Le principe repose sur le déplacement au hasard des individus d'une famille à une autre (avec diminution possible du nombre de familles) et sur le calcul de la vraisemblance correspondante. L'opération est renouvelée jusqu'à ce que la permutation des individus entre famille ne permette plus d'augmenter la vraisemblance de la configuration. De cette manière, COLONY (Wang, 2004) détermine le nombre de familles composant une population d'individus ainsi que leur composition.

Cependant, les procédures de reconstruction de parenté étant encore en procédure, ces résultats ne seront pas présentés dans ce travail.

### 2.19. Autorisations

---

Plusieurs autorisations ont été nécessaires à la réalisation du travail de terrain et pour le rapatriement en France des insectes collectés sur place. Ont ainsi été délivrées:

- par le Ministère de la Science et de la Technologie brésilien, une autorisation de collecte de matériel scientifique par des étrangers (non brésiliens): Portaria MCT N° 679/10 (annexe 1).
- par l'IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Institut Brésilien de l'environnement et des ressources naturelles renouvelables, (SISBIO, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade): (1) une autorisation pour la coupe des palmiers: autorisation n°: 16485-2, 27/06/2008, 16485-3 émission du 19/04/2010, 16485-4, émission 08/06/201, 16485-5 émission 20/04/2011 (annexe 2) et (2) la licence d'exportation des insectes: CITES (Convention

sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction) Permis n°:09BR002832/DF émission du 09/01/2009 (annexe 3). L'accès au patrimoine génétique des insectes collectés est inclus dans le permis d'exportation CITES.



### 3. Résultats

#### Article 1

*Chagas disease spatial environmental risk for amazonian human communities at a local scale based in land use and Attalea palm tree species occurrence*

#### Article 2

*Identification des sources alimentaires et des souches de Trypanosma cruzi associées à Rhodnius robustus dans le bassin du Tapajós*

#### Article 3

*Tamandua tetradactyla Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and Rhodnius robustus Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in Attalea phalerata Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon*

#### Article 4

*Genetic connectivity in natural sylvatic Rhodnius robustus (Larrousse, 1927) populations in fragmented landscape of the Amazon Basin (Tapajós River, Pará state)*



---

**Article 1****Chagas disease spatial environmental risk for amazonian human communities at a local scale based in land use and *Attalea* palm tree species occurrence**

---

Marion Quartier<sup>1</sup>, Eric Delaitre<sup>2</sup>, Fernando Braga Dias Stehling<sup>3</sup>, Robert Davidson<sup>4,5</sup>, Jordan Sky Ostreicher<sup>5</sup>, Christine Rozon<sup>5</sup>, Marc Lucotte<sup>5</sup>, Myriam Harry<sup>6</sup>, Christine A. Romana<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Université de Neuchâtel, Suisse; <sup>2</sup>IRD, UMR ESPACE-DEV, France; <sup>3</sup>Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil; <sup>4</sup>Biodôme de Montréal, Québec, Canada; <sup>5</sup>GÉOTOP et Institut des sciences de l'environnement, Université du Québec, Montréal, Canada; <sup>6</sup>Université Paris Sud 11/ LEGS, CNRS-IRD, Gif sur Yvette, France;; <sup>7</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

Corresponding author: Marion Quartier, e-mail: marion.quartier@unine.ch

Manuscrit préparé pour soumission à PLOS Neglected Disease

---

## Abstract

---

Anthropic disturbances with deforestation of Amazon tropical wet forest leads to a mosaic of landscapes composed of natural forest and secondary vegetation (secondary forest, palm groves, fallows) and pasture. These changes result in the proliferation of invasive heliophilous palm trees of the *Attalea* genus, the principal natural ecotope of *Rhodnius* species, bloodsucking insects acting as vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease in Latin America.

*Attalea* palm trees were used in the present work as an ecological indicator for mapping environmental risk or hazard for human exposure to Chagas disease in three local amazonian communities of the Tapajós river (Brazilian Amazonia). The authors describe the land use and land cover patterns for each community taking into account the occurrence of three *Attalea* palm tree species present in the region (*A. maripa*, *A. phalerata*, and *A. speciosa*) and their infestation rates by triatomines and the triatomine infection rate by *Trypanosoma cruzi*.

Six different land cover classes were identified in the field and applied through supervised classification on a 2009 (date of the field work) SPOT 5 image of the study area in order to cartography environmental risk associated to the presence of palm trees in the area. One hundred and thirty palm trees of the three species were dissected of which 73 (54.9%) were infested with *Rhodnius robustus* (742 insects collected). The distribution of palm species varied in each community. *A. maripa* was the only species found in the most recently settled community (Araipá). In this community the most recently established, significant decrease in insect density were observed and also in the two most disturbed land cover classes.

Insect infection by *T. cruzi* was examined using molecular methods. Respectively, 123 (16.6%) insects in 31 (23.3%) palms were identified positive for *T. cruzi*. A lack of infection was detected in Araipá but no differences were observed between the different land cover classes.

The three rural communities of São Tomé (riparian), Nova Estrela (pionnier front), and Araipá (intermediary between riparian and pionnier colonisation front) have different settlement times. This temporal gradient is associated with differences in *Attalea* palm trees

species presence and distribution, rates of palm infestation by triatomines (*Rhodnius robustus*) and distribution of prevalence of insect infection by *Trypanosoma cruzi*. The epidemiological system correlated to eleven classes of land cover patterns of human settlement showed that the occurrence of *Attalea* palm tree species can be used as an ecological indicator to predict different classes of environmental risk exposure of Chagas Disease for the amazonian population.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MQ, CAR. Analyzed the data: MQ, FBSD, ED, JSO, CAR. Contributed reagents/materials/analysis tools: ED, RD, ML, MH, CAR. Wrote the paper: MQ, CAR, ED. Revised the manuscript MQ, ED, FBSD, JSO, CR, RD, ML, MH, CAR.

### Introduction

An anthroposystem is an interactive system between two units, a sociosystem(s) and a natural or artificialized ecosystem structured and functioning within a given geographical area and evolving over time as a result of external and / or internal factors to the system (Levêque *et al.*, 2003). This concept refers to a systemic vision and dynamic interactions between humans and environments. The human society and his environment can then be understood as a set of interacting elements that may cause hazards and vulnerabilities (anthroposystem at risk) (Romana, 2007). The risk is then characterized by two components, the probability that an event (hazard) occurs in a space (environmental risk), and the severity of the effects of the event supposed to happen according to the vulnerability of individuals or populations. The hazard can be spatialized and mapped (Romaña, 2007).

In the Amazonian basin, the emergence of acute Chagas disease can be considered as the result of an environmental risk or hazard due to colonization of the environment by palm trees of the genus *Attalea* upon deforestation (Romaña, 2007). Through ecological studies applied to epidemiology, Romaña *et al.* (1999, 2003 and 2007) demonstrated that *Attalea* palm trees could be the most important ecological biotope for the genus *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma (Schyzotrypanum) cruzi* Chagas 1909, the pathogenic agent of Chagas disease. Then, *Attalea* palm trees could be an ecological indicator of the

presence of the sylvatic epidemiological system composed of populations of *T. cruzi* parasites, triatomine vectors and mammal parasitic reservoirs. In Amazonia, the *Rhodnius* populations are widespread associated with palm trees and they have an active role in disease transmission (Coura *et al.*, 2002; Grijalva *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2007; Abad-Franch *et al.*, 2009, 2010). Since 1998, in Pará, Amapá and Acre states, 17 oral outbreaks occurred implicating 85 patients (1998-2005) (Valente *et al.*, 1999, 2002 and 2005). Between 2005 and 2009, 455 new cases have been described, from which 85.5% in Northern Brazil, Pará and Amazonas were the states implicating the majority of the cases, with respectively 310 (68.1%) and 29 (6.4%) (Briceño-Leon, 2007). Since beginning of the year 2011, 85 cases were registered in Pará state, from which ten had fatal issue (SESPA 2011).

In 2003 and 2007, Romaña *et al.* also demonstrated that the genus *Attalea*, particularly *Attalea butyraceae* (Mutis ex. L.f.) Wess. Boer. (formerly *Scheelea zonensis*, *S. magdalenica*) in Colombia and Panama and *A. speciosa* Mart. 1826 in Brazilian Amazonia, could not only be a visual and stable indicator of Chagas disease risk for the local populations but also a biogeographical and bioclimatic indicator of the environmental modifications induced by deforestation by human activities. Following the interest of studying this palm trees genus with ecoepidemiological parameter estimation in Amazonia, Abad-Franch *et al.* in 2010, used *Attalea* palm trees to study infestation patterns by triatomine at different spatial scales (region, landscape, and individual palm) through identifying the causes of their variation and to propose a predictive model of palm occupancy that could be used in the context of disease risk mitigation. In terms of broadscale risk mapping, the authors highlighted that soil richness data sets could be interesting but that local-scale covariates could be more useful than regional or landscape features to explain variations in palm occupancy by triatomines. They conclude that local scientific knowledge is needed to assess potential disease risk situations.

In the present work, we used the *Attalea* palm trees as an ecological indicator for mapping environmental risk or hazard for Chagas disease exposure at a local level for three amazonian communities of the Tapajós river (Brazilian Amazonia). We describe the land use patterns for each community and took into account the occurrence of the *Attalea* palm trees, their infestation rates by triatomines and their infection rate by *T. cruzi*.

---

## Material & Methods

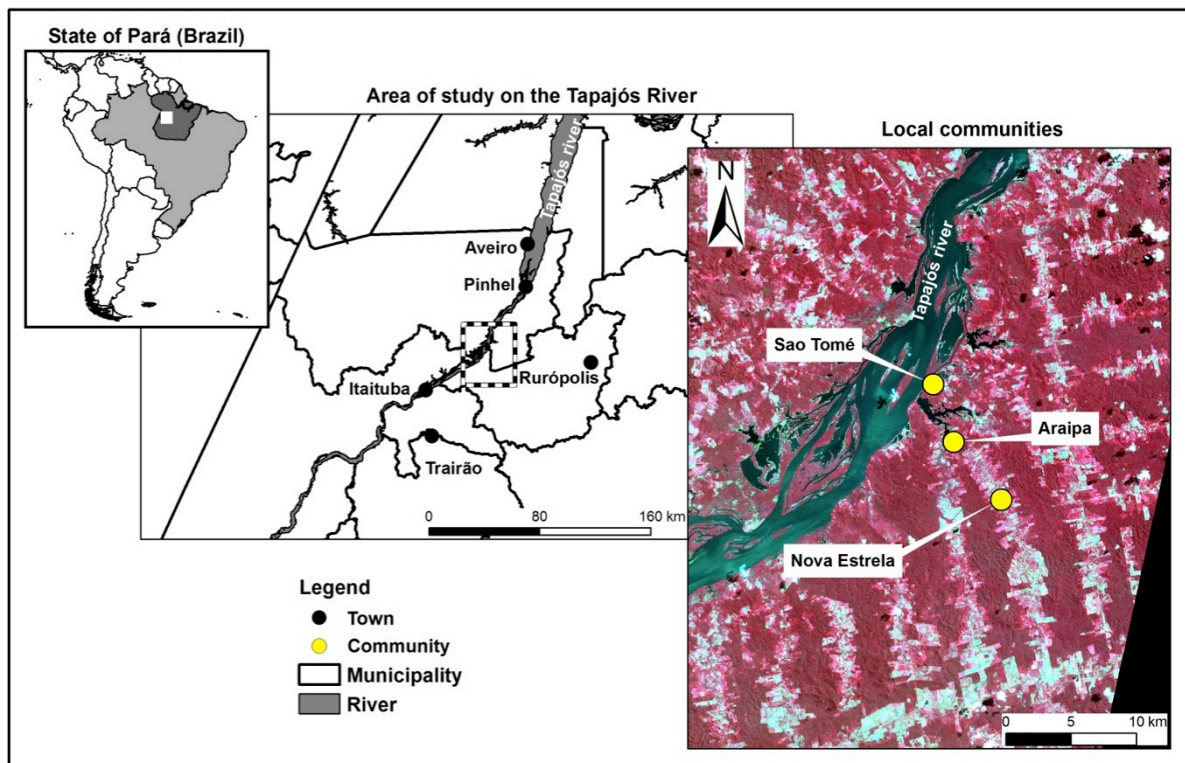
---

### Study Area

The study area (Figure 1) included three small scale farming communities located in the districts of Aveiro and Rurópolis (Pará State, Brazil), 400 km south of the Amazon River in the Lower Tapajós region. These three neighboring communities were chosen according to global research goals of a larger interdisciplinary study on health risks related to land management (acronyme PLUPH “Poor Land Use, Poor Health” <http://www.pluph.uqam.ca>). They were characterized by different establishment time and their location from waterways, such defining a different spatiotemporal relationship between communities and the environment.

The riparian community named São Tomé (S03.99185°, W 55.56538°), was the oldest one, established 70 years ago and characterized by families (95%) natives from the Tapajós region. The plateau community, Nova Estrela (S04.07299°, W55.51772°), located 8km inland from the Araipa lakeshore, was colonized by inhabitants coming through the BR163-transamazonian highway that opened 30 years ago and mostly Northeast migrants (67%). The third community, Araipá Lago (S04.02516°, W55.55224°), had intermediate characteristics in term of its geography, history and society compared to the two latter, with a population formed by 47 % Northeast migrants and 51 % Brazilian North States natives. Araipa Lago was first constituted by older establishment from local riparian inhabitants who installed randomly around the lakeshore and migrants from Nova Estrela who developed a central community at the end of a lake arm, where the side road number 70 ends, heading towards the joint BR 163-transamazonian road. The three communities principal activities are family agriculture and fishing.

The climate in the local area is hot and humid with an annual rainfall varying between 1800 and 2200 mm interrupted by a drier season of approximately three months (August to December) (Grupo de Trabalho Interministerial, 2006). The mean temperatures vary from 25°C to 27°C with a maximum between 31°C to 33°C and a minimum between 24 and 25°C. In the region, vegetation is dominated by a sub-montane open forest (*floresta ombrófila aberta submontana*) (EMBRAPA, 2007) with at least one *Attalea* palm species present in any given area (Pires and Prance, 1985). However slash and burn agriculture conducted for over 30 years now favored an anthropogenic landscape characteristic of a pioneer front formed by crops, pastures, and different stages of secondary forest growth.



**Figure 1.** Multiscale localisation of the study area in the Pará state (Brazil) of the Amazonian region. The three communities, São Tomé, Araipá and Nova Estrela are located on an axis perpendicular to the Tapajós River (Spot5 image 2009, SEAS Guyane project; UMR ESPACE-DEV, IRD-Cayenne, <https://www.seas-guyane.org/seasguyane/index.htm>).

### Sampling

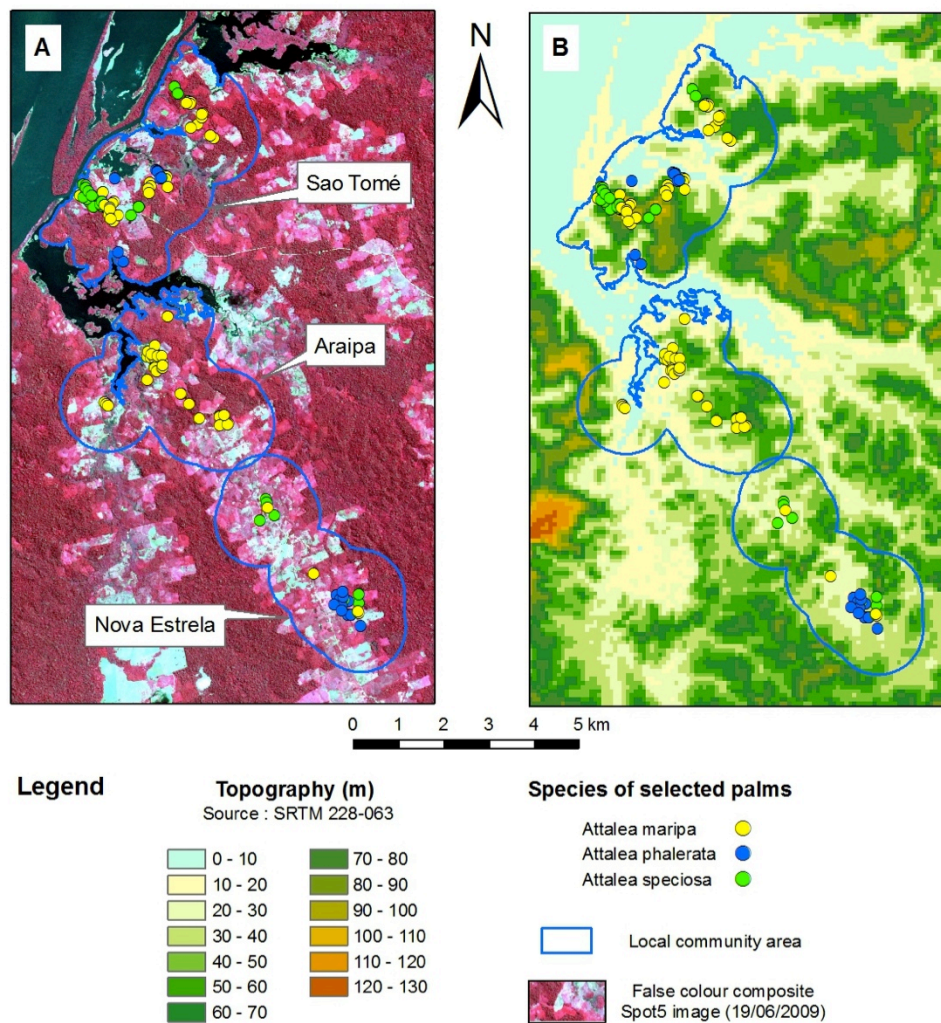
The region was prospected prior to data collection to choose the sampling areas in the three communities according to two criteria: representativity and fragmentation of the different land use classes (Jaeger, 2000; Roux *et al.*, 2008). Palm trees were selected according to their geographic location, their distribution throughout the three communities and to the associated land use. They were identified according to Henderson *et al.* (1995) during the initial survey of the area. Only species of the genus *Attalea* were retained for analysis because they were considered strong indicators of the presence of triatomines (Romaña *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2005, 2010).

The sampling was carried in the three communities, São Tomé, Araipá Lago and Nova Estrela, during two field missions, in September 2008 (dry season) and May 2009 (rainy season). In Nova Estrela, the sampling was performed only once in September 2008 as it was

---

impossible to reach the community during the rainy season. As the original forest cover was gradually replaced with a mosaic landscape composed of pastures, crops, fallows and secondary forest growth, we sampled palm trees in each class of land use.

During the sampling, each *Attalea* palm tree was georeferenced (coordinates and elevation) using a GPS (Garmin etrex, Garmin®). Then, the palm trees were cut down with the authorization of land owners and dissected for triatomines captures. Leaves were removed from stem to crown and meticulously examined for insects and all the organic matter was carefully inspected on a white tissue for nymphal stages identification (Diotauti & Dias 1984).



**Figure 2.** Spatial distribution of the three *Attalea* palm tree species across the study area. The boundaries of the surface of the areas considered for the study of the land cover and land use of the three local communities are illustrated by a blue line in: (A) on a false colour composite Spot 5 image (year 2009) of 2.5m spatial resolution provided from the SEAS French Guyane project and (B) on a 90 m resolution Digital Terrain Model (DTM) used to estimate the topography. The surface of each community was calculated within one kilometer around all the palm trees sampled.

## Data analysis

### *Entomological and parasitological studies*

The captured insects were grouped by dissected palm in order to identify the five larval development stages and the adult males and females. The insects, kept in Eppendorf tubes topped with tissue and placed at 28 C° and 90% relative humidity, were transferred to the laboratory. Live insects were fed on hens and dead insects were placed in absolute ethanol.

The identification of the adults was carried out morphologically according to Lent & Wygodzinsky (1979) and molecularly with third instar nymphs up to adults using *cytochrome b* mtDNA sequences according to Monteiro *et al.* (2003).

For each triatomine, DNA extractions were performed using the blood meal of the digestive tube to confirm infection by *T. cruzi* (Lewis *et al.* 2009).

### *Statistics*

“*Attalea* palm species” variable was analysed as function of the elevation and “presence of insects in *Attalea* palm tree species”, “presence of *T. cruzi* infection in triatomines” and “densities of triatomine infestation in palm trees and *T. cruzi* infection of triatomines” as a function of the factors “*Attalea* palm tree species”, “local communities” and “land cover and land use classes”.

Non parametric statistical analysis were conducted to compare the differences between the variables. Kruskal Wallis, multiple comparison after Kruskal Wallis and pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test were performed with R (R Development Core Team 2010).

Within each population division (palm species, communities and land use class) ratio of adults to nymphs and infected adults to infected nymphs as well as a colonization index (proportion of palms with presence of nymphs to total of palms) were calculated in order to observe variances of palm trees colonization.

### *Topography, remote sensing data and land cover-land use classification*

A Digital Terrain Model (DTM) giving informations at a 90 m resolution was used to estimate the topography of the study area and the elevation of the distribution of *Attalea* palm tree species (SRTM, available on <http://www.landcover.org/data/srtm>).

For landscape analyses, a SPOT 5 image of 2.5m spatial resolution provided from the SEAS GUYANE project (UMR ESPACE-DEV, IRD-Cayenne, <https://www.seas-guyane.org/seasguyane/index.htm>) was obtained during the field collections in 2009. The images have been produced with radiometric and geometric corrections in UTM WGS84 map projection without ground control points (2A production level).

In order to produce a thematic representation of the study area on the ground, the Spot5 image has been subjected to supervised landscape classification with ENVI (Environment for Visualizing Images) software (<http://www.itvis.com/ProductServices/ENVI.aspx>), by calculating Minimum Distance method between different radiometric classes based in the principal land use classes identified on the field and using four bands (Green, Red, PIR and NDVI for Normalized Difference Vegetation Index).

Once landscape classification described (Figures 5 & 6) and according to field works observations, three main classes where the *Attalea* palm tree species were present or absent have been clustered. All georeferenced palms that were used for landscape classification were not necessarily sampled for studying the presence, density and distribution of triatomines. The first clustered class has been described by pixels containing a radiance signature of presence of high densities of adult palm trees. The second one was based in a pixel radiance signature that described landcover likely to harbour divers stages of juveniles and adults palm trees in mid to low densities. Finally, a third clustered class where no *Attalea* palm trees were identified because there is no environmental characteristics related to the presence of *Attalea* palms or because these have been systematically removed in the local context of human activities.

---

## Results

---

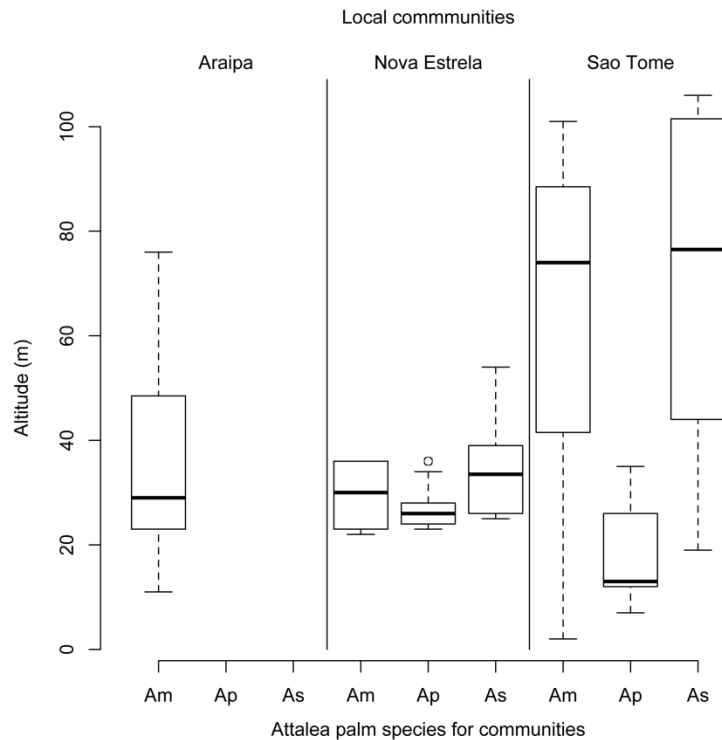
### *Attalea* sp. distribution in the three communities

Three *Attalea* palm species were observed in the study area (common names are given in brackets): *A. maripa* (Aubl.) Martius 1845 (*inajá*), *A. speciosa* Mart. (*babaçu*), *A. phalerata* Mart. ex Spreng. 1825 (*urucuri*), *Oenocarpus distichus* Mart. 1823 (*bacaba*), *Mauritia flexuosa* L. f. 1782 (*buriti*), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1824 (*macaúba*) and *Astrocaryum vulgare* Mart. 1824 (*tucumã*) (Glassman, 1978 ; Balick *et al.*, 1987 ; Henderson *et al.*, 1995 ; Glassman, 1999 ; Pintaud, 2008). Only the first three observed species known to be the ecotopes for insects of the genus *Rhodnius* were retained for analysis.

A total of 133 *Attalea* palms tree were observed in the three communities with a distribution of 74 *A. maripa* palms in São Tomé, Araipá and Nova Estrela, 33 *A. speciosa* and 26 *A. phalerata* palms in Sao Tomé and Nova Estrela (tables 1 and 2). *A. maripa* was exclusively observed in the community of Araipá, whereas the three palm species were present in the two other communities.

The general distribution of the *Attalea* palm tree species was different in function of the local topography. *A. maripa* varied from 2 to 101m above sea level (mean 48.6m  $\pm$  28.4), *A. speciosa* from 19 to 106m (mean 63.9m  $\pm$  29.7) whereas *A. phalerata* from 7 to 36m (mean 22.9m  $\pm$  8.0). The mean and median altitudes were significantly different between the three palm species (pvalues < 0.001, Kruskal Wallis test) (Figure 3).

If in Nova Estrela, the palms were distributed around the median altitude as the mean elevation of *A. maripa* in Araipa (Figure 3), there were no significant differences between the three palm species in Nova Estrela and of *A. maripa* between Araipa and Nova Estrela. The situation is not similar in Sao Tome, where it was possible to observe great variations in altitude of the three palm species, the mean elevation of *A. phalerata* being significantly lower than the two other species (pvalues <0.001, Kruskal Wallis test).



**Figure 3.** Boxplot of elevation per palm species within each community of São Tomé, Araipá and Nova Estrela. Significant differences in altitudinal distribution occurred only in São Tomé community between *Attalea phalerata* (Ap) and the two other species *A. maripa* (Am) and *A. speciosa* (As) ( $A. phalerata \neq A. maripa$ ,  $p$ value < 0.001,  $A. phalerata \neq A. maripa$  < 0.001, KW test).

### **Triatominae, *Attalea* palm trees infestation and triatomine infection by *Trypanosoma cruzi***

From the 133 *Attalea* palm trees sampled in the three communities, 73 (54.9%) were found infested by triatomine insects (Table 1). 742 triatomines were identified as *Rhodnius robustus* Lrousse, 1927 (99.6 % of the total insects captured), three triatomines as *R. pictipes* Stal 1972 and one as *Panstrongylus lignarius* Walker, 1973.

The three specimens of *R. pictipes* were found on separated palms: two nymphs (third and fourth instars) in one *A. maripa* situated in a young fallow in Araipa community and one fifth instar in an *A. speciosa* in secondary grown palm tree forest in Sao Tomé. None of them was found infected by *T. cruzi* but detection of nymphs in these palm trees supposed possible palm colonisation by *R. pictipes* in the area. The unique specimen of *P. lignarius* was found in one *A. speciosa* located in São Tomé in an old fallow. The *R. pictipes* and *P. lignarius* insects were found altogether with individuals of *R. robustus* in the same three palm trees.

Concerning the *cytochrome b* DNA analysis, the sequences of the 742 insects collected as *R. robustus* clustered in 16 haplotypes which shared greatest similarity with haplotypes roBr3m and roBr3L (Monteiro *et al.*, 2003) from Amazonas state (Apuí) and Rob1 from the Alto Beni state in Bolivia (Justi *et al.*, 2010). Further phylogenetic analysis of these *R. robustus* haplotypes are reported elsewhere (Quartier *et al.*, in prep)

The *R. pictipes* specimens matched at 98% with *R. pictipes* Pic1 which was collected in Pará state by Justi *et al.*, (2010). The *Panstrongylus* specimen has not been sequenced and was only characterised with morphological criteria (Lent & Wygodzinsky, 1979).

From the 742 insects of *R. robustus* captured in the 73 *Attalea* palm trees, 623 (84%) were nymphs and 119 (16 %) adults, 86 (72%) triatomines were males and 33 (28%) females. Respectively to the triatomine infection rates by *T. cruzi*, a total of 125 (16.8%) insects were found infected and among them, 86 triatomines were nymphs (14% of total nymph insects) and 39 were adults (26% of total adult insects), 23 were males and 16 females (20 % and 14% of total adult insects).

Concerning the global mean insect numbers/palm trees, the triatomine fluctuated from 0 to 51 individuals per palm with a mean number of 5.58 +/-0.89 insects/palm trees and the number of infected insects per palm fluctuated from 0 to 30 with a mean number mean number of 0.92 +/- 0.27 infected insects per palm trees. From the 73 total infested palms, 31 *Attalea* palm trees corresponding to 46.5% of the infested palms and 23.3 % of the sampled palms harboured insects infected by *T. cruzi*.

#### **Comparison of *Attalea* sp. infestation rates by triatomines between communities**

The number of triatomines collected per infested palms was higher in São Tomé and Nova Estrela in comparison with Araipá. Tables 1 and 2 summarize general results and descriptive statistics.

	Sampled Palms (N)	Infested Palms N (%)	Palms with infected insect(s) (N) (%)	Total of insects (N)	Insects /palms (mean $\pm$ SD)	Infected insect /palms mean $\pm$ SD)	Adults/nymphs index	Adults/nymphs infection index	Colonisation index (%)
<i>Attalea maripa</i>	74	28 (38) <sup>a</sup>	5 (7%) <sup>c</sup>	199	2.69 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.03d	0.15	0.46	89.29
<i>Attalea speciosa</i>	33	25 (76%)	10 (30%)	226	6.84 $\pm$ 1.62	1.8 $\pm$ 0.08	0.17	0.44	88
<i>Attalea phalerata</i>	26	20 (77%)	16 (62%)	317	12.19 $\pm$ 3.05	1.69 $\pm$ 0.09	0.16	0.5	95
Total	133	73	31	742	5.58 $\pm$ 0.89	0.92 $\pm$ 0.27	0.16	0.46	90

**Table 1:** Relationships between palm tree species, population density of *Rhodnius robustus* and infection by *Trypanosoma cruzi*. Infested palms: palms with at least one triatomine; palms with infected insect(s): palms with at least one triatomine infected by *T. cruzi*; adults/nymphs index: ratio of adults on nymphs; adults/nymphs infection index: ratio of infected adults on infected nymphs; colonisation index: percentage of palms with nymphal stages. Significant differences between palm tree species for a) infestation (*maripa*  $\neq$  *speciosa*, *maripa*  $\neq$  *phalerata*, pvalues <0.001, KW), b) density of insects per palm (*maripa*  $\neq$  *speciosa*, *maripa*  $\neq$  *phalerata*, pvalues <0.001, KW), c) infection by *T. cruzi* (*maripa*  $\neq$  *speciosa*, *maripa*  $\neq$  *phalerata*, pvalues <0.001, KW), density of infected insect per palm (*maripa*  $\neq$  *speciosa*, *maripa*  $\neq$  *phalerata*, pvalues <0.001 KW).

	Sampled Palms (N)	Infested Palms (N)	Palms with infected insect(s) (N)	Total of insects (N)	Insects /palms (mean $\pm$ SD)	Infected Insect /palms mean $\pm$ SD)	Adults/nymphs index	Adults/nymphs infection index	Colonization index (%)
<i>Sao Tome</i>	73	50 (68%)	22 (30%)	513	7.03 $\pm$ 1.29	1.46 $\pm$ 0.05	0.14	0.37	96
<i>Nova Estrela</i>	25	13 (52%)	9 (36%)	158	6.32 $\pm$ 2.17	0.64 $\pm$ 0.09	0.21	1.67	84.62
<i>Araipa</i>	35	10(29%) <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	71	2.02 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	0.57	0	70
Total	133	73	31	742	5.58 $\pm$ 0.89	0.92 $\pm$ 0.27	0.16	0.46	90

**Table 2.** Relationships between human communities, population density of *Rhodnius robustus*, and infection by *Trypanosoma cruzi*. Infested palms: palms with at least one triatomine; palms with infected insect(s): palms with at least one triatomine infected by *T. cruzi*; adults/nymphs index: ratio of adults on nymphs; adults/nymphs infection index: ratio of infected adults on infected nymphs; colonisation index: percentage of palms with nymphal stages. Significant differences between communities for a) infestation (Araipá  $\neq$  São Tomé, pvalue <0.001, KW), b) density of insects per palm (Araipá  $\neq$  São Tomé, pvalue <0.001, KW), c) infection for *T. cruzi* (Araipá  $\neq$  São Tomé, pvalue <0.001, KW), d) density of infected insect per palm (Araipá  $\neq$  São Tomé, pvalue <0.001, KW).

Higher frequency of infestation was observed in São Tomé with 50 *Attalea* palms infested (68.5 % of the total sampled palms), 13 in Nova Estrela (52%) and 10 in Araipá (28.57 %). Differences between communities were significant only between São Tomé and Araipá ( $p$ value < 0.001, KW and pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test).

*A. speciosa* and *A. phalerata* had higher infestation indexes (respectively 75.76 % and 76.92%) significantly different from *A. maripa* (37.84%) (KW and WRST  $p$ value < 0.001). Examination of species effect within the communities showed that *A. maripa* infestation was not significantly different from *A. speciosa* and *A. phalerata* within Nova Estrela (KW  $p$ value = 0.452) but significantly different from *A. speciosa* within São Tomé community (KW  $p$ value = 0.0071).

*A. maripa* palm trees harboured lower insects population densities. But as *A. maripa* was the only species present in Araipá community where the infestation was lowest too, a community effect cannot be excluded. Density of insects per palms was significantly lower for *A. maripa* compared to *A. phalerata* and *A. speciosa* ( $p$ values = 0.008 and <0.001, KW test). Densities of insects per palm were different only between Araipá and São Tomé ( $p$ value = 0.002, KW test).

Proportions of adults compared to nymphs were the same for the three *Attalea* palm species (from 0.15 to 0.17) but were different between communities (from 0.14 to 0.57), being higher in Araipá where the adults were proportionnaly more numerous than the nymphs. Colonisation index (88 for *A. speciosa*, 89.29 for *A. maripa* and 95 for *A. phalerata*) followed the same pattern, being homogeneous between the three different *Attalea* species and heterogeneous between communities (from 70 to 96%).

### **Comparaison of *Attalea* sp. and *Trypanosoma* infection rates of *Rhodnius robustus***

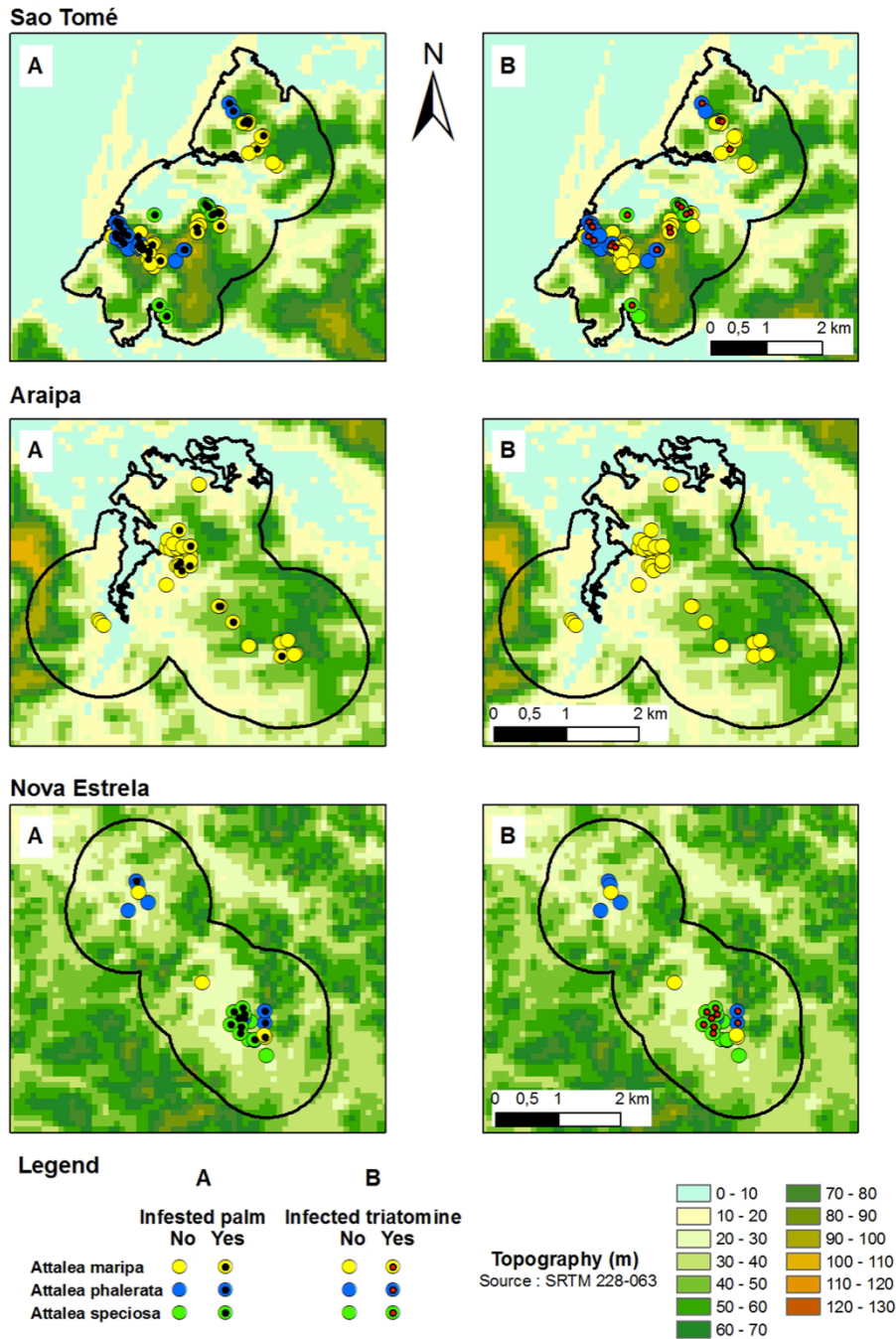
From the 73 infested palms with 742 insects captured, 31 palm trees had a total of 125 infected insects (16.85% of total insects). Number of infected insects per palm fluctuated from 0 to 30 with a mean number of  $0.92 \pm 0.27$  infected insects per palm trees. Thirty-nine were-adults (23 males and 16 females) and 86 nymphs.

No infected insect was found in Araipá. In Nova Estrela, the infected insects were found on *A. maripa*, in only one *A. speciosa* palm and in 8 *A. phalerata* palms out of 14

sampled (57%). Globally, 70 % of the infested *Attalea* sp. palms were found positive for *T. cruzi* insect infection in Nova Estrela.

In São Tomé, the insects infected by *T. cruzi* were found in the three *Attalea* palm species. The mean number of palm tree found with infected triatomine and the mean density of infected insects per palm trees were significantly different between *A. maripa* and *A. phalerata* species (pvalues = 0.011 and 0.012, KW tests).

Globally infection index were not different between Nova Estrela and São Tomé (pvalue = 0.877). Ratios of infected adults on infected nymphs were the same whatever the palm species (from 0.44 for *A. speciosa*, 0.46 for *A. maripa* and for *A. phalerata* 0.45) but were different between Sao Tomé and Nova Estrela.



**Figure 4.** Distribution of (A) *Attalea* palm tree species infestation by Triatominae and (B) triatomine infection by *Trypanosoma cruzi* across São Tomé, Araipá and Nova Estrela communities (Tapajós region, Pará state, Brazil) are signaled on a 90 m resolution Digital Terrain Model (DTM) used to estimate the topography. The surface of each community was calculated within one kilometer around all the palm trees sampled and identified by a black line. Sao Tomé and Nova Estrela have the three species of *Attalea* palm trees (*A. maripa*, *A. speciosa* and *A. phalerata*) whereas only *A. maripa* is present in Araipá. Araipá is also the only community that does not have triatomines infected by *T. cruzi*.

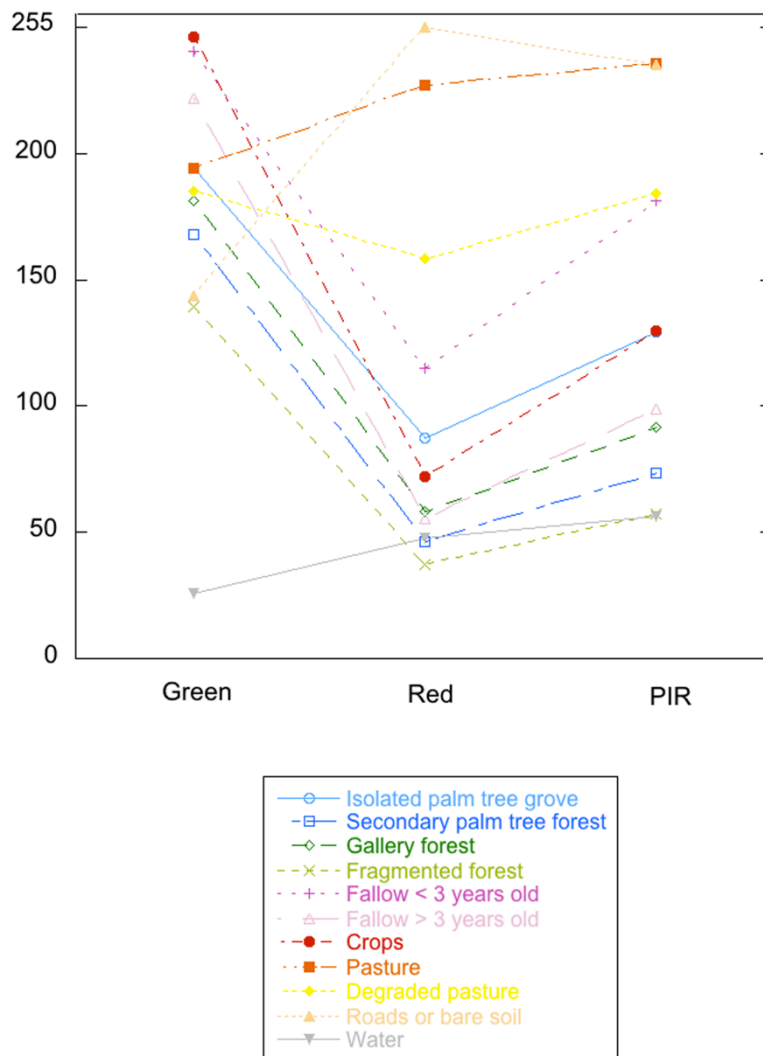
## **Environmental risk analyses**

### ***The land cover/land use classes and classification***

Based on field observation, eleven land uses classes were identified according to landscape dynamics of slash and burning human activities. This classification was applied on the corresponding pixels (or patch of pixels ) of the 2009 SPOT 5 image and subsequently to the whole image (Figure 6) throughout a supervised land cover classification described above. Table 3 and Figure 5 shows the land cover classes, the mean radiometric value for each available band of the SPOT 5 image and the color assigned for the classification map (Figure 6).

Land use Class	Mean Radiometric value				Presence of Attalea	Description
	Green	Red	PIR ( near infrared)	Color (class)		
Isolated palm tree grove	194.42	87.38	129.25	Deep Blue	+++	Aggregation of palms trees in pastures
Secondary palm tree forest	168.11	46.34	73.63	Blue	+++	Monospecific secondary grown forest of Attalea
Gallery Forest	181.22	58.35	91.55	Deep Green	+	Forest
Fragmented Forest	139.55	37.23	57.17	Green	+	Fragmented forest with edge effects
Fallow > 3 years	221.82	55.09	98.5	Purple	++	Fallow (secondary grown vegetation) under 3 years of age after slash and burn
Fallow < 3 years	240.59	114.91	181.29	Rose	++	Fallow (secondary grown vegetation) more than 3 years of age after slash and burn
Crops	246.14	71.79	129.66	Red	-	Patch of cultivated land ( manioc, rice, beans)
Pasture	184.96	158.45	184.29	Orange	-(++)	Deforested area and secondary sowed with Bracharia spp
Degraded Pasture	193.96	227.19	235.57	Yellow	-	Areas of abandoned pasture
Roads or bare soil	143.44	249.97	235.31	Beige	-	Road and bare soil
Water	25.91	47.53	56.22	Grey	-	Water

**Table 3.** Mean radiometric value and description of the land use classes identified on the field and used for the supervised land classification. Green, Red and PIR (near infra rouge) represent values from the initial SPOT 5 images. Colors correspond to assigned colors on the final classification map for each class (fig. 6).



**Figure 5.** Mean radiometric values for the three bands (1: Green, 2: Red, 3: PIR (near infrared)) for the eleven classes of landuse identified on the field.

### ***Land cover classes, *Attalea* palm tree species and triatomine distribution***

*Attalea* palm tree species, triatomine insects and infected triatomines were observed *in situ* in six out of the eleven classes. Table 4 summarizes results and descriptive statistics. Number of infested palm was significantly different between forest and pastures (pvalues = 0.027, KW test) densities of insects per palm were significantly different between forest and young fallows (pvalue = 0.021) and between forest and pastures (pvalue = 0.0074). Concerning insect infection by *T. cruzi* and densities of infected insects, no significant differences were detected between the six land cover classes.

