



HAL
open science

Lutte contre le paludisme et les leishmanioses en Bolivie: Améliorer les connaissances entomologiques en vue d'un contrôle simultané des vecteurs

Frederic Lardeux

► To cite this version:

Frederic Lardeux. Lutte contre le paludisme et les leishmanioses en Bolivie: Améliorer les connaissances entomologiques en vue d'un contrôle simultané des vecteurs. IRD - Institut de recherche pour le développement. 2001, pp.1-59. hal-04846677

HAL Id: hal-04846677

<https://hal.science/hal-04846677v1>

Submitted on 8 Jan 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

**Action concertée incitative de recherche sur le paludisme
dans les pays en développement**

Programme PAL + : Action 2001

**PROJET COORDONNE PAR
Institut de Recherche pour le Développement
(centre de Bolivie)**

(Promoteur : Frédéric LARDEUX)

Titre du Projet

**LUTTE CONTRE LE PALUDISME ET LES LEISHMANIOSES EN BOLIVIE :
AMELIORER LES CONNAISSANCES ENTOMOLOGIQUES EN VUE
D'UN CONTROLE SIMULTANE DES VECTEURS**

1. PRESENTATION GENERALE DU PROJET

RESUME EN FRANCAIS

Préciser les objectifs, la situation du sujet, la problématique, les méthodes, l'échéancier des travaux et les résultats attendus.

Objectifs :

Le projet s'attachera à effectuer les recherches de base en épidémiologie des transmissions dans les mêmes zones, du paludisme et des leishmanioses par l'analyse des indices parasitologiques, entomologiques et écologiques. Le projet prévoit donc d'étudier en parallèle les populations d'anophèles et celles de phlébotomes pour envisager les possibilités d'une lutte dirigée simultanément contre les deux systèmes vectoriels dans une zone géographique donnée. Ce projet peut donc être considéré comme le préambule indispensable à toute recherche future. A moyen terme, les résultats obtenus permettront l'ouverture de thèmes de recherches plus spécifiques. Plus particulièrement, ce projet est le tremplin qui permettra la création d'un laboratoire de recherche sur les vecteurs du paludisme en Bolivie.

Situation du sujet :

Le paludisme est actuellement considéré par le Ministère de la Santé bolivien comme la première maladie à combattre. Il existe une très forte demande des autorités boliviennes pour entamer des recherches sur la transmission du paludisme et acquérir, par la recherche, les capacités à mieux gérer ce problème. La Bolivie ne dispose cependant que de très peu de données sur ses *Anophèles* vecteurs, et manque de personnel technique formé à l'épidémiologie du paludisme. Seulement 15 publications et rapports écrits entre 1942 et 2000 traitent spécifiquement des anophèles de Bolivie.

Problématique

la Bolivie a récemment déclenché des Plans Stratégiques de Développement, induisant des déplacements très importants de populations andines vers des territoires vierges en zone amazonienne. La recherche par ces populations migrantes de meilleures conditions économiques et sociales se traduit par une déforestation intensive, induisant une écologie radicalement différente, notamment en matière de maladies à vecteurs. Ces modifications anthropiques des écosystèmes ont permis l'expansion de populations de vecteurs jusqu'alors présents en faible densité, mais qui se développent aux abords de l'Homme et qui suivent ses implantations. C'est le cas par exemple, d'*Anopheles darlingi*, vecteur du paludisme, ou de certains phlébotomes (vecteurs de leishmanioses), qui trouvent près de l'homme des gîtes de développement (et de prolifération) favorables. Ainsi, les maladies à vecteurs trouvent-elles depuis plusieurs années, un terrain extrêmement favorable à une forte résurgence. Les contacts homme-vecteur sont accrus chez des populations non immunes, aggravant d'autant les pathologies des diverses maladies à vecteurs.

Méthodes : Le programme s'articule autour de deux thèmes:

Thème 1 : Etude épidémiologique de la transmission du paludisme et des leishmanioses en zones écologiquement modifiées par l'action de l'homme. Les recherches concerneront (1) la parasitologie (Prévalence d'infection chez l'homme etc.), (2) la caractérisation bioécologique des vecteurs (variations temporelles des densités vectorielles, degré d'endo/exophilie, taux d'agressivité, prévalence d'infection chez les vecteurs, préférences trophiques, étude des gîtes larvaires etc.), (3) la génétique des populations des vecteurs du paludisme (niveau de variabilité génétique, répartition de cette variabilité en fonction des différences phénotypiques observées, structuration des populations à l'échelle microgéographique,)

Thème 2 : Etude de la résistance des vecteurs aux insecticides (Pyréthroïdes et DDT). Les recherches concerneront (1) la mise en évidence (si elle existe) d'une résistance aux pyrétroïdes, (2) Si oui : évaluation d'une dose diagnostique, (3) mise au point d'un élevage d'*Anopheles* (*darlingi* et *pseudopunctipennis*) et de phlébotomes

Echéancier des travaux : Le projet est prévu sur 3 ans.

Année 1 : Mise en place des techniques de laboratoire ; formation préliminaire (stages de chercheurs boliviens en France) , mise en place des élevages (anophèles, phlébotomes). Début des études de terrain (études longitudinales et études de la résistance)

Année 2 : poursuite des études de terrain, début des analyses de génétique

Année 3 : fin des analyses génétiques, échantillonnages complémentaires, et exploitation des résultats.

Résultats attendus

Meilleure connaissance de la bio-écologie et de la génétique des vecteurs du paludisme et des leishmanioses, pouvant servir de base à la mise au point d'une stratégie de lutte commune. Identification des zones de résistance au pyrétroïdes, permettant la planification à moyen terme d'étude en phase II sur des techniques de lutte anti-vectorielle. Quantification des paramètres écologiques et génétiques de base pour identifier à terme des études plus poussées sur les vecteurs du paludisme. Mise en route d'un laboratoire bolivien d'entomologie du paludisme.

Mots clés : Vecteurs, Amérique du Sud, Contrôle, Ecologie, Génétique

1. PRESENTATION GENERALE DU PROJET

RESUME EN ANGLAIS

Préciser les objectifs, la situation du sujet, la problématique, les méthodes, l'échéancier des travaux et les résultats attendus.

Objectives:

We propose to conduct basic research on the epidemiology of transmission, in the same area, of both malaria and leishmaniosis through combined analyses of parasitologic, entomological and ecological indices. The overall aim of the project is to study simultaneously anopheline and sandflies populations in order to assess the feasibility of a control strategy targeting both vector systems at the same time in the same geographic area. This project will therefore provide basic knowledge for future, more specific, researches. In the meantime, the project will help engineering a laboratory for research on malaria vectors in Bolivia.

Background:

Malaria has recently been rated the first disease to fight by the Bolivian Health department. To better control the disease, researches on malaria transmission are needed and currently advocated for by Bolivian authorities. Knowledge of Bolivian anophelines is extremely limited (only 15 publications and reports have been published on the subject between 1942 and 2000), and peoples trained in malaria research are desperately needed.

Rationale :

Recent implementation of Strategic Development Plans in Bolivia has triggered huge human populations migrations from the Andes to the wealthier Amazonian region. Settlement of these migrants has led to intensive deforestation and modification of the environment that favor reemergence of vector diseases. Habitat alteration by human activities have fostered increases in abundance of locally specific vectors as well as spread of vector populations into new, formally non-permissive, areas. This is the case, for example, of *Anopheles darlingi*, a major malaria vector in South America, as well as several sandfly species, that find in man-made environment, suitable breeding and development sites. Increased Man-vector contacts lead, in non-immune populations, to an increase in severity of the clinical outcomes of the pathology.

Methods: We propose to conduct:

- a comparative, longitudinal study of malaria and leishmaniosis transmission in two villages located in areas of recent human settlement. Studies will address (1) parasitology (prevalence of infections in man, ...), (2) characterization of the bio-ecology of the vectors (temporal variations in abundance, endo-exophily, human biting rate, feeding preferences, infection rates, larval ecology, ...) and (3) population genetics of malaria vectors (level of genetic variability, correlation with phenotypic variability, genetic structure at a microgeographic scale).
- an evaluation of the level of insecticide resistance in natural vector populations (pyrethrinoids and DDT). Studies will encompass (1) screening of natural vector populations for resistance to pyrethrinoids, (2) if a resistant phenotype is identified, evaluation of diagnostic dose and (3) implementation of an insectarium for laboratory rearing of anophelines (*An. darlingi* and *An. pseudopunctipennis*) and sandflies.

Timetable: The project will be conducted during 3 years, as follows:

- Year 1: settlement of the laboratory and insectarium, preliminary skill transfer (including trips to France of Bolivian researchers), beginning of field investigations.
- Year 2: field sampling and laboratory processing, beginning of population genetics studies.
- Year 3: completing population genetics studies, putative additional sampling, and general data processing.

Expected results:

This project will provide basic knowledge of the bio-ecology and genetics of malaria and leishmaniosis vectors in Bolivia, that will help devising a common control strategy. We will evaluate the level and distribution of pyrethrinoid resistance in Bolivia. Eventually, phase II studies will be implemented for vector control strategies. We will estimate basic entomological and epidemiological indices that will allow development of future specific researches. In the meantime, we will be involved in the settlement and the implementation of a Bolivian laboratory devoted to the study of malaria vectors.

MOTS-CLES (cinq au maximum) : Vectors, South America, Control, Ecology, Genetics

2. DESCRIPTION DES EQUIPES IMPLIQUEES*

Laboratoire ou service A

Responsable scientifique (Nom, Prénom) : SIMARD, Frédéric

Site : Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Montpellier, France

LISTE DES PRINCIPALES PUBLICATIONS DE L'EQUIPE

(A l'exclusion des articles en préparation et des présentations à des congrès)

I – Publications les plus significatives des quatre dernières années (10 maximum)

- Darriet F, Guillet P, Chandre F, N'Guessan R, Doannio J.M.C, Rivière F & Carnevale P. 1997. Présence et évolution de la résistance aux pyréthrinoides et au DDT chez deux populations d'*Anopheles gambiae* s.s. d'Afrique de l'Ouest. *Doc. miméo. OMS, WHO/CTD/VBC/97.1001* et *WHO/MAL/97.1081* : 15 pages.
- Darriet F, Guillet P, Chandre F, N'Guessan R, Doannio J.M.C, Koffi A. Konan L.Y. & Carnevale P. 1998. Impact de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.s. à la perméthrine et à la deltaméthrine sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées. *Médecine tropicale*, 58, (4) : 349-354.
- Darriet F, N'Guessan R, Koffi A, Konan L, Chandre F, Doannio J.M.C & Carnevale P. 2000. Impact de la résistance aux pyréthrinoides sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans la prévention du paludisme : résultats des essais en cases expérimentales avec la deltaméthrine SC. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 93, (2) : 131-134.
- Simard F, Lehman T, Lemasson JJ, Diatta M & Fontenille D. 2000. Persistence of *Anopheles arabiensis* during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. *Insect Mol. Biol.* 9(5): 467-479.