Land-use classes	Sampled Palm (N)	Infested Palms (N)	Palms with infected insect(s) (N)	Total n° of insects (N)	Insects per palms (mean ± SD)	Infected Insect /palms (mean ±SD)	Adults/nymphs index	Adults/nymphs infection index	Colonization index
Forest	19	16 (84%) <sup>a</sup>	6 (32%)	206	21.87 ± 3.08 <sup>b</sup>	1.57 ± 0.60	0.01	0.36	100
Fragmented forest	9	4 (44%)	2(22%)	70	17.5 ± 6.89	0.44 ± 0.38	0.13	3	100
Palm trees forest	7	6 (86%)	2(29%)	62	10.33 ± 2.72	0.43 ± 0.30	0.16	0.5	100
Fallows more than 3 years	28	17 (61%)	8 (29%)	153	9 ± 2.66	1.5 ± 1.07	0.22	0.56	88.24
Fallows less than 3years	24	11 (46%)	2 (8%)	50	4.54 ± 1.56 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.58	0.03	0.25	81.81
Pasture	46	19(41%) <sup>a</sup>	11 (24%)	201	10.16 ± 1.43 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.17	0.16	0.5	84.21
Total	133	73	31	742	5.58 ± 0.89	0.92 ± 0.27	0.16	0.46	90

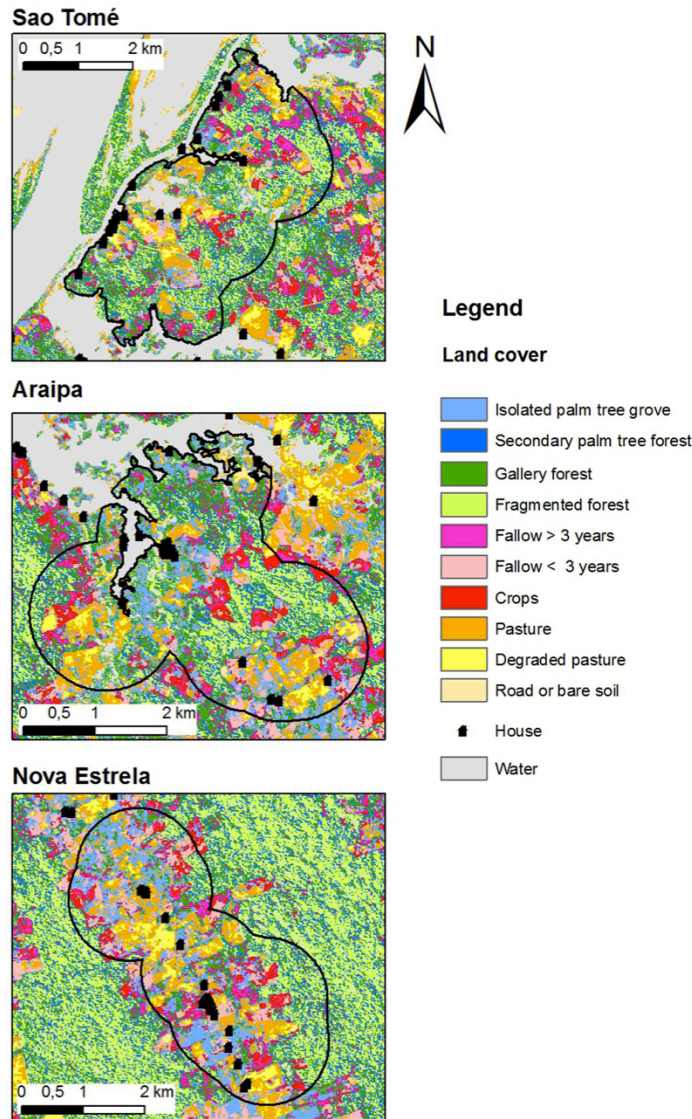
**Table 4.** Relationships between land use classes, population density of *Rhodnius robustus* and infection by *Trypanosoma cruzi*. Infested palms = palms with at least one triatomine; palms with infected insect(s) = palms with at least one triatomine infected by *T. cruzi*; adults/nymphs index = ratio of adults on nymphs; adults/nymphs infection index = ratio of infected adults on infected nymphs; colonisation index = percentage of palms with nymphal stages. Significant differences between land use classes a) infestation (forest ≠ pasture, pvalue = 0.027), b) density of insects per palm (forest ≠ young fallows (pvalue = 0.021), forest ≠ pasture ( pvalue =0.007), c) infection for *T. cruzi* (no differences, pvalue = 0.512), d) density of infected insects per palm (no differences, pvalue = 0.538).

### *Spatial distribution of the three communities*

In figure 6, the localisation of the São Tomé, Araipá and Nova Estrela community dwellings is associated with the eleven land use classes. In São Tomé, the majority of the houses are situated next to the river in a slope overhanging the water. The dwellings are surrounded by pastures with palm trees and remnant forests with numerous high palm trees of second grown palm tree formations. A small village center had been constituted around the school and the church (3-5 houses), the rest being disseminated along the river and inundations *varzeas*.

In Araipá, the nucleous community borders the inundation Araipá Lake at the same elevation than São Tomé. The village, concentrated around the end of the km70 road which link the lakeshore to the Nova Estrela community, is surrounded with numerous pastures with young *A. maripa* specimens and recent fallows.

The community of Nova Estrela is more centralized and organized along the km70 road. The dwellings are surrounded with ancient pastures, whereas fallows and remnant forest are far from the center of the village.



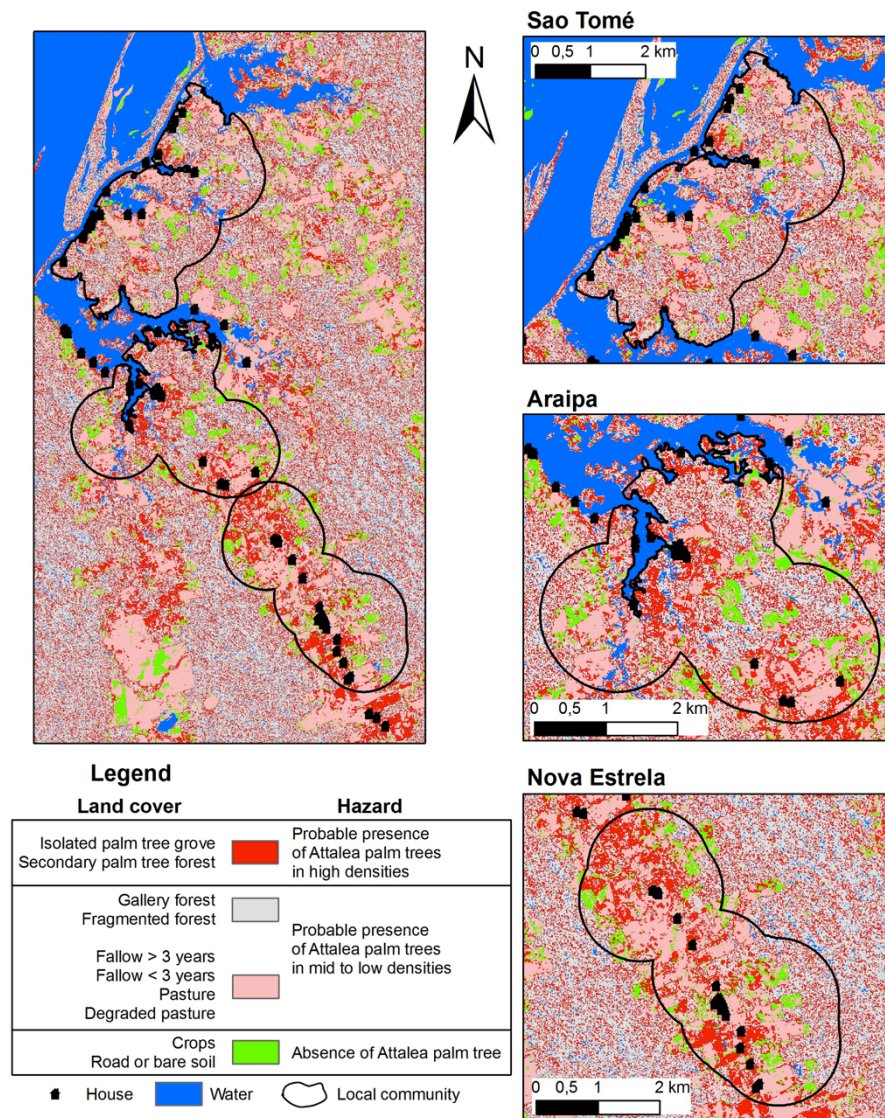
**Figure 6.** Land cover cartography of the three communities (São Tomé, Araipá, and Nova Estrela) based on a supervised classification applied on a Spot 5 image (year 2009) of 2.5m spatial resolution provided from the SEAS French Guyane project. Geographic locations of houses were projected in black and buffer zones of 1km-radius around each palm tree dissected were defined to delimit areas of the three communities.

***Environnemental risk cartography***

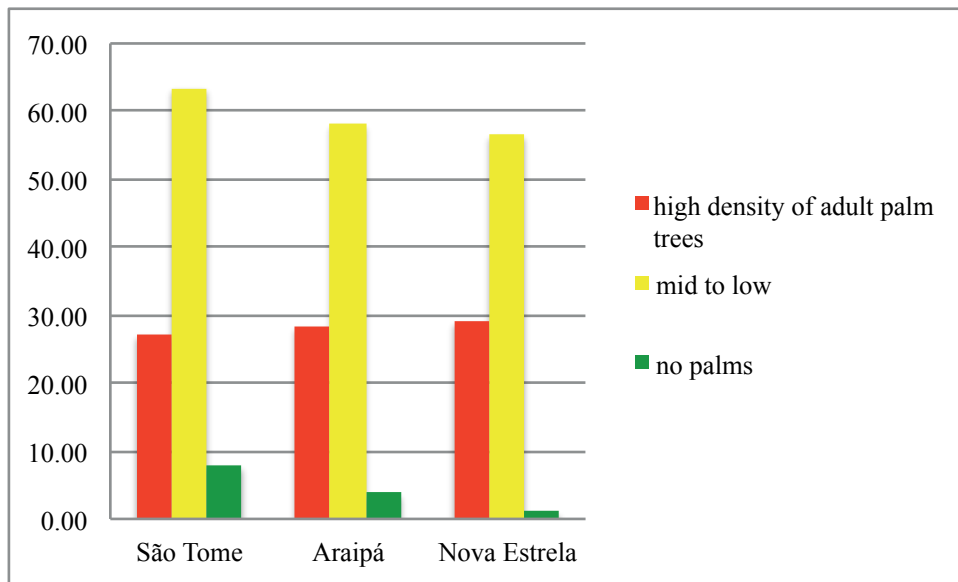
From the eleven land uses classes, six harbouring palm trees were chosen and clustered in class of probability of *Attalea* occurrence. Three classes were obtained (Figure 7) and applied on the land use cartography. From this new hazard cartography, distribution of human dwellings in zones of probability of palm tree presence is shown. Palm trees are disseminated in each natural land use class, with increasing densities in more anthropized land

uses. Few patches with no palm trees were identified. Close proximity between houses and zone of high probability was observed, particularly in Nova Estrela and Araipá.

Figure 8 shows the percentages of the three classes of environmental risk in fonction of the probability of presence or not of the *Attalea* palm trees in the three communities. Percentages of each class are comparable between the three communities, nevertheless, spatial configuration of environmental risk classes is not taken into account in the figure.



**Figure 7.** Environmental risk cartography based on clustering land cover classes previously obtained by supervised classification in hazard classes of palm presence probabilities. Legend describes relationships between original land cover classes with respective hazard classes.



**Figure 8.** Percentage of environment risk classes calculated for communities based on the environmental risk cartography previously described. The territories of the communities were defined by buffer zones of 1km radius around each palm dissected in each community

---

## Discussion

---

The three species of *Attalea* palms observed in the study area, *A. speciosa*, *A. phalerata* and *A. maripa* have been found in the three communities in closed and open areas such as natural forest, river margins, cleared pastures and in isolated state in not disturbed areas and in huge stands in open (highlighted) areas.

For Uhl & Dransfield 1987, *A. maripa* is a tall, solitary and monoic palm found throughout the Amazonian region, widespread towards the open forests of its periphery. The species cannot be found outside Amazonia (Uhl & Dransfield, 1987; Kahn & Granville, 1992).

*A. maripa* is common in highly seasonal forests and is frequently dominant in secondary forests across their distribution range (Henderson *et al.*, 1995). This palm, for example, was the most important species in the palm grove in anthropogenic forest and undisturbed areas at the Pinkaití (Southern Pará, Brazil) cleared for subsistence crops (*roças*), in the first half of last century grove (Salm 2004). Salm has also showed in 2004 that in full-light conditions, the growth in height of *A. maripa* is relatively rapid and the stem of these palms can reach 8m height above ground in  $16.5 \pm 2.8$  (S.D.) years after its emergence. During this phase, the canopy height is gradually raised and the canopy closes, reducing the light that reaches the juveniles. Palms are self-limiting because their regeneration is hampered by the shadow produced by adult palms. With the reduction of light in the understory, liana recruitment becomes less frequent and their negative impact on the trees diminishes, liberating the trees to develop further. With the tree growth and the palm senescence, and replacement, the forest tends to progress to the mature stage.

*A. phalerata* is widespread around the southern and western periphery of the Amazon region and in the *planalto* of Brazil, in Peru, Brazil, Bolivia and Paraguay and have been found in open areas, gallery and disturbed forest, forest islands in savannas and lowland rain forest (Henderson *et al.*, 1995). Their leaves are often an important source of thatching. The palm is often covered with persistent leaf bases.

*A. speciosa* has also a large range and habitat concerning mostly south of the Amazon in Guyana, Suriname, Brazil and Bolivia (Henderson *et al.*, 1995). Like the other two species found in the three communities, it can be observed in forest or open areas, but occurring in huge numbers in disturbed areas, e.g., in Maranhao, where the forest has been cut and the landscape is stabilized (Mitja & Ferraz, 2001)

Taking the three species together and based in the works published firstly by Romana et al. (1999, 2005) and nowadays particularly by Abad-Franch *et al.* (2005, 2009, 2010) it is possible to consider that the three species had the same characteristics concerning their population dynamics in open and closed areas of the Amazonian region and that they are dominant species in disturbed areas. It is also possible to determine that the fruits of those palms represent a major food source for the vertebrate community in several parts of the Amazon (Bodmer, 1991; Kahn & Granville, 1992; Fragoso, 1994).

### ***Attalea* palm distribution as indicator of epidemiological system spatial heterogeneity**

The palm sampling used in the study area was not carried out to specifically study palm species distribution but rather Chagas Disease vectors distribution among human communities and different land use classes. Nevertheless it was possible to observe that the three *Attalea* species are not uniformly distributed across the whole region and that they are not represented in each community in the same proportion. They are patchily distributed over/through farming fields, forming successional groves of palms. *A. maripa* was the most present species in the whole sampling area and was mostly associated with *A. phalerata* and/or *A. speciosa* specimen which were often not present in individual farmer fields.

Elevation could play a role in the distribution of *A. phalerata* because the palm trees specimens were found below 40m, nearer water level.

Review of the literature showed that differences for *Attalea* palms tree distribution could be attributed to soil properties (Gregoire *et al.*, 2011; Kahn, 1987), natural succession of species, artificial plantation, original distribution of the species in the forest, specific human activities (owners cut rather *A. maripa* than *A. phalerata* because a hard tissue exist around the stem structure), seed predation and seedling recruitment by vertebrates (Fragoso & Huffman, 2000).

Heterogeneity in topography was pointed out to be as much as important as canopy cover for distribution of large arborescent palms in Amazonian terra firme forest (Salm *et al.*, 2005). Although topography is suggested to have no direct influence on plants but rather being an indirect gradient of soil hydrology and drainage which also depends of soil texture, the details of succession process are still not fully understood (Salm *et al.*, 2005b)

Concerning landscape distribution, the three palm tree species were present in each land use classes, the only presence of *A. maripa* in Araipá community could reflect the more recent perturbation process. No *A. phalerata* was effectively observed in forest and was mostly associated to open area as pastures and fallows. Secondary grown palm forests were observed only in São Tomé, where originally deforestation occurred in past centuries and where farmers prefer let grow secondary vegetation than culture pastures as make colons in Nova Estrela. In summary palm tree distribution is principally due to natural causes as topography, light access and soil properties and to anthropogenic disturbances. In contrast, farmers decisions are fundamental for palm trees densities.

Following their ecological niches, the entomological distribution of *Rhodnius spp* is intimately linked to *Attalea* palm tree in the different land cover classes. *Rhodnius spp* had been associated to palm trees crown and a long co-adaptation between insects and palms had been assumed (Gaunt & Miles, 2000).

*R. robustus* is considered as a sister species of *R. prolixus*. They are morphologically indistinguishable (Harry, 1994) and they share low nuclear divergence (Harry *et al.*, 1992, 1993) but relatively high mitochondrial genetic distances (Monteiro *et al.*, 2000, 2003). Nevertheless, they have different ecological adaptations. *R. prolixus* has long been considered as a strictly domesticated species, evolved and adapted to domestic structure from sylvatic *R. robustus* (Dujardin *et al.*, 1999). In Venezuela, sylvatic *R. prolixus* has been found sympatric with *R. robustus* in palm trees (Fitzpatrick *et al.*, 2008) but Venezuelan *R. robustus* status remains unclear, considered as a truly *R. prolixus* for some authors (Harry, 1993).

*R. robustus* has been described in French Guyana (Béranger *et al.* 2009), Venezuela (Harry *et al.*, 1992; 1993; Fitzpatrick *et al.*, 2008), Ecuador, Colombia (Galvão *et al.*, 2003), Bolivia (Matias *et al.*, 2001) and in north of Brazil (Pará, Amazonas, Roraima, Rondonia) but frequent confusions with *R. prolixus* make geographical distribution uncertain (Monteiro *et al.*, 2003).

*R. robustus* is considered as a sylvatic species but is known to visit sporadically houses (Coura *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 1983) and as being attracted by light (Castro *et al.*, 2010). Due to its association with sylvatic cycle, the species is considered as a minor epidemiological importance for *T. cruzi* transmission nevertheless, reports of infected adults in houses in western Brazilian Amazon (Fé *et al.*, 2009) and houses invasion in Venezuela

(Feliciangeli *et al.*, 2002) stress possible implication of *R. robustus* oral transmission cases of *T. cruzi*.

Despite ubiquity of *Rhodnius robustus* insects, epidemiological situation appeared different for both palm tree species and communities. Lower infestation rates in palms of *A. maripa* could be explained by the peculiar crown and stem architecture compared to the other *Attalea* species (Table 1). In *A. maripa*, the base of the leaf does not bear leaflets. These nude petioles lead to a diminution of organic matter accumulation between the remnant leaves and permit rain to flood palm crown, probably leading to the death of insects. Concerning colonisation indices and adults/nymphs ratios, they followed the temporal gradient of community settlements with more nymphs in ancient settlement and ecotopes. The indices and ratios remain similar between the different *Attalea* palm species, nevertheless more than 80% palm tree in pastures demonstrated colonisation.

Finally, in Araipá community we found no infected insects among the infested palms. As *A. maripa* is the only *Attalea* species present in Araipá – the most recently established community with intense slash and burning activities – the hypothesis to explain such situation is that functional connectivity provided by palm trees has been lost and, as a result, the circulation of reservoirs of *T. cruzi* limited.

## Conclusion

The hazard or environmental risk area is the area where the epidemiological system circulates naturally, this system being complex for Chagas disease. The epidemiological system consists of a large number of cycles involving a variety of agents (populations of *T. cruzi*), insect vectors (eg. *R. robustus*) and reservoirs (eg armadillos, marsupials) in various environments. In general, *T. cruzi* circulates between insects and reservoirs without human contact. But the phenomenon of deforestation, by changing the habitats of insect vectors and the concentration of these near human dwellings, associated with the active dispersion by flight of the adult insects, increases the contact between insect vectors and human populations. The hazard can be then characterized and mapped by the area occupied by the biotopes, in this case the one that greater concern of researchers and policy, the palm trees of the *Attalea* genus.

The spatial and temporal evolutions of the communities were representative of a more widespread process occurring during these last decades in the whole Amazon region. At the same time, it illustrates the settlements taking place along the riparian and, more recently, along the roads. Both of them are characterized by a specific form of settlement and a unique forest fragmentation. Landscape local scale heterogeneity in the three communities of the Tapajós river was then detected for *Attalea* palm species distribution and epidemiological human exposure to insect vectors of *T. cruzi*, the agent of Chagas disease. São Tomé, Nova Estrela and Araipá are three communities representative of three land use patterns: (i) the riparian communities that lives from fishing and agricultural subsistence on the banks of the Amazonian rivers, (ii) the pioneers communities that occupy the territories by cultivating pasture for animal husbandry and (iii) the agricultural communities of slash and burn practiced by migrants from other parts of the Amazon and the Northeast of Brazil as part of vast operations of colonization by the opening of roads like the BR163.

The state of Pará has recently set up an action plan with several interventions implemented from November 2007 to December 2009 in 86 municipalities selected for the presence of açaí production (a beverage representing the principal way of oral contaminations) and occurrence of acute cases of Chagas disease. This action plan consists in epidemiological, medical, environmental and entomological surveillance, clinical laboratory, primary care, health education and social mobilization. In a so large territories as the Amazonian region where the hazard for Chagas disease human infection exists, mapping the probability of *Attalea* palm trees occurrence as ecological indicator of the presence of the epidemiological system and ecological indicators of bioclimatic ecosystems and anthropic deforestation, represents the first step for the the establishment of a monitoring and alert system based on the territory of the environmental risk and the vulnerability of human populations.

---

## Acknowledgment

---

This work is part of the PhD of Marion Quartier and Fernando Braga Stehling Dias. Field work and part of sequencing costs has been financed by the International Research Program, the “PLUPH” project (Poor land use, poor health: primary prevention of human health through sound land use for small- scale farmers of the humid tropics) supported by the Canadian Global Health Research Initiative and coordinated by M. Lucotte (Université du Québec, Montréal, Canada) and J.Drummond (Universidade de Brasilia, Brazil). We are grateful to all members of the communities in which this study was carried out for allowing and helping in the field-work. Guy D. Mejia for teaching and helping in the field-work, all members and students of the PLUPH project and Emmanuel Roux for methodological assistance and Bruno Betschart for scientific and academic support.

This study strictly followed the ethical codes of Brazil. The sampling and insect exportation were carried out in full compliance with the Brazilian laws (IBAMA (SISBIO) authorization no: 16485-2, 27/06/2008 and CITES: Permit no.: 09BR002832/DF - emission: 09/01/2009).

## References

- Abad-Franch F, Palomeque FS, Aguilar HM, Miles MA (2005) Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): Risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Trop Med Int Health* 10(12): 1258–1266.
- Abad-Franch F, Monteiro FA (2007) Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl.1): 57–69.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo O N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L. (2009) Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 110 (2-3): 159-77.
- Abad-Franch F, Ferraz G, Campos C, Palomeque FS, Grijalva MJ (2010) Modeling Disease Vector Occurrence when Detection Is Imperfect: Infestation of Amazonian Palm Trees by Triatomine Bugs at Three Spatial Scales. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(3): e620.
- Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR (2007) Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl.1): 47–55.
- Arboleda S, Gorla DE, Porcasi X, Saldaña A, Calzada, Jaramillo JN, Henderson O (2009) Development of a geographical distribution model of *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 using environmental data recorded by remote sensing. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 441–448.
- Balick MJ, Pinheiro CUB, Anderson AB (1987) Hybridization in the Babassu Palm Complex: I. *Orbignya phalerata* x *O. eichleri*. *American Journal of Botany* 74 (7): 1013-1032.
- Bérenger JM, Pluot-Sigwalt D, Pagès F, Blanchet D, Aznar C (2009) The triatominae species of French Guiana (Heteroptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(8): 1111-1116.
- Briceño-Leon R (2007) Chagas disease and globalization of the Amazon. *Cad Saude Publica* 23(1): 33-40.
- Bodmer RE (1991) Strategies of Seed Dispersal and Seed Predation in Amazonian Ungulates. *Biotropica* 23: 255-261.
- Castro MC, Barrett TV, Santos WS, Abad-Franch F, Rafael JA (2010) Attraction of Chagas disease vectors (Triatominae) to artificial light sources in the canopy of primary Amazon rainforest. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8): 1061-4.
- Ceballos LA, Cardinal MV, Vazquez-Prokopec GM, Lauricella MA, Orozco MM, Cortinas R, Schijman AG, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE (2006) Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 98(3): 286-9.
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA (2002) Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18(4): 171–176.

- Davies-Colley RJ, Payne GW, van Elswijk M (2000) Microclimate gradients across a forest edge. *New Zealand Journal of Ecology* 24(2): 111-121.
- Dias FB, Quartier M, Romaña CA, Diotaiuti L, Harry M, 2010. *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. *Infect Genet Evol.*10(8): 1278-81.
- Diotaiuti L, Dias JCP (1984) Occorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 293-301.
- Dujardin JP, Chavez T, Moreno JM, Machane M, Noireau F, Schofield CJ (1999) Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Ent* 36: 653-659.
- Dumonteil E, Gourbière S (2004) Predicting *Triatoma dimidiata* abundance and infection rate: a risk map for natural transmission of chagas disease in the yucatan peninsula of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70(5): 514-519.
- EMBRAPA (2007) Zoneamento Ecológico-Econômico da Área de Influência da Rodovia BR-163 (Cuiabá-Santarém): Gestao Territorial. Embrapa Amazônia Oriental, Belém.
- Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MG (2009) Occurrences of triatomines in wild and domestic environments in the municipality of Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(6): 642-646
- Feliciangeli MD, Dujardin JP, Bastrenta B, Mazzarri M, Villegas J, Flores M, Muñoz M (2002) Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? *Trop. Med. Int. Health* 7: 280–287.
- Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA (2008) Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise ruralhouses. *PLoS Negl Trop Dis* 2(4):e210.
- Fragoso JMV (1994) Large Mammals and the Community Dynamics of an Amazonian Rainforest. Florida, PhD thesis, University of Florida.
- Fragoso JMV & Huffman JM (2000) Seed-dispersal and seedling recruitment patterns by the last Neotropical megafaunal element in Amazonia, the tapir. *Journal of Tropical Ecology* 16: 369–385.
- Galeano G & Bernal R (1995) *Field Guide to the Palms of the Americas*. Princeton: Princeton University Press, 363 p.
- Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J (2003) A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographic distribution, with nomenclature and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Gaunt M & Miles M (2000) The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(4): 557-65.

- Glassman, SF (1978) Preliminary taxonomic studies in the palm genus *Maximiliana* Mart. Phytologia. 38 (3): 161-172.
- Glassman SF (1999) A taxonomic treatment of palm subtribe *Attaleinae* (Tribe *Cocoeae*). University of Illinois Press, Urbana 414p.
- Gottdenker NL, Calzada JE, Saldaña A, Carroll CR (2011) Association of anthropogenic land use change and increased abundance of the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* in a rural landscape of Panama. Am J Trop Med Hyg 84(1): 70-7.
- Grégoire B (2010) Le rôle des propriétés du sol dans la distribution des palmiers du genre *Attalea* (Palmae) et des cations échangeables de la région du bas Tapajós (Amazonie Brésilienne). Mémoire de maîtrise en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montreal.
- Grijalva MJ, Escalante L, Paredes RA, Costales JA, Padilla A, et al. (2003) Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon region of Ecuador. Am J Trop Med Hyg 69(4): 380–385
- Grupo de Trabalho Interministerial, 2006. Plano de Desenvolvimento Sustentável Pará a Área de Influência da BR-163. Coordenação da Casa Civil da Presidência da República, Brasília, Brasil.
- Gurgel-Gonçalves R, Duarte MA, Ramalho ED, Palma ART, Romaña CA, Cuba-Cuba C (2004) Distribuição espacial de populações de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal. Rev Soc Bras Med Tropical 37(3): 241-247.
- Gurgel-Gonçalves R, Cuba CAC (2007) Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* (Lent) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg) (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil Rev Bras Zool 24: 157-163.
- Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JB, Santana DB, Cuba CA (2008) Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? Acta Trop 107(2): 90-8.
- Gurgel-Gonçalves R, Cura C, Schijman AG, Cuba CA (2011) Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. Acta Trop doi:10.1016/j.actatropica.2011.10.010
- Harry M, Galindez I, Cariou ML (1992) Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R.robustus* and *R.pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. Med Vet Entomol. 6(1): 37-43.
- Harry M (1993) Isozymic data question the specific status of some blood-sucking bugs of the genus *Rhodnius*, vectors of Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 87(4): 492
- Harry M (1994) Morphometric variability in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. Jpn J Genet. 69(3): 233-50
- Henderson, A, Galeano G, Bernal R (1995) Field Guide to the Palms of the Americas. Princeton: Princeton University Press, 363.

- IBGE (2010) <http://www.censo2010.ibge.gov.br>.
- Jaeger JAG (2000) Landscape division, splitting index, and effective mesh size: new measures of landscape fragmentation. *Landscape Ecology* 15: 115-130.
- Kahn F (1987) The Distribution of Palms as a Function of Local Topography in Amazonian Terra Firme forests. *Experientia* 43: 251-259.
- Kahn F, de Granville JJ (1992) Palms in forest ecosystems of Amazonia. Springer-Verlag, Berlin, DE.
- Kahn F, Souza Cravo M.J, Couturier G (2003) L'invasion du Roraima (Amazonie brésilienne) par le palmier *Maximiliana maripa*: sous l'effet des activités anthropiques. In: Froment Alain (ed.), Guffroy Jean (ed.). Peuplements anciens et actuels des forêts tropicales: actes du séminaire-atelier. Paris, IRD, 309-314.
- Lent H, Wygodzinsky P (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163 (New York). 520.
- Lévêque C, Muxart T, Abbadie L, Weil A, Van Der Leeuw S (2003) L'anthroposystème: entité structurelle et fonctionnelle des interactions sociétés - milieux. In: Quelles natures voulons-nous? Lévêque C et Der Leeuw S (éds), Elsevier, Paris, 110-129.
- Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Ilewellyn MS, Miles MA (2009) Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *Am J Trop Med Hyg.* 81: 1041-1049.
- Matias A, de la Rive JX, Torrez M, Dujardin JP (2001) *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(7): 947-50.
- Miles MA, Arias JR, de Souza AA (1983) Chagas' disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* triatomine vectors of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78(4): 391-8.
- Mitja D & Ferraz I (2001) Establishment of babassu in pastures in Pará, Brazil. *Palms* 45(3): 138-147.
- Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 62(4): 460-465.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB (2003) Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12: 997-1006.
- Pintaud JC, Galeano G, Balslev H, Bernal R, Borchsenius F, Ferreira E, Granville JJ, Mejía K, Millán B, Moraes M, Noblick L, Stauffer FW, Kahn F (2008) The palms of South America: diversity, distribution and evolutionary history. *Rev. peru. biol.* 15(1): 7-29.
- Pires JM & Prance GT (1985) The Vegetation Types of the Brazilian Amazon. Key Environments: Amazonia (eds G. T. Prance & T. E. Lovejoy) Pergamon Press, New York. 109-145.

- Pizarro JC & Romaña CA (1998) Variación estacional de una población silvestre de *Rhodnius pallescens* Barber 1932 (Heteroptera: Triatominae) en la costa caribe colombiana. *Bulletin de l'Institut Français d'Etudes Andines* 27(2): 309-325.
- PLUPH (2010) «Welcome to the PLUPH project». Online. <<http://www.pluph.uqam.ca>>.
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.
- Richards P & GB Williamson (1975) Treefalls and Patterns of Understorey Species in a Wet Lowland Forest. *Ecology* 56: 1226-1229.
- Romaña CA (2007) O controle da tripanossomiase americana requer vigilância ecológica e social da emergência do risco. In Teixeira A: Doença de Chagas e evolução, Ed. UnB/Finatec: 233-251.
- Romaña CA, Pizarro JCN, Rodas E, Guilbert E (1999) Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 594-595.
- Romaña CA, Brunstein D, Collin-Delavaud A, Sousa O and Ortega-Barria E (2003) Public policies of development in Latin America and Chagas' disease. *The Lancet* 362 (9383): 579.
- Romaña CA, Emperaire L, Jansen AM (2003) Conceptual and methodologic approaches for the study of the interactions between environment and health: the case of the American Trypanosomiasis. *Cadernos de Saúde Pública* 19(4): 945-953.
- Roux E, Venâncio AF, Girres JF, Romana C (2009) High resolution remote sensing and heterogeneous data analysis for local scale characterization of environmental risk: an application to Chagas disease in endemic areas. *Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Natal, Brasil, 25-30 abril 2009, INPE: 7577-7586.
- Salm R (2002) The ecology of two large arborescent palms, *Attalea maripa* and *Astrocaryum aculeatum* in a seasonally-dry Amazonian Forest. M.Sc. thesis, University of East Anglia, Norwich. 233
- Salm R (2005) The importance of forest disturbance for the recruitment of the large arborescent palm *Attalea maripa* in a seasonally-dry Amazonian forest. *Biota Neotropica* 5(1): 35-41.
- Salm R, Jalles-Filho E, Schuck-Paim C (2005b) A model for the importance of large arborescent palms in the dynamics of seasonally dry Amazonian forests. *Biota Neotropica* 5(2).
- Sampaio A (1945) *Fitogeografia do Brasil*. São Paulo, Companhia Editora Nacional. 372
- SESPA (2011) Secretaria de Estado de Saúde Pública. Governo do Pará. Online <http://www.saude.pa.gov.br>
- Svenning JC (1999) Recruitment of Tall Arborescent Palms in the Yasuni National Park, Amazonian Ecuador: Are Large Treefall Gaps Important? *J Trop Ecol* 15: 355-366.

- Svenning JC (2000) Growth Strategies of Clonal Palms (Arecaceae) in a Neotropical Rain Forest, Yasuní, Equador. *Aust J Bo* 48: 167-178.
- Valente SAS, Valente VC, Neto HF (1999) Considerations on epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Suppl. I): 395-398.
- Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN (2002) Por que ocorrem episódios familiares de doença de Chagas associado à transmissão oral na Amazônia Brasileira? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 35(Suppl. I): 165-44.
- Valente VC, Almeida AJB, Valente SAS, Pinto AYN, Miranda C, Oliveira RA, Gomes FA, Freitas AB, Barbosa CCS, Silva LOS, Fonseca JMC (2005) Nova micro-epidemia familiar com três casos de doença de Chagas em Belém estado do Pará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38(Suppl. I): 413.
- Uhl C & Dransfield J (1987) *Genera Palmarum - A classification of palms based on the work of Harold E. Moore*. Lawrence, Kansas: Allen Press.
- USGS (2006) Shuttle Radar Topography Mission, 3 Arc Second scene SRTM\_ffB03\_p228r063, full finished-B 2.0, Global Land Cover Facility, University of Maryland, College Park, Maryland, February 2000.
- Wright SJ & Duber HC (2001) Poachers and forest fragmentation alter seed dispersal, seed survival, and seedling recruitment in the palm *Attalea butyracea*, with implications for tropical tree diversity. *Biotropica* 33: 583-595.



**Article 2****Identification des sources alimentaires et des souches de *Trypanosma cruzi* associées à *Rhodnius robustus* dans le bassin du Tapajós en Amazonie brésilienne.**

---

Marion Quartier<sup>1</sup>, Fernando Braga Dias Stehling<sup>2</sup>, Myriam Harry<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de parasitologie Moléculaire, Université de Neuchâtel, Suisse; <sup>2</sup>Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil; <sup>3</sup>Université Paris Sud 11/LEGS, CNRS-IRD, Gif sur Yvette, France

Présenté sous la forme d'un article en français.

---

## Résumé

---

Les sources alimentaires et les souches de *Trypanosoma cruzi* et *T. rangeli* associées à *Rhodnius robustus* dans des palmiers *Attalea spp.* dans trois communautés rurales du Tapajós, en Amazonie brésilienne ont été identifiées à l'aide de marqueurs moléculaires en utilisant l'ADN extrait des résidus de repas sanguin contenus dans le tube digestif des insectes (n= 742). A partir de séquences de *cytochrome b*, 27% des repas sanguins ont pu être attribués à un hôte. Vingt espèces d'hôtes réparties en trois classes ont été déterminées (mammifères, oiseaux, sauropsidés). Il apparaît que 81 % des repas détectés ont été effectués sur des mammifères, hôtes potentiels de *T. cruzi*. L'infection à *T. cruzi* et *T. rangeli* a été détectée chez *R. robustus* en utilisant plusieurs types de marqueurs moléculaires.

Des insectes infectés ont été trouvés dans deux communautés mais pas dans la communauté la plus récemment établie. La prévalence de *T. cruzi* chez *Rhodnius robustus* varie de 4.83 à 37.73 % selon les unités de paysages, avec une moyenne de 16.57%. Concernant *T. rangeli*, la prévalence varie de 3.88 à 16.67% (moyenne de 9.43%). Les souches de *T. cruzi* ont été identifiées moléculairement comme appartenant à la lignée TcI plus précisément TcId. Quelques cas d'infection mixte TcI/TcII ont été mis en évidence. L'association probable de *T. cruzi* avec *Cebus cay*, *Alouatta belzebul*, *Didelphis marsupialis*, *Coendou prehensilis* et *Tamandua tetradactyla* ainsi que de *T. rangeli* avec *T. tetradactyla* dans la région sont mise en évidence. Les activités récentes de déforestation tendent à diminuer la diversité spécifique des espèces identifiées comme ressources alimentaires dans les communautés et limitent les populations de vecteurs et de parasites. Cependant, la présence abondante et ubiquiste d'hôtes potentiels et réservoirs de *T. cruzi* tels que *T. tetradactyla* représente un risque épidémiologique bien présent.

---

## Introduction

---

*Trypanosoma cruzi* est un kinétoplaste flagellé trouvé uniquement sur le continent américain où il parasite des mammifères sauvages depuis des millions d'années. La Maladie de Chagas ou Trypanosomiase américaine causée par *T. cruzi* chez les humains est une des maladies parasitaires les plus importantes en Amérique Latine (Miles *et al.*, 2003; Coura *et al.*, 2007). La transmission de *T. cruzi* se fait principalement par le contact avec les déjections contaminées des insectes vecteurs (Triatomines). L'épidémiologie de la Maladie de Chagas représente un défi car la transmission sylvatique du cycle sauvage se passe dans un réseau trophique complexe qui inclut plusieurs espèces de mammifères (Briones *et al.*, 1999). La diversité de scénari écologiques dans lequel la maladie de Chagas existe reflète la polyvalence de *T. cruzi* et à quel point son épidémiologie très complexe doit être clarifiée (Roque *et al.*, 2008). Cette complexité est illustrée par la situation actuelle en Amazonie où à ce jour, plus de 40 espèces incluant marsupiaux, édentés, rongeurs, carnivores, primates et chauves souris sont considérées comme hôtes capables de maintenir le cycle enzootique de *T. cruzi* (Coura *et al.*, 2002; Marcili *et al.*, 2009).

L'analyse de variabilité de *T. cruzi* à l'aide d'électrophorèse d'enzymes multilocus (MLEE) a démontré que la plupart des isolats amazoniens de *T. cruzi* appartiennent à une subdivision spécifique de *T. cruzi*: TcI. La sous division TcI se distingue de la deuxième lignée principale TcII (Brisse *et al.*, 2001; Anonyme, 1999), qui est la plus commune dans des zones traditionnelles d'endémie de la Maladie de Chagas au Brésil (Miles *et al.*, 1978, 1981). Plus tard, des sous-divisions ont été identifiées au sein de Tc II: TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId, TcIIe renommées TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI (Zingales *et al.*, 2009). Le groupe TcI est assez diversifié et très répandu, il est principalement associé aux cycles de transmissions sylvatiques et est l'agent principal des cas de Chagas des zones endémiques au Nord de l'Amazonie, au Venezuela et en Colombie. Les groupes TcII, TcV et TcIV sont moins diversifiés du point de vue génétique et sont pratiquement trouvés uniquement dans les cycles domestiques des régions les plus au sud de l'Amérique du Sud. La souche TcIII est géographiquement assez répandue et possède un cycle sylvatique terrestre principalement associé aux espèces de tatous (*Dasyppus spp*). TcVI est assez peu étudiée mais possède des génotypes divergents au sud et au nord du continent. TcIII et TcIV sont principalement associés aux cycles terrestres mais tous les deux sont capables de provoquer des infections

humaines lorsqu'ils interfèrent avec les cycles domestiques et sont considérés comme des lignées dérivées d'hybrides de TcI et TcII (Westenberg *et al.*, 2005).

L'hypothèse de diversification des souches de Trypanosomes est mise en relation avec l'association aux hôtes mammifères principalement avec les marsupiaux et les xénarthres primitifs lorsque le continent américain s'est séparé des autres terres (65 millions d'années). TCI est supposé d'avoir évolué avec les marsupiaux et TCII en association avec des mammifères terrestres (Miles *et al.*, 1981a, Gaunt & Miles, 2000; Yeo *et al.*, 2005). Dans ce travail, les hôtes et les souches de *Trypanosoma cruzi* et de *T rangeli* dans le cycle sylvatique impliquant *Rhodnius robustus* et *Attalea spp* dans la région du Tapajós sont identifiés ainsi que leur variabilité moléculaire à l'aide de plusieurs marqueurs moléculaires.

---

## Matériel et méthodes

---

### Détection des sources d'alimentation des insectes

Afin d'identifier les hôtes sur lesquels les triatomes se sont nourris, les ADN extraits du contenu du tube digestif ainsi que l'ADN entier des stades L3, L2, L1 ont été soumis à l'amplification du gène *cytochrome b* à l'aide d'amorces spécifiques aux vertébrés: L148415'AAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA3' et H151495'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3', (Kocher *et al.*, 1989).

Les amplifications ont été réalisées dans un volume total de 25µl contenant 5µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µL dNTP (10 µL chacun), 1µl de chaque amorce (10µM), 1U de GoTaq DNA polymérase (Promega) et 2,5µl d'ADN (25ng). Les conditions PCR sont décrites dans la table 2.2.

Après visualisation des produits PCR sur gel d'agarose et séquençage (voir 2.14), les séquences obtenues ont été comparées avec des séquences de références déposées sur GenBank avec le programme BLAST (*Basic local alignment search tool*) afin d'identifier les espèces d'hôtes ou les espèces les plus apparentées.

### Indices de diversité

L'indice de biodiversité (indice de Shannon,  $H_s$ ) pour les sources alimentaires identifiées a été calculé selon la formule:

$$H_s(p) = - \sum_{k=1}^s p_k * \ln(p_k)$$

où  $p_k$  est la fréquence de l'hôte au sein d'un habitat, calculé pour tous les hôtes (i) au sein de chaque communauté et unité de paysage (Shannon, 1948 ; Shannon & Weaver, 1963). Cet indice peut varier de 0 à 1, il est maximal quand les espèces ont des abondances identiques dans le peuplement et il est minimal quand une seule espèce domine tout le peuplement.

L'indice de Gini-Simpson ( $H_{S-G}$ ) a également été calculé

$$H_{G-S}(p) = 1 - \sum_{k=1}^s p_k^2$$

où  $p_k$  est la fréquence de l'hôte. Sa valeur peut être interprétée comme la probabilité qu'une paire d'espèces choisie au hasard soit de deux espèces différentes (Gini, 1912; Simpson, 1949). L'indice de Gini-Simpson donne moins d'importance aux espèces rares. Il comptabilise les interactions possibles entre paires d'individus : les espèces rares interviennent dans peu de paires, et influent peu sur l'indice. En conséquence, le biais d'échantillonnage est très petit (Marcon, 2011).

### Détection moléculaire de *Trypanosoma cruzi* et de *T. rangeli*

La détection moléculaire de l'infection par *T. cruzi* a été effectuée en utilisant comme marqueur une région inter-génique du gène mini-exon (Souto *et al.*, 1996). Le fragment amplifié est de 350pb pour les isolats de *T. cruzi* TcI et 300pb pour *T. cruzi* TcII, selon la classification ancienne du parasite (Anonyme, 1999). Trois amorces ont été utilisées TCI - 5'- CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3' (spécifique pour *T. cruzi* I, Anonyme, 1999), TC2 - 5'- GTG TCC GCC ACC TCC TCC GGC CC-3' (spécifique pour *T. cruzi* II, Anonyme, 1999) et TC - 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3' (commun aux deux groupes) (Souto *et al.*, 1996).

Pour *Trypanosoma rangeli*, l'identification moléculaire s'est faite à partir de l'amplification d'un fragment de 620 bp d'un gène répétitif d'ARN nucléaire C11 (sno-RNA-C11) qui amplifie un fragment de 620 bp (Morales *et al.*, 2002; Pavia *et al.*, 2007). Les amorces TrF (5'-CGCCCCGTCTTGCCCTGT-3') e TrR2 (5'- CGCAGCAAGGACAG GAGGGA-3') ont été utilisées.

### **Variabilité de *T. cruzi***

Il a été démontré que *T. cruzi* est essentiellement constitué de six unités distinctes (DTUs, Discrete Typing Unit) TcI, TcIIa (TcII), TcIIb (TcIII), TcIIc (TcIV), TcIIId (TcV), and TcIIe (TcVI) (Brisse *et al.*, 2001) ayant chacune différents aspects épidémiologiques et évolutifs (Lewis *et al.*, 2009). La variabilité des différentes souches de *Trypanosoma cruzi* a été évaluée à l'aide de différents marqueurs situés sur des génomes différents. Chez les kinétoplastes, il existe un génome d'origine bactérienne (kinétoplaste) qui contient une grande quantité d'ADN extra nucléaire ou kDNA. Le kDN est organisé en réseaux de molécules d'ADN circulaires de deux types, des structures maxicercles qui contiennent les gènes codant les enzymes nécessaires à la respiration oxydative et les minicercles impliqués dans les phénomènes d'édition permettant d'exprimer les transcrits des maxicercles. Les mini-cercles présentent une grande variabilité génétique et semblent impliqués dans la pathogénicité de *T. cruzi*.

Quatre marqueurs ont été utilisés, un marqueur kinétoplastique, le gène mini-exon (1) (Souto *et al.*, 1996), un marqueur nucléaire non codant, le domaine divergent D7 du locus 24S $\alpha$  rRNA (LSU rDNA) (2), et deux marqueurs nucléaires codants, le gène glucose-6-phosphate (GPI) (3), et le gène hsp60 (Heat Shock Protein, HSP) (4).

La simple visualisation des produits amplifiés avec les marqueurs (1) et (2) sur un gel d'agarose permet de discriminer certaines lignées (TcI/IV et TcIII/V) (Brisse *et al.*, 2001; Kawashita *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2009). Ensuite, la combinaison de l'amplification du LSU rDNA avec deux méthodes de PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) après digestion enzymatique des deux gènes amplifiés (3) et (4) permet de différencier les différents DTU connus selon la séquence méthodologique décrite par (Lewis *et al.*, 2009).

## Reconstitution des topologies phylogénétiques au sein de *T.cruzi*

Les séquences des divers marqueurs de la variabilité de *T.cruzi* obtenues ont ensuite été confrontées à la base de données GenBank via le logiciel BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Dans un deuxième temps des reconstitutions phylogéniques ont été effectuées avec les séquences de références obtenues (Figures 3.2-3.4; Tables 3.7-3.9) à l'aide des logiciels PHYLOGENY (Dereeper *et al.*, 2008) pour les minimum de vraisemblances (ML) et MEGA V5 (Tamura *et al.*, 2011) pour les maximum de parcimonie (MP).

## Résultats

### Sources alimentaires

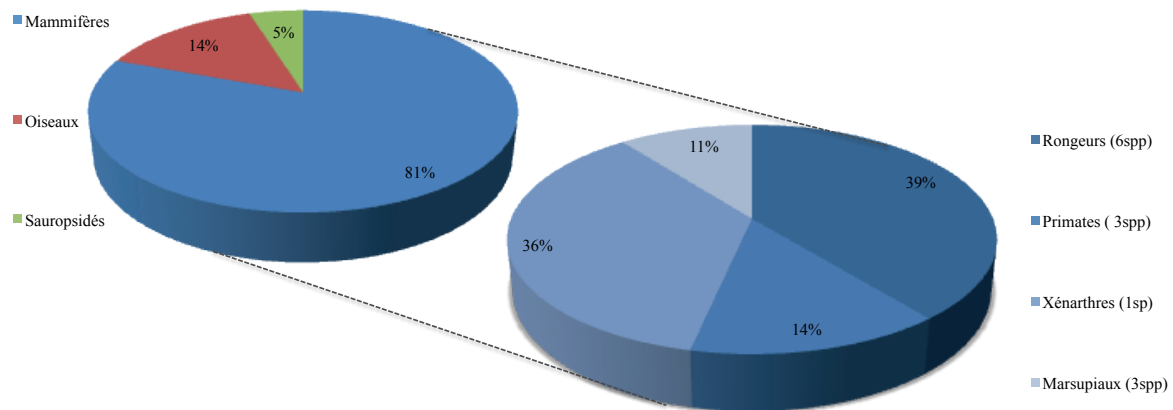
Le contenu digestif de 504 insectes a été soumis à l'amplification d'une partie du gène mitochondrial du *cytochrome b* à l'aide d'amorces spécifiques de vertébrés (Kocher *et al.* 1989). L'identification des sources alimentaires a pu être possible sur 193 insectes (25.74%).

En ce qui concerne les séquences amplifiées mais non valides, 36 % sont dues à des contaminations de laboratoire (*Homo sapiens*, insectes du laboratoire) dont 10 séquences ont été identifiées comme *Rhodnius robustus*. De plus, 4,5 % des séquences ont été identifiées comme *Gallus gallus* ou *Mus musculus*, espèces sur lesquelles les insectes vivants ont été nourris lors de leur transfert au laboratoire. Vingt quatre pour cent des amplifications n'ont pas fonctionné. Les séquences d'*Homo sapiens* obtenues sont ici considérées comme de la contamination de laboratoire car ce sont des populations d'insectes sylvatiques, prélevés dans des palmiers et il apparaît est peu probable que les insectes se soient nourris sur des humains, particulièrement les larves qui ne se dispersent pas en volant et qui représentent 82.91% des contaminations à *H. sapiens* détectées.

En ce qui concerne l'efficacité des l'amplification des séquences du contenu du tube digestif chez les insectes déterminés comme alimentés lors de l'échantillonnage (abdomen gonflé) : 37,6 % des amplifications ont pu être identifiées contre 32,7% chez les insectes considérés comme non alimentés (uniquement restes de sang digéré à l'intérieur de l'abdomen). Pour les insectes vivant nourris au laboratoire sur des poules et des souris, ce chiffre atteint 62%.

Les vertébrés identifiés comme sources alimentaires de *Rhodnius robustus* appartiennent à 20 espèces réparties dans 3 classes (mammifères, oiseaux, sauropsidés)

décrits dans la table 3.1. Sur le nombre total de repas identifiés, 81 % ont été pris sur des mammifères, 14% sur des oiseaux et 5% sur des sauropsidés (Figure 3.1). Les punaises hématophages *Rhodnius robustus* montrent une préférence pour les animaux à sang chaud, particulièrement les mammifères qui sont également les hôtes réservoirs de *Trypanosma cruzi* et *T. rangeli*. Ces mammifères hôtes se diversifient dans la sous-classe des Marsupiaux (3spp.) et celle des placentaires avec trois ordres représentés (Rongeurs, Primates, Xénarthres).



**Figure 3.1.** Proportion des hôtes vertébrés identifiés par l'amplification d'une partie du gène *cytochrome b* chez *Rhodnius robustus* dans les trois communautés.

### Relation espèces, communautés et unités de paysage

Une seule espèce de xénarthre a été identifiée, le *Tamandua tetradactyla* qui représente à lui seul 36.65% des repas pris par les individus de *R. robustus* provenant de 23 palmiers différents et répartis sur les trois communautés. A São Tomé, 61 individus ont été trouvés alimentés de sang de *T. tetradactyla* répartis sur 18 palmiers avec un nombre maximal de 14 individus sur un palmier.

Les rongeurs représentent 39% des sources identifiées et le groupe le plus diversifié (6 espèces) en tant que ressource alimentaire des insectes échantillonnés. Notons qu'à São Tomé cinq espèces ont été identifiées dans le repas des insectes, seule l'espèce *Nectomys squamipes* n'a pas été trouvée. Cette espèce constitue une ressource alimentaire uniquement chez un individu collecté à Nova Estrela. Les deux espèces d'*Oecomys* constituent des sources alimentaires à Nova Estrela et São Tomé mais pas à Araipá. L'espèce *O. roberti* constitue, après le tamandua, l'espèce la plus fréquente en tant que ressource alimentaire. A Araipá, une

seule espèce de rongeur, *Cohendou prehensilis*, a été identifiée dans le repas sanguin de *R. robustus*. Cette espèce constitue la ressource alimentaire la plus souvent identifiée dans le repas sanguin des insectes échantillonnés à Sao Tomé et ce dans 9 palmiers différents mais n'a pas été identifiée dans le repas sanguin des insectes échantillonnés à Nova Estrela.

Concernant les primates, sur les quatre espèces identifiées comme sources alimentaires de *R. robustus*, une seule espèce, *Alouatta belzebul*, le singe hurleur, a été identifiée à partir du contenu intestinal des insectes prélevés dans les trois communautés. Les quatre autres espèces (*Callicebus spp.* et *Cebus spp.*) ont été identifiées comme sources alimentaires des punaises à São Tomé uniquement. Ces espèces de primates, de tailles plus réduites semblent plus sensibles à la fragmentation du couvert forestier.

Concernant la détection des marsupiaux comme sources alimentaires, *Didelphis marsupialis* constitue l'espèce la plus souvent identifiée dans le contenu intestinal des punaises mais est toutefois absente d'Araipá. En fréquence, c'est la troisième principale source alimentaire des individus de *R. robustus*. L'espèce *Philander opossum* a été identifiée uniquement chez un individu de *R. robustus* comme source alimentaire à Araipá, et il en est de même pour *Caluromys philander* à Nova Estrela.

Sur les trois espèces d'oiseaux identifiées dans le contenu digestif des insectes, *Cathartes aura* n'a été détecté qu'une seule fois dans un insecte échantillonné à São Tomé. Les deux autres espèces, *Dendrexastes rufigula* et *Xiphorynchus picu*, sont présentes dans le contenu digestif des insectes échantillonnés dans les trois communautés. Le sang de *Dendrexastes rufigula* a été détecté chez 14 insectes à Araipá répartis dans un seul palmier.

Finalement deux espèces de lézards *Mabuya nigropunctata* et *Mabuya bistratiata* ont été identifiées dans les repas sanguins des insectes échantillonnés pour la première espèce à Araipá et São Tomé et pour la seconde, à Nova Estrela.

Les indices de diversité Shannon et Simpson calculés par communautés (Table 3.1) indiquent tous deux une diversité plus basse à Araipá en comparaison aux deux autres communautés.

	Araipa	Nova Estrela	Sao Tome	Total
Nb de séquences totales	21	41	131	193
Insecte/hôte par palmier (nb de seq)	8	17	62	87
Nb de palmiers	8	9	33	48
Nb d'espèces hôtes identifiées	8	10	16	20
Indice de Shannon	1.29	2.06	2.00	2.27
Indice de Simpson	0.54	0.83	0.76	0.83

**Table 3.1.** Diversité d'hôtes relatives observée par communauté.

En ce qui concerne la répartition des espèces par unité de paysage (Table 3.2.), des espèces les plus détectées comme sources alimentaires, *Tamandua tetradactyla* a été identifiée dans toutes les unités de paysage, en majorité dans les pâturages.

Cinq espèces n'ont été détectées qu'une seule fois, dans les anciennes jachères (*Callicebus moloch*, *Cebus cay* (primates), *Mesomys hispidus*, *Nectomys squamipes* (rongeurs) et *Dendraxestes rufigula* (oiseau), qui représente l'unité de paysage avec la plus grande diversité spécifique. *Mabuya nigropunctata* (sauropsidé) a été détecté uniquement dans les pâturages. Dans la forêt fragmentée, n'ont été détectées que *Lonchotrix emiliae* et la majorité d'*Oecomys roberti* (rongeurs) alors que l'espèce uniquement rencontrée dans les palmeraies était *Cathartes aura* (oiseau). Les indices de diversité/entropie calculés indiquent une diversité élevée dans les anciennes jachères, moyenne dans la forêt et plus basse en forêt fragmentée, palmeraie, jeune jachère et pâturage. On n'observe ici pas de gradient de biodiversité lié au gradient anthropogénique.

Espèce	Nom courant	Forêt		Forêt Fragmentée		Palmeraie		Jachère > 3ans		Jachère <3ans		Pâturage		Total	
		nb de repas identifiés	nb de palmiers	nb de repas identifiés	nb de palmiers	nb de repas identifiés	nb de palmiers	nb de repas identifiés	nb de palmiers	nb de repas identifiés	nb de palmiers	nb de repas identifiés	nb de palmiers	nb de repas identifiés	nb de palmiers
<i>Alouatta belzebul</i>	Singe hurleur	2	2	2	2	0	0	4	4	1	1	0	0	9 (1)	9
<i>Callicebus moloch</i>	Titi Gris	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2 (1)	2
<i>Cebus apella</i>	Sapajou de Guyanne	5	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	6 (3)	5
<i>Cebus cay</i>	Sapajou du Paraguay	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2 (1)	2
<i>Caluromys philander</i>	Opossum laineux	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Didelphis marsupialis</i>	Opossum commun	1	1	0	0	0	0	6	2	1	1	4	1	12 (5)	5
<i>Philander opossum</i>	Opossum gris à quatre yeux	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Coendu prehensilis</i>	Porc-épic brésilien	7	3	1	1	4	1	2	1	1	1	1	1	16 (3)	10
<i>Lonchothrix emiliae</i>	Rat épineux arboricole	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Mesomys hispidus</i>	Rat épineux arboricole sombre	0	0	0	0	0	0	8	1	0	0	0	0	8 (8)	1
<i>Nectomys squamipes</i>	Rat aquatique d'amérique du sud	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Oecomys bicolor</i>	Rat arboréal bicolore	2	1	2	1	3	1	0	0	0	0	2	2	9 (2)	6
<i>Oecomys roberti</i>	Rat arboréal de Robert	2	2	12	1	0	0	0	0	0	0	7	2	21 (13)	5
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamandou à quatre doigst	17	7	2	2	12	2	6	2	1	1	32	5	70 (14)	22
<i>Cathartes aura</i>	Urubu à tête rouge	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Dendrexetastes rufigula</i>	Grimpar à collier	15	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	17 (14)	4
<i>Xiphorhynchus picus</i>	Grimpar talapiot	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	3	1	6 (4)	3
<i>Mabuya bistrata</i>	Lézard bistré de mabuya	0	0	0	0	0	0	3	3	1	1	3	3	6 (2)	8
<i>Mabuya nigropunctata</i>	Lézard à points noir	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

**Table 3.2.** Identification des sources alimentaires de *Rhodnius robustus* au Tapajós. Répartition par communauté et par unité de paysage des repas identifiés pris sur les hôtes. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre maximal de repas identifiés pour un hôte dans un seul palmier.

Note: repas = nombre de repas identifiés, palmiers = nombre de palmiers où l'hôte a été identifié

	Forêt						Total
	Forêt	Fragmentée	Palmeraie	Jachère>3ans	Jachère<3ans	Pâturage	
Nb de séquences totales	51	22	21	40	6	43	193
Insecte/hôte par palmier (nb de seq)	22	8	11	25	6	15	87
Nb de palmiers	13	4	5	12	4	10	48
Nb d'espèces hôtes identifiées	8	6	5	15	6	7	20
Indice de Shannon	1.68	1.48	1.20	2.47	1.79	1.32	2.27
Indice de Simpson	0.77	0.67	0.61	0.89	0.83	0.6	0.83

**Table 3.3.** Diversité d’hôtes relatives observée par unité de paysage.

### Diversité des hôtes par palmier

Parmi les 48 palmiers dans lesquels les hôtes de *Rhodnius robustus* ont pu être identifiés, 24 ont été identifiés hébergeant plus d’un hôte (Table 3.4) dont 12 palmiers (23.91%) avec au moins deux hôtes, 8 (17.34%) avec au moins 3 hôtes et 4 palmiers (8.69%) avec au moins 4 hôtes. Parmi les palmiers avec au moins 3 et 4 hôtes, 100 % avaient au moins deux espèces de mammifères. En ce qui concerne les palmiers avec plus de 2 hôtes 100 % hébergeaient au moins une espèce de mammifères et parmi ceux à un seul hôte, 83 % (20/24) 1 mammifère dont 50 % *Tamandua tetradactyla*.

Diversité d'hôtes	Nb de palmier	Par communauté			Par unité de paysage					
		Araipa	Nova Estrela	Sao Tome	Forêt	Forêt Fragmentée	Palmeraie	Jachère >3	Jachère <3	Pâturage
1	24	4	4	16	8	1	1	6	2	6
2	12	2	2	8	2	2	2	1	2	3
3	8	0	2	6	1	1	2	3	0	1
4	4	0	1	3	2	0	0	2	0	0

**Table 3.4.** Diversité d’hôtes par palmier, par communauté et par unité de paysage.

### Détection de *T. cruzi*

Tous les insectes ont été soumis à la détection par PCR de *T. cruzi* (Souto *et al.*, 2006) et *T. rangeli* (Pavia *et al.*, 2007). Sur les 743 insectes, 123 (16.55%) ont été trouvés infectés par *T. cruzi*, 69 (9.29%) par *T. rangeli* et 14 (1.88%) présentaient une double infection.

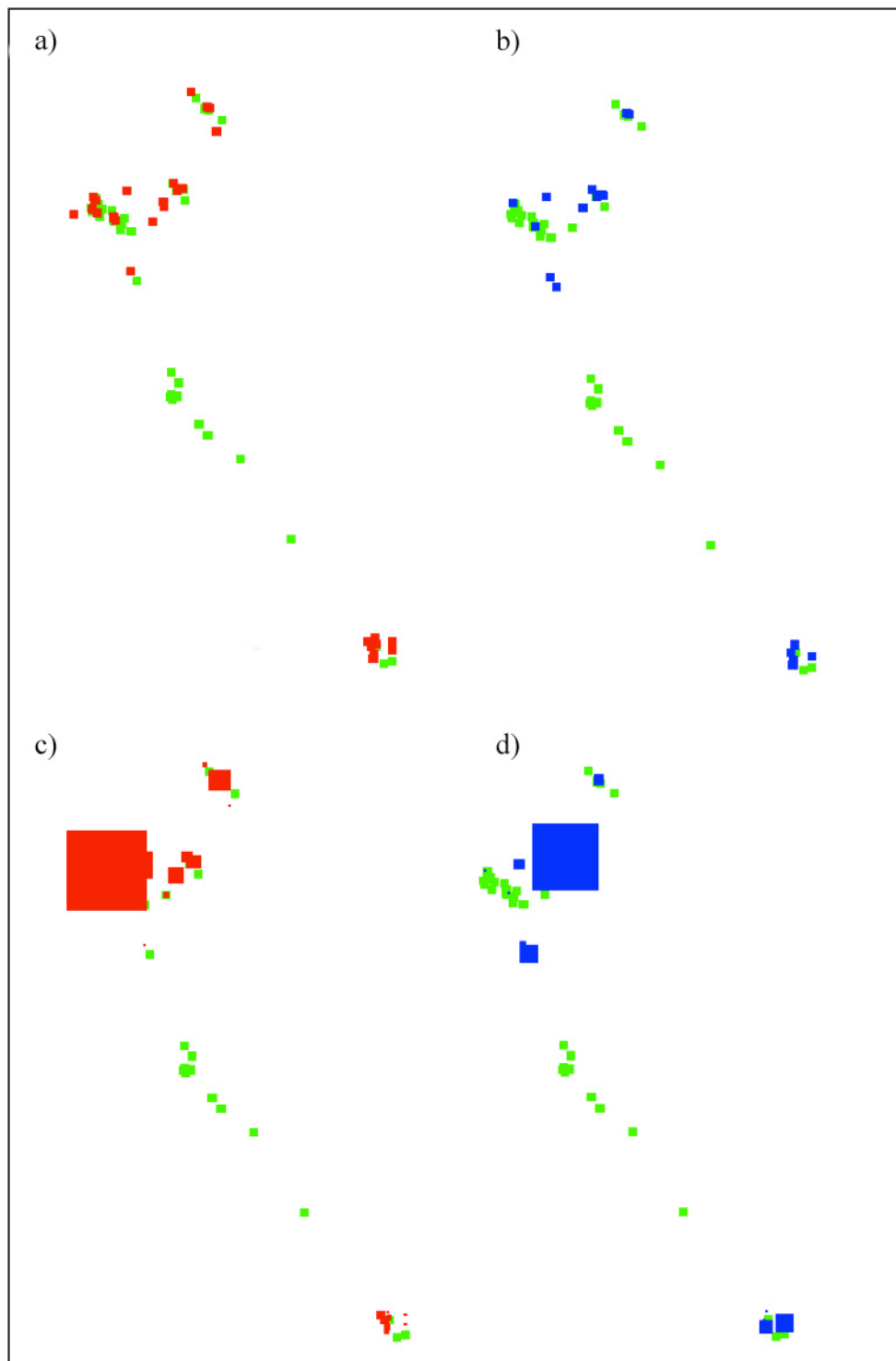
L'identification morphologique des parasites des individus ayant survécu au terrain et au transport a été effectuée au laboratoire. Sur 96 (12.94%) insectes examinés, 20 ont été détectés positifs à un trypanosome, l'identification morphologique ne permettant pas de distinguer de façon formelle *T. cruzi* et *T. rangeli*.

Les 123 insectes infectés par *T. cruzi* ont été trouvés dans 31 (23.31%) palmiers différents dont 22 à São Tomé (30.14 % des palmiers échantillonnés à Sao Tomé) et 9 à Nova Estrela (36% des palmiers échantillonnés à Nova Estrela), aucun insecte infecté n'a été trouvé à Araipá (Table 3.3.). Les insectes infectés ont été trouvés dans toutes les unités de paysage (Table 3.4.). La densité d'insectes infectés par palmier varie de 0 à 30 avec une moyenne de  $3.97 \pm 0.98$  par palmier positif et de  $0.92 \pm 0.27$  par palmier disséqué. Les ratios d'insectes infectés par rapport au nombre d'insectes total par palmier varie de 0.2 à 1 avec une moyenne de  $0.42 \pm 0.06$  pour tous les palmiers positifs.

La valeur de 30 insectes par palmier est une valeur extrême et a été rencontrée dans un spécimen d'*Attalea speciosa* de São Tomé (STBA02\_FB09) localisé dans une ancienne jachère avec au total 37 insectes dont 7 non infectés. Dans ce palmier, 4 repas sanguins ont été identifiés sur trois mammifères (*Didelphis marsupialis*, *Cebus Cay* et *Coendou prehensilis*). De manière générale le pourcentage de palmiers avec des triatomes infectés variait de 22 à 32 % dans toutes les unités de paysage, à l'exception des palmiers situés dans les jeunes jachères où ce pourcentage est seulement de 8%. Le nombre d'insectes infectés par unité de paysage variait de 3-4 insectes (palmeraies et forêts fragmentées) à 42 (anciennes jachères). Cependant aucune différence significative n'a été détectée pour l'occurrence de l'infection à *Trypanosoma cruzi* ni la densité d'insectes infectés par unité de paysage (test de Kruskal-Wallis 4.08, pvalue = 0.54). Du fait de la haute densité d'insectes infectés dans certains palmiers, nous pouvons identifier deux foyers à risque de transmission de *T. cruzi* (fig 3.4), à Sao Tomé et à Nova Estrela, communautés géographiquement séparées de celle d'Araipá où aucune infection n'a été détectée.

<i>Trypanosoma cruzi</i>														
Paysage	Forêt		Forêt fragmentée		Palmeraie		Jachère>3ans		Jachère<3ans		Pâturage		Total	
	nb palmier	nb insectes infectés	nb palmier	nb insectes infectés	nb palmier	nb insectes infectés	nb palmier	nb insectes infectés	nb palmier	nb insectes infectés	nb palmier	nb insectes infectés	nb palmier	nb insectes infectés
Araipa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nova Estrela	0	0	2	4	0	0	4	7	0	0	3	5	9	16
Sao Tome	6	30	0	0	2	3	4	35	2	20	8	19	22	107
Total N(%)	6 (31.5)	30 (14.56)	2(22.2)	4 (5.71)	2(28.57)	3 (4.83)	8(28.57)	42 (28)	2(8.33)	20 (37.73)	11(22.92)	14 (6.96)	31 (23.31)	123 (16.57)
<i>Trypanosoma rangeli</i>														
Araipa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nova Estrela	0	0	1	7	0	0	3	7	0	0	1	1	5	15
Sao Tome	3	8	0	0	1	7	2	2	1	4	5	34	12	55
Total	3 (15.79%)	8(3.88)	1 (11.11%)	7(10)	1 (14.28%)	7 (9.72)	5 (71.43%)	9 (6)	1(4.17%)	4 (7.54)	6 (12.5%)	35 (16.67)	17 (12.78%)	70 (9.43)
	Totaux													
Palmiers/Insectes	19	206	9	70	7	62	28	150	24	53	48	210	133	742

**Table 3.5.** Localisation de *Rhodnius robustus* infectés par *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma rangeli* dans les différentes communautés et unités de paysage.



**Figure 3.4.** Répartition spatiale des foyers d'infection par *T. cruzi* et *T. rangeli*. ■ Palmiers *Attalea* avec *Rhodnius robustus* non infectés ■ Palmiers avec *Rhodnius robustus* infectés par *T. cruzi* ■ Palmiers avec *Rhodnius robustus* infectés par *T. rangeli*. Les carrés sont proportionnels à la densité d'insectes infectés (c et d).

### Variabilité de *T. cruzi*

L'examen de l'ADN de *T. cruzi* selon la séquence méthodologique décrite par Lewis *et al.* 2009 a été effectuée sur 39 individus, soit au moins un individu par palmier identifié comme hébergeant des insectes infectés.

Au niveau de l'amplification du gène mini exon (SL-RNA) et de la visualisation par électrophorèse tous les individus ont démontré une bande unique à 350 pb, les identifiant comme appartenant à la DTU TcI (Table 3.6). L'analyse des fragments de restriction obtenus après digestion par *HhaI* du fragment amplifié GPI, a donné deux bandes (817-447) confirmant l'appartenance à la DTU TcI. L'analyse des fragments de restriction obtenus après digestion par *EcoRV* du fragment amplifié HSP60 a également donné deux bandes, ne permettant pas de discriminer TcI, TcII ou d'autres DTU (voir matériel et méthodes: Table 2.1). L'analyse du fragment du LSU rDNA a présenté un patron hétérogène, certains individus démontrant des doubles bandes plus faibles, indiquant une possible infection mixte par les deux souches TcI et TcIIa (TcII) (110-177). En résumé, les souches de *Trypanosma cruzi* identifiées dans la région appartiennent à deux sous-groupes: 31 isolats ont été identifiés comme TcI parmi lesquels 10 individus ont démontré une double infection à TcI et TcII.

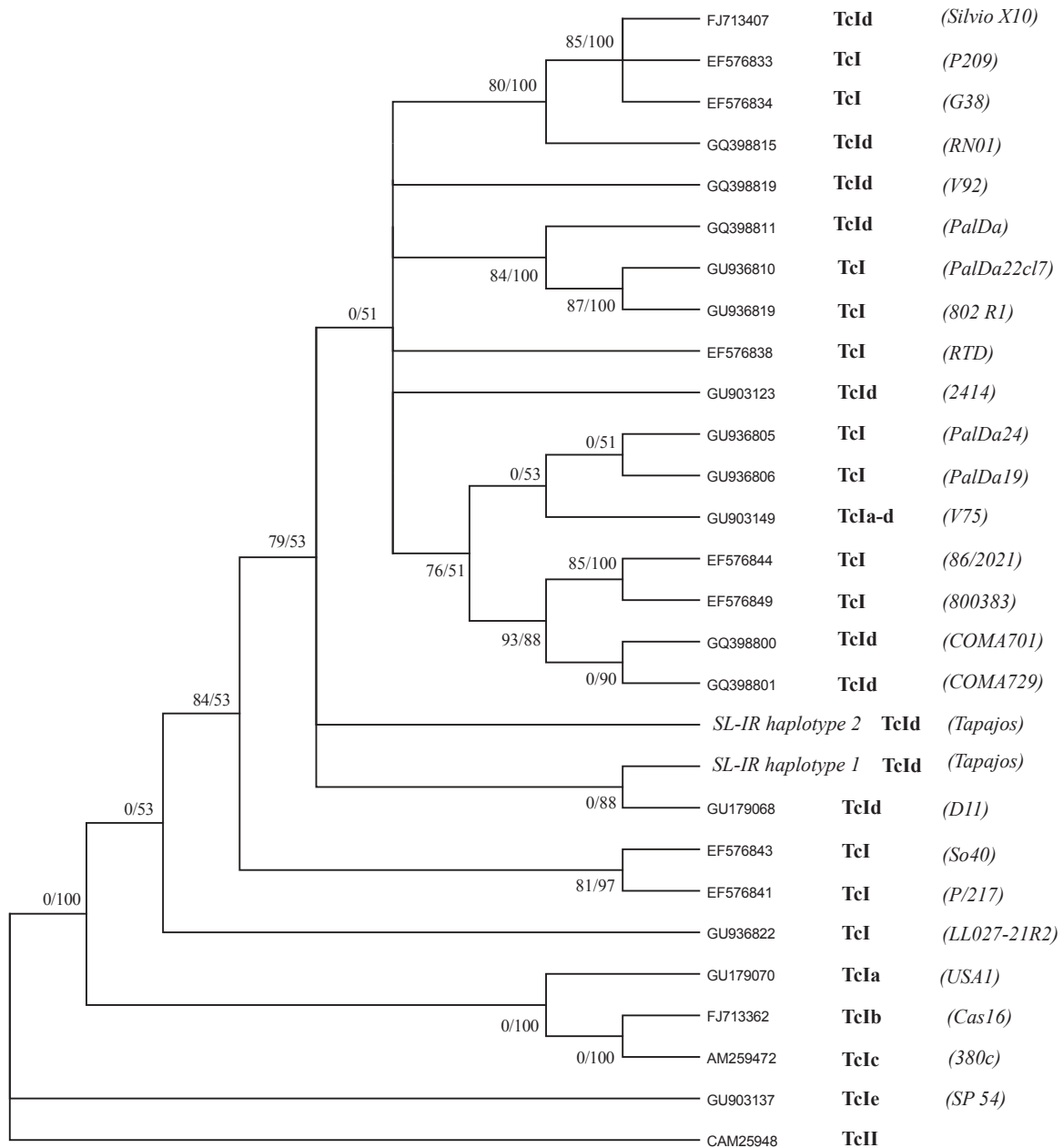
Isolat (insecte ID)	DTU	mini_exon		GPI		HSP60		D7 - 24 $\alpha$ LSU rDNA Taille du/des fragment(s)	Palmier	Hôtes identifiés
		Taille du fragment (n=2)	Haploty e (n=2)	Taille des fragments	Haploty e (n=2)	Taille des fragments	Haploty e (n=11)			
23	I-II-?	350	1	817-447	1	432-462	4	<b>110-117-120</b>	NEUR01_MQ08	( <i>T.tetradactyla</i> ) ( <i>A.belzebul</i> ) ( <i>O.bicolor</i> ) ( <i>T.tetradactyla</i> ) ( <i>Caluromys philander</i> ) ( <i>Dendrexetastes rufigula</i> ) ( <i>Xiphorhynchus picus</i> ) ( <i>Mabuya bistrata</i> )
44	I-II	350	1	817-447	na	432-462	1	110-117	NEUR03_MQ08	( <i>Xiphorhynchus picus</i> ) ( <i>A. belzebul</i> ) ( <i>O. roberti</i> ) ( <i>Tetradactyla</i> ) ( <i>O. roberti</i> )
106	I-II	350	1	817-447	na	432-462	1	110-117	NEBA05_MQ08	( <i>Xiphorhynchus picus</i> )
111	I	350	1	817-447	na	432-462	2	110	NEUR06_MQ08	( <i>A. belzebul</i> ) ( <i>O. roberti</i> )
215	I	350	1	817-447	1	432-462	3	117	STUR14_MQ08	( <i>T.tetradactyla</i> ) ( <i>O. roberti</i> )
358	I	350	1	817-447	na	432-462	5	117	NEUR01_FB08	<b>D.marsupialis</b> ( <i>A. belzebul</i> ) ( <i>N.squamipes</i> )
367	I-II	350	1	817-447	1	432-462	1	110-117	NEUR03_FB08	( <i>T.tetradactyla</i> )
370	I	350	na	817-447	na	432-462	2	110	NEUR04_FB08	( <i>Alouatta belzebul</i> )
371	I	350	1	817-447	1	432-462	2	110	NEUR05_FB08	<b>Mabuya bistrata</b>
379	I-II	350	1	817-447	2	432-462	2	110-117	STIN01_FB08	<b>Callicebus moloch</b> ( <i>Cebus cay</i> )
396	I-II	350	1	817-447	na	432-462	2	110-117	NEUR04_FB08	( <i>A. belzebul</i> ) ( <i>T.tetradactyla</i> )
402	I-II	350	1	817-447	1	432-462	2	110-117	STBA04_FB08	( <i>Callicebus personatus</i> )
409	I-II	350	1	817-447	2	432-462	1	110-117	STBA05_FB08	( <i>C. apella</i> )
423	I	350	1	817-447	1	432-462	2	117	STBA06_FB08	( <i>C. apella</i> ) ( <i>O. roberti</i> ) ( <i>Dendrexetastes rufigula</i> )
451	I	350	1	817-447	1	432-462	6	110	STBA08_FB08	<b>Alouatta belzebul</b> ( <i>Cebus apella</i> ) ( <i>Mesomys hispidus</i> )
526	I	350	1	817-447	1	432-462	7	110	STBA02_FB09	( <i>Coendou prehensilis</i> ) ( <i>Cebus Cay</i> )
529	I	350	1	817-447	1	432-462	7	110	STBA08_FB09	( <i>Coendou prehensilis</i> ) ( <i>Didelphis marsupialis</i> )
540	I-II	350	1	817-447	2	432-462	2	110-117	STBA04_FB09	( <i>Alouatta belzebul</i> ) ( <i>Mabuya bistrata</i> )
547	I-II	350	1	817-447	2	432-462	2	110-117	STBA05_FB09	na
549	I	350	na	817-447	1	432-462	na	na	STBA07_FB09	na
560	I	350	1	817-447	1	432-462	7	110	STBA08_FB09	( <i>Alouatta belzebul</i> )
561	I	350	1	817-447	1	432-462	7	110		
588	I	350	1	817-447	1	432-462	8	110	STIN04_FB09	( <i>T.tetradactyla</i> )
590	I	350	1	817-447	1	432-462	9	110	STIN05_FB09	( <i>T.tetradactyla</i> )
613	I	350	1	817-447	1	432-462	7	110	STIN06_FB09	( <i>T.tetradactyla</i> )
649	I	350	1	817-447	2	432-462	1	110	STUR01_FB09	( <i>T.tetradactyla</i> ) ( <i>M. bistrata</i> )
690	I	350	1	817-447	2	432-462	10	110	STUR04_FB09	( <i>T.tetradactyla</i> ) ( <i>D.marsupialis</i> )
704	I	350	1	817-447	2	432-462	10	110		
709	I	350	1	817-447	2	432-462	na	110	STUR05_FB09	na
801	I	350	2	817-447	2	432-462	2	110	STUR06_MQ09	na
802	I	350	na	817-447	2	432-462	11	110	STUR08_MQ09	<b>Didelphis marsupialis</b>

**Table 3.6.** Description des échantillons de *T. cruzi* caractérisés par digestion enzymatique et électrophorèse (taille du fragment et/ou nombre de bandes), et par séquençage (haplotype) des différents fragments (mini-exon SL, GPI, HSP60, D724 $\alpha$ -LSU rDNA). DTU = Discrete Typing Units, selon les résultats de la méthodologie décrite par Lewis *et al.*, 2009.

L'analyse des séquences mini exon (SL-RNA), GPI, HSP60 a révélé plusieurs haplotypes au sein de chaque marqueur (Table 3.6). Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences disponibles sur GenBank par BLAST et les arbres obtenus par maximum de parcimonie (MP) et minimum de vraisemblance (minimum likelihood: ML) sont montrés dans les figures 3.2 à 3.4 Les résultats sont présentés par marqueur.

La topologie des séquences de mini exon (SL-RNA) (fig.3.2) démontre que les souches identifiées (2 haplotypes) au Tapajós se groupent avec les individus identifiés comme TcId par Cura *et al.*, 2010. Les séquences de références utilisées pour la reconstruction sont décrites dans la table 3.7.

La séquence la plus proche des deux haplotypes (souche *D11*) correspond à une souche isolée à partir d'un opossum (*Didelphis spp*) en région amazonienne, c'est également la séquence avec le plus grand pourcentage d'homologies (248/250 pb, 98%) lors du BLAST.

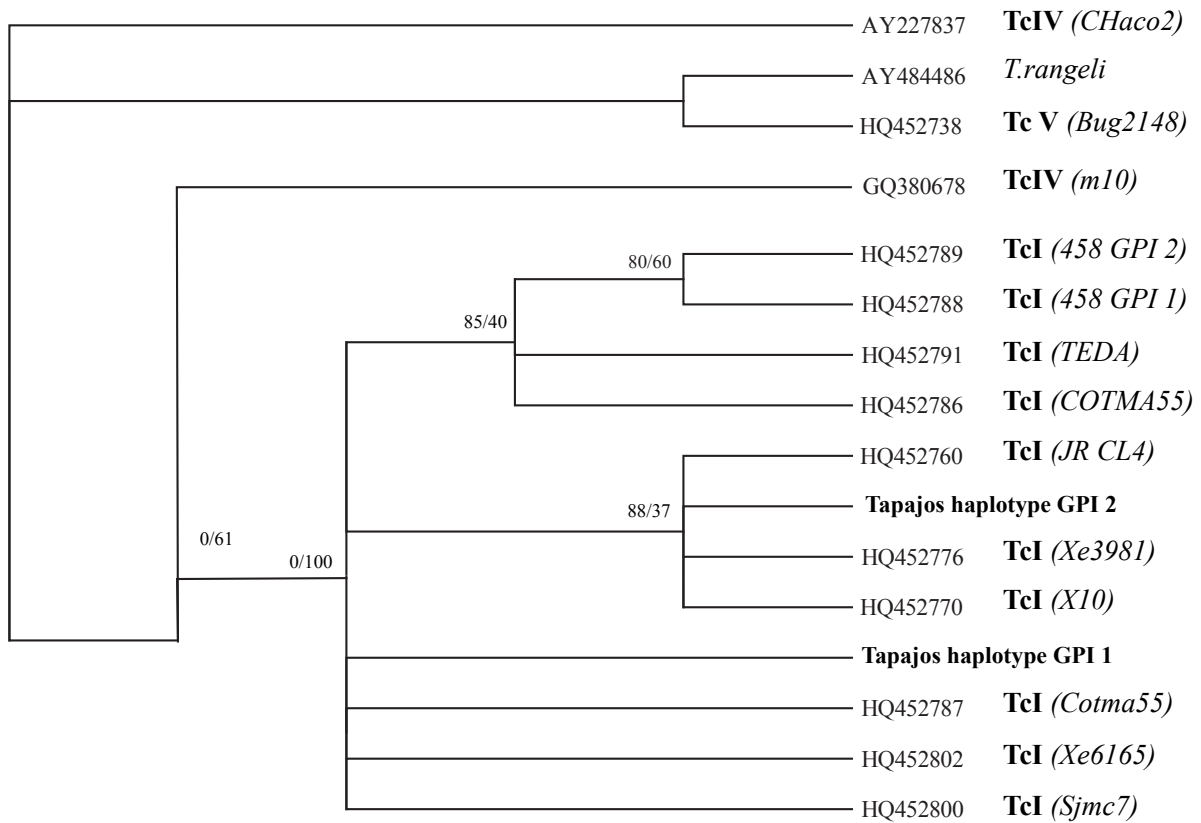


**Figure 3.2.** Reconstructions phylogéniques de *T. cruzi* avec le marqueur mini exon SL. Les valeurs obtenues par minimum de vraisemblance (ML) et maximum de parcimonie (MP) sont indiquées aux embranchements ML/MP. Les codes entre parenthèses représentent les souches de références GenBank identifiées dans la table 3.7.

Marqueur	DTU	Souche	Origine géographique	Origine biologique	GenBank ref.	Référence
	Tc I	P/209c11	Bolivie	<i>Homo sapiens</i>	EF576818	O'Connor <i>et al.</i> 2007
	Tc I	G38	Brésil	<i>Didelphis marsupialis</i>	EF576833	O'Connor <i>et al.</i> 2007
	Tc I	RTD	Colombie	<i>Didelphis marsupialis</i>	EF576838	O'Connor <i>et al.</i> 2007
	Tc I	P/217	Bolivie	<i>Homo sapiens</i>	EF576841	O'Connor <i>et al.</i> 2007
	Tc I	S040	Bolivie	<i>Triatoma infestans</i>	EF576843	O'Connor <i>et al.</i> 2007
	Tc I	86/2021	Bolivie	<i>Didelphis marsupialis</i>	EF576844	O'Connor <i>et al.</i> 2007
	Tc I	800383	Mexique	<i>Triatoma pallidipennis</i>	EF576849	O'Connor <i>et al.</i> 2007
	Tc Id	COMA 701	Argentine	<i>Didelphis albiventris</i>	GQ398800	Cura <i>et al.</i> 2010
	Tc Id	COMA 729	Argentine	<i>Didelphis albiventris</i>	GQ398801	Cura <i>et al.</i> 2010
SL_IR mini exon	Tci D	PalDa	Brésil	<i>Didelphis albiventris</i>	GQ398811	Cura <i>et al.</i> 2010
	Tc Id	RN01	Brésil	<i>Rhodnius nasutus</i>	GQ398815	Cura <i>et al.</i> 2010
	Tc Id	V92	Grand Chaco	<i>Triatoma infestans</i>	GQ398819	Cura <i>et al.</i> 2010
	Tc Id	D11	Amazonie	<i>Dideplhis spp.</i>	GU179068	Cura <i>et al.</i> 2010
	Tc I d	2414	Venezuela	<i>Homo sapiens</i>	GU903123	Cura <i>et al.</i> 2010
	TcIa +TcId	V75 Cl2	Grand Chaco	<i>Triatoma infestans</i>	GU903149	Cura <i>et al.</i> 2010
	TcId	Silvio X10	Brésil	<i>Homo sapiens</i>	FJ713407	Cura <i>et al.</i> 2010
	TcIa	USA1	USA	non défini	GU179070	Cura <i>et al.</i> 2010
	TcIe	SP54	Argentine	<i>Mepraia spinolai</i>	GU903137	Cura <i>et al.</i> 2010
	Tc I	PalDa24	Chaco	<i>Dideplhis albiventris</i>	GU936805	Tomasini <i>et al.</i> 2011
Tc I	PalDa24	Chaco	<i>Dideplhis albiventris</i>	GU936805	Tomasini <i>et al.</i> 2011	
Tc I	802-R1	Chaco T .infestan	<i>Triatoma infestans</i>	GU936819	Tomasini <i>et al.</i> 2011	

**Table 3.7.** Séquences mini exon SL de références utilisées pour les reconstructions phylogéniques de *T. cruzi* identifié chez *Rhodnius robustus* au Tapajós.

La topologie des séquences GPI démontre également les 2 haplotypes au sein de TcI. L'haplotype 1 groupe avec les souches *Cotma 55*, *Xe6165*, *Sjmc* qui sont toutes isolées à partir d'animaux sauvages du Brésil et de Bolivie. Tandis que l'haplotype 2 se groupe avec *JRCL4*, *Xe3981* et *X10*. *JRCL4 X10*, souches isolées à partir d'humains au Venezuela et au Brésil. Aucune distinction entre les sous groupes TcI à l'aide des marqueurs GPI n'a été faite dans la littérature. Cependant *X10* correspond à la souche de référence *Sylvio X10*, caractérisée dans le sous groupe TcId avec le marqueur mini exon (fig 3.2).

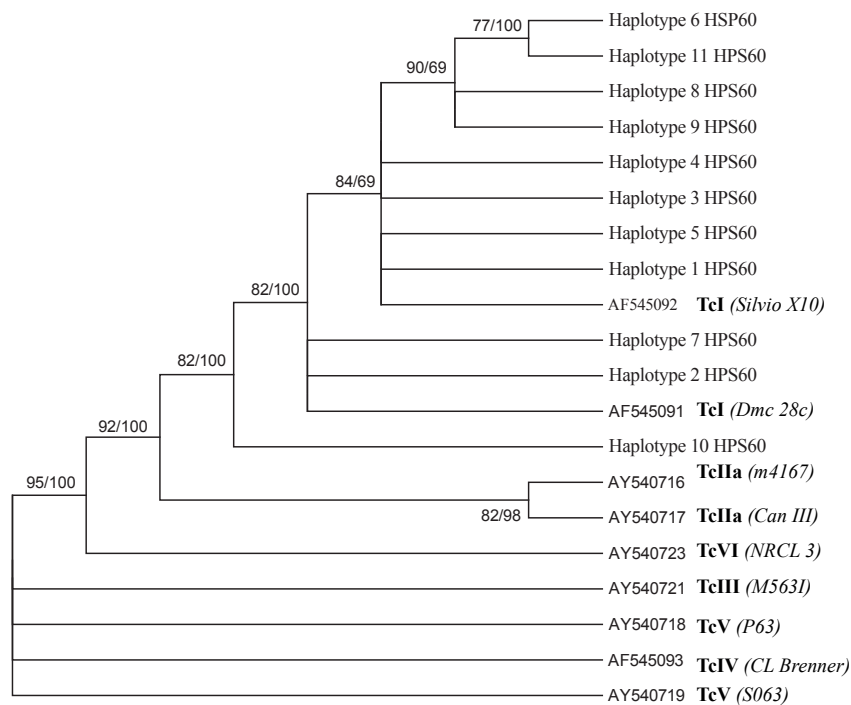


**Figure 3.3.** Reconstructions phylogéniques de *T. cruzi* avec le marqueur GPI. Les valeurs obtenues par minimum de vraisemblance (ML) et maximum de parcimonie (MP) sont indiquées aux embranchements ML/MP. Les codes entre parenthèses représentent les souches de références GenBank identifiées dans la table 3.8.

Marqueur	DTU	Souche	Origine géographique	Origine biologique	GenBank ref.	Référence
	outgroup	rangeli	RGB	OUTGROUP <i>T. rangeli</i>	AY484486	Broutin <i>et al.</i> 2006
	TcIV	Chaco2		OUTGROUP TcIV	AY227837	Gaunt <i>et al.</i> 2003
	TcV	Bug2148		OUTGROUP TcV	HQ452738	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcV	isolate		OUTGROUP TcV	GQ380678	Llewellyn <i>et al.</i> 2009
GPI	TcI	458 cl1	Colombie	<i>Potos flavus</i> (kinkajou)	HQ452789	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	458 cl2	Colombie	<i>Potos flavus</i> (kinkajou)	HQ452788	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	TEDA	Argentine	<i>Didelphis marsupialis</i>	HQ452791	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	COTMA55	Bolivie	<i>Phyllotis osilae</i> (rongeur)	HQ452786	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	JR cl4	Venezuela	<i>Homo sapiens</i>	HQ452760	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	Xe3981	Brésil	<i>Didelphis marsupialis</i>	HQ452776	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	X10/1	Brésil	<i>Homo sapiens</i>	HQ452770	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	Xe5165	Brésil	<i>Didelphis marsupialis</i>	HQ452802	Lewis <i>et al.</i> 2011
	TcI	Sjmc7	Brésil	<i>Sciurus spadiceus</i> (écureuil)	HQ452800	Lewis <i>et al.</i> 2011

**Table 3.8.** Séquences GPI de références utilisées pour les reconstructions phylogéniques de *T. cruzi* identifié chez *Rhodnius robustus* au Tapajós.