II – Publications consacrées au sujet (sur papier libre éventuellement)

- Bregues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., Mc Caroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Hemingway, J. Pyrethroid resistance in multiple strains of the mosquito *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Insect Molecular Biology*. (à paraître)
- Chandre, F., Darriet, F., Manguin, S., Bregues, C., Carnevale, P., Guillet, P. 1999. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15 (1) : 53-59
- Chandre, F., Manguin, S., Bregues, C., Dossou Yovo, J., Darriet, F., Diabate, A., Carnevale, P., Guillet, P. 1999. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*ldr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia*, 41 : 319-322.
- Darriet F, Robert V, Tho Vien N & Carnevale P. 1984. Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. *Doc. miméo. OMS, WHO/VBC/84.899* et *WHO/MAL/84.1008* : 20 pages (français et anglais).
- Carnevale P & Robert V. 1984. Laboratory and field evaluation of an ecdysoïd- type insect growth inhibitor, Triflumuron (OMS-2015) on *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Doc. miméo. OMS, WHO/VBC/85.916* : 16pages.
- Robert V & Carnevale P. 1987. Evaluation de trois inhibiteurs de croissance, deux ecdysoïdes et un juvénioïde, dans la lutte contre *Culex quinquefasciatus*. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol*, 25, (3-4) : 119-126.
- 1987. Evaluation sur le terrain de trois inhibiteurs de croissance, deux ecdysoïdes et un juvénioïde, dans la lutte contre *Anopheles gambiae*. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol*, numéro spécial : 113-119.
- 1989. Evaluation en laboratoire et sur le terrain de l'activité insecticide d'un inhibiteur de croissance de type ecdysoïde : l'OMS-3031 sur *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 et *Aedes aegypti* Linne 1762. *Doc. miméo. OMS, WHO/VBC/89.978* : 15 pages.
- Darriet F. 1991. Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyréthrinoides dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parassitologia*, 2, (33) : 111-119.
- Darriet F. & Hougard J.M. 1993. Etude en laboratoire de la biologie et des capacités prédatrices de l'Hétéroptère aquatique *Ranatra parvipes vicina* (Signoret, 1880) à l'encontre des larves de moustiques. *Rev. Hydrobiol. Trop*, 26, (4) : 305-311.
- Darriet F. 1998. La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies. *Coéditions Karthala-Orstom*, Collection Economie et développement : 114 pages.
- Darriet F, Guillet P, Chandre F, N'Guessan R, Doannio J.M.C, Koffi A. Konan L.Y. & Carnevale P. 1999. The

- impact of permethrin and deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae* s.s. on the efficacy of insecticide-treated mosquito nets. *Doc. miméo. OMS, WHO/CTD/VBC/99.1002 et WHO/MAL/97.1088* : 20 pages.
- Darriet F. 2000. Virus Ebola et Marburg : une hypothèse entomologique à confirmer. *Médecine Tropicale.*, 60 (3) : 302-304.
 - Lehman T, Hawley WA, Kamau L, Fontenille D, Simard F & Collins FH. 1996. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity* 77: 192-208.
 - Lemasson JJ, Fontenille D, Lochouart L, Dia I, Simard F, Ba K, Diop A, Diatta M & Molez JF. 1997. Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a sahelian area of Senegal. *J. Med. Entomol.* 34(4): 396-403.
 - Girod R, Salvan M, Simard F, Andrianavolambo L, Fontenille D & Laventure S. 1999. Evaluation de la capacité vectorielle d'*Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) à l'île de La Réunion: une approche du risque sanitaire lié au paludisme d'importation en zone d'éradication. *Bull. Soc. Path. Exot.* 92(3): 203-209.
 - Simard F. 1999. Variabilité génétique et flux de gènes chez les moustiques *Anopheles arabiensis* et *An. gambiae*, vecteurs du paludisme en Afrique. Apport des loci microsatellites. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré-Nancy I. Nancy, France. 270 pages.
 - Simard F, Fontenille D, Lehman T, Girod R, Brutus L, Gopaul R, Dournon C & Collins FH. 1999. High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and eastern outer islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(6): 1000-1009.
 - Weill, M., Chandre, F., Brengues, C., Manguin, S., Akogbeto, M., Pasteur, N., Guillet, P., Raymond, M. 2000. The *kar* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology*, 9 (5) : 451-455.