Finalement la topologie des séquences HSP 60 (Figure 3.4) démontre également le groupement des 11 haplotypes avec les souches TcI: *Dm28c* et *Silvio X10* (Sturm *et al.*, 2003). Peu de séquences sont disponibles pour la comparaison au sein de HSP60 malgré une grande variabilité observée entre nos individus (11 haplotypes pour 31 séquences). Certaines sous-divisions sont assez bien supportées par les valeurs de ML et MP. A nouveau la souche *Silvio X10* est la souche de référence, précédemment identifiée comme TcId à l'aide du marqueur GPI (Cura *et al.*, 2010).



**Figure 3.4.** Reconstructions phylogéniques de *T. cruzi* avec le marqueur HSP60. Les valeurs obtenues par minimum de vraisemblance (ML) et maximum de parcimonie (MP) sont indiquées aux embranchements ML/MP. Les codes entre parenthèses représentent les souches de références GenBank identifiées dans la table 3.9.

Marqueur	DTU	Souche	Origine géographique	Origine biologique	GenBank ref.	Référence
	TcI	Dm28c	Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>	AF545091	Sturm et al. 2003
	TcI	Sylvio X10	Brésil	<i>Homo sapiens</i>	AF545092	Sturm et al. 2003
	TcVI	CL Brenner	Brésil	<i>Triatoma infestans</i>	AF545093	Sturm et al. 2003
HSP60	TcII	m4167	OUTGROUP TcII		AY540716	Westenberger et al.
	TcII	CanIII	OUTGROUP TcII		AY540717	Westenberger et al.
	TcVI	P63	OUTGROUP TcVI		AY540718	Westenberger et al.
	TcV	SO3	OUTGROUP TcV		AY540719	Westenberger et al.
	TcIII	M5631	OUTGROUP TcII		AY540721	Westenberger et al.
	TcVI	NR	OUTGROUP TcVI		AY540723	Westenberger et al.

**Table 3.9.** Séquences HSP60 de références utilisées pour les reconstructions phylogéniques de *T. cruzi* identifié chez *Rhodnius robustus* au Tapajós.

En résumé, les souches identifiées par la méthodologie de Lewis *et al.*, 2009 puis par séquençage appartiennent bien à la souche TcI, plus précisément au sous groupe TcId. La double infection (TcII) détectée par l’analyse du marqueur D7-24  $\alpha$  LSU rDNA (Table 3.6) n’a pas été démontrée par le séquençage des autres marqueurs.

### ***Trypanosma rangeli***

Septante insectes ont été identifiés positifs à l’infection par *Trypanosoma rangeli* dans 17 palmiers situés à Nova Estrela (5) et à São Tomé (12) grâce à l’amplification du marqueur sno-RNA-C11 (Morales *et al.*, 2002 ; Pavia *et al.*, 2007) . Aucun insecte infecté par *T. rangeli* n’a été trouvé à Araipá (fig.3.4). Presque toutes les infections à *T. rangeli* ont été identifiées en association avec *T. cruzi* à l’intérieur du même palmier (16/17). *T. rangeli* a été identifié dans toutes les unités de paysages et aucune différence significative n’a été détectée (Kruskal-Wallis test, 2.19, pvalue=0.822).

### **Infection mixte**

L’infection à la fois par *T. cruzi* et *T. rangeli* chez le même insecte a été détectée chez 19 individus, 4 à Nova Estrela et 15 à SãoTomé. Aucune infection mixte n’a été détectée à Araipá. Les infections mixtes ont été trouvées en forêt, dans les deux types de jachères et dans les pâturages.

### Association entre espèces d'hôtes et infection

La table 3.10 décrit le nombre de repas sanguins identifiés associés à une infection par *T. cruzi* et à *T. rangeli*.

Les mammifères sont considérés comme les seuls réservoirs de *T. cruzi* et *T. rangeli* et les triatomes prennent de nombreux repas au long de leur cycle de développement. On ne peut donc pas formellement associer les repas sanguin et l'infection avec un hôte infecté, à l'exception du premier stade larvaire où l'on suppose que la larve 1 n'a eu que très peu d'opportunité pour se nourrir. Dans le cas de *Trypanosoma cruzi* une seule larve L1 positive s'est nourrie sur *Cebus cay*. Pour *Trypanosoma rangeli*, quatre larves L1 d'un même palmier se sont nourries sur un tamandou (*Tamandua tetradactyla*) (Dias *et al.*, 2010) La table 3.10 indique cependant les relations putatives entre *T. cruzi* et les hôtes, notamment pour *A. belzebul*, *D. marsupialis*, *C. prehensilis* et *T. tetradactyla*.

Parmi les palmiers identifiés avec plusieurs hôtes (Table 3.10), 100 % des palmiers avec au moins 4 hôtes présentaient une infection à *T. cruzi* chez au moins un individu de *Rhodnius robustus*, 75% (6/8) dans les palmiers avec plus de 3 hôtes, 33% (4/12) dans les palmiers à deux hôtes et 29% (7/24) dans les palmiers à un hôte. Pour rappel, 100% des palmiers à plus de deux hôtes hébergeaient au moins une espèce de mammifère et 83% des palmiers à un seul hôte. Ceci indique l'importance des mammifères comme source alimentaire de *Rhodnius robustus*, et que la probabilité d'infection à *T. cruzi* augmente avec le nombre d'hôtes mammifères disponibles.

		Nombre de repas identifiés	Infection de <i>T.cruzi</i> associée (%)	Infection de <i>T.rangeli</i> associée (%)
Primates	<i>Alouatta belzebul</i>	9	3 (33.33)	1(11.11)
	<i>Callicebus moloch</i>	1	1 (100)	1(100)
	<i>Callicebis personautus</i>	1	0	0
	<i>Cebus apella</i>	7	0 (0)	0
	<i>Cebus cay</i>	2	1 (50)	0
Marsupiaux	<i>Caluromys philander</i>	1	0 (0)	0
	<i>Didelphis marsupialis</i>	12	8 (66.67)	5 (41.67)
	<i>Philander opossum</i>	1	0 (0)	0
Rongeurs	<i>Coendu prehensilis</i>	16	4 (25)	0
	<i>Lonchothrix emiliae</i>	1	0 (0)	0
	<i>Mesomys hispidus</i>	8	0 (0)	0
	<i>Nectomys squamipes</i>	1	0 (0)	0
	<i>Oecomys bicolor</i>	11	0 (0)	0
	<i>Oecomys roberti</i>	21	1(4.76)	1 (4.76)
Xénarthres	<i>Tamandua tetradactyla</i>	70	9 (12.86)	22 (31.42)
Oiseaux	<i>Cathartes aura</i>	1	0 (0)	0
	<i>Dendrexetastes rufigula</i>	17	1 na	0
	<i>Xiphorhynchus picus</i>	6	0 (0)	0
Sauropsidés	<i>Mabuya bistrinata</i>	8	0 (0)	1 (na)
	<i>Mabuya nigropunctata</i>	1	0 (0)	0

**Table 3.10.** Association observée entre identification de la dernière source alimentaire de l’insecte et infection à *T. cruzi* et à *T. rangeli* chez *Rhodnius robustus*.

### Abondance et variabilité des hôtes

Les séquences *cyt b* obtenues à partir des hôtes mammifères les plus abondants (*Tamandua tetradactyla*, *Didelphis marsupialis*, *Alouata belzebul*, *Coendu prehensilis*, *Cebus apella*, et *Oecomys roberti*) ont été comparées afin d’estimer le nombre minimal d’hôtes potentiel par espèce par la définition d’haplotypes distinct. Nous avons ensuite regardé si les insectes nourris sur ces « haplotypes » étaient infectés par *T. cruzi*. La relation entre les haplotypes par hôtes et l’infection est décrite dans la table 3.11. Les haplotypes sont différenciés lorsqu’ils ne sont identifiés qu’une seule fois dans un repas, dans un unique palmier (haplotypes uniques) et en haplotypes partagés, c’est à dire lorsque le même haplotype est identifié dans plusieurs repas sanguin, au sein du même palmier ou de différents palmiers. L’identification de plusieurs haplotypes par hôtes indique l’existence de plusieurs individus, parfois au sein du même palmier. L’identification d’un haplotype dans plusieurs palmiers proches, peut donner une indication sur les déplacements d’un seul hôte ou d’individus d’une même famille sur le territoire.

	Nb Haplotypes (nombre de seq)	Haplotypes uniques			Haplotypes partagés			
		ID	Communautés	Palmier	ID	Communautés	<b>Nb infectés/ nb total</b>	Palmier
Alouatta belzebu	4 (8)	<b>H1+</b>	Nova Estrela	NEUR01_MQ08	H2	Sao Tome	<b>1/1</b>	STBA08
				Araipa		0/1	STBA97	
		H4	Sao Tome	STBA08_FB09	H3 (0/3)	Nova Estrela	0/1	ARIN04
						0/1	NEUR06	
Coendou prehensilis	5 (14)	H2	Araipa	ARIN04_FB09	H1	Sao Tome	<b>3/3</b>	STBA02FB09
		H3	Sao Tome	STBA09_MQ08		0/1	STBA07FB08	
		H4		STUR10_MQ08		0/1	STBa07MQ08	
		H5		STBA08_FB09		0/2	STUR10MQ08	
						0/1	ARIN04FB09	
Didelphis marsupialis	3(12)	H2	Nova Estrela	NEUR01_FB08	H1	Nova Estrela	<b>1/4</b>	NEUR01_FB08
		<b>H3+</b>	Sao Tome	STUR04_FB09		Sao Tome	<b>2/2</b>	STBA02_FB09
							<b>4/4</b>	STUR08_MQ09
Oecomys roberti	5(23)	H1	Sao Tome	JUUR02_MQ09	H2	NE	0/14	NEUR06_MQ08
		<b>H3+</b>		STUR10_MQ08		ST	0/1	STBA06_FB08
		H5		STUR14_MQ08		ST	0/1	STUR14_MQ08
							ST	0/3
		Tamandua tetradactyla		13(61)		<b>H2+</b>	Nova Estrela	NEUR03_MQ08
H13			0/1		NEUR01_MQ08			
H3			Nova Estrela		<b>1/3</b>	NEUR03_MQ08		
H4					0/1	NEBA04_MQ08		
H5					0/2	STIN07_MQ08		
H6			STUR10_MQ08		0/1	STUR10_MQ08		
H7	Sao Tome				0/7	STUR14_MQ08		
H8			STIN07_FB09		0/2	STBA15_MQ08		
<b>H9+</b>			STUR01_FB09		0/1	STIN05_FB08		
H10			STUR02_FB09		0/1	STIN04_FB09		
H11					0/1	STIN05_FB09		
						Sao Tome	<b>1/4</b>	STIN06_FB09
							0/2	STIN08_FB09
							1/1	STUR01_FB09
							<b>1/10</b>	STUR02_FB09
							1/1	STUR04_FB09
							1/1	GLIN05_MQ09
							0/1	JUUR01_MQ09
							0/6	JUUR01_MQ09
							0/2	JUUR02_MQ09

**Table 3.11.** Relation entre haplotypes des hôtes et infection par *T. cruzi*. Les repas sanguins associés à une infection par *T. cruzi* sont indiqués en gras.

Pour *T. tetradactyla*, à partir de 61 séquences, 13 haplotypes distincts ont été détectés. L’haplotype 1 est retrouvé chez 41 insectes dans 18 palmiers différents, 1 à Araipá, 3 à Nova Estrela et 14 à São Tomé. De plus, différents haplotypes ont été détectés au sein du même palmier. Ces résultats indiquent que *T. tetradactyla* est fortement associé aux palmiers dans la région, il forme probablement des colonies de plusieurs individus à l’intérieur des palmiers.

Concernant *A.belzebul*, à partir de 8 séquences, 4 haplotypes ont été identifiés: deux exclusivement à Nova Estrela, un à SãoTomé et à Araipá et un seul uniquement à SãoTomé. Les haplotypes identiques ont été identifiés dans des palmiers distants de 800m à SãoTomé et de 315 et 431m à Nova Estrela.

Pour *C. prehensilis*, à partir de 14 séquences, 6 haplotypes ont été identifiés, 5 une seule fois, 4 à SãoTomé et 1 à Araipá. Un haplotype est partagé dans 6 palmiers de São Tomé,

---

distants de 8m à 3km. L'haplotype 1 a été observé circulant chez 5 palmiers dans un périmètre de 500m, le 6<sup>ème</sup> palmier étant situé à plus de 2 km.

Pour *D. marsupialis*, à partir de 12 séquences, 3 haplotypes ont été détectés dans 5 palmiers différents et pour *Cebus apella* à partir de 6 séquences, 4 haplotypes sont détectés, tous à São Tomé. Finalement pour *O. roberti*, à partir de 23 séquences, 5 haplotypes ont été retrouvés dont l'haplotype 2 chez 14 individus nourris sur le même palmier à Nova Estrela, ainsi que dans deux palmiers de São Tomé distants de 800m.

---

## Discussion

---

### Diversité des hôtes et déforestation

L'origine supposée de *Trypanosoma cruzi* remonte à 80 millions d'années, lorsque le continent américain était encore rattaché à l'Afrique, l'Antarctique et l'Australie. A cette époque, aucun insecte hématophage n'existait encore et la faune endémique était constituée de marsupiaux et de xénarthres qui sont considérés comme les hôtes primitifs de *T. cruzi* (Briones *et al.*, 1999 ; Buscaglia & Di Noia, 2003). La transmission se faisait par prédation ou *via* le contact des sécrétions glandulaires des opossum (*Didelphis spp.*) qui sont les seules espèces capables de maintenir la métacyclogenèse à l'intérieur de leurs glandes anales (Deane *et al.*, 1984 ; Schofield, 2000) et de transmettre le parasite directement. Actuellement *T. cruzi* a été identifié chez plus de 100 espèces de mammifères (Noireau *et al.*, 2009) dont les rôles dans la transmission naturelle du parasite peuvent varier d'une région à l'autre pour une même espèce. Ainsi, chaque système d'hôtes réservoirs doit être considéré comme unique au sein d'une certaine échelle spatio-temporelle (Jansen & Roque, 2011).

L'Amazonie est considérée comme la région ayant la plus haute biodiversité animale dans le monde et à l'instar de la Forêt Atlantique, très peu d'études ciblées sur l'impact de la fragmentation sur la dynamique de *T. cruzi* y ont été menées à ce jour (Gottdenenker *et al.*, 2010 ; Vaz *et al.*, 2007 ; Roque *et al.*, 2008). Dans notre étude, en observant la distribution des hôtes par unité de paysage, certains apparaissent prépondérants par le nombre de repas sanguin identifiés et leur présence dans tous les types de paysage. Il s'agit des espèces *Tamandua tetradactyla* (xénarthre), *Alouatta barzabul* (primate), *Coendu prehensilis*, *Oecomys roberti* (rongeurs) et *Didelphis marsupialis* (marsupial). Les interactions spécifiques du réseau trophique (hôtes-parasites) ont été examinées dans notre étude via les repas sanguins des insectes et ce qui ne permet de déduire ou de suggérer qu'indirectement la séroprévalence des espèces présentes.

En se basant sur les espèces identifiées au travers des repas sanguins dans les trois communautés, la diminution de diversité spécifique en fonction de la date d'implantation des communautés a confirmé l'impact négatif des perturbations anthropiques lié à l'époque d'installation sur la biodiversité des espèces animales (Fahrig, 2003 ; Turner, 1996).

Le plus grand nombre d'espèce a été détecté non pas en forêt mais dans les anciennes jachères. *Didelphis spp.* (Deane *et al.*, 1984) et *Tamandua tertradactyla* (Miles *et al.*, 1981 ;

Yeo *et al.* 2005) sont des hôtes potentiels de *T. cruzi* fréquemment décrits en association avec *Rhodnius spp.* Il est démontré que *Didelphis albiventris* est un hôte synanthropique dont les populations ont tendance à augmenter en zone de forêts perturbées (Olifiers *et al.*, 2005 ; Xavier *et al.*, 2007 ; Herrera *et al.*, 2007 ; Roque *et al.*, 2008 ; Vaz *et al.*, 2007) et que cette augmentation de réservoirs favorise l'augmentation de la prévalence à *T. cruzi*. Nos résultats ont permis de démontrer l'importance de *T. tetradactyla* comme source alimentaire dans les trois communautés, cependant la situation des xénarthres en tant que réservoirs actuels de *T. cruzi* et *T. rangeli* est peu documentée, les dernières infections détectées chez *T. tetradactyla* remontent à 1968 au Panama (Pipkin *et al.*, 1968) et Bento *et al.* (2002) au Nordeste brésilien ont détecté des formes flagellées identiques à *T. cruzi*. C'est une espèce placée sur liste rouge de l'UICN comme « faiblement menacée » et qui a disparu d'Uruguay par exemple à cause des monocultures d'eucalyptus (Abba *et al.*, 2008). Cependant en Amazonie, la prolifération des palmiers lui assure une protection, ils ont été observés dans 5 palmiers de pâturage à São Tomé et à Nova Estrela. Le tamandou se nourrit principalement de termites à terre ou dans les arbres (Montgomery, 1985), diverses communautés de termites ont été observées dans tous les palmiers étudiés.

Les espèces *Alouatta spp* et *Coendou spp* ont été identifiées associées à des triatomes et portant de formes de trypanosomes " t-cruzi like " (Kowalewski & Gillespie, 2009 ; Gaunt & Miles 2000) mais leur rôle en tant que réservoir est encore méconnu. Concernant les primates, la prévalence de *T. cruzi* est de 45.5% en Amazonie et 46% en Forêt Atlantique (Lisboa *et al.*, 2006) et peut atteindre 86% chez certaines espèces. Ces prévalences élevées peuvent mettre au rang de réservoirs ces hôtes vertébrés. Cependant, dans l'étude de Lisboa *et al.* (2006), aucune association entre les différents génotypes de *T. cruzi* et l'infection chez les primates n'a été détectée. Notons, que les cinq espèces de primates rencontrées dans notre étude peuvent être associées à une infection par *T. cruzi*. Parmi ces espèces, seule *A. belzebul* est considérée comme vulnérable aux perturbations humaines (Veiga *et al.*, 2008) et dans les trois communautés, aucun primate n'a été détecté dans les pâturages.

Dans les pâturages seuls trois hôtes sont observés, principalement *T. tetradactyla* et *O. roberti* ainsi qu'un individu de *Coendou prehensilis*. *Oecomys roberti* est un rongeur nocturne, arboricole très répandu en Amazonie (Costa *et al.*, 2009). Dans le Pantanal brésilien, une espèce proche *O. momorae* a été identifiée comme l'espèce la plus abondante en zone préservée autant qu'en zone sous pression d'élevage (Herrera *et al.*, 2007), la prévalence à *T. cruzi* chez ces rongeurs est cependant plus basse en milieu perturbé passant de 27.5 à 11.76 %,

suggérant que dans la région les pratiques d'élevage ne conduisent pas forcément à l'augmentation du risque de la Maladie de Chagas.

Généralement, dans les fragments de Forêt Atlantique, on observe une persistance des rongeurs et une augmentation de l'abondance des marsupiaux (Vaz *et al.*, 2007). La séroprévalence des animaux est plus élevée en milieu fragmenté qu'en milieu forestier préservé probablement dû à l'absence d'effet de dilution (Schmidt & Ostfeld, 2001). Roque *et al.* (2008) ont comparé la diversité des mammifères et leur prévalence à *T. cruzi* dans trois zones de microépidémies orales, situées dans 3 biomes différents du Brésil, marqués par des perturbations anthropiques, la Forêt Atlantique, le massif montagneux du Baturité (sertão) et l'Amazonie, biome considéré comme étant le plus préservé des trois. Dans les deux premières régions, la perte de la biodiversité et la destruction des habitats sont illustrés par la faible diversité de petits mammifères recueillis et la présence exclusive d'espèces synanthropiques (Didelphidae). La région étudiée en Amazonie (Cachoiera do Arari, Pará) a démontré cependant un paysage panzootique avec une forte prévalence chez tous les mammifères terrestres, arboricoles et volants (chauves-souris) capturés. Dans la partie Est de l'Amazonie brésilienne, considérée comme représentative de l'occupation humaine récente et typique de la colonisation future de la zone restante si les pratiques actuelles persistent, *Alouatta belzebul* a disparu de certains sites (Ayres, 1978 ; Lopes & Ferrari, 2000) et les singes plus petits, *Cebus spp* ont totalement disparu (Lopes & Ferrari 2000).

Dans d'autres régions, par exemple en Colombie, dans des fronts pionniers plus âgés, dans une palmeraie (*Attalea butyracea*) vieille de plus de 500 ans, 86 % des palmiers sont infestés par *R. pallenscens*, avec une moyenne de 19 insectes par palmier et seulement deux espèces de mammifères y ont été capturées *Didelphis marsupialis* et *Tamandua mexicana* (Pizarro & Romaña, 1998). Au Panama, dans des zones de déforestation âgées de 75 à 100 ans, Gottdenker *et al.* (2011) ont observé une forte augmentation des densités d'insectes (*Rhodnius pallenscens*) dans les palmiers d'*A. butyracea* et la majorité des repas sanguin pris sur des xénarthres, qui avec les marsupiaux sont considérés comme les réservoirs primitifs de *T. cruzi* (Noireau *et al.*, 2009).

Les oiseaux sont réfractaires à l'infection par *T. cruzi* car leur système du complément, intervenant dans la défense innée contre les organismes étrangers détruit cette espèce de trypanosome (Kierzenbaum *et al.*, 1981). De plus, il a été démontré que les formes épimastigotes de *T. cruzi* à l'intérieur de l'estomac d'insectes infectés sont détruites après

l'ingestion de sang de poulet (Schaub, 2009) mais pas les parasites contenus dans l'intestin (Garcia *et al.*, 2010).

Cependant, les populations d'oiseaux peuvent participer indirectement à la maintenance du cycle dans l'environnement naturel. En effet, les poulaillers en zone péri-domestique peuvent être de forts attractifs pour des triatomes en quête d'hôtes et offrent un bon abri et constituent souvent une étape intermédiaire vers la domiciliation des insectes. En Equateur, *Rhodnius ecuadoriensis*, dont l'habitat principal est le palmier *Phytelephas ecuadoriensis*, colonise les zones péri-domiciliaires et les habitations, où 65 % des insectes se nourrissent sur des oiseaux (Abad-Franch *et al.*, 2002). Bien que les infections expérimentales de *T. cruzi* chez les lézards ne produisent aucune parasitémie détectable (Urdaneta-Morales & McLure, 1981), certains auteurs ont décrit le cycle complet de *T. cruzi* chez une espèce de lézard associée au vecteur *Dipetalogaster maximus* (Teixeira *et al.*, 2006). Dans notre étude, les oiseaux et les lézards constituent 19% des repas sanguins identifiés.

Parmi les oiseaux, deux espèces de grimparis: *Dendrexetastes rufigula* et *Xiphorhynchus picus* ont été détectés dans les trois communautés, *D. rufigula* en forêt et en jachère ancienne et *X. picus* dans les jachères et les pâturages. Les espèces de lézards identifiées *Mabuya bistrata* et *M. nigropunctata* sont des lézards vivipares à activité diurne, qui se nourrissent principalement d'insectes, dont les Reduviidae (Vitt & Blackburn, 1991). Les reptiles quant à eux peuvent donc agir comme prédateurs naturels des triatomes et bien que leur rôle soit présumé faible (Schofield, 1979) cet aspect reste peu documenté (Undiano, 1968).

Traditionnellement les méthodes immunologiques (ELISA) sont utilisées pour l'identification des sources alimentaires des triatomes. Cependant, ces techniques nécessitent la préparation des antisérums dont la spécificité est limitée au genre d'hôte vertébré (Noireau *et al.*, 1997 ; Brenière *et al.*, 2004 ; Bosseno *et al.*, 2006). Plus récemment les techniques de séquençage ont été utilisées pour amplifier directement l'ADN contenu dans le sang du tube digestif des insectes à l'aide de marqueurs spécifiques à certaines espèces (Pizarro & Stevens, 2008) ou plus généralement spécifiques aux vertébrés (Gottdenker *et al.*, 2011). L'avantage des techniques de séquençage est d'une part, que le matériel n'a pas besoin d'être frais, ni congelé, et d'autre part, qu'il permet une identification au niveau de l'espèce d'hôte et même de distinguer des haplotypes. Ceci peut fournir des indications utiles sur la diversité des hôtes et aider à l'élaboration de certains *scenarii*. De plus, l'efficacité de la technique semble être

prouvée en cas de famine d'au moins deux mois (Pizarro & Stevens, 2008) ainsi que le démontre le pourcentage (32.7%) de repas détectés, dans cette étude, sur des individus non alimentés.

L'utilisation des marqueurs plus fins, comme les microsatellites, permettrait de reconstituer les fratries d'hôtes et d'évaluer plus précisément leur abondance ainsi que leur dispersion. Des marqueurs microsatellites sont d'ores et déjà disponibles pour *A. belzebul* (Goncalves *et al.*, 2004) et pour *Didelphis marsupialis* (Lavergne *et al.*, 1999).

### **Infection par *Trypanosoma cruzi* et *T. rangeli***

Historiquement, TcI a été associé au cycle sauvage et les cinq sous divisions de TcII au cycle domestique (Brisse *et al.*, 2001). Cependant, si TcI est prédominant dans le cycle sauvage au sud de l'Amérique du Sud (Zingales *et al.*, 2009), il est aussi le plus présent à la fois dans le cycle sauvage et domestique dans les régions les plus au nord de l'Amérique du Sud, l'Amérique Centrale et le Mexique (Moncayo & Silveira, 2009).

Parmi les six unités taxonomiques couramment reconnues de *T. cruzi*, trois ont été identifiées dans la zone d'étude TcI, TcII (précédemment TcIIa) et une sous division de TcI (Dias, 2010). La sous division de TcI a déjà été suggérée par plusieurs auteurs qui ont détectés en Colombie 4 isolats de TcI: TcIa, associé aux isolats domestiques de *Rhodnius prolixus*; TcIb associé au cycle domestique et péri-domestique de *Triatoma dimidiata*; TcIc, peu étudié, associé au cycle péri-domestique et TcId, associé au cycle sauvage (Falla *et al.*, 2009 ; Herrera *et al.*, 2007). Cette distribution des lignées TcI a été étendue aux autres pays endémiques (de l'Argentine au Mexique): TcIa, associée aux cycles domestiques au nord et au sud et aux cycles sylvatiques d'Amérique Centrale et du Nord ; TcIb, a été identifié dans tous les cycles en Colombie ; TcId dans tous les cycles d'Argentine, Colombie, Brésil, Guyane française, Panama et Venezuela et une cinquième lignée ; TcIe en Argentine, Chili et Bolivie (Cura *et al.*, 2010).

A partir de la classification faite par Cura *et al.* 2010, la zone d'étude coïncide avec la distribution de la lignée TcId. Ceci est confirmé par les reconstitutions phylogéniques et les BLAST effectués à partir des séquences des trois marqueurs min-exon (SL-RNA), GPI et HSP60.

Le TcId est un des groupes les plus répandus (Cura *et al.*, 2010) et a été identifié à partir de vecteurs domestiques en Argentine, Paraguay et Colombie chez *T. infestans* et

*Rhodnius prolixus* et à partir de cycle sauvages au Brésil chez *R. neglectus* et *R. nasutus*, en Colombie chez *T. infestans*, *T. dimidiata*, *R. pallescens*, *R. robustus*, *R. colombiensis*, *R. prolixus* et *P. geniculatus* et finalement au Chili chez *Mepraia spinolai*. C'est la première fois qu'il est décrit chez *R. robustus* en Amazonie brésilienne. L'intérêt des subdivisions au sein du groupe TcI est assez récent et reste encore peu documenté (Herrera *et al.*, 2007 ; O'Connor *et al.*, 2007 ; Cura *et al.* 2010).

En Amazonie brésilienne, TcI est la souche prédominante parmi les cas aigus et cardiaques de maladie de Chagas, mais ne cause pas de syndrome digestif (Miles *et al.* 1981).

Une deuxième souche a été décrite dans les cas de transmission orale TcIII (Monteiro *et al.* 2010, Valente *et al.* 2009, Miles *et al.* 1981) mais TcII n'a encore jamais été décrite en Amazonie (Roque *et al.*, 2008). TcI a souvent été isolé à partir de l'opossum (*Didelphis spp.*) au nord et au sud du bassin amazonien et il a été proposé une histoire évolutive commune entre TcI, les opossums et les *Rhodnius spp.* des palmiers (Gaunt & Miles, 2000). TcIII a été associée aux écotopes terrestres des réservoirs et des vecteurs (Yeo *et al.*, 2005 ; Marcili *et al.* 2009). Dans notre étude, TcII a clairement été associée à la strate arboricole. Du fait que notre zone d'étude ne correspond pas à la zone de distribution actuellement décrite pour TcII (TcIIa), nos données suggèrent une extension plus étendue vers le Nord de cette lignée et le manque de connaissances spécifiques sur la complexité du système épidémiologique amazonien. L'hôte naturel de TcII n'a pas encore été identifié (Jansen *et al.*, 2009). Certains auteurs ont proposé le tatou (*Dasybus spp.*, xénarthre) (Yeo *et al.*, 2005) ou les primates (Lisboa *et al.*, 2004). Dans cette étude, les résultats montrent que les insectes démontrant une possible infection mixte TcI / TcII sont souvent associés à des palmiers dans lesquels des primates ont été identifiés (*A. belzebul*, *Callicebus moloch*, *C. personatus*, *Cebus cay*, *C. apella*).

---

## Conclusion

---

Les palmiers du genre *Attalea*, par leur architecture représentent un écotope stable pour les populations de *Rhodnius spp.* (Romana *et al.*, 1999 ; Dias *et al.*, 2010) mais également pour les espèces d'animaux arboricoles (frugivores, insectivores, prédatrices) qui y trouvent refuge, même en milieu perturbé. C'est particulièrement au niveau du pâturage que le palmier représente souvent l'unique abri disponible. De manière générale on ne peut conclure à un effet de dilution défavorisant *T. cruzi*, car plus il y a d'hôtes dans le même palmier plus la probabilité d'infection est élevée. Cette analyse permet de connaître un peu mieux la diversité des réservoirs potentiels et des souches de Trypanosomes associés aux palmiers *Attalea spp.* et à *R. robustus* dans la zone d'étude ainsi que leur distribution dans les différentes unités de paysage qui forment actuellement le paysage amazonien. Il reste à approfondir l'analyse des sources alimentaires éventuellement non détectées par la méthodologie décrite ici et particulièrement de déceler les cas où les repas ont été pris sur plusieurs hôtes.

Notre étude montre la présence de la souche TcII de *T. cruzi*, non encore décrite en Amazonie et même si nos données sont indirectes, elles avèrent *Tamandua tetradactyla* comme réservoir de *T. rangeli* dans la région du Tapajós et suggèrent *Cebus cay* (Capucins) comme un hôte potentiel de *T. cruzi*. Il serait important aussi d'évaluer la séroprévalence locale de *T. cruzi* chez les hôtes *T. tetradactyla* et *Oecomys roberti* qui sont les deux espèces les plus rencontrées en zone de pâturage. L'Amazonie, considérée actuellement comme une zone d'émergence de la zoonose (Coura *et al.*, 2002), pourrait connaître une prévalence aggravée par certaines adaptations synanthropiques de réservoirs naturels efficaces (Teixeira *et al.*, 2009).

---

## Remerciements

---

Ce travail fait partie de la thèse de Marion Quartier et de Fernando Braga Stehling Dias. Le travail de terrain ainsi qu'une partie des coûts de laboratoire ont été financés par le Programme international de recherche, le PLUPH (Usage Inapproprié de la Terre, Santé Précaire: prévention primaire de la santé humaine grâce à l'utilisation adéquate des terres par les petits agriculteurs des régions tropicales humides) appuyée par l'Initiative Canadienne de Recherche (IRDC) en santé mondiale et coordonnée par M. Lucotte (Université du Québec, Montréal, Canada) et J. Drummond (Universidade de Brasilia, Brésil). Les auteurs remercient tous les membres des communautés dans lesquelles cette étude a été réalisée, Maud Lecomte et Cécile Campagne pour le travail de laboratoire et Bruno Betschart pour le soutien scientifique et académique.

---

## Références

---

Voir partie: V. Références

---

**Article 3*****Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon**

---

Fernando Braga Stehling Dias<sup>1,4</sup>, Marion Quartier<sup>2,3,4</sup>, Christine A. Romaña<sup>5</sup>, Lileia Diotaiuti<sup>1</sup>, Myriam Harry<sup>3,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil; <sup>2</sup>Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Université de Neuchâtel, Suisse; <sup>3</sup>Université Paris 12, Créteil, France; <sup>4</sup>LEGS, CNRS-IRD, France; <sup>5</sup>Université Paris Descartes/Espace S140, IRD, France; <sup>6</sup> Université Paris Sud-11, F-91 403 Orsay & LEGS, CNRS-IRD, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Corresponding author: Fernando Braga Stehling Dias: fbragasdias@gmail.com

Article paru dans: *Infection, Genetics and Evolution* 10 (2010): 1278–1281





Contents lists available at ScienceDirect

## Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

## Short communication

*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon

Fernando Braga Stehling Dias<sup>a,d</sup>, Marion Quartier<sup>b,c,d</sup>, Christine A. Romaña<sup>e</sup>, Liléia Diotaiuti<sup>a,1,\*</sup>, Myriam Harry<sup>f,1</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisa René Rachou, Av Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, Belo Horizonte, MG, CEP 30190-002, Brazil

<sup>b</sup> Université Paris 12, Créteil, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Institut de Biologie, Université de Neuchâtel, Suisse, Switzerland

<sup>d</sup> LEGS, CNRS-IRD, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

<sup>e</sup> Université Paris Descartes/Espace S140, IRD, France

<sup>f</sup> Université Paris Sud-11, F-91 403 Orsay & LEGS, CNRS-IRD, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 April 2010

Received in revised form 24 June 2010

Accepted 28 June 2010

Available online 7 July 2010

## Keywords:

*Tamandua tetradactyla*

*Rhodnius robustus*

*Trypanosoma rangeli*

Infection focus

Brazilian Amazon

## ABSTRACT

A sylvatic infection focus of *Trypanosoma rangeli*, whose cycle involves the anteater *Tamandua tetradactyla* and triatomine insect *Rhodnius robustus* was observed in a pasture-dominated landscape of the rural riparian community of São Tomé located along the Tapajós river in the municipal district of Aveiro (State of Pará, Brazil), the Brazilian Amazon region. During a field work campaign with the objective of Chagas disease diagnosis in the Tapajós region, an anteater and 31 triatomines were found inhabiting in the same *Attalea phalerata* palm tree crown. Collected triatomines were identified as *R. robustus* with morphological and molecular procedures. The analysis of infection by *T. rangeli* using the repetitive ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) gene showed that 25 triatomines of all stages were infected by *T. rangeli* (total infection rate of 80.6%). Infection by *Trypanosoma cruzi* using mini-exon markers was not identified. Examination of the digestive content of the triatomines demonstrated that the only feeding source found was the anteater. These results demonstrate that *T. tetradactyla* can be an important reservoir for *T. rangeli* and a good vehicle of the parasite within the Brazilian Amazon region.

Crown Copyright © 2010 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, the ethiological agent of Chagas disease, are also vectors of the parasite *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, both of the Trypanosomatidae family (Euglenozoa, Kinetoplastidae) and widely distributed throughout Central and South Americas.

*T. cruzi* and *T. rangeli* have a sympatric distribution in some areas producing mixed infections in vectors or in vertebrates. Moreover *T. rangeli* bears similarities with *T. cruzi* regarding surface antigens, impairing the diagnosis of Chagas disease when serological assays are carried out (D'Alessandro, 1976).

*T. rangeli* is mainly transmitted via saliva and occasionally by feces but is not pathogenic to vertebrates hosts where it is found in low density (D'Alessandro, 1976). However, in triatomines, *T. rangeli* is a good biological control because it can cause histopathological injuries, which can induce difficulties or even have lethal effects in moulting and feeding (Añez et al., 1987; Watkins, 1971). The species in the genus *Rhodnius* are considered the most important vectors of *T. rangeli*, being capable of transmitting the parasite both under natural and experimental conditions (Guhl and Vallejo, 2003). Unlike *T. cruzi* whose development in triatomines is entirely restricted to the gut, *T. rangeli* multiplies in the gut but completes its development in the insect salivary glands, where metacyclogenesis takes place (Añez and East, 1984; Guhl and Vallejo, 2003).

Like *T. cruzi*, *T. rangeli* also lacks mammalian host specificity and has been reported infecting a variety of mammals such Edentata, Rodentia, Carnivora, Primates and Marsupialia (D'Alessandro and Saraiva, 1992). The first report about the presence of *T. rangeli* in

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 33497762; fax: +55 31 32953115.

E-mail address: diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br (L. Diotaiuti).

<sup>1</sup> Co-last authors in alphabetical order.

Brazil was done by Deane (1958) in *Didelphis marsupialis* in the state of Pará. In the Brazilian Amazon, Miles et al. (1983) found the mammals *D. marsupialis*, *Metachirus nudicaudatus*, *Tamandua tetradactyla* and *Nasua nasua* infected by *T. rangeli*. However, various studies documented the occurrence of *T. rangeli* in different regions of Brazil – including tropical humid and dry forest (Barrett and Oliveira, 1977; Steindel et al., 1991; Diotaiuti et al., 1992; Ramirez et al., 1998; Dias et al., 2007) – especially in on-human primates like tamarins and marmosets (Maia da Silva et al., 2008).

In the present study, we report on *T. rangeli* sylvatic infection involving the vector *Rhodnius robustus* collected in the palm tree *Attalea phalerata* and the Edentata *T. tetradactyla*, in the Tapajós region of the Brazilian Amazon where natural habitats have been modified by humans. On the sampled vectors, we investigated both the molecular identification of the host-feeding sources and trypanosome infection using respectively sequences of mtDNA *cytochrome b* gene and ARN nucleolar Cl1 gene (sno-RNA-Cl1) for *T. rangeli* and non-transcribed intergenic region of mini-exon gene for *T. cruzi*.

## 2. Materials and methods

Triatominae were collected from a palm tree *A. phalerata*, named “uricuri” (S03.98715 W55.55081) in a cattle pasture along the Tapajós River in the community of São Tomé, municipal district of Aveiro, Pará, Brazil. The population of the community near the pasture is composed by 23 families native to the region. Generally, the population lives on self-subsistence, growing corn, rice, beans and manioc, practicing the cultivation after slash and burn. In the surrounding vegetation, *A. phalerata* is constantly associated with *Attalea maripa* (“inajá”) and *Attalea speciosa* (“babaçu”). Although a large part of the vegetation is composed by cleared land and pastures, it is still possible to find fragments of the Amazon forest.

The triatomines sampling and the observation of the anteatr *T. tetradactyla* was realized on May 13th 2009, using palm tree dissection according to Diotaiuti and Dias (1984). The anteatr was removed and walked to the closest palm tree, climbing to its crown.

The insects collected were transferred to the laboratory. Live insects were fed on hens and dead insects were placed in absolute alcohol. The identification of the triatomines was carried out morphologically according to Lent and Wygodzinsky (1979), and molecularly using *cytochrome b* mtDNA sequences according to Monteiro et al. (2003).

For each triatomines two DNA extractions were performed, first using the legs and thorax of the insects for molecular identification of the triatomines and to confirm infection for *T. rangeli* (DNA A). A second extraction using the digestive tube containing blood meal was performed to identify the host-feeding sources and to confirm

infection for *T. cruzi* (DNA B). This procedure was carried out for third instar nymphs to adults. For first and second instar nymphs, the DNA's extraction was performed with the whole insect (DNA AB). The DNA was extracted using DNease<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA).

For the Polymerase Chain Reaction (PCR), we used DNA A and AB for Triatominae identification with CYTB7432F and CYTB7433R primers (Monteiro et al., 2003) amplifying a 510 bp fragment of *cytochrome b* gene and for the molecular characterization of *T. rangeli* with the TrF/TrR2 primers (Pavia et al., 2007) amplifying a 620 bp fragment of the sno-RNA-Cl1 gene. We also tested other primers for the characterization of *T. rangeli*, like TrINT/TrINT-1/TrINT-2 primers for the amplification of the mini-exon gene (Grisard et al., 1999) and S35 and S36 primers that amplifying both kDNA of *T. rangeli* and *T. cruzi* (Sturm et al., 1989).

We used DNA B and AB for PCR targeted vertebrate hosts with the highly conserved primers L14841 (35mer) and H15149 (34mer) designated by Kocher et al. (1989) which amplified a 307 bp segment of *cytochrome b* gene (excluding primers) from a various panel of vertebrates and successfully used by Malmqvist et al. (2003) to identify the host species of blood feeding black flies. Bugs infection by *T. cruzi* was also checked in these DNA samples using a pool of three primers (TC/TC1/TC2) that amplify the non-transcribed intergenic region of *T. cruzi* mini-exon gene (Souto et al., 1996). DNA extracted from an individual of *Rhodnius prolixus* experimentally infected with *T. rangeli* (Choachi strain) and *T. cruzi* (CL strain) was used as positive controls.

For blood meal identification, the PCR reaction was realized in a total volume of 25 µL, including 4–6 µL (20–50 ng) of genomic DNA, 5 µL of 5× Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer (Promega), 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM of dNTP, 1 U GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega) and 10 µM of each primer and were carried out on a thermal cycler Eppendorf Mastercycler EP Gradients. The others PCR reactions were carried out in a total volume of 10 µL, including 1 µL 5× Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer (Promega), 1,5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM of dNTP, 0,5 U GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega) 2 µM of each primer and it was carried out on a thermal cycler Biometra<sup>®</sup> T-1 Termoblock (Germany). The thermal profile for each PCR is found in Table 1. The amplified products were observed in 1% agarose gel, stained with ethidium bromid. PCR products were purified using the Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) and the DNA quantified on Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Termo Fisher Scientific Inc.).

For *cytochrome b* amplicons, sequence reactions were performed using BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystem, UK) and sequence data were obtained using an automatic DNA sequencer (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer sequencer, Applied Biosystem, UK). For the identification of the

**Table 1**  
The thermal profile for each Polymerase Chain Reaction, with the used primers.

Primers	Target	Thermal profile
L14841 and H15149 <sup>a</sup> S35 and S36 <sup>b</sup>	cyt b mtDNA – blood meal sources kDNA	93 °C/1 min, 30 cycles of 93 °C/1 min, 50 °C/1 min, 72 °C/3 min and 72 °C/5 min 95 °C/5 min, 30 cycles of 95 °C/1 min, 60 °C/1 min, 72 °C/1 min and 72 °C/5 min
TrINT/TrINT1/TrINT2 <sup>c</sup>	Mini-exon gene <i>T. rangeli</i>	94 °C/10 min, 6 cycles of 94 °C/30 s, 45 °C/2 min, 72 °C/30 s, 26 cycles of 94 °C 30 s, 50 °C/1 min, 72 °C/30 s and 50 °C/1 min, 72 °C/5 min
TC/TC1/TC2 <sup>d</sup>	Mini-exon gene <i>T. cruzi</i>	94 °C/5 min, 61 °C/30 s, 72 °C/30 s, 27 cycles of 94 °C 1 min, 61 °C/30 s, 72 °C/1 min and 94 °C/1 min, 61 °C/30 s, 72 °C/10 min
CYTB7432F and CYTB7433R <sup>e</sup> TrF and TrR2 <sup>f</sup>	Molecular characterization of triatomines sno-RNA-Cl1 gene <i>T. rangeli</i>	94 °C/3 min, 38 cycles of 94 °C/30 s, 47 °C/1 min, 72 °C/2 min and 72 °C/10 min 95 °C/5 min, 15 cycles of 95 °C/30 s, 63 °C/1 min, 72 °C/30 s. 20 cycles of 95 °C/30 s, 61 °C/1 min, 72 °C/30 s and 72 °C 5 min

<sup>a</sup> Kocher et al. (1989).

<sup>b</sup> Sturm et al. (1989) and Vallejo et al. (2002).

<sup>c</sup> Grisard et al. (1999).

<sup>d</sup> Thermal profile modified of Souto et al. (1996).

<sup>e</sup> Monteiro et al. (2003).

<sup>f</sup> Thermal profile modified of Pavia et al. (2007).

feeding source DNA the sequences were compared to the sequences deposited on the database of GenBank by BLAST searches.

3. Results and discussion

Thirty-one triatomines were found: three first instar nymphs; nine second instar nymphs; seven third instar nymphs; two fourth instar and two fifth instar nymphs; one female and seven males. The cytochrome b DNA sequences from all insects collected in *A. phalerata* (n = 31) of the matched with 99% of similarity with that of roBR3m (access EF011714.1) a specimen of *R. robustus* collected in Apuí, Amazonas, Brazil (Monteiro et al., 2003), that confirm the morphological identification of the collected specimens based on the keys established by Lent and Wygodzinsky (1979).

Concerning the identification of the hosts of the bloodsucking insects, the BLAST results performed with the cytochrome b sequences (n = 14) obtained with the universal vertebrate primers showed 98% similarity with the *T. tetradactyla* cytochrome b sequence (access AJ421450.1). This Edentata was the role feeding source identified from the blood meal of the bugs collected from the palm tree. We cannot entirely discard multiple feeding sources but direct sequencing gave reliable sequences without profiles showing a mix of sequences. Moreover, the triatomines fed at the laboratory presented, as expected, 100% similarity with *Gallus gallus cytochrome b* sequence (access EU839454.1), demonstrating the accuracy at these primers for host-feeding source studies.

In the present study, we used molecular markers for the identification of the trypanosomes because the large morphological variability found among *T. rangeli* and *T. cruzi* is already known and could lead to misidentifications. Of the 31 triatomines collected, 25 amplified the fragment of 620 bp which corresponds to the ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) repetitive gene for *T. rangeli*, giving an infection rate of 80.6% (Fig. 1). Moreover, we tested the primers S35 and S36 designed on the *T. cruzi* kDNA minicircle conserved regions (Sturm et al., 1989), but it also hybridized with *T. rangeli* kDNA minicircles due to the high homology between these parasites (Vallejo et al., 2002). Nevertheless, the ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) repetitive gene showed more sensitivity to identifying infection for *T. rangeli* in the triatomines analyzed. However, no amplification of the non-transcribed intergenic region of *T. cruzi* mini-exon gene was observed in the *R. robustus* sample but just in positive controls.