III – Brevets

* Remplir une fiche par Laboratoire ou Service impliqué

2. DESCRIPTION DES EQUIPES IMPLIQUEES*

Laboratoire ou service B

Responsable scientifique (Nom, Prénom) : LARDEUX, Frédéric

Site : Laboratorio de Parasitologia, Instituto Nacional de Salud, LA PAZ, Bolivia

LISTE DES PRINCIPALES PUBLICATIONS DE L'EQUIPE

(A l'exclusion des articles en préparation et des présentations à des congrès)

I – Publications les plus significatives des quatre dernières années (10 maximum)

- Gironda, W., 1999. Eficacia de insecticidas piretroïdes contra *Anopheles darlingi*, vector de malaria en el distrito de salud de Guayaramerin, del departamento del Beni. Rapport de l'INLASA (La paz, Bolivie). 44 p.
- Gironda, W., 2000. Biodiversidad de *Anopheles* (Diptera : Culicidae) en Guayaramerin. Rapport technique de l'INLASA (La Paz, Bolivie).
- Lardeux, F., Nguyen, N. L., & Cartel, J. L. 1995. *Wuchereria bancrofti* (Filariidea: Dipetalonemadidae) and its vector *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae) in a French Polynesian village. *Journal of Medical Entomology* 32 (3) : 346-352.
- Martinez, E., Le Pont, F., Torrez, M., Telleria, J. Vargas, F et al. 1998. A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a subandean region of Bolivia. *Acta Tropica* 71 : 97-106.
- Martinez, E., Le Pont, F., Torrez, M., Telleria, J., Vargas, F., Dujardin, J.C., Dujardin, JP. 2000. *Lutzomyia nuneztovarii anglesi* Le Pont & Desjeux 1984 as a vector of *leishmania amazonensis* in a subandean leishmaniasis focus of Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62.
- Mollinedo, S., Munoz, M., Herbas, D., Yaksic, N., 1988. Leishmaniasis. Anuario Bodas de Plata del IBBA, 109-122.
- Mollinedo, S. & Mollinedo R. 1999. Malaria, revision de tema. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud, INLASA, Ministerio de salud y prevision Social, Programa de malaria
- Mollinedo, S., Mollinedo, R., 1999. Malaria en Bolivia. Instituto Nacional de Salud y prevision Social.
- Mollinedo, S. 2000. Guia de diagnostico de laboratorio de la leishmaniasis. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud.
- Torrez, M. Lopez, M., Le Pont, F., Martinez, E., Munoz, M., Hervas, D. Yaksic, N., Arevalo, J., Sossa, D. Deder, JP, Dujardin, JP. 1998. *Lutzomyia nuneztovarii anglesi* (Diptera : Psychodidae) as a probable vector of *Leishmania braziliensis* in the Yungas, Bolivia. *Acta tropica* 71 : 311-316.

II – Publications consacrées au sujet (sur papier libre éventuellement)

Publications sur le paludisme et/ ou les leishmanioses et/ ou la lutte anti vectorielle et/ ou enquêtes entomologiques

- Bouchité B, Baldet T, Manga L, Demanou M, Antonio Nkondjio C, Folefack G, Gardon J., 1999. Operational malaria control programme using impregnated mosquito nets in medium-sized agro-industrial town in southern Cameroon / Mbandjock. Final report 1- Results of entomological evaluation of Solfac® EW50(cyfluthrin, BAYER A.G.) Phase III WHO-PES field trial. English version. OMS report /Laboratoire de Recherche en Epidémiologie et Santé Publique ORSTOM – CPC 1 : 1-161.
- Brenière, S.F., Carrasco, R., Mollinedo, S., Lemesre, J.L., Dejeux, P., Afchain, D., Carlier, Y., 1987. Specific Immunodiagnosis of Chagas disease. Immunodiffusion test using a specific serum anti-*trypanosoma cruzi* component. *Trop. Geogr. Med.* 39(3), 281-282.
- Chippaux JP, Bouchité B, Boussinesq M, Ranque S, Baldet T, et Demanou M. Impact of repeated large scale ivermectin treatments on the transmission of *Loa loa*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1998;92:454-8.
- Chippaux JP, Bouchité B, Demanou M, Morlais I, Legoff G. Study on the dispersal and the density of loiasis vectors *Chrysops dimidiata* in rain forest of southern Cameroon. *Med. Vet. Entomol.* 2000 ;14,339-344
- Desjeux, P., Aranda, E., Alaiga, O., Mollinedo, S., 1983. Human visceral leishmaniasis in Bolivia. First proven autochthonous case from « los Yunagas ». *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77 (6), 851-852.
- Desjeux, P., Aranda, E., Alaiga, O., Mollinedo, S., 1984. Leishmaniasis visceral humana en Bolivia. Primer caso autoctono procedente de los Yunagas. *Anuario IBBA* 83-84, 57-62.
- Desjeux, P., Le Pont, F., Mollinedo, S., Tibayrenc, M., 1984. Les *Leishmania* de Bolivie I. *Leishmania braziliensis braziliensis* dans les départements de La paz et Beni. Premiers isolements de souches humaines et caractérisation isoenzymatique. *Instit. Medit. d'Epidemiologie*
- Desjeux, P., Le Pont, F., Mollinedo, S., Tibayrenc, M., 1984. Les *Leishmania* de Bolivie II. *Leishmania chagasi*. I. premiers isolements dans « Los Yungas » de La Paz. Comparaison isoenzymatique de souches humaines de chiens et du phlébotome *Lutzomyia longipalpis*. *Instit. Medit. d'Epidemiologie*.
- Desjeux, P., Le Pont, F., Mollinedo, S., Tibayrenc, M., 1983. Las leishmaniasis de Bolivia I. *Leishmania braziliensis braziliensis* en los departamentos de La Paz y Beni. Primeros aislamientos de cepas humanas y su caracterización enzimática. *Anuario IBBA* 83-84, 155-162.
- Desjeux, P., Le Pont, F., Mollinedo, S., Tibayrenc, M., 1983. Las leishmaniasis de Bolivia II. *Leishmania chagasi*