Among the infected bugs, three first instar nymphs completely engorged exhibited *T. rangeli* infection. Since *T. tetradactyla* was the unique feeding source detected in the blood meal of these bugs, this Edentata is more likely the potential host of *T. rangeli* even if

the evaluation of infection by *T. rangeli* directly from this anteatr was not performed in this study.

*T. tetradactyla* is included in the list of sylvatic reservoirs of *T. cruzi* presented by Barretto (1979). However, the only report about the infection by *T. rangeli* of animals from the Xenarthra order in Brazil was published by Miles et al. (1983). These authors isolated 46 strains of *T. rangeli* from mammals and Triatominae, including *R. robustus*. The criteria adopted for identification of *T. rangeli* on the collected vectors were (i) natural or experimental infection of triatomines' salivary glands; (ii) inoculation of parasite through bite (via saliva) in mice; (iii) morphological parameters of parasitemia in mice and (iv) comparison of the isozymes profiles with a characterized strain of *T. rangeli*. However, three isolates, including the strain of *T. tetradactyla*, were characterized only based on the morphology of cultured parasites.

In the study region, palm trees are the dominant vegetation on cattle pastures. Thus, the palm trees are the only shelter for animals of larger size as anteatr. The presence of *T. tetradactyla* inhabiting the palm tree's crown, associated with the feeding sources of triatomines and the high infection rate by *T. rangeli*, suggests that the *T. tetradactyla* can be an important reservoir of *T. rangeli* and carry the parasite within the Brazilian Amazon region.

Because of the biological similarities between *T. rangeli* and *T. cruzi*, good taxonomical markers are needed in order to correctly evaluate the epidemiological risks and reduce difficulties for the diagnosis of Chagas disease. In this study, we showed that the ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) repetitive gene gives reliable amplification of *T. rangeli* from dead triatomines kept in alcohol. The use of this molecular marker could enhance understanding of the geographical distribution of the parasite. Moreover, the identification of feeding sources of *R. robustus* helps to a better understanding of the transmission dynamics of the *R. rangeli* and of the role of the Edentata *T. tetradactyla* as reservoirs of trypanosomes in Amazon region. The epidemiology of *T. rangeli* will be improved with the analysis of more mammalian hosts and vectors especially from not yet investigated geographical areas.

Conflict of interest

No conflict of interest related to this article for all authors.

Ethical statement

This study strictly followed the ethical codes of Brazil. The sampling was carried out in full compliance with the Brazilian laws (IBAMA authorization no.: 16485-2, 27/06/2008).

Financial support

This study has been financed by the International Research Program, the "PLUPH" project (Poor land use, poor health: primary prevention of human health through sound land use for small-scale farmers of the humid tropics) supported by the Canadian Global Health Research Initiative and coordinated by M. Lucotte (Université du Québec, Montréal, Canada) and J. Drummond (Universidade de Brasília, Brazil).



Acknowledgments

We thank the community in which this study was carried out for allowing the sampling and helping in the field work, Dra. Alessandra A. Guarneri for the triatomines infected in laboratory and Jordan Sky Oestreicher for revising the paper.

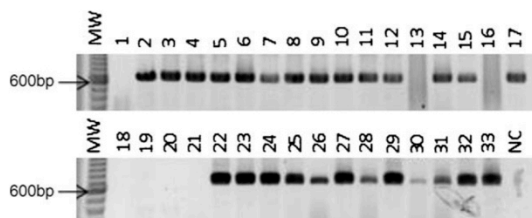


Fig. 1. Polymerase Chain Reaction amplification products using the primers TrF/TrR2 for characterization of *T. rangeli*. MW – standard for molecular weight (Ladder 100 bp), lanes: 1 – *R. prolixus* infected in laboratory with *T. cruzi* (strain CL); 2 – *R. prolixus* infected in laboratory with *T. rangeli* (strain Choachi); lanes 3 a 33: *R. robustus* collected in the *A. phalerata* palm tree: 3–5 – 1st stage nymphs; 6–14 – 2nd stage nymphs; 15–20 and lane 33 – 3rd stage nymphs; 21 and 22 – 4th stage nymphs; 23 and 24 – 5th stage nymphs; 25 – female; 26–32 – males, NC – negative control of reaction (no DNA add); MW – molecular weight.

## References

- Añez, N., East, J.S., 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. *Acta Trop.* 41, 93–95.
- Añez, N., Nieves, E., Cazorla, D., 1987. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 1–6.
- Barretto, M.P., 1979. Epidemiologia. In: Brener, Z., Andrade, Z. (Eds.), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, (cap. 3), pp. 89–151.
- Barrett, T.V., Oliveira, T.S., 1977. A *Trypanosoma* indistinguishable from *Trypanosoma rangeli* in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 445–446.
- D'Alessandro, A., 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of Kinetoplastida*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 327–403.
- D'Alessandro, A., Saraiva, N.G., 1992. *Trypanosoma rangeli*, Parasitic Protozoa, 2nd ed., vol. 2. Academic Press, San Diego, pp. 1–54.
- Deane, L.M., 1958. Novo hospedeiro de tripanosomas dos tipos cruzi e rangeli no Estado do Pará. O marsupial *Metachirops opossum opossum*. *Rev. Bras. Malar. D. Trop.* 10, 531–541.
- Dias, F.B.S., Diotaiuti, L., Romanha, A.J., Bezerra, C.M., Machado, E.M.M., 2007. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 643–645.
- Diotaiuti, L., Dias, J.C.P., 1984. Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 293–301.
- Diotaiuti, L., Silveira, A.C., Elias, M., Steindel, M., 1992. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 451.
- Grisard, E.C., Campbell, D.A., Romanha, A.J., 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology* 118, 375–382.
- Guhl, F., Vallejo, G.A., 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920—an updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 435–442.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6196–6200.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163 (New York).
- Maia da Silva, F., Naiff, R.D., Marcili, A., Gordoc, M., D'Affonseca Neto, J.A., Naiff, M.F., Franco, A.M.R., Campaner, M., Valente, V., Valente, S.A., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., Miles, M.A., 2008. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop.* 107, 168–173.
- Malmqvist, B., Strasevicius, D., Hellgren, O., Adler, P.H., Bensch, S., 2003. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* 271, 152–155.
- Miles, M.A., Arias, J.R., Valente, S.A.S., Naiff, R.D., Souza, A.A., 1983. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1251–1259.
- Monteiro, F.A., Barrett, T.V., Fitzpatrick, S., Cordon-Rosales, C., Feliciangeli, D., Beard, C.B., 2003. Molecular Phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* 12, 997–1006.
- Pavia, P.X., Vallejo, G.A., Montilla, M., Nicholls, R.S., Puerta, C.J., 2007. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone h2a/sire and the sno-rna-cl1 genes. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49, 23–30.
- Ramirez, L.E., Machado, M.I., Maywald, P.G., Matos, A., Chiari, E., Silva, E.L., 1998. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 99–102.
- Souto, R., Fernandes, O., Macedo, A., Campbell, D., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152.
- Steindel, M., Carvalho-Pinto, J.P., Toma, H.K., Mangia, H.R., Ribeiro-Rodrigues, R., Romanha, A.J., 1991. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasytrix*) in Santa Catarina island, Santa Catarina state: first report of this trypanosome in southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 73–79.
- Sturm, N.R., Degreve, W., Morel, C., Simpson, L., 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 205–214.
- Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Lozano, L.E., Sánchez, J.L., Jaramillo, J.C., Gualtero, D., Castañeda, N., Silva, J.C., Steindel, M., 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop.* 81, 77–82.
- Watkins, R., 1971. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Invertebr. Pathol.* 17, 59–66.

**Article 4****Genetic connectivity in natural sylvatic *Rhodnius robustus* (Larousse, 1927) populations in fragmented landscape of the Amazon Basin (Tapajós River, Pará state)**

---

Marion Quartier<sup>1,4,6</sup>, Fernando Braga<sup>2</sup>, Christine Romana<sup>3</sup>, Myriam Harry<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Université de Neuchâtel, Suisse; <sup>2</sup>Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brésil; <sup>3</sup>Université Paris Descartes, France; <sup>4</sup>Université Paris 12, Créteil, France; <sup>5</sup>Université Paris Sud-11, 91 403 Orsay, France; <sup>6</sup>LEGS, CNRS-IRD, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

Corresponding author: Marion Quartier, e-mail: marion.quartier@unine.ch

Manuscrit prêt pour soumission à Molecular Ecology

---

## Introduction

---

Chagas Disease (American trypanosomiasis) is produced by infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae), which is transmitted by hematophagous insects belonging to subfamily Triatominae (Hemiptera; Reduviidae).

Long time considered as a hypo-endemic zone of Chagas Disease, Amazonia is now considered as an emergence region of the disease (Coura *et al.*, 2002). There is a growing concern about sylvatic species of the triatomines, which can sporadically invade houses or contaminate food (Teixeira *et al.*, 2001). In Amazonia, palm tree populations of *Rhodnius robustus*, *R. pictipes*, and *R. brethesi* act as sources of adult adventitious bugs that invade (but do not colonise) houses, contaminate food-processing equipment, or attack forest workers (Coura *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2007). Due to these new transmission processes, sylvatic populations need to be identified and followed up, in order to prevent further risk for local human populations.

It is largely considered that distribution of sylvatic species as *Rhodnius ssp* is intimately linked to the distribution of palm trees, particularly palm species of the genus *Attalea* (Abad-Franch *et al.*, 2010; Abad-Franch *et al.*, 2005; Romana *et al.*, 2007; Romana *et al.* 2003; Miles *et al.*, 1981), which are invasive species in deforestation areas where slash and burn area practices leads to replacement of primary forest by mosaic of secondary vegetation, the vegetation being then composed of fallows, shrubs, palm trees, pastures and forest remnants.

Microsatellites markers have been used for the surveillance and control of Chagas Disease vectors in order to assess dispersal of insects vectors, mainly to examine the events of house re-colonization after insecticide treatments (Perez de Rosas *et al.*, 2007; 2008, Marcet *et al.*, 2008; Richer *et al.*, 2007) and to understand connection between wild and domiciliated habitats (Dumonteil *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2008). All these previous studies focus on populations that are domiciliated but present some sylvatic populations or are nearly fully domiciliated as *T. infestans* or *R. prolixus* (Fitzpatrick *et al.*, 2008; Pérez de Rosas *et al.*, 2011).

This study deals with *R. robustus*, a sister species of *R. prolixus*, but seeming to be refractor to the domiciliation process, in the sense that even under the deforestation pressure, *R. robustus* populations remain essentially sylvatic. *Rhodnius robustus* is one of the four

members of the *Rhodnius prolixus* complex that although include *R. nasutus* and *R. neglectus*. *Rhodnius* species are primarily associated with palm tree ecotopes except for *Rhodnius prolixus*, which has domiciliation abilities and is responsible for major endemicity of Chagas Disease in the northern parts of South America and Central America (Felicangieli *et al.* 2003). It has long been considered that *Rhodnius prolixus* is strictly domestic while *Rhodnius robustus* was the sylvatic sibling species associated to palm trees, until sylvatic *Rhodnius prolixus* populations were documented in Venezuela (Gamboa, 1973, Fitzpatrick *et al.* 2008). *Rhodnius robustus* has a population distribution that is restricted to Northern and Northwestern South America.

---

## Materials and Methods

---

### Study Area and Communities

The regional vegetation is dominated by a sub-mountain open forest, however, ongoing slash-and-burn agriculture yielded an advancing pioneer front formed by crops, pastures, and different stages of secondary forest growth.

The study area (Figure 1) includes three small scale farming communities in the Low Tapajós region (Pará State, Brazil), 400 km south of the Amazon River, located in the districts of Aveiro and Ruropolis. These three communities were chosen according to global research goals of a larger interdisciplinary study on health risks related to land management (PLUPH, 2010) and were characterized by a gradient of land-use patterns and settlement time.

One Riparian community, SãoTomé (ST; S03.99185°, W 55.56538°), is mostly made up of families native to the Tapajós region and was established 80 years ago. One Plateau community Nova Estrella (NE; S04.07299°, W55.51772°), which was settled via the transamazonian (BR136) opening (Divinópolis and vicinal 70) 30 years ago is mostly inhabited by North Eastern immigrants (67%). The third community, Araipá Lago (AR: S04.02516°, W55.55224°), extended in the extreme part of the lake where the vicinal (70) towards road (BR 163) begins and showed geographical, historical and social characteristics that are intermediate to the other communities. Araipá Lago is composed of riparian inhabitants who settled along the lake side several generations ago and of migrants from Nova Estrella.

The study region has a warm and humid climate, mean temperature varying from 25 °C to 27 °C, maximum between 31 °C to 33 °C and minimal between 24 °C and 25 °C, with clear differentiation between rainy season (January to July) and a dry season (August to December). Two additional communities along the Transamazonian Highway (BR 163) were sampled in a perspective of regionalization the whole research project (PLUPH), km17 (S04,43482, W55.90239) and km70, "Divinópolis" (S04,17922, W55.48920). Due to small number of individuals sampled in these two latter communities, specimens were only included in the phylogenetic analysis and individuals of km17 as an outgroup in the microsatellites analysis.

### Sampling

The sampling for triatomines was carried out in the three communities during two field sessions in September 2008 (dry season) and May 2009 (rainy season). During the rainy season, it was logistically infeasible to reach the community of Nova Estrela. Communities along Transamazonian road (Km 70 and Km 17) were sampled once in May 2009.

Despite the presence of numerous palm tree species, only species of the genus *Attalea* were sampled because they are considered as strong indicators of the presence of triatomines (Romaña *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2005, 2010).

Palm species identified according to Henderson *et al.* (1995) were cut down and leaves were removed from stem to crown and meticulously examined for triatomines (Diotauriti & Dias, 1984). All the organic matter was carefully inspected for nymphal stages on a white cloth. Botanical parameters of each palm were documented, including size, number of leaves, stipe size and enumeration of invertebrate, and vertebrate fauna, as well as any indicators of animal presence (i.e., feathers, nests, porcupine spines). Insects were identified according to morphological criteria (Lent & Wigodinsky, 1979) and were molecularly identified using *cytochrome b* mtDNA sequences (cf population genetics analysis) and GenBank comparison (BLAST). Each sampling point was georeferenced using a GPS (Garmin etrex, Garmin®) and linear distances between sites were calculated with GENALEX (Peakall & Smouse 2006). One insect found by an inhabitant of Nova Estrela in his house (S04.07586, W55.51558) was added to the sampling.

### **DNA extraction and amplification (Laboratory procedures)**

In order to avoid consanguinity biases, we used only adults sampled in palm trees or one nymph where adults were lacking. Total genomic DNA was extracted from legs and flight muscle for adults, fifth and fourth nymphal stages or from whole insects for third, second and first nymphal stages, using the DNeasy Tissue Kit® (Qiagen).

A 458 bp portion of *cytochrome b* mitochondrial gene was amplified using the following primers: CYTB7432F, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC, and CYTB7433R, 5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA (Monteiro et al. 2003).

PCR amplification were performed using the GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) in a final volume of 25µl containing 20-50ng of template DNA, 3µl of MgCl<sub>2</sub> of 25mM, 5µl of 5X buffer, 1µl of dNTP at 40µM each, 1µl of each primer at 10µM and 0.5µl of Taq Polymerase at 5U/µl. Both strands were sequenced directly in both directions with amplification primers, using an Applied Biosystem model 3100 automated DNA sequencer. The consensus sequences were edited and assembled using the Bioedit (Hall, 1999) and aligned using Alignment ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)

Ten out of 20 available loci for *Rhodnius prolixus* (Harry *et al.* 2008; Fitzpatrick *et al.* 2009) were used for genotyping studies. PCR amplification were performed using Dye labelled primer (Applied Biosystem) and the GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) in a final volume of 12µl containing 20-50ng of template DNA 1.5µl of MgCl<sub>2</sub> of 25mM, 2.5µl of 5X buffer, 0.5µl of dNTP at 10µM each, 0.5µl of each primer at 10µM and 0.05µl of Taq Polymerase at 5U/µl. PCR were performed with 30-40 cycles (denaturation at 94°C for 30sec, annealing for 30sec, and extension at 72°C for 30 sec). Microsatellite data were collected on an ABI Prism 3100 (Applied Biosystem) and alleles analyzed using GeneMapper® (Applied Biosystem).

### **Population genetics analysis**

#### **Mitochondrial DNA *cytochrome b***

In order to confirm the specific status of *Rhodnius robustus*, sequences were compared with published sequences of the *Rhodnius prolixus* complex (Lyman *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2003; Maia da Silva *et al.*, 2007; Pavan & Monteiro, 2007; Harry *et al.* 2008; Justi *et al.*,

2010). Bayesian inference (BI) was used to reconstruct phylogenetic relationships among taxa. Bayesian analyses were carried out using MRBAYES v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). However, jModelTest 0.1.1 (Posada, 2005) was first used in order to determine the best-fit substitution model for the data under BI through the Akaike information criterion. For the Bayesian analysis, we ran 3,000,000 generations using the MCMC algorithm using MRBAYES with 4 incrementally heated chains and parameters estimated with a GTR+I+ $\Gamma$  model. Outgroup sequences were taken from GeneBank, *R. pallescens* (EF071584), and *R. neglectus* (AF045716). Population analysis using *cytochrome b* was examined both at community and land-use levels. Codons positions were identified with MacClade (Maddison & Maddison, 2000). No stop codon was detected. The evolutionary relationship among mitochondrial haplotypes was evaluated through a parsimony network using TCS version 1.21 (Clément *et al.*, 2000). To assess diversity within and among palm tree locations, indices of haplotype diversity: number of haplotypes, Nh (Nei, 1987), haplotypic diversity, Hd (Nei, 1987) nucleotide diversity, Pi (Tajima, 1983), mean number of pairwise differences, theta (Tajima, 1983) and average number of nucleotide differences, k (Tajima, 1983) were calculated using DNAsp v5 software (Librado & Rozas, 2009). Populations pairwise Nst and Nm (Lynch & Crease, 1990) and average of number of nucleotide differences (Kxy, Tajima, 1983) and average number of nucleotide substitutions per site, Dxy (Nei, 1987) were used to calculated differentiation and gene flow between communities and land-use classes, also using DNAsp v5 (Librado & Rozas, 2009).

### ***Demographic analysis***

The observed distribution of pairwise differences between sequences (mismatch distribution) was examined using DNAsp (Rosas *et al.*, 2010). Mismatch distributions are theoretically multimodal for populations at stationary demographic equilibrium and typically smoother or unimodal for populations that have recently undergone demographic expansion (Rogers & Harpending, 1992). Fu's F statistics (Fu, 1997) and Ramos-Onsins & Rosas R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) were also calculated with DNAsp 5.10.1 (Rosas *et al.* 2010). Recent population expansions are expected to be associated with low R2 values. The overall validity of the estimated demographic model was also evaluated by the tests of raggedness index (Hri, Harpending, 1994) and the sum of squared differences SSD using ARLEQUIN 3.5.1 (Excoffier *et al.* 2005). Significance of Hri and SSD was assessed by parametric

bootstraps (10, 000 replicates). Divergence time between phylogroups was calculated from  $\tau = 2ut$  where  $\tau$  is a parameter of the time to expansion in units of mutations and  $u$  is the mutation rate per generation. We used a mutation rate of 2.3 per million years (My), which is the rate assumed for mitochondrial divergence in arthropod taxa (Bower 1994) and was used for *Rhodnius* by Monteiro *et al.* (2003). The generation time was estimated to be 2 per year.

### ***Genotypes Microsatellites***

Possible genotyping errors due to stuttering, short allele dominance and null alleles was tested using MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Linkage disequilibrium was tested between all pairs of loci overall and in each population using FSTAT (Goudet, 2001). Deviations from Hardy Weinberg equilibrium were tested at each locus within each population using ARLEQUIN.3.5.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Mismatch analysis was conducted using DNAsp (Librado & Rozas, 2009). Inbreeding coefficients ( $F_{is}$ ) were estimated using FSTAT (Goudet, 2001). Population comparison was made through  $F_{st}$  pairwise estimates and  $N_m$  estimates (Wright, 1943; Slatkin, 1995:  $N_m = ((1-F_{st})/4F_{st})$ ) computed using ARLEQUIN (Excoffier *et al.* 2005). Bonferroni correction was used throughout levels to account for all multiple testing (Hochberg, 1988). Finally, STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) was used to assess population structure for each set of data. K-values ranged from 1 to 15, with 10 replicates for each K and a burn-in period of length 500,000 followed by 1,000,000 additional iterations, under both no admixture and admixture models with allele frequency correlated. To identify the most likely K we used the  $\Delta K$  statistic method (Evanno *et al.*, 2005). Multivariate genetic spatial autocorrelation was also performed with GenAlEx V6.1 (Peakall & Smouse, 2006).

### ***Wolbachia***

To confirm that any observed structure in the population could not be attributed to manipulation of reproductive processes by endosymbionts, female insects were screened for *Wolbachia* infection via PCR using general *wsp* primers for PCR amplification: *wsp81F* *wsp691R* described in Braig *et al.* (1998), and *coxA* (Baldo *et al.* 2006). DNA extracts of others *Rhodnius spp* previously detected positive for *Wolbachia* were used as positive control in each PCR.

### **Land-use classification**

Different land-use types, ranging from exploited forest to increasingly disturbed and fragmented forests, where palms trees were present were identified in the field. These types were classified as secondary palm tree forests, fallows older than 3 years, fallows younger than 3 years and pastures. A supervised landscape classification was conducted with ENVI (Environment for Visualizing Images) software on a SPOT 5 image of 2.5m spatial resolution provided by the SEAS GUYANE project (UMR ESPACE-DEV, IRD-Cayenne, <https://www.seas-guyane.org/seasguyane/index.htm>) using the Minimum Distance method between different radiometric classes from the principal land use classes identified in the field, using 4 bands (Green, Red, PIR and NDVI for Normalized Difference Vegetation Index) (Quartier *et al.*, in prep). This classification allowed us to cluster geographic patches of land-use classes within each community.

### **Level of analysis**

In order to understand the genetic structure of the sampled population, the data set has been separated into different groups, according to: 1. phylogroups defined by Bayesian analysis of *cytochrome b* mitochondrial marker, 2) sampled communities, 3) land-use/landcover classes 4) patch of land-use within communities.

---

## Results

---

### **Palm infestation and insect infection**

In the three communities (Araipá, Nova Estrela and SãoTomé), seventy-three palm trees (54.89%) were found infested with triatominae, with a total of 742 insects. The community with the highest number of infested palms was SãoTomé with 68.49% of the palms dissected found to be positive for triatomines presence. This is followed by the community of Nova Estrela, with 52% of sampled palms being infested, and finally 28.57% in Araipá. From these 73 palms, 31 (23.31 %) were found with insects infected with *Trypanosoma cruzi*, this represents 16.58% of the total insect population. Details of infestation and infection for *T. cruzi* are reported elsewhere (Quartier *et al.* in prep). In order to avoid intra-palm kinship bias, we studied adults and one specimen per palm where no adults were present for mitochondrial and microsatellites characterization. On these 132 individuals, 75 were males (56.81%), 33 were females (23.40%) and 25 were nymphs from L3 to L5 (18.94%), which represents 19 % of the whole total population sampled in the three communities. Eleven individuals of *Rhodnius robustus* were sampled in 4 palms in Km 17 and one from 1 palm in Km 70.

### ***Wolbachia***

None of the female specimens sampled were found to be positive for infection by *Wolbachia ssp*, despite detection of *Wolbachia* in samples of *Rhodnius robustus* from other region of Brazil (Benfica, GenBank accession number EU444069) and in other *Rhodnius spp* (Espino *et al.* 2009).

### **Phylogenetic relationships using *cytochrome b***

Analysis of 132 sequences among the three communities (AR, NE, ST) revealed the existence of 16 unique haplotypes (Table 1), GenBank accession number (JN831953-JN831970). We identified 18 segregation sites of the 458 nucleotides (3.71 % of polymorphism). Of the 18 mutations, 17 were synonymous and one non synonymous (position 270), in one individual of Nova Estrela (haplotype 11 in NEUR06\_MQ08 palm). All

mutations were point mutations, 7 singletons and 11 parsimony informative. Two additional haplotypes were detected in km17 (17) and km70 (18).

In our Bayesian tree (Figure 3) the 16 haplotypes divided into three major clades within the clade II defined by Monteiro *et al.* (2003). These three groups were confirmed by network analysis (Figure 4), therefore, we defined three phylo-groups as group 1 (hap 1-7), group 2 (hap 8-12) and group 3 (hap 13-16). All the haplotypes of *Rhodnius robustus* from Tapajós shared greatest similarity with haplotypes roBr3m, roBr3L (Monteiro *et al.* 2003) from Amazonas state (Apuí) and specimen Rob1 from Provincia of Alto Beni in Bolivia (Justi *et al.*, 2010).

Haplotype 17 from the community of km17 clustered alone with individuals from Carauari, Amazonas (Monteiro *et al.* 2003) and haplotype 18 from the community of km70 with the first majoritarian phylogroup of the study (group1).

Considering the community level, we observed from 7 (Araipá, Nova Estrela) to 12 (Sao Tomé) distinct haplotypes, and from two (Araipá, Nova Estrela) to six (São Tomé) private haplotypes (Figure 4, Table 2). The relationships between the 16 haplotypes are described in the global TCS network (Figure 4) where we observed distinctly the three phylogenetic groups corresponding to the three levels of the global network. The topology of the network, with 3 principal haplotypes and satellites haplotypes connected with a small number of mutation steps in a star-like shape, is typical of recent demographic expansion events, especially for the most recent phylogroup (group 1). We could clearly observe no structuration for the sampled communities, even though each community had at least one private haplotype, a number of haplotypes were shared between the three communities. Three haplotypes were most frequent in the three communities: haplotype 1 (32.64%), haplotype 8 (17.36%) and haplotype 13 (30.56%).

Concerning the land-use types, despite the greater number of individuals analysed in pasture, only 7 haplotypes were observed in these individuals, indicating a loss of diversity in the most anthropogenic land-use class. The 3 majoritarian haplotypes were shared between them except for the fragmented forest where the haplotype 8 was not represented and except for young fallows, we found one private haplotypes for each land-use type. Three haplotypes (14, 15, 16) were mostly found in forest and fragmented forest but the haplotypes 15 and 16 were present in old fallows in two palm trees. One could be remnant from the primary forest (19m) and the other (8m height) was not far from a fragmented forest patch (125m).

Haplotypic networks within communities (Figures 3a, 4a, 5a) showed no clear structuration between different palm trees, and when we examined the spatial repartition in each community (Figure 3b, 4b, 5b) no clear geographical structure pattern appeared. Nevertheless, we could observe in each community, palms with great haplotypic diversity, these palms were the ones carrying more than one adult. In Araipá, one palm in particular had large intra-population variability (ARIN08\_FB08), with 6 out the 7 haplotypes present in the area. This palm was geographically isolated from the central part of the community, in the forest between Araipá and Nova Estrela. Moreover, haplotype diversity per palm is positively correlated to the number of individuals per palm ( $r = 0.5$ ) but is not correlated to land-use class (Pearson pvalue = 0.49).

### **Mitochondrial polymorphism and gene flow**

#### ***Group Level (3)***

From the three groups determined via the haplotypic network (Figure 2) and the phylogenetic tree (Figure 1) we reconstructed the historical evolution of the triatominae sampled in the Tapajós region. The topology of the phylogenetic tree indicated that group 3 is more ancestral. Moreover, we observed that this group is principally associated with sylvatic ecotopes, such as forest and fragmented forest (Table 2).

Recorded haplotypic diversity varied from 0.234 (group 3) to 0.541 (group 2) for a total of 0.781 (Table 2). Within each group  $\pi$ ,  $\theta$  and  $k$  values were very low compared to total values because of phylogroups maximise inter group variability.  $\pi$  estimates varied from 0.107 (group 1) to 0.177 (group 2). A low  $H_d$ , was observed for group 3, is associated with an intermediate  $\pi$  estimate and the reverse situation is observed for the group 1. This could be indicative of an expansion for group 1 and bottleneck events for group 3. Group 2 had higher values of these two estimates, indicating a stable population. Tajima's  $D$  values were negative for the three groups but were only significant for group 1, confirming the possibility of a demographic expansion.

Genetic differentiation determined with both DNAsp (Table 3) and AMOVA (Table 8) showed great differentiation among each group, all permutation tests available in DNAsp were highly significant for  $N_{st}$  values between each pair of group,  $K_{xy}$ ,  $D_{xy}$  values were

greater between group 3 and the two latter groups, than between group 1 and 2, which is congruent with the Bayesian phylogenetic topology.

### *Community level (3)*

Recorded haplotypic diversity varied from 0.670 to 0.817 in the three communities whereas total diversity was 0.780. The higher Hd,  $\pi$ ,  $\theta$  and k values were recorded in Araipá. By contrast, values were lower for SãoTomé and Nova Estrela. Pi estimates varied from 0.705 for SãoTomé to 0.896 for Araipá. The combination of Hd and Pi estimates indicate a stable population in Araipá (high Hd and high Pi), whereas a recent bottleneck event may have occurred in Nova Estrela and an older short bottleneck event may have occurred in São Tomé. No significant deviation from neutrality was identified at level of the communities examining Tajima's D values. Geneflow analysis and AMOVA conducted between communities showed no great differentiation between communities. All Nst values were negative, only one permutation test, Sdd (Hudson, 2000) was slightly significant for Nst between Araipá and the two other communities (Table 3 ). Kxy, Dxy were comparable between the three communities. Sdd is considered as the more powerful statistics test available in DNAsp (Hudson, 2000).

### *Land-use level (6)*

At the level of land-use classes, Hd varied from 0.755 (pasture) to 0.808 (young fallow), pasture had the lowest Hd estimate (Table 2) whereas other Hd estimates are comparable (0.800-0.808). Pi estimates varied from 0.646 (young fallow) to 1.025 (fragmented forest). For pasture, and young fallows, Hd values associated with low Pi estimates could indicate a bottleneck effect, which could indicate a residual population from the initial deforestation event. The highest Pi estimate was detected for fragmented forest classes and a combination of both elevated Hd and Pi values for forest, palm tree forest and old fallow demonstrated stable population situations (high Hd, high Pi).

No significant deviation from neutrality was identified at the land-use level, as determined by examining Tajima's D values.

Pairwise permutation test performed with DNAsp showed no significant differentiation between any land-use classes, however we could observe differences in Nm

inferred from Nst values (Table 4). Nst values varied from -0.36 to 0.028, which are very low, indicating low differentiation between land-uses.

### **Population expansion**

Mismatch distribution for phylogroups and communities are shown in Figure 7. Mismatch analysis for phylogroups showed a distinct pattern (Figure 8). Groups 1 and 2 have a smooth and curved pattern, suggesting that population is constant, whereas significant Fu's F-value for group 1 indicated population expansion (Table 5). Group 3 had a bimodal distribution, suggesting more stability of the ancestral group. The global population also had the same bimodal distribution as group 3; however the global population distribution had a higher mixture of populations (Zhao *et al.*, 2008) (Figure 5) as shown under the two mismatch distribution models (constant and growth decline).

According to the tau value ( $\tau$ ) estimation of expansion time was found to be 65'748 years for the group 3, 18'039y for the group 2 and 9'731y for the group 1.

At the community level, we observed a bimodal distribution, however the demographic parameters SSD and Hri (Table 5) were not significant for any community. A bimodal distribution suggests an admixture of population but non-significant values of SSD and Hri suggest that population expansion cannot be rejected. The D\* value was negative and significant in São Tomé, suggesting a historical reduction in population size (bottleneck) (Tajima, 1989). None of the Fu's F values were significant.

### **Microsatellites analysis**

#### ***Molecular diversity***

As no linkage disequilibrium was detected according to a global test of all the loci over all populations and within each population, we therefore proceeded under the assumption of statistical independence between the loci.

All loci were polymorphic with the number of distinct alleles per locus ranging from 3 (R13) to 14 (R4). The 10 loci were polymorphic for all populations considered among and within the different subsets. Allelic richness ranged from 4.8 to 6.9. Mean observed heterozygosity ranged from 0.510 to 0.657 and expected heterozygosity between 0.571 to

0.648. Table 6 shows allelic richness (N), observed (Ho) and expected (He) heterozygosity and inbreeding coefficient (Fis) for each subset. Within each population subset (phylogroups, communities and land use classes), no departure from HW equilibrium was detected.

No deviation of HWE equilibrium was detected in Araipá and in the community of km17. From one to four loci showed HW disequilibrium, in São Tomé and Nova Estrela respectively due to homozygosity excess that could be due to presence of null allele at each locus (Microchecker). For the whole population (all individuals), we observed deviations at three (R31, R26, L10) loci. At the land-use level no deviation in palm forest was observed at any loci but in forest and fragmented forest (R26), old fallows (R26, L10), and young fallows and pasture (L37). All these deviations except L37 in young fallows were due to homozygosity excess.

### ***Population differentiation and gene flow***

Pairwise *Fst* values ranged from 0 to 0.006 (negative values considered as null, c.f., Jaramillo & Long 1986) and inferred *Nm* values from 19 individuals to infinite. Pairwise *Fst* comparisons between phylogroups showed a significant differentiation between group 3 and group 2 (Table 8) but AMOVA conducted between groups with microsatellite data (Table 8) showed that the amount of variation within groups (99.64) was greater than between groups (0.36).

Pairwise *Fst* comparisons indicated a lack of population structure between the three communities (Table 8), which was also confirmed with the AMOVA, with 100 % of variation being explained within communities. However, genetic differentiation (*Fst*) was observed between the three communities as well as the outgroup community of transamazonian highway, km17.

Lack of structuration between land-uses was also confirmed by pairwise *Fst* and AMOVA tests (Table 10). Smaller but non-significant *Nm* values for pasture could indicate that it is a more isolated ecotope relative to other land-uses. Pairwise *Fst* values for landscape patch analysis showed one group of palms more isolated, the patch n3 which include palm trees in Nova Estrela sampled in the open area between remnant forest and the active deforestation front. This group of palms is isolated from fragmented forest, from palms sampled in Araipá (an1) and some groups of palms in São Tome: s1, s3 and s6 which are groups of palms in riparian remnant forests.

One subdivision within São Tomé was also observed between s6 and s7, a patch of palms in remnant forest (s6) and one palm (s7) in and adjacent pasture. The population divergence was also analyzed using AMOVA (Table 8). Again, variation due to subdivisions within patches was greater than between patches. Spatial genetic structure (SGS) assessed with Genalex (Figure 9) showed no spatial autocorrelation. Correlogram (Figure 10) demonstrated correlation ( $r$ ) for individuals as a function of distance between palm trees,  $r$  is positive but not significant within the first distance class of 0m to 10m, however  $r$  is negative at a distance of 25m and 50m and then close to 0. The correlogram patterns showed significant trends of spatial correlation within the first 10 meters that is inside the palm itself.

### ***Population assignment***

Diverse STRUCTURE runs (not shown) for microsatellites data within each subset failed to detect any assignment for phylogroups, communities or land uses. This revealed no strong structuration of populations within the study area and high ability to disperse for adults.

### ***Congruence between mitochondrial data and microsatellites***

AMOVAS's conducted for each data set and each marker (Table 7) revealed that most of the variation was found among individuals within the population (101.4 – 98.6 %), excepted for phylogroups where most of the variation was found among groups for mitochondrial markers (85.21- 86.72 %). Fst estimates were close to one (0.860-0.870) and p-value were significant.

PCO INTER (Principal Coordinate Ordination) conducted between haplotypes and microsatellite genotypes showed no effect of haplotype identity (not shown) and phylogroups (Figure 10) on genotypic diversity (inertia = 0.017,  $P = 0.123$ ).

---

## Discussion

---

To our knowledge, no previous studies have examined Brazilian sylvatic populations of *Rhodnius robustus*. Some authors have studied sylvatic populations of *Rhodnius robustus* in Venezuela (Felicangieli *et al.*, 2002; Fitzpatrick *et al.*, 2008b) but the status of Venezuelan *R. robustus* remains unclear (Harry *et al.* 1992) and it doesn't seem to share the same behavioural traits as the Brazilian population. *Cytochrome b* analyses proved that all specimens were Brazilian *Rhodnius robustus*, and showed no introgression as sylvatic *Rhodnius prolixus* do not seem to occur in the Brazilian Amazon (Felicangieli *et al.*, 2003).

According to Abad-Franch *et al.* 2007, the study area corresponds to Tapajós-Xingu moist forest where *Rhodnius robustus* III has been documented (Monteiro *et al.*, 2003). However the 18 haplotypes divided into three major clades within lineage II (roBR3l, roBR3m) which is described as being present in the Tapajós-Madeira eco-region and is likely to be present in the Tapajós-Xingu region (Abad Franch *et al.*, 2007). As this clade derives most from the three Amazonian clades (II, III, IV) and primarily originated from the western lowlands, our results suggested an eastern expansion of the original distribution of the clade II or the lack of previous sampling in the studied area.

From mitochondrial analysis and diversity indices, different historical scenarios for the phylogroups in the Tapajós could be proposed.

From diversity indices we could deduce that the group 3, the most ancestral, principally associated with natural ecotopes and with low haplotypic diversity has probably emerged from a more central population (clade II) with an initial founder effect (bottleneck), around 65'000 years ago. The group 2 showed the highest diversity values, indicating a stable population with a high effective size whereas the group 1 population was the most derived and recent with a rapid expansion from an initial small population.

Haplotype and mismatch distributions showed that *Rhodnius robustus* populations within communities resulted in a mixture of the different phylogroups, as well as in the different land uses with exception of some haplotypes of the group 3 that were strictly associated to natural ecotopes. Nevertheless, the temporal gradient of community settlement time was not detected at the mitochondrial level. In Araipá, which is the most recently settled community, diversity indices were high, indicating that the population is stable and has a high effective size. Forest fragmentation is supposed to reduce diversity and  $N_e$  (effective

population size) of natural species (Gaggioti & Couvet, 2003). Yet, mitochondrial structure analyses failed to detect differences due to forest fragmentation from recent community expansion events.

At the land use level, bottleneck events were detected in the two most anthropogenic land uses, pastures and young fallows. On the other hand *Rhodnius robustus* populations appeared to be stable within the four other land uses. Bottleneck effects can illustrate residual populations of triatomines that survived after initial forest clearing (e.g., protected in the palm crown), but can also illustrate that there are few individuals that have rapidly colonised young palm trees from adjacent forest ecotopes. Generally it is assumed that forest clearance may first have a negative impact on triatomine survival, however some individuals remaining in palms after deforestation (mainly *Rhodnius spp*) do remain (Abad-Franch & Monteiro, 2007) and are able to subsequently recover and build up large colonies in some palms (Abad-Franch *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2007; Romana & Pizarro, 1999).

Gene flow between different geographic units (communities and land uses) showed no differentiation at both the mitochondrial and microsatellite levels. However, patch analysis detected some genetic differentiation between palms in open areas and in fragmented forests and old fallows in Nova Estrela and as well as between most distant groups of palm trees in São Tomé. This isolation between palm trees from open areas and closed areas in Nova Estrela could reflect the type of modern processes of colonisation, typical from “road openings”. In Nova Estrela, landscape fragmentation appeared to be a more “abrupt” process, which can lead to rapid loss of connectivity between land use and patches. Whereas in São Tomé, the longest settled riparian community, the fragmented mosaic configuration maintained some genetic connection. In Araipá, forest fragmentation processes are too recent to be detected.

Spatial autocorrelation also showed a clear lack of isolation by distance and  $F_{st}$  pairwise based on microsatellites failed to detect differentiation at the scale of the three communities (within 10 km). However, differentiation was detected at a larger scale (60km), indicating that adult insects have great dispersal abilities. Moreover, assignment methods failed to find any structure proving that gene flow is high and homogeneity of the whole population is preserved. Genetic connectivity within sylvatic triatominae populations has already been detected between different ecotopes (Fitzpatrick *et al.*, 2009b, Dumonteil *et al.* 2007; Harry *et al.*, 1998) whereas domestic populations have shown systematically more

structured populations, probably owing to genetic drift following population size reductions due to insecticide treatments in endemic areas (Pérez de la Rosas *et al.*, 2007, 2008; Pizarro *et al.*, 2008).

For sylvatic species, dispersal is particularly relevant for estimation of risk situations, in non-endemic regions and particularly in the Amazon region. The transmission of *T. cruzi* occurs principally when flying insects invade households and directly infect humans or contaminate food and beverages, leading to oral transmission (Coura *et al.*, 2002, 2011; Aguilar *et al.*, 2007; Valente *et al.*, 1999). Population genetics help to determine historical population processes by providing indirect demographic indices which may help to understand dispersal patterns (Bohonak, 1999; Whitlock & McCauley, 1999). In the case of the Tapajós, the fragmentation is shown to have little effect on the population structure of *Rhodnius robustus*, whereas it generally affects most of the vertebrates (Less & Peres, 2008; Jorge, 2008; Michalski & Peres, 2007) and invertebrates (Aguire & Dirzo, 2008; Vasconcelos *et al.* 2006). However, fragmentation is generally also associated with habitat loss, but the invasive dynamic of *Attalea spp* palm trees in anthropogenic land covers (Mitja & Ferraz, 2001) is actually the result of a multiplication of suitable habitats for triatomines (Abad-Franch *et al.*, 2010; Romana *et al.*, 1999). Thus *Attalea* palm trees act like functional connectors between sylvatic and domestic compartments.

---

## Acknowledgment

---

This work is part of PhD of Marion Quartier and Fernando Braga Stehling Dias. Field work and part of sequencing costs has been financed by the International Research Program, the “PLUPH” project (Poor land use, poor health: primary prevention of human health through sound land use for small-scale farmers of the humid tropics) supported by the Canadian Global Health Research Initiative and coordinated by M. Lucotte (Université du Québec, Montréal, Canada) and J.Drummond (Universidade de Brasilia, Brazil). Laboratory costs and technical assistance of Maud Lecomte were supported by the ANR ADAPTANTROP (Dir. M. Harry). We are grateful to all members of the communities in which this study was carried out for welcoming us and helping in with field-work. Guy D. Mejia for his guidance and help with the field-work, all members and students of the PLUPH project, Emmanuel Roux for methodological assistance, Eric Delaître for helping creating maps Claire Capdevielle-Dulac for precious technical assistance, Jordan Sky Oestreicher for kindly revising the paper, and Bruno Betschart for academic and scientific support.

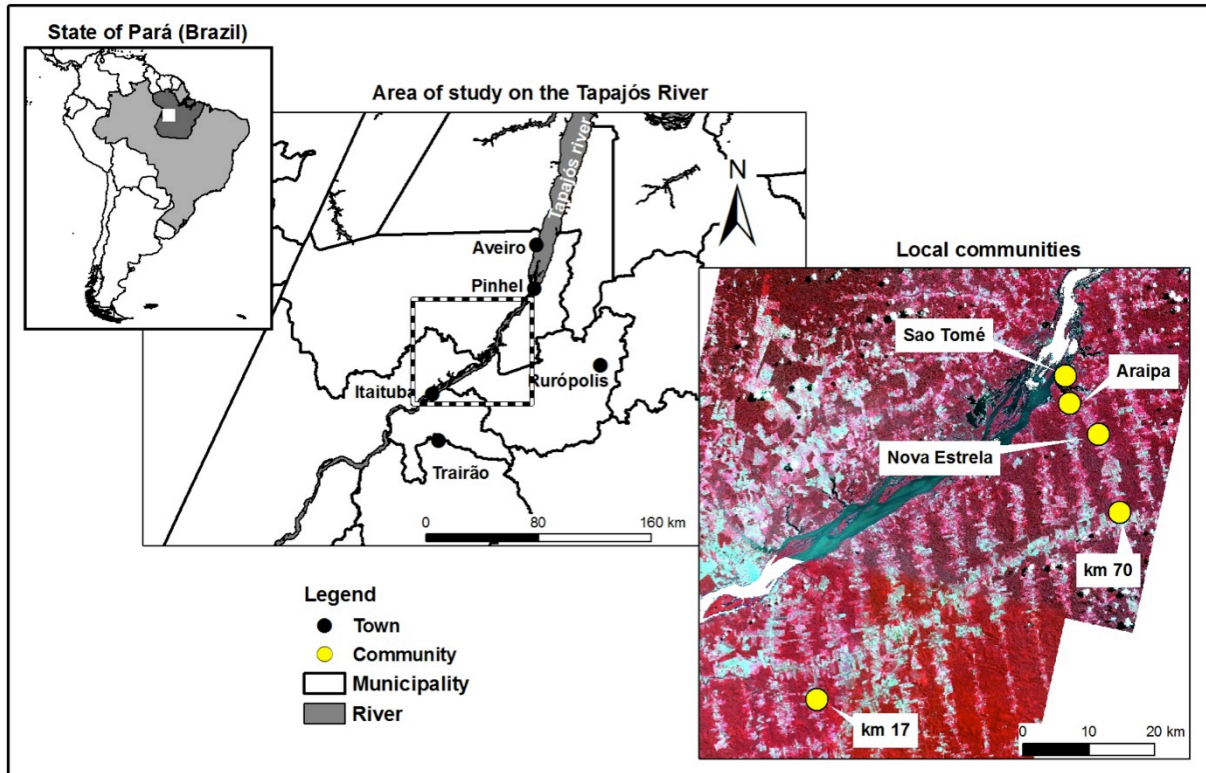
---

## Ethical statement

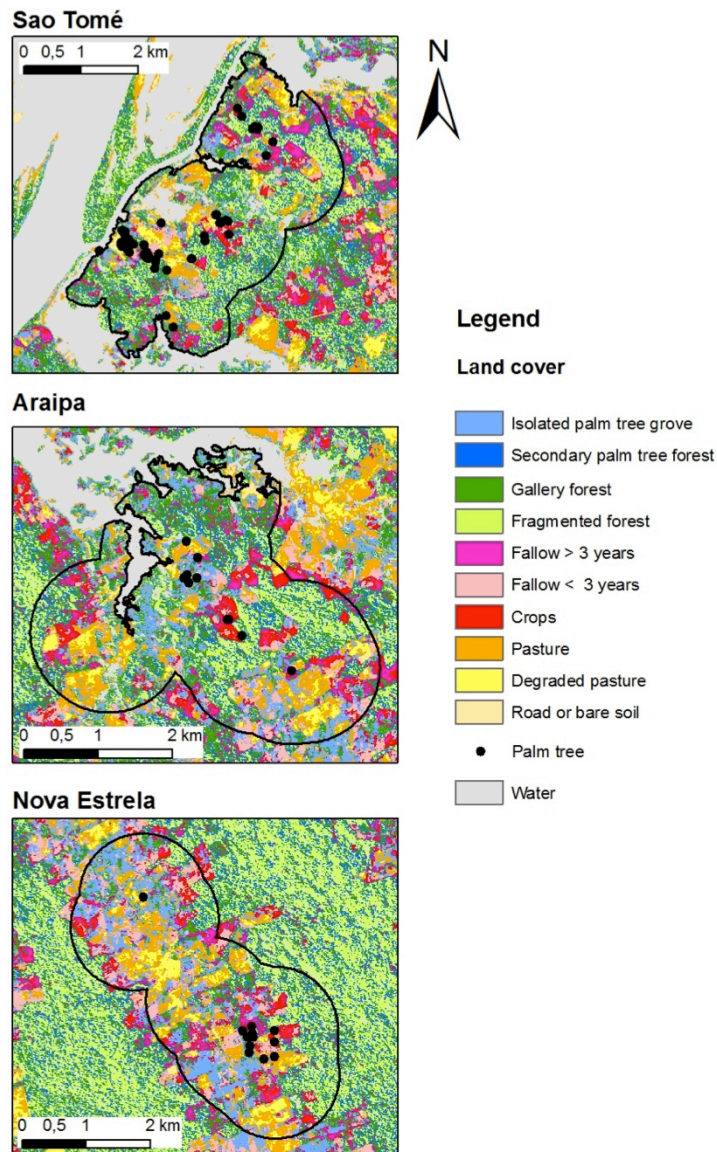
---

This study strictly followed the ethical codes of Brazil. The sampling and insect exportation were carried out in full compliance with the Brazilian laws (IBAMA (SISBIO) authorization n° 16485-2, 27/06/2008 and CITES: Permit n° 09BR002832/DF-emission: 09/01/2009).

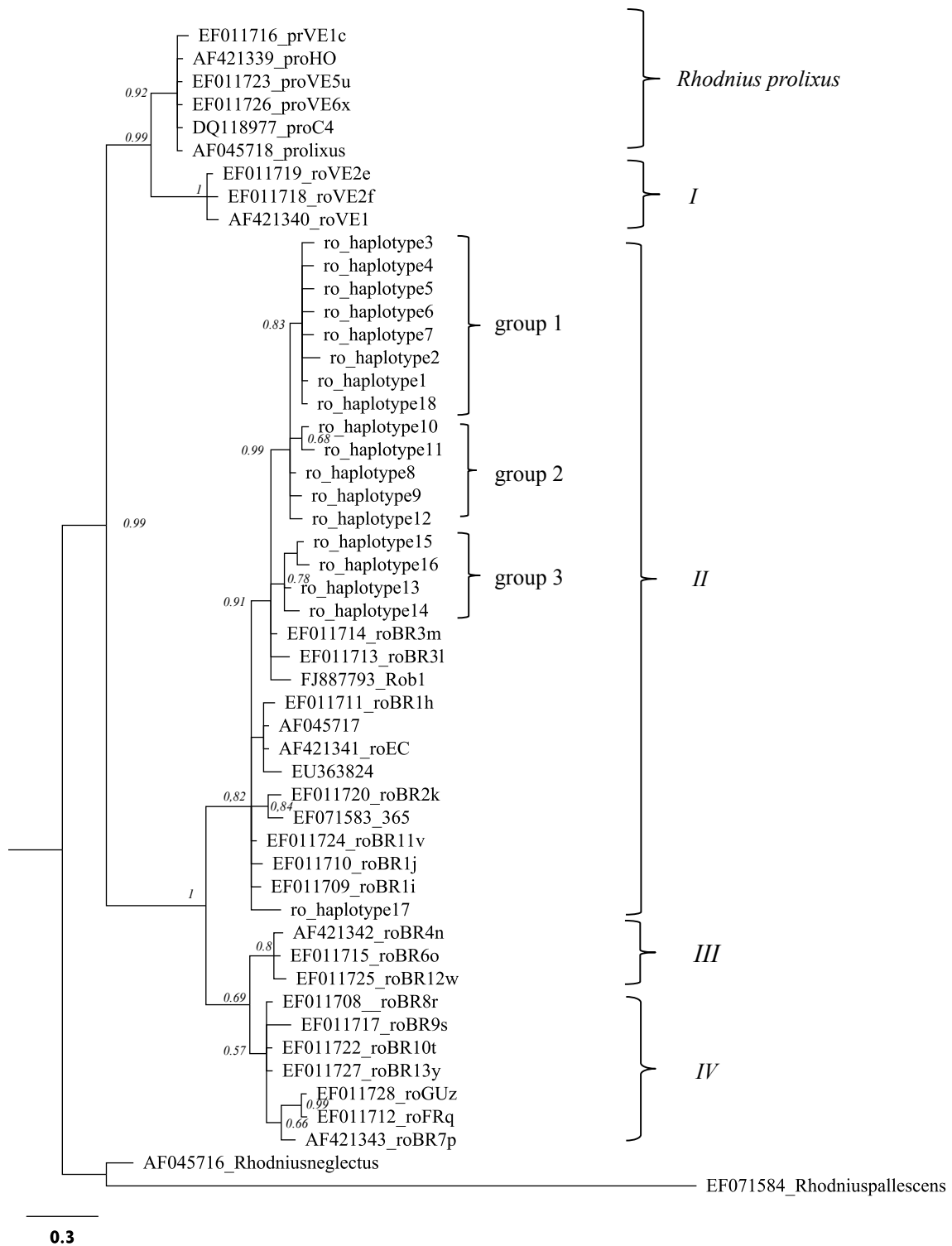
Figures and Tables



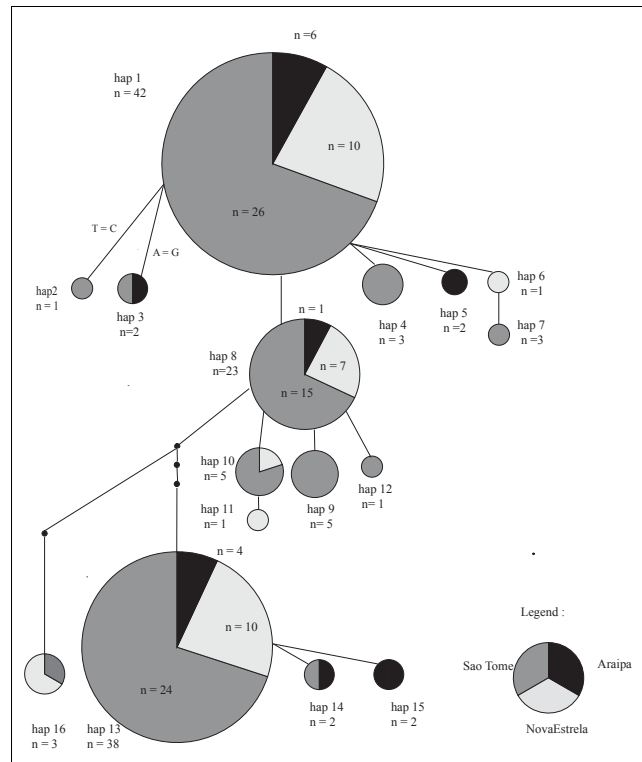
**Figure 1.** Study area. Communities sampled were located near the Tapajós River, confluent of Amazon River and the Transamazonian road BR-163 (Cuiaba-Santarem).



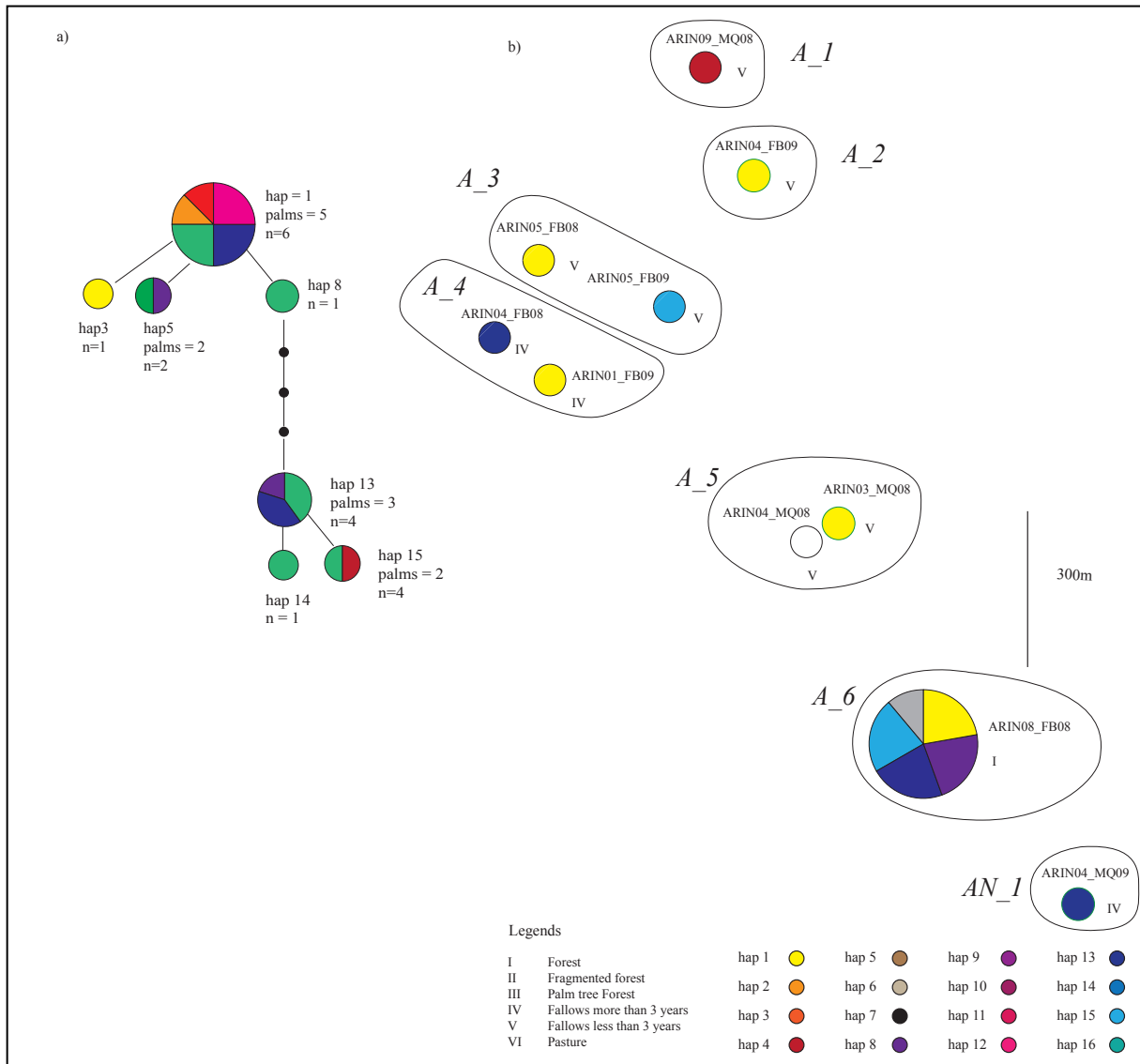
**Figure 2.** Localisation of the sampled palm trees in the three communities on supervised classification of different land use units (legend).



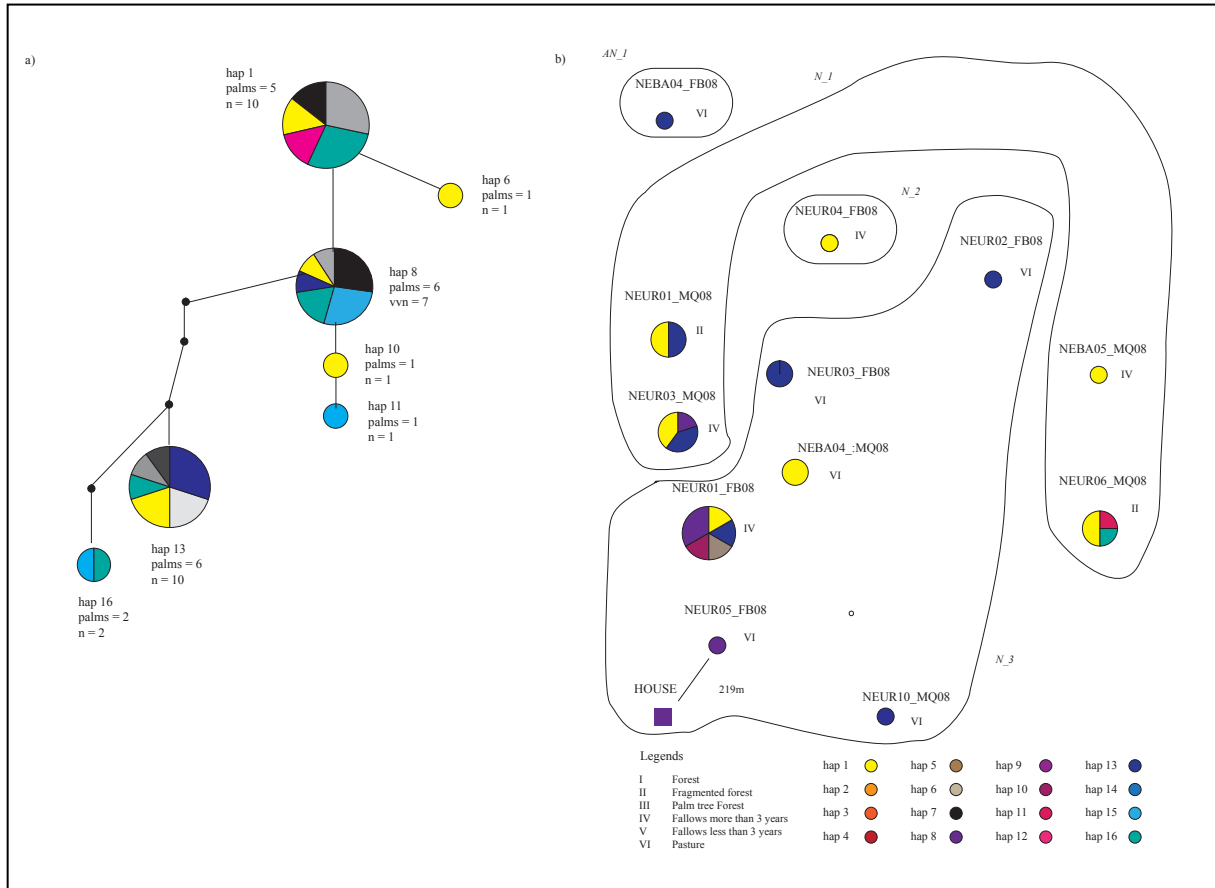
**Figure 3.** Consensus phylogenetic Bayesian tree obtained with haplotypes present in the study. Numbers at nodes are posterior probabilities recovered by the Bayesian analysis. Numbers I to VI represent phylogenetic clades describes by Monteiro *et al.* 2003.



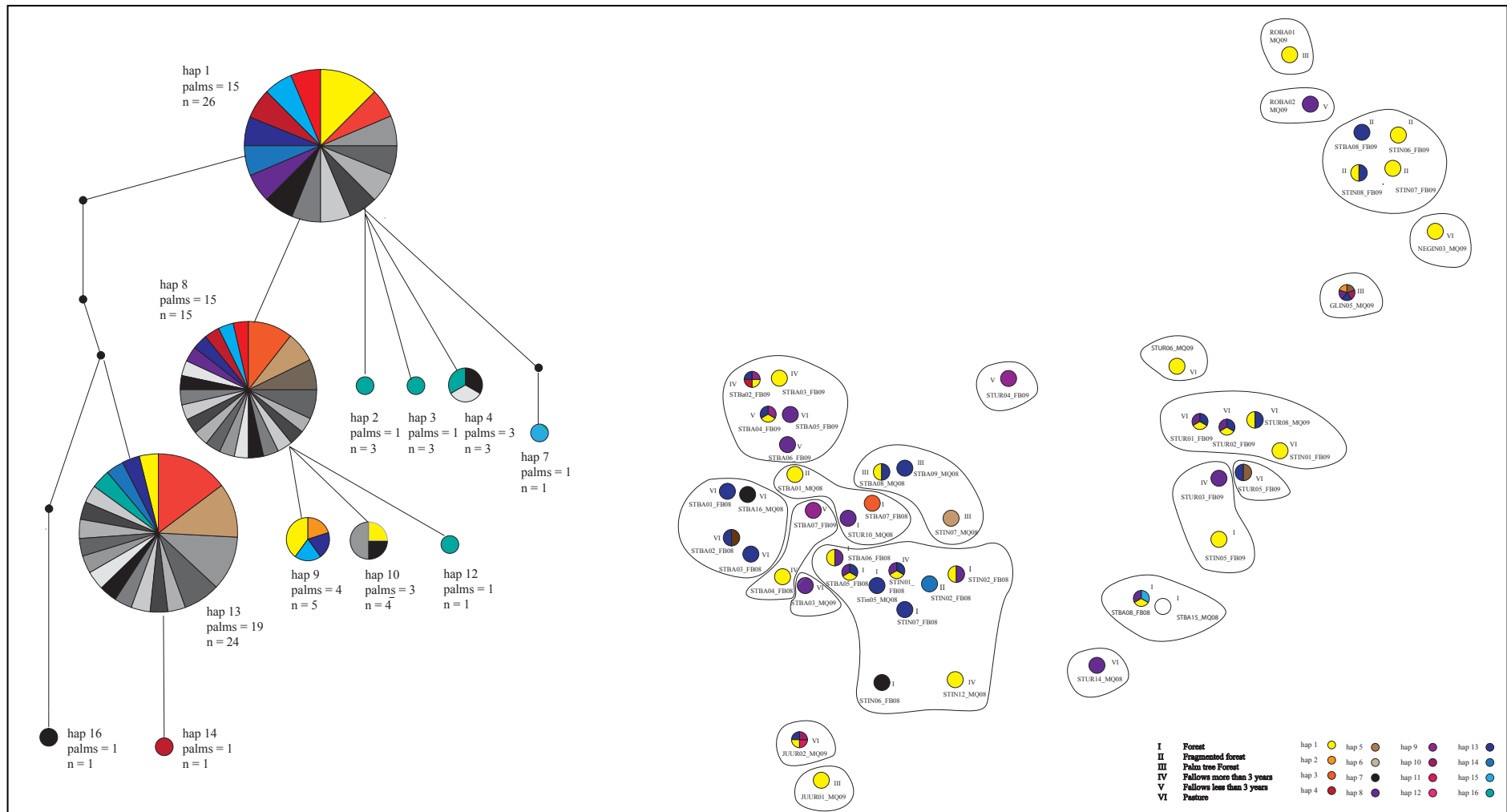
**Figure 4.** *Cytochrome b* parsimony network of all individuals for the three communities. Network circle sizes are proportional to haplotype frequencies.



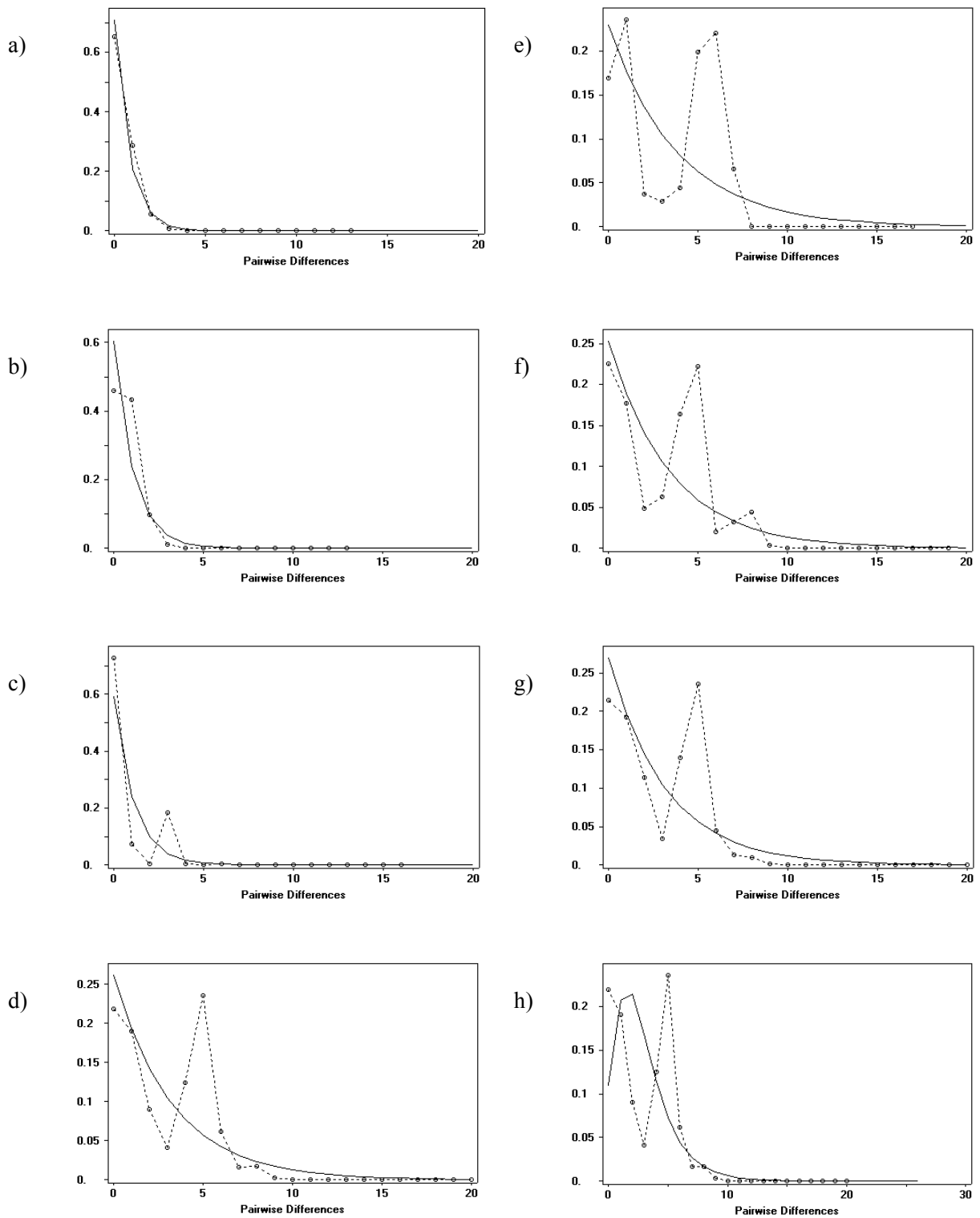
**Figure 5.** a) *Cytochrome b* parsimony network of individuals of Araipá community, colored for palm trees and; b) spatial projection of the haplotypes, colored for haplotypes (legend) within Araipá community, land-use units are indicated with letter code (legend). White dots represent palms with no haplotype identified.



**Figure 6.** a) *Cytochrome b* parsimony network of individuals of Nova Estrela Community, colored for palm trees and house; b) Spatial projection of haplotypes distribution by palms in Nova Estrela community, land-use units are indicated with letter code (legend).

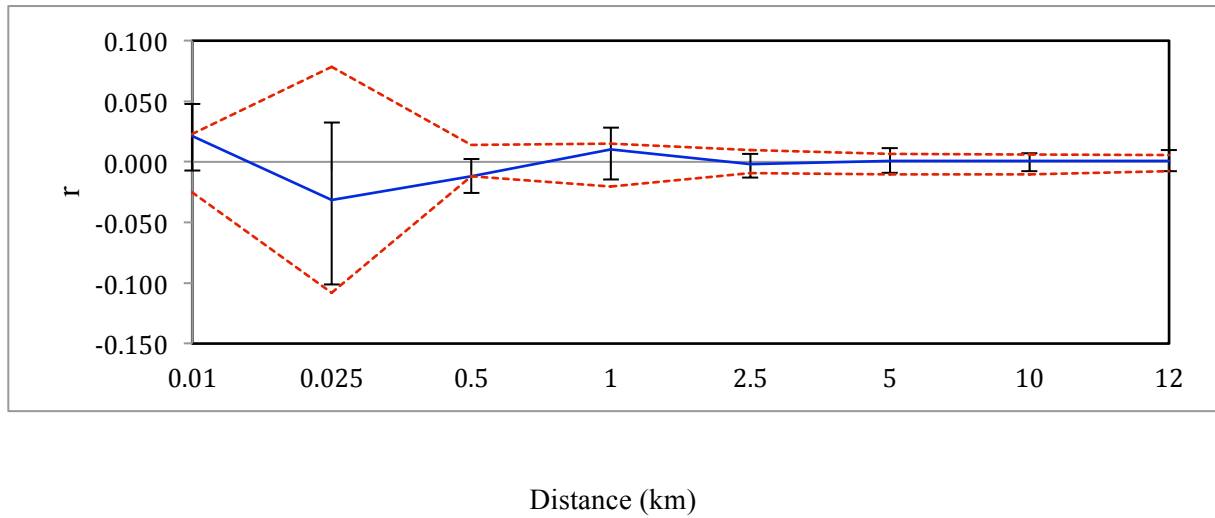


**Figure 7.** a) *Cytochrome b* parsimony network of individuals of Saõ Tomé Community, colored for palm trees; b) Spatial projection of mitochondrial haplotypes in Saõ Tomé community, land-use units are indicated with letter code (legend).



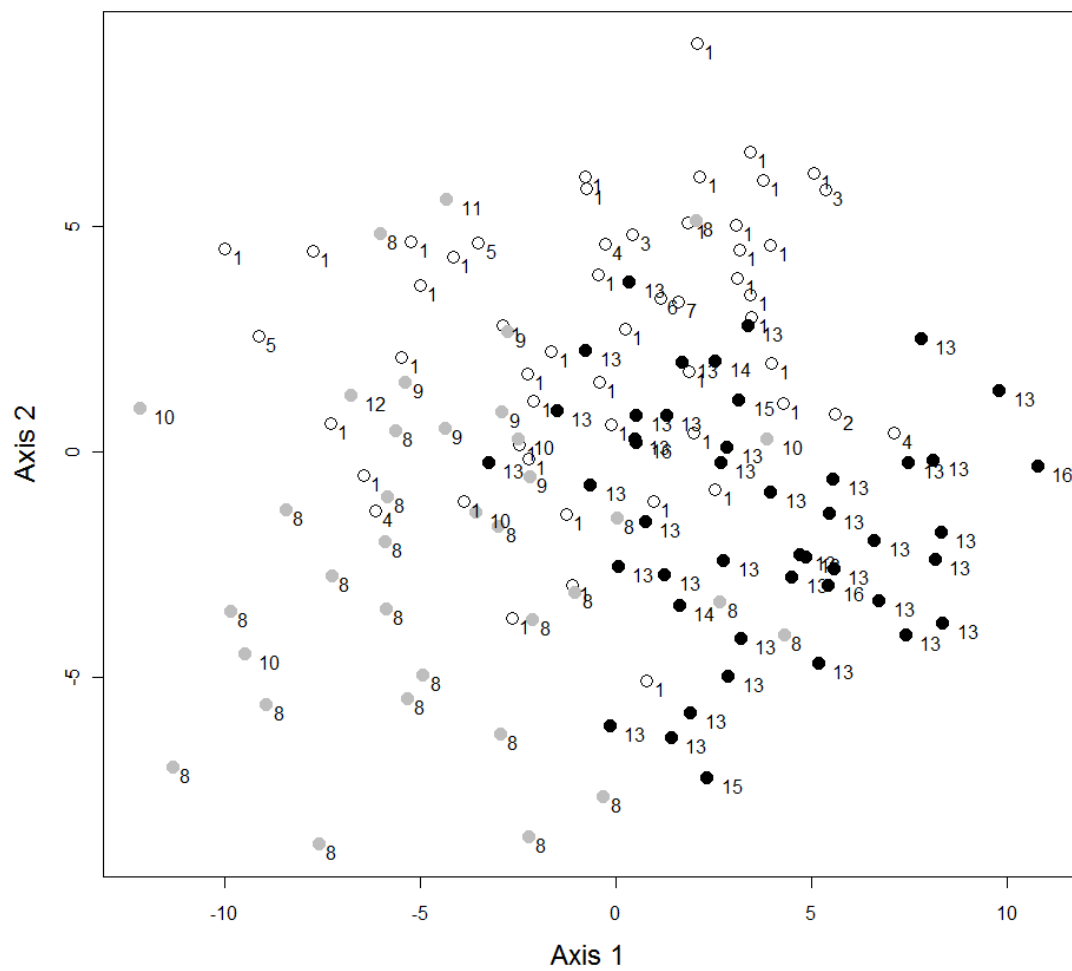
**Figure 8.** Population expansion scenario for phylogroups: a) group 1; b) group 2; c) group 3; and communities e) Araipá; f) Nova Estrela; g) São Tomé and for the global population under d) constant demographic model and h) under expansion model. The expected frequency represented by a continuous line is based on (a, b, c, d, e, f, g) a population constant model and on (h) a growing and

decline model determined using the DNASP v5. program (Librado & Rozas, 2009) The observed frequencies are represented by dotted lines.



**Figure 9.** Spatial autocorrelation analysis results for the adult population. Correlogram shows the combined spatial correlation ( $r$ ) as function of distance in kilometres between the sampled palm trees. 95 CI about the null hypothesis of a random distribution is shown with dotted line.

Note: distance class sizes are 1,25,50,100,250,500,1000,12000m



**Figure 10.** Principate Coordinate Analysis (PCO) between phylogroups and genotypic diversity based on microsatellites, inter-group inertia = 0.017 ( $P = 0.123$ ); white dots = group 1; grey dots = group 2; black dots = group 3.

Haplotype ID	Araipa	Nova Estrela	Sao Tome	km70	km17	Total	14	45	58	71	74	80	83	90	191	203	209	242	260	266	270	272	275	311	329	395
hap 1	6	10	26	0	0	42	T	C	T	A	A	T	C	G	C	T	A	T	G	G	G	A	A	T	C	A
hap 2	0	0	1	0	0	1	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hap 3	1	0	1	0	0	2	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hap 4	0	0	3	0	0	3	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hap 5	2	0	0	0	0	2	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hap 6	0	1	0	0	0	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
hap 7	0	0	1	0	0	1	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
hap 8	1	7	15	0	0	23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
hap 9	0	0	5	0	0	5	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
hap 10	0	1	4	0	0	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.
hap 11	0	1	0	0	0	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	T	.
hap 12	0	0	1	0	0	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.
hap 13	4	10	24	0	0	38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	G	.	C	A	.
hap 14	1	0	1	0	0	2	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G	.	C	A	.
hap 15	2	0	0	0	0	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	C	.	.	.	G	.	C	A	.
hap 16	0	2	1	0	0	3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	C	.	.	.	G	G	C	A	G
hap 17	0	0	0	0	3	3	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hap 18	0	0	0	1	0	1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
All	17	32	83	1	3	136																				

**Table 1.** Variable positions of the 458 bp of the *cytochrome b* gene from the 16 haplotypes of sylvatic *Rhodnius robustus* collected. GenBank accession numbers JN831953-JN831970.

Level	ID	Nb palm	Ns	Nh	ID haplo	HD ± sd	Pi (π ± sd)	teta (θ ± sd)	k	D
Phylogenic	Group 1	41	52	7	<b>1,2,3,4,5,6,7</b>	0.335 ± 0.0068	0.107 ± 0.03	0.353 ± 0.168	0.40	-1.747*
	Group 2	26	35	5	<b>8,9,10,11,12</b>	0.541 ± 0.0076	0.177 ± 0.037	0.260 ± 0.146	0.66	-0.794
	Group 3	28	44	4	<b>13,14,15,16</b>	0.243 ± 0.0068	0.135±0.052	0.305±0.156	0.50	-1.227
Communities	Araipa	10	16	7	<b>1,3*,5,8,13,14,15*</b>	0.817 ± 0.073	0.896 ±0.102	0.808 +/-0.373	3.34	0.406
	Nova Estrela	13	25	7	<b>1,6*,8,10,11,13,16</b>	0.670 ± 0.095	0.711±0.095	0.639 ±0.286	2.65	0.006
	Sao Tome	50	91	12	<b>1,2*,3,4,7*,8,9,10,12*,13,14,16</b>	0.775 ± 0.025	0.705 ± 0.041	0.695 ± 0.254	2.63	-0.162
Land use units	Pasture	19	37	7	<b>1,4,7,8,10,12*,13</b>	0.755 ± 0.036	0.688 ± 0.047	0.450 ± 0.209	2.57	0.985
	Young Fallow	11	13	5	<b>1,8,9,10,13</b>	0.808 ± 0.077	0.646 ± 0.121	0.518 ± 0.276	2.41	0.260
	Old Fallow	17	31	8	<b>1,3,6*,8,10,13,15,16</b>	0.800 ± 0.037	0.762 ± 0.078	0.604 ±0.265	2.84	0.424
	Palm Forest	6	9	7	<b>1,4,5,7,8,9,13</b>	0.806 ± 0.12	0.789 ± 0.198	0.888 ± 0.456	2.94	-0.510
	Fragmented Forest	4	10	5	<b>1,11*,13,14,16</b>	0.800 ± 0.01	1.025 ± 0.138	0.948±0.47	3.82	-0.076
	Forest	16	32	9	<b>1,2*,3,5,8,9,13,14,15</b>	0.800 ± 0.045	0.795 ± 0.063	0.799±0.326	2.97	-0.015
All		73	132	16		0.780 ± 0.021	0.748 ± 0.033	0.835 ± 0.274	2.78	-0.427

**Table 2.** Haplotypic diversity of different population of *Rhodnius robustus* based on mitochondrial cytb sequence data, classified by phylogroups, communities, land use units and sex (adults).

Note: Ns, number of sequences, Nh, number of haplotypes, HD, haplotypic diversity (± standard deviation), Pi, Nucleotide diversity (± standard deviation), teta, Watterson estimator (± standard deviation), k, average number of nucleotide differences, D, Tajima’s neutrality test.

Level			Group 1	Group 2	Group 3
		indices		Nst Nm	
Phylogenic	Group 1	Kxy Dxy		0.665***	0.917***
	Group 2		1.575	0.25	0.05
	Group 3		0.422		0.868***
			5.373	4.374	0.08
			1.440	1.173	
			Araipa	Nova Estrela	Sao Tome
Communities	Araipa	Kxy Dxy		-0.022*	-0.012*
	Nova Estrela		3.09	-23.35	-19.9
			0.675		-0.011
	Sao Tome		2.99	2.806	-45.17
			0.655	0.613	

**Table 3.** Genetic differentiation between Groups and Communities based on mitochondrial cytb sequences data.

Note: Kxy and Dxy (x100) below diagonal, Kxy: Average number of nucleotide differences between populations; Dxy: average number of nucleotide substitution s per site between populations; and Nst and Nm inferred from Nst, above diagonal. Nst: average number of pairwise differences using the Juke and Cantor correction, Nm: number of migrants estimated from Nst values.

Significant values of permutation tests on gene-flow between groups are indicated with \* (pvalues: \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

Land use/land cover classes		Forest	Fragmented forest	Palm forest	Old Fallow	Young Fallow	Pasture
	indices	Nst Nm					
Forest			-0.036	-0.007	-0.023	-0.021	-0.022
Fragmented forest		3.27	-7.14	-36.35	-11.05	-12.01	-11.54
Palm forest	Kxy	0.878		0.028	-0.038	0.002	-0.033
Old Fallow	Dxy	2.93	3.48	8.71	-6.81	109.34	-7.72
Young Fallow		0.787	0.932		0.008	-0.044	0.007
Pasture		2.84	3.21	2.91	32.28	-5.9	35.72
		0.761	0.861	0.781		-0.021	-0.023
		2.63	3.12	2.56	2.57	-12.03	-11.12
		0.706	0.837	0.687	0.689		-0.025
		2.71	3.09	2.77	2.64	2.43	-10.26
		0.726	0.829	0.744	0.709	0.651	

**Table 4.** Genetic differentiation between land-use units based on mitochondrial cytb sequences data.

Note: Kxy and Dxy (x100) below diagonal, Kxy: Average number of nucleotide differences between populations; Dxy: average number of nucleotide substitution s per site between populations; and Nst and Nm inferred from Nst, above diagonal. Nst: average number of pairwise differences using the Juke and Cantor correction, Nm: number of migrantes estimated from Nst values.

Significant values of permutation tests on geneflow between groups are indicated with \* (pvalues: \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). No significant values.

ID	D*	Rs	Fs	$\tau$ (90 CI)	Hri (pvalue)	SSD (pvalue)
Group 1	-0.559 (ns)	0.043	-5.486(0.00)	0.41(0.19-0.85)	0.203(0.48)	0.00004(0.73)
Group 2	-1.041 (ns)	0.089	-1.576(0.09)	0.76(0.39-01.3)	0.121(0.30)	0.008(0.12)
Group 3	1.179 (ns)	0.055	-0.125(0.44)	2.77(0-5.66)	0.495(0.72)	0.021(0.43)
Araipá	0.064 (ns)	0.158	0.008(0.51)	4.25 (0.45- 16.45)	0.088(0.65)	0.050(0.15)
Nova Estrela	0.418	0.144	0.98(0.70)	3.58 (0.92-8.2)	0.086(0.57)	0.034(0.37)
Sao Tome	-0.266(*)	0.083	-1.00 (0.36)	3.228(0.66-9.13)	0.092(0.43)	0.043(0.20)
All	-0.243(ns)	0.077	-2.43(0.17)		0.273 (0.50)	0.01(0.43)

**Table 5:** Statistical test for neutrality, mismatch analysis and the estimate of demographic parameters for phylogroups and communities based on mitochondrial cytb sequence data. Indices: D\* (Fu, 1997); Fs (Fu & Li, 2003); Rs (Roger & Harpending 1992);  $\tau$  = estimator of time divergence; Hri (Harpending 1994); SSD (Schneider *et al.* 2000)

Level		N	Ho	He	Pval	Fis
Phylogenic	Group 1 (n = 53)	5.5	0.557	0.608	0.520	0.084
	Group 2 (n = 35)	5.5	0.526	0.586	0.678	0.104
	Group 3 (n = 46)	5.6	0.590	0.607	0.762	0.029
Communities	Araipa (n = 16)	5	0.657	0.611	0.608	-0.077
	Nova Estrela (n = 32)	5.5	0.536	0.606	0.395	0.117
	Sao Tome (n = 92)	6.1	0.553	0.604	0.490	0.084
	Three comm. (n = 140)	6.3	0.561	0.604	0.565	0.071
	Transamazonian (n = 12)	4.8	0.642	0.635	0.937	-0.011
	Four comm. (n = 152)	6.9	0.567	0.615	0.515	0.077
Land cover/land use classes	Forest (n = 17)	5.2	0.615	0.598	0.684	-0.03
	Fragmented Forest (n = 8)	5.5	0.587	0.607	0.843	0.035
	Palm Forest (n = 8)	4.8	0.637	0.648	0.912	0.017
	Old Fallow (n = 21)	5.5	0.510	0.609	0.228	0.165
	Young Fallow (n = 6)	4.4	0.600	0.621	0.746	0.037
	Pasture (n = 21)	5.3	0.543	0.576	0.683	0.058
All		6.9	0.561	0.604	0.565	0.071

**Table 6.** Global Heterozygosity and Hardy-Weinberg expectation for the ten microsatellites loci, by groups: haplogroups (phylogenic), communities, land use units Indices: *N* means number of alleles, *Ho* observed Heterozygosity, *He* expected Heterozygosity *Pval* Pvalue of HWE estimation, *Fis* inbreeding coefficient.

AMOVA	Group	Fst	% Among group	% Among pop within group	% Within pop	pvalue
<i>cyt B</i>	Groups	0.860	86.72	na	13.28	<0.001***
	Communities	-0.013	-0.29	na	101.29	0.705
	Land-use units	-0.008	-0.8	na	100.8	0.579
	Groups + Comm.	0.860	86.38	0.27	13.34	<0.001***
	Group + Land-use	0.870	85.21	2.46	12.33	<0.001***
	Comm + Land-use	-0.014	0.42	-1.81	101.4	0.687
<i>msat</i>	Groups	0.004	0.36	na	99.64	0.130
	Comm	-0.004	-0.4	na	100	0.967
	Land-use units	0.020	0.2	na	99.8	0.437
	Groups + Comm.	0.054	0.74	-0.68	99.95	0.828
	Group + Land-use	0.063	0.22	0.41	99.37	0.440
	Comm + Land-use	0.000	-0.47	0.18	100.28	0.850
	Patches	0.013	1.33	na	98.67	0.10
Comm + Patches	0.008	-1.06	1.84	99.22	0.11	

**Table 7.** AMOVA, Fixation indices percentage variation explained at each level of analysis, phylogroups, communities, land-use classes, and combination of each, based on mitochondrial *cytb* sequences data and microsatellites loci.

Level		Group 1	Group 2	Group 3
Phylogenic	Group 1			
	Group 2	0.000 inf		
	Group 3	0.000 1099.755	0.013** 19.245	
Communities	Araipa	Araipa	Nova Estrela	Sao Tome
	Nova Estrela	-0.012 inf		
	Sao Tome	-0.004 inf	-0.003 inf	
	Trans	0.076*** 3.06	0.084*** 2.73	0.092*** 2.46

**Table 8.** Microsatellites based linearized Fst and Nm inferred values (below) for pairwise comparisons among groups and communities between the palm trees location (pvalues: \*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001).

Fst	Forest	Fragmented Forest	Palm tree forest	Old fallow	Young fallow
Forest					
Fragmented Forest	0.001 271.09				
Palm tree forest	-0.003 inf	-0.008 inf			
Old fallow	-0.006 inf	-0.001 inf	0.001 366.230		
Young fallow	0.006 38.80	-0.004 inf	-0.004 inf	0.002 140.800	
Pasture	0.008 32.38	0.006 40.21	0.003 82.48	0.003 74.85	0.008 31.01

**Table 9.** Microsatellites based linearized Fst values for pairwise comparisons among land-use units between the palm trees location. (pvalues: \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001) and Nm inferred from Fst.

Fst/Nm	a6	an1	n1	n3	s1	s2	s3	s5	s6	s7	s10	s11	s12	s13
a6														
an1	0.022													
n1	-0.013	0.008												
n3	-0.011	<b>0.075</b>	<b>0.026</b>											
s1	-0.009	0.012	-0.022	<b>0.026</b>										
s2	0.002	-0.026	0.003	0.042	-0.025									
s3	-0.018	-0.032	-0.003	<b>0.057</b>	-0.014	-0.028								
s5	0.000	0.069	-0.030	0.072	-0.009	0.018	-0.011							
s6	-0.008	0.035	-0.007	<b>0.025</b>	0.011	0.015	0.009	0.010						
s7	0.002	0.022	0.029	0.005	0.029	0.041	0.050	0.050	<b>0.049</b>					
s10	-0.004	0.056	0.002	0.010	-0.001	0.043	0.040	0.052	0.011	0.022				
s11	0.020	0.022	0.011	0.078	0.026	-0.004	0.037	0.044	0.052	0.074	0.040			
s12	0.000	0.025	-0.003	0.043	-0.004	0.021	0.000	-0.030	0.020	0.015	0.011	0.086		
s13	-0.014	0.038	-0.009	-0.024	-0.003	0.002	0.017	0.035	0.023	0.002	-0.007	0.040	0.024	
s17	-0.003	0.060	-0.002	0.018	-0.007	0.028	0.038	0.024	0.025	0.037	0.000	0.032	0.023	-0.036

**Table 10.** Microsatellites based linearized Fst values for pairwise comparisons among landuse classes assembled per landscape patches across the three communities and Nm inferred from Fst (significant values of Fst are indicated in bold).

## References

- Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo O N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L (2009) Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 110(2-3): 59-77.
- Abad-Franch F, Monteiro FA (2005) Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc.* 77: 437-454.
- Aguirre A, Dirzo R (2008) Effects of fragmentation on pollinator abundance and fruit set of an abundant understory palm in a Mexican tropical forest. *Biological Conservation* 141: 375–384.
- Aris-Brosous S, Excoffier L (1996) The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution* 13: 494–504.
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol.* 72(11):7098-110.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of bacteriology* 180: 2373-8.
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Q Rev Biol.* 74(1): 21-45.
- Brower AVZ (1994) Rapid morphological radiation and convergence in the butterfly, *Heliconius erato*, inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 6491– 6495.
- Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Opin Genet Dev* 3: 939–943.
- Castro MC, Barrett TV, Santos WS, Abad-Franch F, Rafael JA (2010) Attraction of Chagas disease vectors (Triatominae) to artificial light sources in the canopy of primary Amazon rainforest. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8): 1061-4.
- Clément M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Coura JR. (2006) Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 113-7.
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS & Miles MA (2002) Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology* 18, 171–176.
- Da Silva FM, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Añez N, Shaw JJ, Stevens JR, Teixeira MM (2004) Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129(5): 549-61.