- s.l.* Primeros aislamientos en los Yungas de departamento de La Paz ; comparacion isoenzimatica de la cepas aisladas de un caso humano autoctono, de perros y phlebotomos *Lutzomyia longipalpis*. Anuario IBBA 83-84, 163-170.
- Desjeux, P., Le Pont, F., Mollinedo, S., 1985. Visceral leishmaniasis in the La Paz Departement of Bolivia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 96.
 - Desjeux, P., Le Pont, F., Mollinedo, S. 1989. Etude épidémiologique des leishmanioses du département de La Paz (Bolivie). Summaries of the final reports. Commission des Communautés Européennes, 248-252.
 - Desjeux, P., Le Pont, F., Mollinedo, S., 1987. Leishmania tegumentaria y visceral en el departamento de La Paz, Bolivia. Principales características clinicas epidemiologicas y terapeuticas. Anuario IBBA 86-87, 269-272.
 - Desjeux, P., Mollinedo, S., Le Pont, F., Paredes, A., Ugarte, G., 1985. Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz departement). Isolation and isoenzymatic characterization of 26 strains of Leishmania braziliensis braziliensis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81 (5).
 - Dujardin, J.P., Le Pont, F. 2000. Morphometrics of a neotropical sandfly subspecies, *Lutzomyia carrerai thula*. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie 323 : 273-279.
 - Dujardin, J.P., Le Pont, F. Galati, AEB. 1999. Cryptic speciation suspected by morphometry within *Lutzomyia runoides*. C. R. Acad. Sci. Paris, 322 :375-382.
 - Dujardin, JP, Le Pont, F., Martinez, E. 1999. Quantitative phenetics and taxonomy of some phlebotomine taxa. Mem. Inst. Osw. Cruz 94 : 735-742.
 - Dujardin, J.P., Torrez, M., Le Pont, F., Hervas, D. Sossa, D. 1997. Isozymic and metric variation in teh *Lutzomyia longipalpis* complex. Med. Vet. Entomol. 1 : 394-400.
 - Gardon J, Kamgno J, Folefack G, Gardon-Wendel N, Bouchité B., Boussinesq M., 1997. Marked decrease in *Loa loa* microfilaraemia six and twelve months after a single dose of ivermectin. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 91 :593-594
 - Kamgno J, Bouchité B., Baldet T., Folefack G., Godin C., Boussinesq M. Contribution à l'étude de la répartition des filarioses humaines à l'Ouest Cameroun. . Bull Soc Path. Ex 1997., 90 : 327-330.
 - Kamgno J, Gardon J, Enyong P, Bouchité B., 1999. L'onchocercose dans la région Mamfé-Kumba, Province du Sud-Ouest Cameroun : Enquête REMO. Bull liaison doc OCEAC; 31 : 33-38
 - Lardeux, F., Loncke, S., Séchan, Y., Kay, B. H., & Rivière, F. 1990. Potentialities of Mesocyclops aspericornis (Copepoda) for broad scale control of Aedes aegypti in French Polynesia. Arbovirus Research in Australia 5 : 154-159.
 - Cartel, J. L., Nguyen, N. L., Spiegel, A., Moulija-Pelat, J. P., Plichart, R., Martin, P. M. V., Manuellan, A. B., & Lardeux, F. 1992. Wuchereria bancrofti infection in human and mosquito populations of a Polynesian village ten years after interruption of mass chemoprophylaxis with diethylcarbamazine. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 86 : 414-416.
 - Lardeux, F. 1992. Biological control of Culicidae with the copepod Mesocyclops aspericornis and larvivorous fish (Poeciliidae) in a village of French Polynesia. Medical and Veterinary Entomology 6 : 9-15.
 - Lardeux, F., Rivière, F., Séchan, Y. and Kay, B. H. 1992. Release of Mesocyclops aspericornis (Copepoda) for control of larval Aedes polynesiensis (Diptera: Culicidae) in land crab burrows on an atoll of French Polynesia. Journal of Medical Entomology 29 (4) : 73-79.
 - Nicolas, L., Luquiaud, P., Lardeux, F., & Mercer, D. R. 1996. A polymerase chain reaction assay to determine infection of Aedes polynesiensis by Wuchereria bancrofti. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 90 : 136-139.
 - Lardeux, F. & Cheffort, J. 1996. Behavior of Wuchereria bancrofti (Filariidea: Onchocercidae) infective larvae in the vector Aedes polynesiensis (Diptera: Culicidae) in relation to parasite transmission. Journal of Medical Entomology 33 (4) : 516-524.
 - Lardeux, F. & Cheffort, J. 1997. Temperature thresholds and statistical modelling of larval Wuchereria bancrofti (Filariidea: Onchocercidae) developmental rates. Parasitology 114 : 123-134
 - Lardeux, F., Ung, A. & Chebret, M. 2000. Spectrofluorometers are not adequate for aging Aedes and Culex (Diptera : Culicidae) using pteridine Fluorescence. Journal of Medical Entomology 37 (5) : 769-773.
 - Lardeux, F., Séchan, Y., Loncke, S., Deparis, X., Cheffort, J. & Faaruaia, M. 2000. Integrated control of peridomestic larval habitats of Aedes and Culex mosquitoes (Diptera : Culicidae) in atoll villages of French Polynesia. Journal of Medical Entomology (sous presse).
 - Lardeux, F., Séchan, Y. & Faaruaia, M. 2000. Evaluation of insecticide impregnated baits for control of mosquito larvae in land crab burrows on French Polynesian atolls. Journal of Medical Entomology (sous presse).
 - Le Pont, F., Mollinedo, S., Mouchet, J., Desjeux, P. 1989. Leishmaniose en Bolivie IV. Le chien dans les cycles des leishmanioses. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84(3°), 417-421.
 - Le pont, F., Desjeux, P., Torrez, J.M., Fournet, A., Mouchet, J. 1992. *Leishmanioses et phlébotomes en Bolivie*. ORSTOM-INSERM, 116 p
 - Le Pont, F., Martinez, E., Torrez, M. Dujardin, JP. 1998. Phlébotomes de Bolivie : description de cinq nouvelles espèces de *Lutzomyia* de la région subandine (Diptera : Psychodidae). Bull. Soc. Ent. France 103 : 159-173.
 - Le Pont, F., Torrez, M., Dujardin, J.P. 1997. Phlébotomes de Bolivie : description de quatres nouvelles espèces de *Lutzomyia* (Diptera : Psychodidae) 33 : 55-64.
 - Martinez, E., Mollinedo, S., Torrez, M., Munoz, M., Banuls, A.L., Le Pont, F. 2001. Coinfection by *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi* in a fatal case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. In Press
 - Manga L., Bouchité B., Toto JC., Froment A., 1997. La faune anophélienne et la transmission du paludisme dans une zone de transition forêt/savane au centre du Cameroun. Bull Soc Path Ex 90 :128-30.
 - Mollinedo, S., 1982 (1^{ère} Ed.), 1994 (2^{nde} Ed.) Guia de trabajos practicos de parasitologia. Facultadd de medicina