- Diotaiuti L, Dias JCP (1984) Occorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 293-301.
- Dumonteil E, Tripet F, Ramirez-Sierra MJ, Payet V, Lanzaro G, Menu F (2007) Assessment of *Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatan peninsula of Mexico using morphometry and microsatellite markers. Am J Trop Med Hyg. 76: 930–937.
- Espino CI, Gómez T, González G, do Santos MF, Solano J, Sousa O, Moreno N, Windsor D, Ying A, Vilchez S, Osuna A (2009) Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). Appl Environ Microbiol. 75(2): 547-50.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14 : 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.
- Feliciangeli MD, Dujardin JP, Bastrenta B, Mazzarri M, Villegas J, Flores M, Muñoz M (2002) Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? Trop. Med. Int. Health 7: 280–287.
- Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Martinez C, Gonzalez D, Coleman P (2003) Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. Trends Parasitol 19: 44–49.
- Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA (2008) Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise ruralhouses. PLoS Negl Trop Dis. 2008 Apr 2;2(4):e210.
- Fitzpatrick S, Watts PC, Feliciangeli MD, Miles MA, Kemp S (2009) A panel of ten microsatellite loci for the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Infection, Genetics and Evolution. 9(2): 206–209.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915-925.
- Fu YX & Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693-709.
- Gaggiotti OE, Couvet D (2003) Spatial Genetic Structure, pp. 229-243 in Evolutionary Conservation Biology, edited by R. Ferrier, U. Dieckman, D. Couvet, and R. Buerger, Cambridge University Press, Cambridge.
- Goudet J (2001) FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. University of Lausanne, Dorigny, Switzerland.
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.
- Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology 66: 591-600.

- Harry M, Galindez I, Cariou ML (1992) Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Med Vet Entomol.* 6(1): 37-43.
- Harry M, Poyet G, Romaña CA, Solignac M (1998) Isolation and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens*. *Mol. Ecol.* 7: 1784- 1786.
- Harry M, Roose CL, Vautrin D, Noireau F, Romaña CA, Solignac M (2008) Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae), and their applicability to *Rhodnius* species. *Infect Genet Evol.* 8(3): 381-5.
- Henderson A, Galeano G Bernal, R (1995) *Field Guide to the Palms of the Americas*. Princeton: Princeton University Press, 363 p.
- Hochberg Y (1988) A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 75: 800-802.
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011-2014.
- Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Justi SA, Noireau F, Cortez MR, Monteiro FA (2010) Infestation of peridomestic *Attalea phalerata* palms by *Rhodnius stali*, a vector of *Trypanosoma cruzi* in the Alto Beni, Bolivia. *Trop Med Int Health* 15(6): 727-32.
- Lees AC, Peres CA (2008) Conservation value of remnant riparian forest corridors of varying quality for amazonian birds and mammals. *Conserv Biol.* Apr;22(2):439-49
- Lent H & Wygodzinsky P (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163 (New York).
- Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Lopez DC, Jaramillo C, Guhl F (2007) Population structure and genetic variability of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: reduviidae) from different geographic areas of Colombia. *Biomédica* 27 (1): 28-39.
- Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM (1999) Mitochondrial DNA sequence variation among Triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-386.
- Lynch M & Crease TJ (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol. Biol. Evol.* 7 : 377-394.
- Maddison DR & Maddison WP (2000) *MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution*. Sunderland: Sinauer Associates

- Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Coura JR, Añez N, Teixeira MM (2007) Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol* 16:3361-73.
- Matias A, de la Riva J, Martinez E, Torrez M, Dujardin JP (2003) Domiciliation process of *Rhodnius stali* (Hemiptera: Reduviidae) in Alto Beni, La Paz, Bolivia. *Trop Med Int Health* 8(3): 264-8.
- Mitja D & Ferraz I (2001) Establishment of babassu in pastures in Pará, Brazil. *Palms* 45(3): 138-147.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB, 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12: 997–1006.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89: 2699-2702.
- Pavan MG & Monteiro FA (2007) A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Int Health* 12: 751-758.
- Peakall R & Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-289.
- Pérez de Rosas AR, Segura EL, Garcia BA (2007). Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Mol Ecol* 16(7): 1401-1412.
- Pérez de Rosas AR, Segura EL, Fichera L, Garcia BA (2008). Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. *Genetica* 133: 247-260.
- Pérez de Rosas AR, Segura EL, García BA (2011) Molecular phylogeography of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* in Argentina. *Heredity* 107(1): 71-9.
- Pizarro JC, Gilligan LM, Stevens L (2008) Microsatellites reveal a high population structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *PLoS Neglect Trop Dis* 2 (3), e202.
- PLUPH (2010) Welcome to the PLUPH project. Online. <<http://www.pluph.uqam.ca>>.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959.

- Quartier M, Braga, Delaître E, Dias FBS, Oestreicher JS, Rozon C, Davidson R, Harry M, Romaña C (2012) Chagas disease spatial environmental risk for amazonian human communities at a local scale based in land cover-land use and *Attalea* palm trees species occurrence (in prep.).
- Ramos-Onsins SE & Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248-249.
- Richer W, Kengne P, Cortez MR, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Noireau F (2007) Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Trop. Med. Int. Health* 12 (6), 759–764.
- Romaña CA, Pizarro JCN, Rodas E, Guilbert E (1999) Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 594-595.
- Romaña CA, Emperaire L, Jansen AM (2003) Conceptual and methodologic approaches for the study of the interactions between environment and health: the case of the American Trypanosomiasis *Cadernos de Saúde Pública* 19(4): 945-953.
- Romana CA (2007) O controle da tripanossomiase americana requer vigilância ecologica e social da emergencia do risco. In Teixeira A., Doença de Chagas e evolução, Ed. UnB/Finatec, 309 pp.
- Rogers AR & Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.
- Rosaz J & Librado, P (2009) DNAsp v5: a software for comprehensive analysis of polymorphism data. *Bioinformatic* 25 (11): 1451-1452.
- Rousset F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Eco. Resources* 8: 103-106.
- Slatkin M (1995) A Measure of Population Subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Takezaki N & Nei M (2008) Empirical Tests of the Reliability of Phylogenetic Trees Constructed With Microsatellite DNA. *Genetics* 178: 385-392
- Valente SAS, Valente VC, Fraiha-Neto H (1999) Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Suppl.I): 395-8.

- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535-538.
- Vandergast AG, Bohonak AJ, Weissman DB, Fisher RN (2007) Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmatidae: *Stenopelmatus*). *Mol Ecol* 16(5): 977-992.
- Vasconcelos HL, Vilhena JMS, Magnuson WE, Albernaz LKM (2006) Long-term effects of forest fragmentation on Amazon ant communities. *Journal of Biogeography* 33: 1348-1356.
- Whitlock MC & McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}$  not equal to  $1/(4Nm + 1)$ . *Heredity* 82(Pt 2): 117-25.
- Zhao L, Zhang J, Liu Z, Funk SM, Wei F, Xu M, Li M (2008) Complex population genetic and demographic history of the Salangid, *Neosalanx taihuensis*, based on cytochrome b sequences. *BMC Evol Biol* 8: 201-219.



## 4. Discussion Générale

Cette discussion a pour point de départ les résultats généraux du travail replacés dans le contexte des connaissances actuelles sur l'évolution des scénari épidémiologiques de la Maladie de Chagas en milieu tropical humide face aux perturbations anthropiques. Les techniques utilisées sont reprises l'une après l'autre afin de décrire de quelle manière elles nous ont permis de répondre aux objectifs spécifiques et finalement quelques questions toujours ouvertes sont abordées et des aspects méthodologiques sont proposés pour y répondre.

### **Impact des perturbations anthropiques**

Les perturbations anthropiques et particulièrement la fragmentation forestière sont souvent liées à l'émergence et la ré-émergence de certaines maladies (Foley *et al.*, 2005 ; Patz *et al.*, 2004 ; Brownstein *et al.*, 2005). Dans le cadre du projet PLUPH, il s'agissait d'étudier l'impact des activités de culture sur un jeune front pionnier d'Amazonie, et de comparer les différents types d'appropriation du sol entre trois communautés rurales du moyen Tapajós ayant des époques d'installation et des stratégies d'occupation de l'espace différentes afin de comprendre par quelles mécanismes ces activités de cultures agissent sur le risque d'exposition de la transmission de la Maladie de Chagas.

Par ce travail, des nouvelles données sont fournies sur la structure et le fonctionnement du cycle de transmission de la Maladie de Chagas en Amazonie concernant la distribution des vecteurs et des trypanosomes, leur variation génétique ainsi que l'identification des hôtes potentiels, des vecteurs et des réservoirs des parasites.

Dans le cas de la maladie de Chagas, la plupart des hypothèses se rejoignent sur le fait que les perturbations anthropiques, particulièrement la déforestation résultent en une perte de la biodiversité des hôtes réservoirs, et donc une perte de l'effet de dilution (Ostfeld & Keesing, 2000). L'effet de dilution décrit l'effet tampon qu'une biodiversité élevée peut avoir contre la transmission de certaines pathologies zoonotiques par différents mécanismes, soit en réduisant la densité de population d'un important réservoir naturel pour le pathogène, soit en réduisant la densité de population de vecteurs pathogènes (par pression de prédation) ou

encore en réduisant la probabilité de rencontre entre les vecteurs et les réservoirs (Keesing *et al.*, 2006 ; Ostfeld, 2009).

Lors de la déforestation initiale, les densités des populations de triatomes sont diminuées mais certains individus survivent à l'intérieur de la couronne des palmiers, les palmiers eux-mêmes pouvant survivre au feu (Voecks & Vinha, 1988 ; Tomlinson, 1979). L'ouverture du couvert forestier favorise ainsi la prolifération des palmiers, biotope favorable aux insectes et aux mammifères opportunistes et anthropophiles (ex. *Didephis marsupialis*) (Olifiers *et al.* 2005). A l'intérieur de la couronne des palmiers, les populations résiduelles de triatomes augmentent. La forte densité de population peut être à l'origine d'une diminution de l'accessibilité à la ressource trophique induisant des vols actifs plus fréquents ce qui augmente ainsi le risque de transmission (Schofield *et al.*, 2009 ; Aguilar *et al.*, 2007 ; Abad *et al.*, 2005 ; Teixeira *et al.*, 2001). De nombreux auteurs ont mis en évidence une augmentation de la densité des populations de triatomes en zones déforestées et rurales (Pizarro & Romaña, 1998 ; Gurgel-Goncalvez *et al.*, 2004 ; Abad-Franch *et al.*, 2006, 2010 ; Gottdenker *et al.*, 2011).

Dans la région du Tapajós, la diminution des densités de triatomes et de l'infection dans les zones les plus anthropisées (pâturages et jeunes jachères) ainsi que l'absence de l'infection chez les insectes à Araipá, reflètent les différences d'âge des peuplements humains et la situation d'un front pionnier assez jeune. Ainsi, malgré la petite échelle de la zone d'étude (12km), trois situations différentes ont été observées. En observant les deux communautés les plus anciennes (Nova Estrela et SãoTomé), on remarque qu'au fil du temps, le cycle de *T. cruzi* se perpétue et/ou se rétablit.

A SãoTomé, le cycle de *T. cruzi* a probablement toujours existé dans l'environnement direct car le type d'aménagement du territoire, caractéristique d'une colonisation riveraine, est très fragmenté. En effet, malgré une occupation plus ancienne, les zones de forêts fragmentées sont proches des maisons, placées en ligne au bord de la rivière. La connectivité entre tous les milieux est spatialement préservée par un effet de juxtaposition des différentes parcelles de type de paysage.

A Nova Estrela, le noyau du village est centré au bord de la route, bordée elle-même de pâturages. Les activités sont centrées sur l'élevage et la conversion rapide des espaces forestiers en pâtures. Les jachères et les fragments de forêts sont repoussés toujours plus loin par rapport au centre du village, à l'extrémité des parcelles. Par contre, les palmiers subsistent.

Ce deuxième type d'aménagement, très mathématique et organisé, se spatialise sous forme d'arêtes de poissons sur les images satellites (Arima *et al.*, 2005), ce qui est typique de la colonisation organisée à partir des grands axes routiers en Amazonie. Le cycle de *T. cruzi* existe en zone ouverte (pâturages et jachères).

A Araipá, qui est la communauté la plus récente des trois, bien que située au bord du lac intérieur, le type d'occupation de l'espace ressemble plus au type de Nova Estrela, avec un noyau central, le village, et des pâturages encerclant le village. Les jachères et les fragments forestiers sont également repoussés au plus loin par rapport centre du village et au bord de la route conduisant à Nova Estrela. L'absence de l'infection à *T. cruzi* chez les insectes à Araipá peut s'expliquer par plusieurs raisons: (i) parmi les trois espèces d'*Attalea* étudiées, seule l'espèce *A. maripa* est observée. Or cette espèce possède une particularité structurale (base des pétioles dénudée) et peu d'amoncellement de matière organique qui probablement les rendent moins propice à la colonisation d'hôtes vertébrés et à celles des vecteurs du fait d'une plus grande vulnérabilité pour les populations résidant à l'intérieur de la couronne, (ii) les palmiers observés sont plus jeunes et plus bas que les palmiers rencontrés dans les autres communautés (habitats également moins propices à la colonisation d'hôtes et de vecteurs), (iii) les activités anthropiques sont récentes. On peut supposer que ces perturbations ont affecté les populations d'hôtes vertébrés de plus grande taille, réservoirs de *T. cruzi* et que seules quelques colonies d'insectes se maintiennent sur des petits hôtes vertébrés qui ne sont pas infectés. Cependant, la présence des vecteurs, et ce dans toutes les unités de paysage, fait craindre un rétablissement du cycle de *T. cruzi* si un ou plusieurs hôtes infectés s'établissent dans cette zone.

### Utilisation de la télédétection en épidémiologie

Les outils d'analyse spatiales tels que les systèmes d'information géographique (GIS/SIG), la télédétection et la modélisation des niches écologiques sont de plus en plus utilisés pour améliorer la capacité à évaluer les relations entre les facteurs environnementaux, l'écologie des vecteurs et la transmission des maladies vectorielles (Kitron, 1998). Ces outils ont été utilisés pour définir la distribution de vecteurs de maladies telles que la malaria (revu par Machault *et al.*, 2011), les trypanosomiasés africaines (Bouyer *et al.*, 2006), la maladie de Lyme (Brownstein *et al.*, 2003 ; 2005) et la maladie de Chagas (Costa *et al.*, 2002 ; Gorla *et al.*, 2002, 2009 ; Dumonteil & Gourbières, 2004 ; Arboleda *et al.*, 2009 ; Carbajal de la Fuente *et al.*, 2009 ; Gurgel-Gonçalves & Cuba, 2009 ; Parra-Henao *et al.*, 2011).

Généralement ce type d'analyse repose sur la covariance entre la présence et/ou l'abondance des insectes avec les variables bioclimatiques géographiques ou paysagères (à petite échelle), via des régressions multiples. Ensuite ne sont retenues que les variables qui expliquent le mieux l'abondance des insectes. Ainsi, au Mexique par exemple, l'abondance de *Triatoma dimidiata* est associée positivement aux zones d'agriculture et de pâturages et négativement aux zones de forêts et de mangroves (Dumonteil & Gourbières, 2004). Dans le cas de *Rhodnius pallescens*, Arboleda *et al.*, (2009) ont conclu que le déficit de pression de vapeur (calculée à partir des données brutes d'un senseur météorologique (Hay, 2000)) est la variable principale qui explique la distribution du vecteur en Colombie.

Cependant, la grande majorité de ces prédictions sont basées sur des paramètres environnementaux et climatiques et ne prennent pas en compte l'écotopie spécifique de l'espèce considérée, lequel lui fournit les conditions microclimatiques idéales, malgré les modifications de l'environnement. Ceci est particulièrement important dans le cas des espèces de *Rhodnius* où la répartition des espèces doit être mise en relation avec la distribution des palmiers. Gurgel-Gonçalves & Cuba en 2009 ont utilisé les techniques de modélisation de la niche écologique afin de prédire la distribution de *R. neglectus* au Brésil. Les auteurs ont aussi comparé la distribution de l'insecte avec la distribution de quatre espèces de palmiers et de deux espèces d'oiseaux, *R. neglectus* présentant un comportement fortement ornithophile. Ils ont ainsi démontré que la distribution de l'espèce coïncidait avec celle de deux espèces de palmiers (*Acrocomia aculeata* et *Syagus olearacea*) ainsi qu'avec celles des oiseaux (Furnariidae).

Ainsi, l'hypothèse que le palmier est un indicateur paysager de la distribution des espèces de *Rhodnius* est validée. L'approche développée dans ce travail considère les palmiers comme objets intégrateurs c'est-à-dire qu'ils sont à la fois des indicateurs paysagers de la perturbation anthropique et de la présence potentielle des vecteurs sylvatiques (Romaña *et al.*, 1999) et de leurs hôtes vertébrés. L'approche focalisée sur le palmier se base sur le fait que les insectes et les parasites ont été retrouvés dans toutes les unités de paysage et sa validité est ensuite confirmée par les résultats obtenus en génétique des populations qui démontrent que les populations d'insectes ne sont pas structurées par le paysage. La cartographie du risque environnemental développée dans le premier article fait apparaître une distribution homogène des classes de présence probable des palmiers dans l'environnement, sans illustrer toutefois les niveaux de complexités observés dans les différentes communautés. C'est pourquoi il est possible de parler de risque environnemental et non pas de risque

épidémiologique car malgré la quantité de données obtenues sur le système, quelques informations manquent pour la prédiction des estimations de densité de vecteurs, de leur infection ainsi que du risque de transmission dans les différentes unités de paysage, localement et globalement.

En effet, les données concernant les densités réelles des palmiers dans les différentes unités de paysage n'ont pas été étudiées. Cette information nécessite un nombre important d'observations et de mesures sur le terrain. De plus, l'obtention de ces données est dépendante des différents propriétaires des lots qui n'ont pas tous le même comportement face aux palmiers, ni même face aux différentes espèces de palmiers. Par exemple, de par la structure de son stipe, *A. maripa* est plus facilement abattu que *A. phalerata*. Certains auteurs ont essayé de cartographier directement le palmier mais les approches développées nécessitent en plus des images satellites, des photographies aériennes et de la vidéo digitale (Thalès, 2001 ; Espírito Santo & Shimabukuro, 2005). De plus des difficultés à reconnaître le palmier en zone de jachères mixtes persistent en raison de l'association du palmier avec d'autres espèces végétales (da Silva *et al.*, 2009). Il a donc été utilisé la cartographie des unités de paysage/utilisation du sol, pour parvenir à cartographier la probabilité de présence de palmiers en hautes et moyennes densités.

### **Dispersion de *Rhodnius robustus* en milieu fragmenté**

Ensuite, l'estimation de la dispersion des insectes vecteurs est capitale dans la prédiction du risque de contact, ainsi que dans l'élaboration de méthodes de lutttes anti-vectorielles appropriées. La génétique des populations apporte des informations sur les flux géniques qui nous renseignent sur les dynamiques de dispersion (Whitlock & McCauley, 1999).

Généralement la fragmentation du milieu a un impact négatif sur la plupart des espèces sylvatiques (Brown & Brown, 1992). Cependant, il apparaît clairement, dans ce travail, que dans le cas des espèces de *Rhodnius*, les palmiers assurent aux insectes une connectivité fonctionnelle leur permettant de s'affranchir de la fragmentation forestière. Les données de génétique de populations utilisant les marqueurs microsatellites révèlent l'absence de restriction de flux géniques entre les différentes unités du paysage et entre les communautés. Ainsi, la dynamique des populations d'insectes suit celle des palmiers, là où les palmiers subsistent et prolifèrent, les populations d'insectes persistent et s'établissent. Les effets de "bottleneck" (goulet d'étranglement) observés à l'aide du marqueur mitochondrial

(*cytochrome b*) dans les pâturages et les jeunes jachères confirment que les effectifs de *Rhodnius* sont dans un premier temps diminués, mais qu'ils se rétablissent.

### Relation insectes – hôtes

Le palmier représente également l'interface de contact entre les triatomes et les hôtes. Cependant les prédictions de l'effet de la fragmentation sur les différentes espèces d'hôtes de *T. cruzi* demeurent pour le moment difficile en Amazonie car peu d'études ciblées sur les hôtes de *T. cruzi* y sont menées et des hétérogénéités micro-régionales existent et peuvent subsister. L'absence de foyers d'infection par *T. cruzi* à Araipá est très probablement liée à la diminution des hôtes potentiels, dérangés par les perturbations récentes et les activités intenses de brûlis. Ainsi, l'impact de la fragmentation sur les populations d'hôtes réservoirs reste un point clef pour la prédiction de l'évolution des scénarii épidémiologiques. Nos observations quant à la distribution des hôtes sont ici sous-estimées car uniquement 25,74 % de repas sanguins ont été identifiés et nous pouvons uniquement formuler des hypothèses basées sur la comparaison avec d'autres régions et en intégrant des informations éparses quant à la situation réelle en Amazonie (Teixeira *et al.*, 2001 ; Coura *et al.*, 2002 ; Maia da Silva *et al.*, 2008 ; Aguilar *et al.*, 2007 ; Fe *et al.*, 2009 ; Valente *et al.*, 2009). De manière générale, la transformation de la forêt primitive en aire de pâturage résulte en la prolifération d'habitats favorables pour de nombreuses espèces généralistes (Olifiers *et al.*, 2005) et diminue la pression de prédation exercée par de plus grands mammifères carnivores (Lyra-Jorge *et al.*, 2010).

Dans la partie Est de l'Amazonie brésilienne, considérée comme représentative de l'occupation humaine récente et typique de la colonisation future de la zone restante si les pratiques actuelles persistent, *Alouatta belzebul* a disparu de certains sites (Ayres, 1978 ; Lopes & Ferrari, 2000) et les singes plus petits, *Cebus spp* ont totalement disparu (Lopes & Ferrari, 2000).

Cependant, la réduction de densité des hôtes sauvages peut aussi conduire les triatomes à se nourrir sur les animaux domestiques, bétail, poules, cochons, chiens. Des repas sanguins pris sur *Bos Taurus* (Vache) et *Canis familiaris* (Chien) ont été détectés par amplification du gène 12S de vertébré chez des individus de *Rhodnius pallescens* prélevés à l'intérieur des palmiers *Attalea butyracea* au Panama (Gottdenker, 2009). Valente *et al.* 1998

ont constaté une forte association entre les porcs domestiques (*Scus scrofa*) et une autre espèce d'insecte vecteur répandue en Amazonie, *Panstrongylus geniculatus* dans la région du delta de l'Amazone (Marajo). En Amazonie, les porcs sont cependant souvent élevés assez loin des maisons à l'ombre des fragments forestiers, et la séroprévalence à *T. cruzi* peut atteindre 72.4 % et jusque à 41.7 % chez les chiens (Roque *et al.* 2008).

Les résultats ont aussi indiqué que la probabilité d'infection des insectes par *T. cruzi*, augmente avec la diversité des hôtes, lorsque plus de deux mammifères sont détectés sur un même palmier. Cependant la permanence d'un nombre réduit d'espèces adaptées à l'anthroposystème, ainsi que la contamination des animaux domestiques suffisent au maintien du cycle en zone péri-domestique (Pineda *et al.*, 2011).

En Argentine, dans le grand Chaco (forêt subtropicale sèche), la situation inverse est observée, avec une diminution de l'infection par *T. cruzi* chez les hôtes réservoirs (opossums et mouffettes des Andes) du fait de campagnes d'insecticides qui ont maintenu les populations de *Triatoma infestans* domestiques et péri-domestiques en basse densité et de la déforestation massive autour des villages qui a conduit à la réduction de la population d'opossums en faveur d'hôtes moins compétents pour la maintenance du cycle de *T. cruzi* (Ceballos *et al.*, 2006). L'effet de dilution dépend donc des espèces d'hôtes impliquées dans chaque foyer de transmission de *T. cruzi* et l'impact des perturbations anthropiques doit être évalué sur chacune d'elles.

### ***Rhodnius* dans l'habitat humain ?**

La dispersion favorise les insectes à entrer en contact avec les humains mais également avec les structures péri-domiciliaires (poulaillers, porcheries) ou domiciliaires et de ce fait, augmente la possibilité de domiciliation.

La domiciliation est considérée comme une tendance généralisée au sein des triatomines (Schofield *et al.*, 1999) et à l'exception de l'espèce *Rhodnius prolixus* qui est principalement domiciliée, de nombreuses espèces de *Rhodnius* pourtant inféodées aux palmiers démontrent une tendance à envahir les domiciles. Une femelle fécondée atteignant un domicile peut y pondre des œufs, la colonisation qui peut en découler dépend alors de : (i) la présence d'un substrat idéal pour la ponte, (ii) de conditions microclimatiques adéquates pour la maturation de l'œuf puis de l'éclosion et (iii) enfin d'alimentation adéquate pour le développement de la nymphe (Abad-Franch *et al.*, 2010).

En Equateur *R. ecuadoriensis* démontre de fortes aptitudes à coloniser l'habitat humain (Grijalva *et al.*, 2005), tout comme *R. pallescens* au Panama (Calzada *et al.* 2006, Pineda *et al.*, 2008). Au sein du groupe « prolixus/robustus », *R. nasutus*, qui naturellement colonise les palmiers Carnauba (*Copernicia prunifera*) au Brésil, a été également capturé en milieu domestique et péri-domestique (Sarquis *et al.*, 2006, 2011 ; Dias *et al.*, 2011) et *R. neglectus* est capable de se reproduire à l'intérieur des maisons (de Oliveira & Silva, 2007 ; Gurgel Goncalves *et al.*, 2008) ainsi que *R. stali* en Bolivie (Matias *et al.*, 2003).

*R. pictipes* et *R. robustus* sont retrouvés tous les deux à l'intérieur des domiciles à Manaus (Amazonas) ainsi que dans les palmiers avoisinants (Miles *et al.*, 1983 ; Coura *et al.* 2002, Fe *et al.* 2009) mais ces deux espèces n'ont jamais démontré de capacité à former des colonies à l'intérieur des domiciles (Abad-Franch *et al.*, 2009). *R. pictipes* est l'espèce la plus décrite en association avec des micro-épidémies locales en Amazonie (Miles *et al.*, 1983 ; Cabrera *et al.*, 2010). *R. robustus* et *R. pictipes* sont fréquemment trouvés en sympatrie, comme c'est le cas dans cette étude. Cependant *R. pictipes* avait un nombre réduit d'individus. Il est cependant probable que *R. pictipes* soit plutôt associé à une autre espèce de palmiers *Acrocomia sclerocarpa* (Mucajá) (Miles *et al.*, 1983 ; Gaunt & Miles, 2000) qui n'a pas été pris en compte dans cette étude.

En Amazonie, nous sommes confrontés à des vecteurs sylvatiques qui ne peuvent pas être contrôlés par des campagnes traditionnelles d'insecticides, et de plus les pratiques de déforestation favorisent la prolifération et le maintien de leur écotope principal (Briceño Leon *et al.*, 2008 ; Romana *et al.*, 2007). Des tentatives de lutte préventive ont été réalisées en Colombie et au Venezuela contre les invasions de *R. robustus* et de *R. prolixus* sylvatiques où des moustiquaires, des rideaux et des écrans imprégnés de pyréthroides provoquent 100% de mortalité chez les insectes invasifs (Kroeger *et al.*, 2003).

En forêt atlantique, Leite *et al.* (2011) ont tenté d'observer si la dégradation de l'environnement stimulait ou non la domiciliation des triatomes. Comme dans notre étude, ces auteurs ont trouvé des densités de triatomes plus élevées dans les milieux moins dégradés, et suggèrent que ces plus grandes densités d'insectes favorisent les indices de dispersion et d'invasions potentielles de domiciles. Cette situation correspond à ce que nous avons observé à São Tomé, cependant le seul insecte à l'intérieur d'un domicile qui a été détecté par un habitant, a été trouvé à Nova Estrela dans une habitation située à 210m de palmiers infestés d'insectes.

D'un point de vue génétique, les flux géniques continus entre les différents paysages peuvent s'avérer positifs dans le maintien du cycle enzootique préférentiellement dans le milieu naturel, seulement les habitations se trouvent dans la répartition naturelles des insectes, au sein du paysage entre les différents palmiers. La proximité de palmiers autour des maisons ainsi que les sources lumineuses peuvent favoriser l'invasion des insectes à l'intérieur des maisons (Barghini *et al.*, 2011 ; Roux *et al.*, 2011). Dans les trois communautés, l'électricité est fournie par des génératrices individuelles ou communautaires. Généralement l'électricité est fournie quotidiennement entre 18h et 21h et les propriétaires qui possèdent une génératrice individuelle l'utilisent pour regarder la télévision tard le soir, ceci pouvant favoriser l'attraction des triatomes.

Nous avons observé que les palmiers assuraient aux vecteurs et au système épidémiologique une connectivité globale, et la structure génétique des populations de *Rhodnius* n'est pas affectée par la fragmentation du paysage dans les trois communautés à l'exception de Nova Estrela où l'on observe un effet de l'ouverture de la forêt sur les populations.

L'analyse de parenté en cours (itérations de COLONY, n=5'000 000) pourra nous donner des indications plus fines quant à la dispersion des individus palmier par palmier.

### **Conclusion**

En 2011, les institutions de surveillance de la déforestation, l'INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Institut National de Recherche spatiale) et AMAZON (Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia, Institut de l'Homme et de l'Environnement en Amazonie) ont enregistré une augmentation de la déforestation, notamment dans l'état du Pará, par rapport à l'année 2010. Cette année 2010 était une année record pour le plus bas taux de déforestation enregistré depuis le début des suivis annuels mis en place dans les années 1980. Depuis 2004, le renforcement des lois sur le " code forestier " (Loi 4771/ 65) qui oblige les propriétaires terriens à maintenir 80% de leurs terres comme réserve forestière, a provoqué une diminution des taux annuels de déforestation. L'augmentation observée en 2011 fait suite à la révision de cette loi (Tollefson, 2011) et les experts prévoient la légalisation de la déforestation de 220 000 km<sup>2</sup> de forêt. Le paysage amazonien est donc en perpétuel mouvement ; les hétérogénéités et la complexité des foyers de transmissions de la maladie de Chagas au sein du biome amazonien, les conditions de vie des petits agriculteurs et les

*scenarii* locaux doivent être replacés dans le cadre plus global de l'évolution politique et agricole de l'Amazonie.

Le travail ici présenté démontre que la dynamique invasive des palmiers *Attalea* assure aux vecteurs et à certains réservoirs vertébrés de *T. cruzi* une connectivité fonctionnelle lors de la fragmentation de la forêt amazonienne et il en résulte, avec le temps, une forte situation d'exposition pour les populations locales. L'observation à la fois d'un gradient écologique et temporel a permis d'évaluer qu'au fil du temps, malgré les perturbations anthropiques, le cycle de *T. cruzi* se rétablit. Ainsi une surveillance à plus long terme ciblée sur les populations de vecteurs et d'hôtes au travers de divers gradients d'anthropisation est nécessaire, cette étude représentant un point de départ pour la compréhension des processus d'émergence de l'aléa et du risque de contact entre les vecteurs et les populations humaines.

Certaines questions concernant la caractérisation plus fine du risque d'exposition restent à être résolues, notamment la dispersion à petite échelle des individus (de palmier à palmier), ainsi que l'influence spatiale de l'arrangement des fragments forestiers sur les risques d'invasion des domiciles.

Malgré le nombre de pays et de régions concernés par la présence de populations de triatomines sylvatiques associés aux palmiers, aucune approche de lutte intégrée n'a été développée contre la prolifération des palmiers, les systèmes de santé locaux étant pour l'instant focalisés uniquement sur les déclarations obligatoires d'apparition de cas aigus.

Il devient donc urgent de proposer des solutions concrètes d'aménagement du territoire afin de limiter le risque d'exposition pour les populations rurales d'Amazonie.

## V. Références Bibliographiques

- Abad-Franch F, Aguilar V HM, Paucar C A, Lorosa ES, Noireau F (2002) Observations on the domestic ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 97(2): 199-202.
- Abad-Franch F, Monteiro FA (2007) Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. Mem Inst Oswaldo Cruz 102 (Suppl.1): 57–69.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo O N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L. (2009) Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). Acta Trop.110 (2-3): 159-77.
- Abad-Franch F, Ferraz G, Campos C, Palomeque FS, Grijalva MJ (2010) Modeling Disease Vector Occurrence when Detection Is Imperfect: Infestation of Amazonian Palm Trees by Triatomine Bugs at Three Spatial Scales. PLoS Negl Trop Dis. 4(3): e620.
- Abba AP Lara-Ruiz G (2009) Members Of The International Union For Conservation Of Nature And Natural Resources Species Survival Commission Edentate Specialist Group. 2008. *Tamandua tetradactyla*. In International Union for Conservation of Nature and Natural Resources 2009. IUCN Red list of threatened species. Version 2009.1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR (2007) Chagas disease in the Amazon region. Mem Inst Oswaldo Cruz 102 (Suppl.1): 47–55.
- D'Alessandro A (1976) Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), Biology of Kinetoplastida, vol. 1. Academic Press, London, pp. 327-403.
- Altschul SF, Madden ML, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- AMCHA (2005) Iniciativa dos países amazônicos Pará a vigilância e o controle da doença de Chagas. Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). Conclusiones y recomendaciones generales 2a. Reunión de la Iniciativa Intergubernamental de Vigilancia y Prevención de la Enfermedad de Chagas en la Amazonía (AMCHA) (Cayenne, Guayana Francesa). En ligne: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/dch-amcha-2-recom.pdf>.
- Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM (2002) *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of Parasite clonal populations. Exp Parasitol 100: 269-275.
- Añez N, Nieves E, Cazorla D (1987) Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 82(1):1-6.

- Anonyme (1999) Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94: 429-432.
- Araújo CA, Waniek PJ, Jansen AM (2009) An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 9(3): 227-34.
- Arima EY, Walker RT, Perz SG, Caldas M (2005) Loggers and Forest Fragmentation: Behavioral Models of Road Building in the Amazon Basin. Annals of the Association of American Geographers 95(3): 525-541.
- Ayres JM (1978) A situação atual da área de ocorrência do cuxiu preto (*Chiropotes satanas satanas*, Hofmannsegg, 1807). Instituto Nacional de Pesquisa de Amazonia. Manaus-Amazonas. Brazil.
- D'Ascoli A & Gómez-Núñez JC (1966) Notes on the dispersion methods of *Rhodnius prolixus* Stal. Acta Cient Venez 17(1): 22-25.
- Baker WL (2001) The r.le Programms. A set of GRASS programs for the quantitative analysis of landscape structure. Department of Geography and Recreation University of Wyoming Laramie, U.S.A. ([http://grass.fbk.eu/gdp/landscape/r\\_le\\_manual5.pdf](http://grass.fbk.eu/gdp/landscape/r_le_manual5.pdf))
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl Environ Microbiol. 72(11):7098-110.
- Barghini A & de Meideros BAS (2010) Artificial Lighting as a Vector Attractant and Cause of Disease Diffusion Environmental Health Perspectives 118 (11) :| 1503-1506.
- Barretto MP, Albuquerque DRR, Funayama GK (1969) Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVI: investigação sobre triatomíneos de palmeiras no município de Uberaba, MG, Brazil. Rev Bras Biol 29(4): 577-588.
- Bastos CJ, Aras R, Mota G Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araújo EG, Prazeres J, Grassi MF (2010) Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 15;4(6):e711.
- Bento DN, Farias LM, Godoy MF, Araújo JF (1992) The epidemiology of Chagas' disease in a rural area of the city of Teresina, Piauí, Brazil. Rev Soc Bras Med 25(1): 51-8.
- Bérenger JM & Blanchet D (2007) A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guyana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 733-736.
- Béranger JM & Pagès F (2007). Les Triatomínés : une domestication qui se généralise. Med Trop 67: 217-222.
- Bosseno MF, García LS, Baunaure F, Gastelúm EM, Gutierrez MS, Kasten FL, Dumonteil E, Brenière SF (2006) Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex minixon polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 74(2): 303-305.

- Bouyer J, Guerrini L, Desquesnes M, de la Rocque S, Cuisance D (2006) Mapping African Animal Trypanosomosis risk from the sky. *Vet Res*37(5): 633-45.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of bacteriology* 180: 2373-2378.
- Brenière SF, Pietrokovsky S, Gastelum EM, Bosseno MF, Soto MM, Ouaiissi A, Kasten FL, Wisnivesky-Colli C (2004) Feeding patterns of *Triatoma longipennis* Usinger (Hemiptera, Reduviidae) in peridomestic habitats of a rural community in Jalisco State, Mexico. *J Med Entomol* 41: 1015-1020.
- Briceno-Leon R (2007) Chagas disease and globalization of the Amazon. *Cad Saude Publica* 23(1): 33-40.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B (1999) The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 104: 219-232.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M (2000) Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol.* 11(1): 95-105
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 31(11): 1218-1226.
- Brouard C, de Valk H, Pillonel J (2007) pour le groupe de travail Afssaps, EFS, INTS, InVS. Estimation quantitative du risque de contamination d'un don de sang par des agents infectieux. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 50-55.
- Brown KS Jr & Brown GG (1992) Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. *Tropical deforestation and species extinction* (ed. by T.C. Whitmore and J.A. Sayer), 119-142. Chapman and Hall, London.
- Brownstein JS, Holford R, Fish D (2003) A climate-based model predicts the spatial distribution of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in the United States. *Environ Health Perspect* 111: 1152-1157.
- Brownstein JS, Skelly DK, Holford TR, Fish D (2005) Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. *Oecologia*146(3):469-475.
- Buscaglia CA, Di Noia JM (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* 5: 419-427.
- Cabrera R, Vega S, Cáceres AG, Ramal AC, Alvarez C, Ladera P, Pinedo R, Chuquipiondo G (2010) Epidemiological investigation of an acute case of Chagas disease in an area of active transmission in Peruvian Amazon region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52(5): 269-272.
- Calzada JE, Pineda V, Montalvo E, Alvarez D, Santamaría AM, Samudio F, Bayard F, Cáceres L, Saldaña A (2006) Human Trypanosome infection and the presence of

- intradomicile *Rhodnius pallescens* in the Western Border of the Panama Canal, Panama. *Am J Trop Med Hyg* 74: 762-765.
- Camarão AP, Rodrigues Filho JA, Rischkowsky B, Hohnwald S, Clecio M (2000) Botanical Composition and Quality of Enriched and Traditional Pastures in Northeastern Pará, Brazil. German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems, Hamburg, September 3-8, 2000.
- Carbajal de la Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Noireau F, Lazzari CR, Lorenzo MG. (2007) Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Trop.* 101(2):115-119.
- Carbajal de la Fuente AL, Porcasi X, Noireau F, Diotaiuti L, Gorla DE (2009) The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae) with environmental variables recorded by remote sensors. *Infect Genet Evol.* (1):54-61.
- Carcavallo RU, Galindez Girón I, Jurberg J, Lent H (1997) Bibliographic checklist of the American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). In: Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, vol.1. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro: 15-52.
- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C (2000) Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomología y Vectores* 7 (Supl. 1): 1-99.
- CARUSO <http://www.unites.uqam.ca/gmf/caruso/caruso.htm>. Consulté le 1er octobre 2011
- Castro MC, Monte-Mor RL, Sawyer DO, Singer BH (2006) Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2452–2457.
- Castro MC, Barrett TV, Santos WS, Abad-Franch F, Rafael JA (2010) Attraction of Chagas disease vectors (Triatominae) to artificial light sources in the canopy of primary Amazon rainforest. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8): 1061-4.
- Ceballos LA, Vazquez-Prokopec GM, Cecere MC, Marcet PL, Gürtler RE (2005) Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop* (2): 149-59.
- Chagas C (1909) Nova tripanozomiose humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1(2): 159-218.
- Chagas C (1924) Infection naturelle des singes du Pará (*Crysotrix sciureus*) par *Trypanosoma cruzi*. *C R Soc Biol (Paris)* 90: 873.
- Clément M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9(10): 1657-1660.
- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF (2007) Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infect Genet Evol* 7: 587-593.

- Cortez M, Silva MR, Neira I, Ferreira D, Sasso GRS, Luquetti AO, Rassi A, Yoshida N (2006) *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect* 8: 36-44.
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC (2003) The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 443-449.
- Costa J, Argolo AM, Felix M (2006) Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-52.
- Costa J & Felix M (2007) *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
- Costa L, Weksler M, Bonvicino C (2008) *Oecomys roberti*. In IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.
- Costa J & Lorenzo M (2009) Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(Suppl. I): 46-51.
- Coura JR, Viñas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465(7301): 6-7.
- Coura JR (2007) Chagas disease: what is known and what is needed a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl 1): 113-22.
- Coura JR (2006) Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 (Suppl. 3): 113-117.
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS & Miles MA (2002) Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology* 18: 171-176.
- Coura JR & de Castro SL (2002b) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
- Covarrubias C, Cortez M, Ferreira D, Yoshida N (2007) Interaction with host factors exacerbate *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol* 37: 1609-1616.
- Cruz-López L, Malo EA, Rojas JC, Morgan ED (2001) Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Med Vet Entomol* 15(4): 351-317.
- Cuba CA (1998) Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop* 31(2): 207-220.
- Cura CI, Mejia-Jaramillo AM, Duffy T (2010) *Trypanosoma cruzi* I genotypes indifferent geographic regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the spliced leader genes. *Int J Parasitol* 40: 1599-1607.
- De Meeûs T, McCoy KD, Prugnolle F (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to “débuser la bête”. *Infect Genet Evol* 7: 308-332.

- Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM (1984) *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 513-515.
- Deane LM (1964) Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brasil. Rev Bras Malariol Doenças Trop 16: 27-48.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist Nucleic Acids Research 36 (Web Server Issue):465-469.
- Dias JP, Bastos C, Araújo E (2008) Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Rev Soc Bras Med Trop. 41: 296-300.
- Dias Stehling Braga, F. (2010) Aspectos ecológicos da Tripanosomíase Americana em comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil, e riscos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* às populações humanas da região. Thèse de doctorat. Centre de Recherche René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, Brésil
- Dias FB, Paula AS, Belisário CJ, Lorenzo MG, Bezerra CM, Harry M, Diotaiuti L (2011) Influence of the palm tree species on the variability of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Infect Genet Evol in press.
- Diotaiuti L & Dias JCP (1984) Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 293-301.
- Diotaiuti L, Bezerra CM, Ferraz ML, Gomes A (2009) Transmissão do *Trypanosoma cruzi* por espécies secundárias. Rev Soc Bras Med Trop 42 (Suppl 2): 100-102.
- Dujardin JP (1998) Population genetics and the natural history of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz 93: 34-36.
- Ekkens DB (1981) Nocturnal flights of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) in Sabino Canyon, Arizona. J Med Entomol 18: 211-227.
- Espirito Santo FDB & Shimabukuro YE (2005). Validação do mapeamento de uma área de floresta tropical com o uso de imagens de vidiografia aérea e dados de levantamento de campo. Revista Árvore 29(2): 277-239.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14 : 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131: 479-491.
- Excoffier L (2003) Analysis of Population Subdivision. In: Balding D, Bishop M, Cannings C, editors. Handbook of Statistical Genetics. 2nd Edition. New York: John Wiley and Sons, Ltd, 713-750.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.

- Fahrig L (1998) When does fragmentation of breeding habitat affect population survival? *Ecol Model* 105: 273-292.
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34: 487-515.
- Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MG (2009) Occurrences of triatomines in wild and domestic environments in the municipality of Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(6): 642-646.
- Fearnside PM (2005) Deforestation in Brazilian Amazonia: History, Rates, and Consequences. *Conservation Biology* 19(3): 680-688.
- Feliciangeli MD, Dujardin JP, Bastrenta B, Mazzarri M, Villegas J, Flores M, Muñoz M (2002) Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? *Trop Med Int Health* 7(3):280-287.
- Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Martinez C, Gonzalez D, Coleman P, Davies C, (2003) Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean Region and beyond. *Trends Parasitol.* 19 :44-49.
- Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, Jansen AM, Cupolillo E, Campbel DA (1999). Populational heterogeneity of Brazilian Trypanosoma cruzi isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 195-197.
- Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA (2008) Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2(4):e210.
- Fitzpatrick S, Watts PC, Feliciangeli MD, Miles MA, Kemp SJ (2009) A panel of ten microsatellite loci for the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol* 9(2): 206-209.
- Foley JA, Defries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Ramankutty N, Snyder PK (2005) Global consequences of land use. *Science* 309(5734):570-574.
- François O, Ancelet S, Guillot G (2006) Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics* 174: 805-816.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Fu YX & Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J (2003) A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographic distribution, with nomenclature and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Galvão C & Angulo VM (2006) *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241: 61-68.

- Gamboa JC (1973) La población silvestre de *Rhodnius prolixus* en Venezuela. Arch Venez Med Trop Parasit Med 5: 321-352.
- Garcia ES, Genta FA, de Azambuja P, Schaub GA (2010) Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol 26(10): 499-505.
- Gaunt M & Miles M (2000) The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 95(4): 557-65.
- Gaunt MW, Veo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GAJ, Acostak N, Ariask AR, Miles MA (2003) Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 421: 936-939.
- Gini C (1912) Variabilità e mutabilità. Studi Economico-Giuridici dell'Università di Cagliari, Università di Cagliari. 3: 1-158.
- Gonçalves EC, Silva A, Barbosa MSR, Schneider MPC (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in Amazonian red-handed howlers *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini). Mol Ecol Notes 4: 406-408.
- Gorla DE & Schofield CJ (1989) Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine Chaco. Med Vet Entomol 3: 179-194.
- Gorla DE (2002) Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Ecol Austral 12: 117-127.
- Gottdenker NL (2009) Effects of anthropogenic landuse change on the ecology of the Chagas Disease agent *Trypanosoma cruzi*. Dissertation of the University of Georgia. Athens, Georgia.
- Gottdenker NL, Calzada JE, Saldaña A, Carroll CR (2011) Association of anthropogenic land use change and increased abundance of the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* in a rural landscape of Panama. Am J Trop Med Hyg 84(1): 70-77.
- Goudet J (2001) FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. University of Lausanne, Dorigny, Switzerland.
- Grijalva MJ, Palomeque-Rodríguez FS, Costales JA, Davila S, Arcos-Teran L (2005) High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. J Med Entomol 42(1): 68-74.
- Guerenstein PG & Lazzari CR (2009) Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. Acta Trop. 110: 148-158.
- Guhl F & Marinkelle CJ (1982) Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. Ann Trop Med Parasitol 76:361.
- Guhl F & Vallejo GA (2003) *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 435-442.
- Guhl F, Pinto N, Aguilera G (2009) Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz 104 (Suppl. 1): 71-75.