- catedra de parasitologia. Universidad Mayor de san Andres.
- Mollinedo, S. 1998. El diagnostico laboratoril de la malaria en Guayaramerin, Beni. Editions INLASA, La Paz, Bolivia
 - Mollinedo, S. 1999. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnostico de las Leishmaniasis. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud, INLASA, Ministerio de salud y prevision Social.
 - Mollinedo, S., Dejeux, P., Le Pont, F. 1984. American *Leishmaniasis*. Shell International Petroleum Maatschappij B.V. Occupational Health and Hygiene Digest 23, 14-16.
 - Mollinedo, S., Munoz, M., Hervas, D., Yaksic, N., Torrez, M., Desjeux, P., Le Pont, F. 1992. Leishmaniasis visceral y tegumentaria en ninos de dos zonas endemicas de Bolivia. Parasitol. Al dia 16, 117-120.
 - Mollinedo, S., Munoz, M., Herbas, D., Yaksic, N., 1988. Leishmaniasis. Anuario Bodas de Plata del IBBA, 109-122.
 - Mollinedo, S. & Mollinedo R. 1999. Malaria, revision de tema. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud, INLASA, Ministerio de salud y prevision Social, Programa de malaria
 - Mollinedo, S., Mollinedo, R., 1999. Malaria en Bolivia. Instituto Nacional de Salud y prevision Social.
 - Mollinedo, S. 2000. Guia de diagnostico de laboratorio de la leishmaniasis. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud.
 - Prod'hon, J., Lardeux, F. & P. Ambroise-Thomas. 1982. Etude sérologique et parasitologique comparative entre deux villages d'hyperendémie Onchocerquienne au Mali (zone de savanne) et en Côte d'Ivoire (zone pré-forestière). Relation avec la gravité de la maladie. Annales de la Société Belge de Medecine Tropicale 62 : 343-352.
 - Prod'hon, J., Lardeux, F., Bain, O., Hébrard, G. & J.M. Prud'hom. 1987. Ivermectine et modalités de la réduction de l'infection des simulies dans un foyer forestier d'onchocercose humaine. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 62 : 590 - 598.
 - Torrez, M., Lopez, M., Le Pont, F., Martinez, E., Munoz, M., Hervas, D. Yaksic, N., Arevalo, J., Sossa, D. Deder, JP, Dujardin, JP. 1998. *Lutzomyia nuneztovarii anglesi* (Diptera : Psychodidae) as a probable vector of *Leishmania braziliensis* in the Yungas, Bolivia. Acta tropica 71 : 311-316.

III. Brevets

* Remplir une fiche par Laboratoire ou Service impliqué

Plan du projet

5.1. Objectifs de la recherche	26
5.1.1. Objectifs généraux	26
5.1.2. Objectifs spécifiques.....	28
5.2. Situation actuelle du sujet dans le contexte international et références bibliographiques les plus importantes.	29
5.2.1. Déforestation, anthropisation du milieu et migrations de populations : une situation favorable à la ré-émergence des maladies à vecteur.....	29
5.2.2. Le paludisme en Bolivie, une endémie localement mal connue et en forte recrudescence	30
5.2.3. Paludisme et Leishmanioses en Bolivie : Etat des connaissances.....	31
5.2.3.1. Etudes antérieures sur les anophèles et le paludisme	31
5.2.3.2. Etudes antérieures sur les phlébotomes et les leishmanioses	35
5.3. Activités antérieures de l'équipe dans le domaine et résultats préliminaires éventuels.....	37
5.4. Exposé détaillé du programme de recherche et des méthodologies utilisées	39
5.4.1. Problématique de la recherche – Hypothèses de travail	39
5.4.2. Description générale du programme.....	41
5.4.3. Méthodologie employée et justification du matériel demandé.....	42
5.4.3.1. Thème 1. Etude épidémiologique de la transmission du paludisme et des leishmanioses en zones écologiquement modifiées par l'action de l'homme.....	42
a) Zones d'étude.	42
b) Parasitologie humaine	43
c) Caractérisation bioécologique des vecteurs (paludisme et leishmanioses) ..	44
d) Génétique des populations des vecteurs du paludisme	46
5.4.3.2. Thème 2 : Etude de la résistance des vecteurs aux insecticides (Pyréthroïdes et DDT).....	49
5.5. Echancier de la recherche	53
Bibliographie	54

La Bolivie :

- plus de deux fois la superficie de la France ; plusieurs millions de personnes exposées aux maladies à transmission vectorielle.
- Les zones impaludées correspondent grossièrement aux régions amazoniennes et de forêts inter-andines (en vert clair et vert foncé sur la carte ci dessous). La distribution des phlébotomes, vecteurs de leishmanioses, est approximativement identique.



La Bolivie et les 9 départements qui la composent. En couleur les régions botaniques.

	région amazonienne		végétation de la Puna et altiandine
	Campos Cerrados		vallées interandines sèches
	forêt Tucumano-Bolivienne, forêt montagnarde humide et Yungas		Chaco

5.1. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

5.1.1. Objectifs généraux

Depuis quelques années, les migrations massives des populations de l'alti-plano andin vers les terres amazoniennes ont amené un changement radical des paysages agricoles boliviens : déforestation, défrichement, nouvelles pratiques agricoles, industries pionnières avec installation de colons etc.. autant de facteurs qui ont modifié et amplifié les contacts homme –vecteur en Bolivie. Ainsi, le paludisme y est en forte résurgence et la prévalence des leishmanioses en forte croissance dans ces populations non-immunes.

L'objectif général de la recherche est d'obtenir une évaluation de l'impact des modifications anthropiques des écosystèmes sur l'épidémiologie de la transmission simultanée du paludisme et des leishmanioses en Bolivie.

Le paludisme est actuellement considéré par le Ministère de la Santé bolivien comme la première maladie à combattre. Il existe une très forte demande des autorités boliviennes pour entamer des recherches sur la transmission du paludisme et acquérir, par la recherche, les capacités de mieux gérer ce problème (cf rapport de mission de Cot et al. 1999).

La Bolivie ne dispose cependant que de très peu de données sur ses *Anophèles* vecteurs, et manque de personnel technique formé à l'épidémiologie du paludisme. C'est pourquoi, ce projet intéresse fortement le Ministère de la Santé de Bolivie pour qui la lutte contre le paludisme et les leishmanioses sont deux priorités (cf. en annexe, la lettre de soutien du Dr. R. Bilbao, vice Ministre de la Santé).

Le projet s'attachera donc à effectuer les recherches de base en épidémiologie des transmissions par l'analyse des indices parasitologiques, entomologiques et écologiques. Il peut donc être considéré comme le préambule indispensable à toute recherche future. A moyen terme, les résultats obtenus permettront l'ouverture de thèmes de recherches plus spécifiques.

Plus particulièrement, ce projet est le tremplin qui permettra la création d'un laboratoire de recherche sur les vecteurs du paludisme en Bolivie.

Plus spécifiquement, les champs d'action suivant seront développés dans le projet :

- estimation de la prévalence d'infection chez l'homme, détermination des espèces de plasmodies en circulation (et leur fréquence relative) etc.,
- recherches en entomologie (écologie des vecteurs, étude des niveaux de transmission, sensibilité aux insecticides, structure génétique des populations) : il s'agira de caractériser les systèmes vectoriels par des approches diverses et complémentaires.

Les recherches seront menées dans deux foyers de transmission où sont présents les deux principaux vecteurs du paludisme: *Anopheles darlingi* et *Anopheles pseudopunctipennis*, mais où coexistent aussi des phlébotomes, vecteurs de leishmanioses (*Lutzomyia longipalpis* ; *Lutzomyia anglesi* notamment), afin d'envisager les possibilités d'une lutte dirigée simultanément contre les deux systèmes vectoriels dans une zone géographique donnée.

La motivation d'une étude des possibilités d'une lutte simultanée deux catégories de vecteurs (anophèles et phlébotomes) se base sur l'observation de certains effets réducteurs d'un traitement sur les densités d'une population non cible de vecteurs. Par exemple, en luttant contre le paludisme, on a constaté la disparition de la filariose de Bancroft dans certaines régions de Nouvelle Guinée. De même, la lutte antipaludique par aspersions intradomiciliaires a permis un excellent contrôle des populations de phlébotomes « domestiques » au Moyen-Orient, etc. Ces exemples supposent toutefois que le comportement des vecteurs soit sensiblement identique face aux traitements (éthologie similaire, bonne sensibilité aux insecticides etc.). Malgré ces observations de terrain, aucune étude n'a été à ce jour orientée spécifiquement sur les perspectives d'une lutte pluri-vectorielle. Ce projet s'inscrit donc dans une optique novatrice pour l'amélioration de la lutte anti-vectorielle dans les zones où différents vecteurs de différentes endémies transmettent simultanément

Par ailleurs, un volet d'étude de la résistance aux insecticides les plus courants est prévu. Cette étude de sensibilité des vecteurs est importante, car elle débouche sur l'identification des zones géographiques où existe (ou non) une résistance des vecteurs. L'obtention d'une telle cartographie, avec l'estimation des niveaux de résistance de chaque zone, permet d'envisager, à moyen terme, le développement d'études en phase II, et à plus long terme, des études en phase III dans la lutte contre les endémies.