- Hanski I & Simberloff D (1997) The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. In: Hanski I, Gilpin ME (eds) *Metapopulation biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 5-26.
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series* 41: 95-98.
- Hardy GH (1908) MENDELIAN PROPORTIONS IN A MIXED POPULATION. *Science*. 1908 Jul10;28(706):49-50.
- Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66: 591-600.
- Harry M, Galindez I, Cariou ML (1992) Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R.robustus* and *R.pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Med Vet Entomol.* 6(1): 37-43.
- Harry M (1993) Isozymic data question the specific status of some blood-sucking bugs of the genus *Rhodnius*, vectors of Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(4): 492.
- Harry M (1994) Morphometric variability in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Jpn J Genet.* 69(3): 233-50.
- Harry M, Roose CL, Vautrin D, Noireau F, Romaña CA, Solignac M (2008) Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae), and their applicability to *Rhodnius* species. *Infect Genet Evol* 8(3): 381-385.
- Hay SI (2000) An overview of remote sensing and geodesy for epidemiology and public health application. *Adv. Parasitol.* 47, 2–36.
- Henderson A, Galeano G, Bernal R (1995) *Field Guide to the Palms of the Americas*. Princeton: Princeton University Press, 363.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM (2005) *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park “Serra da Capivara”, and its surroundings (Piauí, Brazil), endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 379-388.
- Herrera C, BARGUES MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F (2007) Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol* 7(4): 535-539.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hypergéó (2004) GDR Libergéo –En ligne: <http://www.hypergeo.eu>.
- Jackson Y, Chappuis F, Loutan L (2008) Chagas disease in Switzerland: managing an emerging infection and interrupting its transmission. *Rev Med Suisse* 4(157): 1212-1214.
- Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H (2009) Congenital transmission of chagas disease in latin american immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis* 15: 601–3.

- Jackson Y, Chappuis F (2011) Chagas disease in Switzerland: history and challenges. *Euro Surveill* 16 (37).
- Jaeger JAG (2000) Landscape division, splitting index, and effective mesh size: new measures of landscape fragmentation. *Landscape Ecology* 15: 115-130.
- Jansen AM & Roque ALR (2011) Domestic and Wild Mammalian Reservoirs dans American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier (S&T): 249-276.
- Jimenez ML & Palacios C (2002) Life cycle and reproductive and feeding behavior of *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions in Baja California Sur, Mexico. *Southwest. Entomol.* 27: 65-72.
- Jorge MLSP (2008) Effects of forest fragmentation on two sister genera of Amazonian rodents (*Myoprocta acouchy* and *Dasyprocta leporina*). *Biol Conserv* 141: 617-623.
- Justi SA, Noireau F, Cortez MR, Monteiro FA (2010) Infestation of peridomestic *Attalea phalerata* palms by *Rhodnius stali*, a vector of *Trypanosoma cruzi* in the Alto Beni, Bolivia. *Trop Med Int Health* 15(6): 727-32.
- Kawashita SY, Sanson GFO, Fernandes O, Zingales B, Briones MRS (2001) Maximum-Likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol* 18: 2250-2259.
- Kowalewski MM, Gillespie TR (2009) Ecological and anthropogenic influences on patterns of parasitism in free-ranging primates: a meta-analysis of the Genus *Alouatta*. In: Estrada A, Garber P, Strier K, Bicca-Marques J, Heymann E, editors. *South American Primates: testing new theories in the study of primate behavior, ecology, and conservation*. New York: Springer. 433-461.
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS (2006) Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett* 9: 485-498.
- Kierszenbaum F, Gottlieb CA, Budzko DB (1981) Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Parasitol.* 67: 656-660.
- Kitron U (1998) Landscape ecology and epidemiology of vector-borne diseases: Tools for spatial analysis. *J Med Entomol* 35: 435-445.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(16):6196-6200.
- Lavergne A, Douady C, Catzeflis FM (1999) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) *Mol Ecol* 8 (3): 517-518.
- Lazzari CR & Lorenzo MG (2009) Exploiting triatomine behavior: alternative perspectives for their control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(Suppl.1): 65-70.
- Leite GR, Biral dos Santos C, Falqueto A (2011) Influence of the landscape on dispersal of sylvatic triatomines to anthropic habitats in the Atlantic Forest. *J Biogeogr* 38: 651-663.

- Lent H & Wygodzinsky P (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Amer Mus Nat Hist vol 163. New York.
- Lescure FX, Canestri A, Melliez H, Jaureguiberry S, Develoux M (2008) Chagas disease, France, Emerg Infect Dis 14: 644-646.
- Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA (2009) Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. Am J Trop Med Hyg 81: 1041-1049.
- De Lima MG & Gascon C (1999) The conservation value of linear forest remnants in central Amazonia Biol Conserv 91: 241-247.
- Lisboa CV, Mangia RH, Rubião E, de Lima NRC, Xavier SCC, Picinatti A, Ferreira, LF, Fernandes O, Jansen AM (2004) *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brasil. Acta Trop 90: 97-106.
- Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM. (2006) Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. Parasitology 133(5): 603-11.
- Llewellyn MS & Miles MA (2010) Who, how, what and where? Nature Outlook Chagas Disease, 465: S8-S9.
- Lopes MA, Ferrari SF (2000) Effects of human colonization on the abundance and diversity of Mammals in Eastern Brazilian Amazon. Conservation Biology 14(6): 1658-1665.
- Luz C, Fargues J, Romaña CA, Moreno J, Goujet R, Rougier M, Grünewald J (1994) Potential of entomopathogenic Hyphomycetes for the control of Triatominae vectors of Chagas Disease in Proceedings of the VIth International Colloquium on invertebrate pathology and microbial control: 272-275. Montpellier, France.
- Luz C, Fargues J, Grünewald J (1999) Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under constant and cyclic conditions of temperature and humidity. Mem Inst Oswaldo Cruz 94(3): 403-9.
- Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM (1999) Mitochondrial DNA sequence variation among Triatomine vectors of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 60: 377-386
- Lynch M & Crease TJ (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. Mol. Biol. Evol. 7 : 377-394.
- Lyra-Jorge MC, Ribeiro MC, Ciocheti G, Tambosi LR, Pivello VR (2010) Influence of multi-scale landscape structure on the occurrence of carnivorous mammals in a human-modified savanna, Brazil. Eur J Wildl Res 56: 359-368.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ (2004) *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 1-12.

- Machault V, Vignolles C, Borchi F, Vounatsou P, Pages F, Briolant S, LacauxJP, Rogier C (2011) The use of remotely sensed environmental data in the study of malaria. *Geospat Health* 5(2): 151-68.
- Maia da Silva F, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, D'Affonseca Neto JA, Naiff MF, Franco AM, Campaner M, Valente V, Valente SA, Camargo EP, Teixeira MM, Miles MA (2008) Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop* 107(2): 168-73.
- Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Coura JR, Añez N, Teixeira MM (2007) Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol*. 16:3361-73.
- Málaga S & Yoshida N (2001) Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun*. 69(1):353-359.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM (2009) *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* and inhumans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* 39: 615-623.
- Marcon E (2011) Mesures de la biodiversité:  
<http://www.ecofog.gf/Docs/PFDA/MesuresBiodiversite.pdf>
- Martinez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B, Vidaurre P (2007) *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stal, 1859. *Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo* 3: 1-11.
- Miles MA, SouzaA, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ (1978) Isoenzyme heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in the Amazon Brazil. *Nature* 272: 819–821.
- Miles MA, Pova MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS (1981) Chagas's disease in the Amazon Basin: Ii. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75(5): 667-74.
- Miles MA, Arias JR, de Souza AA (1983) Chagas' disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* triatomine vectors of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78(4): 391-8.
- Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR (2003) Science, medicine, and the future. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 326: 1444-1448.
- Minoli SA & Lazzari CR (2006) Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Trop*. 97: 324–330.

- Moncayo A, Silveira AC (2009) Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 17-30.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB (2003) Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12: 997-1006.
- Montgomery GG (1985) Movements, foraging and food habits of the four extant species of Neotropical vermilinguas (Mammalia: Myrmecophagidae). Pp. 365–377 in *The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas* (G. G. Montgomery, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Morales L, Romero I, Diez H, Portillo PD, Montilla M, Nicholls S, Puerta C (2002) Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp Parasitol* 102: 72–80.
- Mortara RA, Silva S, Araguth MF, Blanco SA, Yoshida N (1992) Poly-morphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect. Immun.* 60: 4673-4678.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Nóbrega, AA, Garcia, MH, Tatto, E, Obara MT, Costa E, Sobel, J, Araujo WN (2009) Oral transmission of Chagas disease by Consumption of Acai Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Disease*. 15 (4): 653-655.
- Noireau F, Brenière SF, Ordonez J, Cardozo L, Morochi W, Gutierrez T, Bosseno MF, Garcia S, Vargas F, Yaksic N, Dujardin JP, Peredo C, Wisnivesky-Colli C (1997) Low probability of transmission of *Trypanosoma cruzi* to humans by domiciliary *Triatoma sordida* in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 653–656.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F (2000) Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(1): 23-7.
- Noireau F, Abad-Franch F, Valente SAS, Dias-Lima A, Lopes CM, Cunha V (2002) Trapping Triatominae in sylvatic habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 61-63.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM (2009) *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res* 40: 26.
- Olifiers N, Gentile R, Fiszon JT (2005) Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest, *Braz J Biol* 65: 495-501.
- de Oliveira AW, da Silva IG (2007) Geographical distribution and indicators entomologic of sinantropic triatomines captured in the State of Goiás]. *Rev Soc Bras Med Trop* 40(2): 204-8.
- OPS: Organización Panamericana de la Salud (2006) Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Panamericana de la Salud OPS/HDM/CD/425-06.

- Ortiz I & Molina J (2009) Preliminary evidence of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Triatominae) attraction to human skin odour extracts. *Acta Trop.* 113: 174–179.
- Ostfeld RS & Keesing F (2000) The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can J Zool* 78: 2061-2078.
- Ostfeld RS (2009) Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. *Clin Microbiol Infect.* 15(Suppl 1): 40-43.
- Oszwald J, Lefebvre A, Arnault de Sartre X, Thalès M, Gond V (2010) Analyses des directions de changement des états de surface végétaux pour renseigner la dynamique du front pionnier de maçaranduba (Pará, Brésil) entre 1997 et 2006. *Revue Télédétection* 2: 97-111.
- PAHO (2011) Pan American Health Organisation. En ligne <http://www.paho.org>.
- Parra-Henao G, Segura A, Jaramillo N, Alexander N (2011) Use of geographical information systems and remote sensing tools for the generation of predictive models of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) distribution in Colombia. *Biomédica* 31(3): 284-287.
- Patterson BD (1994) Accumulating knowledge on the dimensions of biodiversity: systematic perspectives on Neotropical mammals. *Biol Letters* 2: 79-86.
- Patz JA, Daszak P, Tabor GM, Aguirre AA, Pearl M, Epstein J, Wolfe ND, Kilpatrick AM, Foufopoulos J, Molyneux D, Bradley DJ (2004) Working Group on Land Use Change and Disease Emergence. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ Health Perspect* 112(10): 1092-8.
- Pavan MG & Monteiro FA (2007) A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Int Health* 12: 751-758.
- Pavia PX, Vallejo GA, Montilla M, Nicholls RS, Puerta CJ (2007) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone h2a/sire and the sno-rna-cl1 genes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49: 23-30.
- Peakall R & Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-289.
- Pentreath VW (1995) Trypanosomiasis and the nervous system. *Pathology and immunology. Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 9-15.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA (2009) Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 72: 441-46.
- Peres CA (2001) Synergistic effects of subsistence Hunting and Habitat Fragmentation on Amazonian Forest Vertebrate. *Biol Conserv* 15 (6): 1490-1505.
- Pérez de Rosas AR, Segura EL, García BA (2007) Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Mol Ecol.* 16(7):1401-1412.

- Pineda V, Montalvo E, Alvarez D, Santamaría AM, Calzada JE, Saldaña A (2008) Feeding sources and trypanosome infection index of *Rhodnius pallescens* in a Chagas disease endemic area of Amador County, Panama. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 113-116.
- Pineda V, Saldaña A, Monfante I, Santamaría A, Gottdenker NL, Yabsley MJ, Rapoport G, Calzada JE (2011) Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Vet Parasitol* 178(3-4): 360-363.
- Pinto AY, Harada GS, Valente VC (2001) Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop.* 34:413-419.
- PintoAY, ValenteAS, ValenteVC, Ferreira Junior AG, Coura JR (2008) Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region. Study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:602-614.
- Pipkin AC (1968) Domiciliary reduviid bugs and the epidemiology of Chagas' disease in Panama (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomo* 5: 107-124.
- Pizarro JC & Stevens L (2008) A new method for forensic DNA analysis of the blood meal in chagas disease vectors demonstrated using *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *PLoS One.* 2008;3(10):e3585.
- PLUPH (2010) «Welcome to the PLUPH project». Online. <http://www.pluph.uqam.ca>.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet.* 6(11):847-59.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Prata A (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959.
- Rabinovich JE & Nieves EL (2011) Vital statistics of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) under laboratory conditions: III. *Rhodnius neglectus*. *J Med Entomol.* 48(4):775-87.
- Ramos-Onsins SE & Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.
- Rassi A, Rassi A Jr, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* 375(9723): 1388-402.
- Remme JHF, Feenstra P, Lever PR, Medici AC, Morel CM, Noma M, Ramaiah KD, Richards F, Seketeli A, Schmunis G, van Brakel WH, Vassall A (2006) Tropical Diseases Targeted for Elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, EvansDB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Washington (DC): World Bank; 2006. Chapter 22.

- Rogers DJ, Randolph SE, Snow RW, Hay SI (2002) Satellite imagery in the study and forecast of malaria. *Nature* 415: 710-715.
- Rolón M, Vega MC, Román F, Gómez A, Rojas de Arias A (2011) First Report of Colonies of Sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, Using a Trained Dog. *PLoS Negl Trop Dis* 5(5): e1026.
- Romaña CA, Pizarro JCN, Rodas E, Guilbert E (1999) Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 594-595.
- Romaña CA, Emperaire L, Jansen AM (2003) Conceptual approaches and methodological proposals for the study of interactions between environment and health: application to a research program on American trypanosomiasis. *Cad Saude Publica* 19(4): 945-953.
- Romaña CA (2007) O Controle da Tripanossomíase Americana Requer Vigilância Ecológica e Social da Emergência do Risco. Dans *Doença de Chagas e evolução*, sous la direction d' A. R. L. Teixeira, p. 233-251. Brasília: UnB/Finatec.
- Roque AL, Xavier SC, da Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PS, Jansen AM (2008) *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg.*79(5):742-749.
- Roux E, Fátima Venâncio AM, Girres JF, Romana CF (2011) Spatial patterns and eco-epidemiological systems – part I: multi-scale spatial modelling of the occurrence of Chagas disease insect vectors. *Geospatial Health* 6(1): 41-51.
- Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N (1998) Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. *Biochem J.* 15;330 ( Pt 1):505-11.
- Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvao C (2007) *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55-64.
- Sarquis O, Sposina R, de Oliveira TG, Mac Cord JR, CabelloPH, Borges-Pereira J, Lima MM (2006) Aspects of peridomiliary ecotopes in rural areas of northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 143-147
- Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM (2011) Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitol Res.* 2011 Oct 7.
- Schaub GA (2009) Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Adv. Insect Physiol.* 37: 177-242.
- Schmidt KA & Ostfeld RS (2001) Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 82: 609-619.

- Schmunis GA (1999) Proceedings of the Second International Workshop on Population Biology and Control of Triatominae, Tegucigalpa, Honduras: Iniciativa del Cono Sur: 26-31.
- Schmunis GA (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102(1): 75-85.
- Schmunis GA & Yadon ZE (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 115(1-2): 14-21.
- Schofield CJ (1979) The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. Buffent Res 69: 363-379.
- Schofield CJ (1988) Biosystematics of the Triatominae. In: Service, M.W. (Ed.), Biosystematic of Haematophagous Insects, Special vol. 37. Clarendon Press, Oxford, pp. 284-312. Systematics Assoc.
- Schofield CJ (1994) Triatominae-Biology & Control, Eurocommunica Publications, Bognor Regis, West Sussex, UK.
- Schofield CJ (2000) *Trypanosoma cruzi* - The vector-Parasite Paradox. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 535-544.
- Schofield CJ, Lehane MJ, McEwen P, Catala SS, Gorla DE (1992) Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. Med Vet Entomol. 1992 Jan;6(1): 51-56.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP (1999) The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (Suppl 1): 375-378.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R (2006) The future of Chagas disease control. Trends Parasitol 22(12): 583-588.
- Schofield CJ & Galvão C (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop 110(2-3): 88-100.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- da Silva MR, de Carvalho Junior OM, de Souza Martins E, Mitja D, Gomes RAT, Renato Guimarães RF (2009) Mapeamento de áreas potenciais do babaçu (*Attalea speciosa* mart. ex spreng) na bacia do rio Cocal, Tocantins. Espaço & Geografia 12(1): 1-29.
- SESPA, Secretaria de Estado de Saúde Pública. Governo do Pará. En ligne <http://www.saude.pa.gov.br> (consulté le 1er novembre 2011).
- Shannon CE (1948) A Mathematical Theory of Communication. The Bell System Technical Journal 27: 379-423, 623-656.
- Shannon CE & Weaver W (1963) The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press

- Shaw J, Lainson R, Frahia H (1969) Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autoctones de doença de Chagas registrado em Belém, Pará, Brazil. Ver. Saude Publ. São Paulo 3:153–157.
- Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC (1991) Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 33:351–357.
- Simpson EH (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163(4148): 688.
- Smouse PE & Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Souto R, Fernandes O, Macedo A, Campbell D, Zingales B (1996) DNA markers define two major phylogenetics lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 83: 141-152.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC (1999) The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 118: 107-116.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson WC (2001) The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasit.* 48: 1-56.
- Storfer A, Murphy MA, Spear SF, Holderegger R, Waits LP (2010) Landscape genetics: where are we now? *Mol Ecol* 19(17): 3496-514.
- Storfer A, Murphy MA, Evans JS, Goldberg CS, Robinson S, Spear SF, Dezzani R, Delmelle E, Vierling L, Waits LP (2007) Putting the "landscape" in landscape genetics. *Heredity* 98(3): 128-42.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA (2003) Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 3: 269-279.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Taneja J & Guerin PM (1997) Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *J Comp Physiol* 181: 21-34.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tatto E, Menezes JA, Kitagawa BY, Freitas DR, Dimech GS, Wada MY (2007) Acute Chagas disease (ACD) outbreak related to sugar cane drunk in Santa Catarina State, south Brasil. In: Abstracts of the 56th Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007 Nov 4–8; Philadelphia. Philadelphia: The Society : Abstract 997.
- Taylor PD, Fahrig L, Henein K, Merriam G (1993) Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 68: 571-572.

- Teixeira AR, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L (2001) Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg Infect Dis* 7: 100-112.
- Teixeira ARL (1987) The Stercorarian trypanosomes. In *Immunopathology, Immunoprophylaxis. Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology*, CRC Press, LLC, Boca Raton, FL, 125-145.
- Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR (2006). Evolution and pathology in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 463-91.
- Thales MC (2001) Imagem fração sombra na caracterização e mapeamento de babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng.) em áreas de floresta. Dissertação de Mestrado em Sensoriamento Remoto. INPE São José dos Campos.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-4680.
- Tibayrenc M (1998) Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85-104.
- Tibayrenc M (1999) Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Ann Rev Genet* 33: 449-477.
- Tollefson J (2011) Brazil revisits forest code. *Nature* 476: 259-260.
- Tomlinson PB (1979) Systematics and ecology of the palmae. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 10: 85-107.
- Tonn RJ, Carcavallo RU, Ortega R (1978) Trampa de luz negra como método de capturas nocturna de Triatominae en Venezuela. *Bol Dir Malariol San Amb* 18: 25-30.
- Toso AM, Vial FU, Galanti N (2011) Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev. Med. Chile* 139: 258-266.
- Turner IM (1996) Species Loss in Fragments of Tropical Rain Forest: A Review of the Evidence. *J Appl Ecol* 33(2): 200-209.
- Undiano C (1968) Predadores naturales de los triatomídeos, su biología y posibilidades de utilizarlos en la lucha biológica. *Rev. Fac. Cienc med Córdoba* 16: 307-318.
- Urdaneta-Morales S & McLure I (1981) Experimental infections in Venezuelan lizards by *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 38(2): 99-105.
- Urdaneta-Morales S & Tejero F (1992) *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): observations upon pleomorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 511-516.
- Valbuena R (2008) «Santarém, entre la Amazonia de los ríos y la Amazonia de las carreteras. Nuevas estructuras territoriales en el oeste del Estado de Pará, Brasil, un abordaje geohistórico». *Confins*, no 3. En ligne <<http://confins.revues.org/index3903.html>> Consulté le 1er janvier 2010.

- Valente SAS, Valente VC, Neto HF (1999) Considerations on epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94(Suppl. I): 395-398.
- Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN (2002) Por que ocorrem episódios familiares de doença de Chagas associado à transmissão oral na Amazônia Brasileira? Rev. Soc. Bras. Med. Trop 35(Suppl. I): 165-44.
- Valente SAS, Valente VC, Fraiha Neto H (1999) Transmissão da doença de Chagas: como estamos? Rev Soc Bras Med Trop. 32(Suppl II):51-55.
- Valente SAS, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernandes O (2009) Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. Trans R Soc Trop Med Hyg. 103(3):291-297.
- Valente VC, Valente SAS, Noireau F, Carrasco HJ, Miles MA (1998) Chagas Disease in the Amazon Basin: Association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with Domestic Pigs. Journal of Medical Entomology 35(2): 99-103.
- Valente VC, Almeida AJB, Valente SAS, Pinto AYN, Miranda C, Oliveira RA, Gomes FA, Freitas AB, Barbosa CCS, Silva LOS, Fonseca JMC (2005) Nova micro-epidemia familiar com três casos de doença de Chagas em Belém estado do Pará. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38(Suppl. I): 413.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA (2009) Triatomine-*Trypanosoma cruzi/rangeli*: Vector Parasites interactions. Acta Tropica 110: 137-147.
- Vallvé SL, Rojo H, Wisnivesky-Colli C (1996) Urban ecology of *Triatoma infestans* in San Juan, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91: 405-408.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4: 535-538.
- Vaz VC, D'Andrea PS, Jansen AM (2007) Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 134(12): 1785-93.
- Vázquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Marcet PL, Cecere MC, Cardinal MV, Kitron U, Gürtler RE (2006) Seasonal variations in active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* in rural north-western Argentina. Med Vet Entomol 20: 273-279.
- Veiga LM, Kierulff C, de Oliveira MM (2008) *Alouatta belzebul*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Vitt LJ, Blackburn DG (1991) Ecology and life history of the viviparous lizard *Mabuya bistriata* (Scincidae) in the Brazilian Amazon. Copeia 4: 916-927.
- Walter A, Rego IP, Ferreira AJ, Rogier C (2005) Risk factors for reinvasion of human dwellings by sylvatic triatomines in northern Bahia State, Brazil. Cad Saude Publica 21(3):974-948.
- Wang J (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. Genetics 166: 1963-1979.

- Weinberg W (1908) Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahresh. Ver. Vaterl. Naturkd. Württemb. 64: 369–382.
- Weir BS & Cockerham CC (1978) Testing Hypotheses about Linkage Disequilibrium with Multiple Alleles. *Genetics* 88(3):633-42.
- Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR (2005) Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171 : 527–543.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}$  not equal to  $1/(4Nm + 1)$ . *Heredity* 82 (Pt 2):117-125.
- WHO (1991) World Health Organization. Control of Chagas' disease. WHO Tech Rep Ser 811.
- WHO (2002) Control of Chagas Disease. Second Report of the WHO Expert Committee, World Health Organization, Geneva, 57-58.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright S (1951) The genetical structure of population. *Annals of Eugenics* 15: 323-353.
- Xavier SC, Vaz VC, D'Andrea PS, Herrera L, Emperaire L, Alves JR, Fernandes O, Ferreira LF, Jansen AM (2007) Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). *Parasitol Int.* 56(2):119-28.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles, GAJ (2005) Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 35: 225-233.
- Zacharias CA, Pontes GB, Lorenzo MG, Manrique G (2010) Flight initiation by male *Rhodnius prolixus* is promoted by female odors. *J Chem Ecol* 36(4): 449-51.
- Zeledón R & Rabinovich JE (1981) Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol* 26: 101–133.
- Zeledón R, Ugalde JA, Paniagua LA (2001) Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 757–764.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054.



## VI. Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu mes deux co-directeurs, les Professeurs Myriam Harry et Bruno Betschart pour la confiance qu'ils m'ont accordée dès le début de cette aventure, puis tout au long du parcours pour leur soutien scientifique, académique et humain. Merci à tous les deux de m'avoir offert cette merveilleuse opportunité.

Je tiens également à remercier Dr Lise Gern, Prof. Christian Lengeler, Dr Karol Kerduelhé, Dr Christina Romaña et Dr Virgine Roy pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier également la CRUS (Conférence des Recteurs des Universités Suisse), pour l'octroi de ma bourse de co-tutelle qui a permis de financer mes nombreux voyages entre Paris et Neuchâtel, je remercie également le Professeur Bruno Betschart, encore une fois, de m'avoir accordé le poste d'assistant-doctorant durant ces quatre années, le projet PLUPH (Poor Land Use, Poor Health) pour le financement des missions de terrain et d'analyses de laboratoire ainsi que l'ANR ADAPTANTHROP (Dir. M. Harry) pour certains frais d'analyses de laboratoire.

Un remerciement tout particulier à Christina Romaña qui m'a ouvert les portes de cette grande aventure scientifique. Merci Christina pour ta générosité, ton dévouement à tes étudiants en toute situation, ta patience, tes idées géniales, ton ouverture d'esprit, tes connaissances, merci de m'avoir ouvert les yeux sur ton approche intégrée, la spatialisation et de m'avoir fait rencontrer autant de gens sur mon chemin.

Un grand merci à Marc Lucotte et à Robert Davidson qui m'ont accueilli dans le projet PLUPH me permettant de participer à cette aventure extraordinaire qui est la recherche en Amazonie et la vie sur un bateau au milieu d'une équipe d'étudiants québécois. A Marc pour ses histoires fascinantes sur le Tapajós et à Robert pour son soutien sans faille à tous les problèmes de logistique rencontrés lors de la préparation des missions de terrain, à tous les deux pour votre bonne humeur, votre enthousiasme et votre dévouement à former les étudiants au travers de projets tels que le PLUPH.

Merci chaleureux à tous les habitants des trois communautés du Tapajós dans lesquelles nous avons été accueillis, Araipá, São Tomé, Nova Estrela, et aux équipages du Dona Zizi et du Genesis II. Un merci tout particulier au Capitaine Ray et sa famille, de nous avoir ouvert les portes de sa maison à Santarém, au Padre Arnau de nous avoir aidé lors de la mission de reconnaissance le long de la transamazonienne. A Harisson de nous avoir accompagné et surtout sorti de toutes les galères, en musique! A Dona Maria et Mamusca de nous avoir préparé tous les jours de si bons repas.

Merci du fond du cœur à Roberto Leite Araujo, Francisco Leite Araujo dit Fogoio, Marcelo, Oziel de Souza Araujo et Rosinaldo, mes fidèles assistants de terrain, prêts à braver chaque aventure! Merci d'avoir eu tant de patience avec mon portugais balbutiant et tout au long des nombreux kilomètres parcourus en plein soleil ou sous la pluie tropicale, merci de

m'avoir ouvert la porte de vos familles, de vos maisons et de vos cœurs. Votre amitié, votre générosité et votre joie de vivre, ainsi que vos chansons restent à jamais gravés dans ma mémoire. A Beto, Tanjico, Neginhou, pour l'amitié lorsque nos aventures se sont croisées. A Pichouna, que descanse em paz.

Merci à Paraiban, Glacenildo, Rosinaldo, Zé Mendes, Zé Ferreira, Chico Borges, Vava, Joasao, Seu Cariri de nous avoir autorisé à abattre les palmiers situés sur vos propriétés.

Un immense merci à Guy Demostenes Mejia, qui nous a rejoint depuis la Colombie sur la bateau du PLUPH afin de m'accompagner dans mon apprentissage à la technique de dissection des palmiers, un immense merci pour ta patience, ta confiance, tes rires et ta musique des caraïbes.

Tout spécialement un grand merci à Emmanuel Roux et Kenji Ose qui ont participé à l'élaboration méthodologique de mon protocole de terrain. Merci Emmanuel de m'avoir ouvert les yeux sur R et GRASS! Merci pour ta patience et tes nombreux et précieux conseils scientifiques et méthodologiques.

Un grand merci à Eric Delaître d'avoir réalisé la classification du paysage à partir des images et de mes données de terrain. Merci de m'avoir accueillie à Montpellier et d'avoir consacré beaucoup de temps à l'élaboration de nombreuses cartes, merci pour ta disponibilité et ta patience.

Merci à Fernando Braga Stehling Dias, Obrigada Fernando! D'avoir partagé avec moi tous ces moments, parfois intenses et difficiles, que ce soit pour traverser le Rio en pirogue ou le parc du CNRS en plein hiver, mais surtout pour tous les moments du quotidien et les bons petits plats pleins de bonheur et d'Alegria !

Un grand merci à Pascal Campagne, qui dans ma dernière foulée m'a donné de nouvelles pistes d'analyses et de nombreux points à développer encore et encore!

Merci à Jordan Sky Ostreicher mi compañera! Du fin fond de la transamazonienne à l'autre bout de l'Atlantique, merci pour ta fidélité de tous les instants, pour les nombreux échanges scientifiques et amicaux riches et pour ton précieux support quant à la relecture de mes papiers en anglais.

Un grand merci, à tous les autres étudiants du PLUPH avec qui j'ai partagé de près ces expériences de terrain Juliana Valentini, Benjamin Grégoire, Angela Guentert, Natacha Lecours, Fabio Sidonio, Ligia Valdão, Nicolas Lechoppier, un merci tout spécial aux courageux qui se sont dévoués pour la dissection d'un ou deux palmiers. Merci Leandra pour tout le travail de coordination au sein du PLUPH. Merci Stéphane pour ton amitié, ta complicité et nos réveils sur le toit du monde, du Genesis II.

Un grand merci à Jean-François Sylvain et à son équipe DEEIT (Diversité, Ecologie et Evolution des Insectes Tropicaux) au sein du LEGS (Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation), de m'avoir accueillie en milieu de parcours, ce fut un environnement stimulant et riche, et une super équipe. Merci donc à toute l'équipe DEEIT: Laure Kaiser, Paul- André

Calatayud, Bruno le Rü, Yves Carton, Stéphane Dupas, François Rebaudo et Annie Amirault. Et tout spécialement merci à Claire Capedevielle-Dulac Crouch pour ta merveilleuse expertise technique au laboratoire et dans de nombreux logiciels, ton amitié, tes goûts cinématographiques et tennistiques. A Maud pour les nombreux coups de main, et pour ta bonne humeur au quotidien. A Cécile pour les sauvetages de dernière minutes et à Lise Pingault d'avoir partagé avec moi la découverte de nombreux logiciels. A Maria Angela per la vostra bella amicizia et à Floriane Chardonnet pour l'agréable compagnie et complicité!

Merci aux voisins de l'équipe « Abeille », Florence Mougel, Sibyle Moulin, Bénédicte Bertrand et Yves Loublier pour les échanges amicaux et scientifiques, les lifts dans le parc et les encouragements de dernière minutes.

Un grand merci à toute l'équipe de la parasitologie de Neuchâtel, mes collègues adorés et mes amis de longue date Nicolas Tonetti, Renaud Maire, David Perez, Caroline Burri Cordonnier, Liselore Roelfstra, Coralie Herrmann, Léonore Lovis, Pitou parce que ce laboratoire représente une fabuleuse page de notre histoire commune. Merci à tous les anciens qui se reconnaîtront et à tous les petits loulous Daniel, Christopher, Mégane, Maud, Angélique et Jeanette pour votre fraîcheur et votre amitié.

Tout spécialement merci à Elena Lommano, ou Cuquette, pour les nombreuses heures d'assistantat et de préparations de TP's, merci pour ton amitié ton soutien et bravo d'avoir réussi à supporter mon organisation et mes goûts musicaux !

Merci à Brigitte Cattin, Natacha Schneider Josiane Pont et Roberta Ventura, d'être si serviables et de nous accueillir toujours avec le sourire.

Merci à Brigitte David, pour votre soutien et votre patience en ce qui concerne mes aventures dans l'administration française et ses méandres.

Merci à toute l'équipe de Créteil Lise Dupont, Alexandre Livet, Virginie Roy, Vincent Chassany, Catherine Gounou, Jennifer Harris et Catherine Martin pour votre accueil durant ma première année de thèse.

Merci à Christophe Poupon pour les nombreux coups de main en télédétection et de m'avoir fourni le GPS pour mes terrains.

Un immense merci à la ferme playmobile pour ces moments de liberté et de joie ultimes, de partage et d'amour inconditionnel, qui rendent la vie plus belle à chaque instant même dans les pires moments et qui nous ont rendus toutes, plus fortes ! Merci Camiloulette, Camille, Lilo, Barbara, Fantine, Babou mais aussi merci à Papalfrenier, Béné, Etienne & Monique et Bogdan pour toute la logistique de la ferme et son organisation.

Merci à Dom, Greg, Léa, Eliah et Basile pour ces instants d'amitiés partagés à cheval ou à table!

Merci ma Laeti Spätz, pour les nombreux conseils avisés concernant Adobe et cie, merci pour ton amitié de tous les instants, ta vision de l'horlogerie de luxe sur mes tentatives de graphisme! Merci d'être là.

Merci ma Laurette, ma biche merci pour tous ces instants parisiens, de là où on naît de là où on est, always with me!

A ma bibi Marie, courageuse qui m'a supporté tout au long de ces années et surtout mes incessants allers-retours merci de partager avec moi depuis si longtemps tous les petits soucis du quotidien qui n'en sont pas et merci à notre gros loutz, pour être si plein d'amour à nous donner, merci d'être ma sœur de cœur.

A tous ceux qui m'ont ouvert leur porte parisienne, pour une ou plusieurs nuits, avec mon sac sur le dos, merci pour l'accueil et les moments partagés, les concerts, les virées nocturnes et les petites brasseries parisiennes, les dimanches matin télé foot et les rhums arrangés. Merci Edouard, Daniel, Brice, Julien, Blaise, Maria Angela, Laurette.

A Cabral du Jardin et Pépette de la Pampa, qui m'avez tout appris de la patience, de la douceur et de la persévérance, merci de m'avoir montré la vraie voie du cavalier, celle du cœur et à Jacky la girafe et Symbad le rebelle, de me permettre de poursuivre cette quête de liberté absolue.

A Sandino merci d'être ma source d'inspiration et de me permettre d'aller à chaque instant chercher le meilleur au fond de moi, caus' You are the best.

A mes parents Ursula et Jean-Marie, de m'avoir donné tout l'amour, la confiance et la liberté dans ma vie, dans mes choix, de m'avoir permis de devenir ce que je suis, et d'en être fière.

## VII. Annexes

- Annexe 1:** Autorisation d'activité scientifique pour des chercheurs étrangers (Portaria MCT N° 679/10)
- Annexe 2:** Autorisation de collecte de matériel scientifique
- Annexe 3:** Licence d'exportation des insectes



## Ministério da Ciência e Tecnologia

### GABINETE DO MINISTRO

#### PORTARIA Nº 50, DE 3 DE FEVEREIRO DE 2009

O MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 2º do Decreto nº 98.830, de 15 de janeiro de 1990, bem como no art. 12 e no caput do art. 16 da Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, resolve:

Art. 1º. Autorizar a inclusão dos pesquisadores estrangeiros, ANGÉLA GUENTERT, natural do Canadá, MARION QUARTIER, natural da Suíça, EMMANUEL ROUX, natural da França, GUY DEMOSTENES MEJIA, natural da Colômbia, e NATACHA LECOURS, natural do Canadá, na Pesquisa Científica relativa ao projeto intitulado "Mau uso da terra e saúde precária: prevenção em saúde por meio do uso adequado da terra por pequenos agricultores dos trópicos úmidos", que vem sendo realizado no Estado do Pará, através de parceria entre a Universidade de Brasília, UNB, representada pelo contraparte brasileira, Dr. JOSÉ AUGUSTO LEITÃO DRUMMOND, e a Université du Québec à Montreal, representada pelo Dr. MARC MICHEL LUCOTTE, contraparte estrangeira, conforme lista de pesquisadores abaixo:

Equipe Estrangeira	Nacionalidade	Instituição
MARC MICHEL LUCOTTE	Canadense	Université du Québec à Montreal
JOHANNES SAINT-CHARLES	Canadense	Université du Québec à Montreal
MYRIAM HARRY	Francesa	Université Paris Descartes e IRD
CHRISTINE AGUEDA ROMANA	Canadense	Université du Québec à Montreal
BENJAMIN GREGOIRE	Canadense	Université du Québec à Montreal
ROBERT DAVIDSON	Canadense	Université du Québec à Montreal
JORDAN SKY OESTREICHER	Canadense	McGill University
ANNIE BÉLIVEAU	Canadense	Université du Québec à Montreal
ANGÉLA GUENTERT	Canadense	Université du Québec à Montreal
EMMANUEL ROUX	Francesa	Institut de Recherche pour le Développement-IRD
GUY DEMOSTENES MEJIA	Colombiana	Universidad del Magdalena
MARION QUARTIER	Suíça	Université de Neuchâtel
NATACHA LECOURS	Canadense	Université du Québec à Montreal

Art. 2º. A presente inclusão terá validade pelo mesmo prazo de vigência da Portaria/MCT nº 629, de 2 de setembro de 2008, publicada no Diário Oficial da União de 04 de setembro de 2008, que autorizou o projeto descrito no artigo 1º desta Portaria pelo prazo inicial de dois anos, contados da sua publicação.

Art. 3º. A coleta de material biológico humano, prevista no âmbito do projeto a que se refere o art. 1º desta Portaria, ficará condicionada à obtenção da anuência prévia do Conselho de Ética em Pesquisa - CONEP, do Ministério da Saúde.

Art. 4º. Fica autorizada a coleta de material mineral, conforme autorização do Departamento Nacional da Produção Mineral - DNPM, ficando o destino dos materiais coletados vinculados à estrita observância das normas do Decreto nº 98.830, de 15 de janeiro de 1990, e da Portaria/MCT nº 55, de 14 de março de 1990.

Art. 5º. A remessa de material ao exterior deverá ser realizada de conformidade com as disposições constantes do art. 19 da Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001.

Art. 6º. Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

SERGIO MACHADO REZENDE

920.003604/2009	558.431.706-78	HILDEU FERREIRA DA ASSUNCAO	29/01/2014
920.003605/2009	191.520.908-09	ENIO PEDONE BANDARRA FILHO	30/01/2014
920.003606/2009	090.667.304-63	HUGO ORLANDO CARVALLO GUERRA	02/02/2014
920.003607/2009	833.690.900-15	MARTIN PABLO CAMMAROTA	02/02/2014
920.003608/2009	362.590.127-72	JOAQUIM TEIXEIRA DE ASSIS	03/02/2014
920.003609/2009	255.458.920-87	LAURO JULIO CALLIARI	03/02/2014
920.003610/2009	116.148.148-64	MARCOS CARLOS DE MATTOS	03/02/2014

GILBERTO PEREIRA XAVIER

### FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS ÁREA FINANCEIRA E DE CAPTAÇÃO

#### DESPACHO DO SUPERINTENDENTE Em 3 de fevereiro de 2009

Comprometimento orçamentário do FNDCT nº 9/2009

O Superintendente da Área Financeira e de Captação, no uso de suas atribuições conferidas pela RES/DIR/0084/00, resolve: comprometer o orçamento do Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FNDCT, na forma abaixo:

BENEFICIÁRIO	NUMERO VENTO	CON-	NUMERO EMPENHO FTRES	VALOR EMPE NHO	EMPE CONVENCIO	VIGENCIA
CNPQ	0343.08		2009NC000005	716.819,41		20/5/2010
	625464		4886.4904.4891			
CNPQ	0343.08		2009NC000006	994.311,46		20/5/2010
	625464		25363.521965.4886			
CNPQ	0343.08		2009NC000007	387.430,44		20/5/2010
	625464		4886.4904.4891			
CNPQ	0343.08		2009NC000008	281.727,78		20/5/2010
	625464		4892.521965.4899.4890			
CNPQ	0343.08		2009NC000009	322.703,55		20/5/2010
	625464		4896.521965.4897.4896			
CNPQ	0343.08		2009NC000010	257.782,03		20/5/2010
	625464		4896.4895.4894			
CNPQ	0343.08		2009NC000011	281.345,14		20/5/2010
	625464		4894			
Fundação Universitária do Desenvolvimento do Oeste	0059.06		2009me000065	29.000,00		3/10/2009
	570915		7744			
Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa	3644.05		2009me000066	63.500,00		14/6/2009
	555452		7744			
Fundação Guimarães Duque	0162.07		2009me000380	7.300,00		12/5/2009
	595437		4886			
Faculdades Católicas	1152.08		2009me000373	246.980,80		18/12/2010
	637278		25363			
Fundação Valeparaíba de Ensino	0367.08		2009me000374	322.000,00		5/11/2010
	635498		521965			
Fundação Estadual do Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia de Roraima	0313.08		2009me000375	838.339,00		22/12/2011
	638011		4886			
Fundação Estadual do Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia de Roraima	0313.08		2009me000376	4.471.579,00		22/12/2011
	638011		4886			



Ministério do Meio Ambiente - MMA

**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA****Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Autorização para atividades com finalidade científica**

<b>Número: 16485-2</b>	<b>Data da Emissão: 27/06/2008 18:04</b>	<b>Data de Validade: 27/06/2009</b>
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 302215	Nome: José Augusto Leitão Drummond	CPF: 380.122.277-20
Título do Projeto: Mau uso da terra e saúde precária: prevenção em saúde por meio do uso adequado da terra por pequenos agricultores dos trópicos úmidos. Título Original: Poor Land Use and Poor Health (PLUPH): primary prevention of human health through sound land-use for small-scale farmers of the humid tropics.		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

**Observações, ressalvas e condicionantes**

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br/cites">www.ibama.gov.br/cites</a> . Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

**Outras ressalvas**

1	A participação dos pesquisadores Frederique Sabine Vachald Seyler, Robert Davidson, Quartier Marion, Benjamin Grégoire, Marc Michel Lucotte, Harry Myriam, Annie Béliveau, Guy Demostenes Mejia e Romana Christine nas atividades previstas nesta autorização dependerá de autorização a ser expedida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, MCT. O pesquisador Frédéric Adelin Georges Mertens fica dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
---	---

**Equipe**



#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Anderson Martins de Souza Braz	Estudante de mestrado, atuação no eixo meio ambiente (3.5)	591.356.542-87	2926941 SEGUP-PA	Brasileira
2	Frédéric Adelin Georges Mertens	Coordenador do eixo desenvolvimento subprojetos 3.4	148.068.648-46	V099418P SEDPMAFDPF-	Estrangeira
3	Annamaria de Fátima Venâncio	Pesquisador colaborador no eixo saúde (3.3)	470.839.309-10	987940007 SSP-BA	Brasileira
4	Carlos José Sousa Passos	Pesquisador colaborador do projeto 3.3 - Área de Saúde	437.358.192-49	2461794 SEGUP-PA	Brasileira
5	Frederique Sabine Vachald Seyler	Pesquisador colaborador no eixo meio ambiente (3.5) e saúde	715.737.801-97	P9965-00 Rel. Ext.-DF	Estrangeira
6	Juliana Valentini	Estudante de doutorado, atuação no eixo saúde subprojeto 3.3	725.472.270-53	9015505507 SSP-RS-RS	Brasileira
7	Robert Davidson	Lider do projeto 3.5 - Área de Meio Ambiente		BA134514 Canada-	Estrangeira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 36893561**

Página 1/4



 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70818-900 - Brasília-DF		 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 22/06/2009 3) Válido Até/Valid Until: 22/12/2009											
4) Licença nº/Permit nº: <b>09BR003406/DF</b>		6) Selo nº/Stamp nº: ***** 7) Selo/Stamp  *****		8) Controle/Check : 5KBRICSC2W899UW7 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature											
5) Licença de/Permit for <b>Exportação</b>															
10) Importador/Importer Myriam Harry Avenue de la Terrasse, Bâtiment 13, Boite Postale 1 Paris - 91198 Gif sur Y fone: - França - FR			11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) Liléia Gonçalves Diotaiuti Rua Simão Irfri 51 apt 201 BELO HORIZONTE - 30380270 fone: 33422346 - diotaiuti@cpqrr.flocruz.br Brasil - BR												
12) País Importador/Country of Import França - FR			13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Brasil - BR												
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Scientific/Fins científicos...															
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations															
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/Al Confinis Data Provável/Probable Date: 01/07/2009 ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.															
17) Item 20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		21) Anexo/Origem Appendix/Source		18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark											
19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date															
17) I 20) 1. Rhodnius spp.		21) NC   W		18) ANIMAL MORTO/BODY 22) animal morto/body 400,00 UN -											
				19) -- 400.00 UN -- 23) - - 24) - -											
----- Fim dos Itens/Itens End -----															
<p>*Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições /in situ/, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções /ex situ/, desde que coletados em condições /in situ/, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"</p> <p>"This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge e with potential commercial use."</p>															
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement															
Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
_____ ASSINATURA/SIGNATURE															
1 Verificar/Verify: <a href="http://ibama.gov.br/cites/verificar">http://ibama.gov.br/cites/verificar</a> E-mail: <a href="mailto:cites.sede@ibama.gov.br">cites.sede@ibama.gov.br</a> 1ª Via - Original - Importador   Exportador - Brasil   Importer   Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador   Importador - Estrangeiro   Exporter   Importer - Other Country 3ª Via - Aduana / Customs 4ª Via - IBAMA															