Le projet se déroulera en collaboration avec une équipe bolivienne déjà extrêmement performante dans l'étude des phlébotomes, mais qui doit répondre désormais aux

sollicitations de leur ministère de tutelle qui leur demande de se pencher sur les problématiques du paludisme. Le projet, au travers des études longitudinales qu'il propose, sera aussi l'occasion pour cette équipe bolivienne de se former aux techniques d'études sur le paludisme.

5.1.2. Objectifs spécifiques

- Estimation des paramètres parasito-cliniques et de leurs variations temporelles. Estimation de l'importance relative du paludisme au sein de la famille des maladies à vecteurs.
 - Prévalence d'infection chez l'homme (paludisme et leishmaniose)
 - Espèces plasmodiales / de leishmanies, et importance relative
 - Charges parasitaires etc.
 - Taux d'incidence des fièvres et des « accès palustres » (paludisme)
- Connaissance de la biologie, de l'écologie des vecteurs principaux (paludisme et leishmaniose)
 - Variations temporelles d'abondance
 - Degré d'endo/exophilie
 - Taux d'agressivité
 - Dynamique de transmission / prévalence d'infection chez les vecteurs
 - Préférences trophiques
 - Etude des gîtes larvaires
 - Analyse de l'homogénéité génétique des populations étudiées en fonction des différences phénotypiques observées.
- Estimation du niveau de résistance aux pyréthrinoïdes et DDT (anophèles et phlébotomes), en liaison avec les activités de déforestation et d'installation de cultures maraîchères ou fruitières
 - Mise en évidence (si elle existe) d'une résistance
 - Si oui : Evaluation d'une dose diagnostique (non encore disponible pour les espèces étudiées)
 - Mise au point d'un élevage d'*Anopheles (darlingi et pseudopunctipennis)* et de phlébotomes (notamment *Lu. longipalpis* et *Lu. anglesi*)
- Equipement d'un laboratoire en Bolivie pour l'étude des vecteurs du paludisme (matériel d'entomologie de laboratoire et de terrain, élevage etc..)

- Formation de techniciens et jeunes chercheurs boliviens aux études des transmissions par moustique (épidémiologie / génétique des vecteurs)

5.2. Situation actuelle du sujet dans le contexte international et références bibliographiques les plus importantes.

5.2.1. Déforestation, anthropisation du milieu et migrations de populations : une situation favorable à la ré-émergence des maladies à vecteur.

L'imagerie populaire engendrée par l'histoire des Incas, peuple d'altitude et de hauts plateaux, fait croire à tort que la Bolivie est uniquement constituée de montagnes élevées où sévit un climat froid. Or, plus de 70% du territoire bolivien est en plaine amazonienne ! Il s'agit donc essentiellement un pays « tropical », où le paludisme est endémique sur plus de 75% du territoire, c'est à dire en Amazonie et dans les vallées inter-andines (Yungas). Il est vrai que jusqu'à récemment, ces territoires n'ont pas fait l'objet d'une forte colonisation: la nature, hostile, ne permettait une survie que de quelques années dans certaines contrées ! Or, la Bolivie a récemment déclenché des Plans Stratégiques de Développement, induisant des déplacements très importants de populations andines vers ces territoires vierges amazoniens. La recherche par ces populations migrantes de meilleures conditions économiques et sociales se traduit par une déforestation intensive, la création de villes/ villages au développement incontrôlé, l'émergence de nouvelles habitudes culturelles (riz, soja, cane à sucre, palmiers, noix du Brésil etc.) ou industrielles (recherche de minerais, exploitation de bois précieux, pétrole, gaz etc.). Ainsi, l'écosystème tropical est-il très fortement modifié, induisant une écologie radicalement différente, notamment en matière de maladies à vecteurs : ce n'est plus le parasite qui vient à l'homme, mais l'homme qui va au devant du parasite. Qui plus est, les modifications anthropiques des écosystèmes ont permis l'expansion de populations de vecteurs jusqu'alors présents en faible densité, mais qui se développent aux abords de l'Homme et qui suivent ses implantations. C'est le cas par exemple, d'*Anopheles darlingi*, vecteur du paludisme, ou de certains triatomes et/ou phlébotomes, qui trouvent près de l'homme des gîtes de développement (et de prolifération) favorables (Le Pont et al. 1992). La déforestation intensive en zone amazonienne entraîne ainsi non seulement l'apparition de biotopes favorables au développement de nombreuses espèces vectrices, mais encore permet à certaines espèces ayant de bonnes capacités d'adaptation, de proliférer, changer de

comportement et de se « domestiquer ». Ainsi, les maladies à vecteurs trouvent-elles depuis plusieurs années, un terrain extrêmement favorable à une forte résurgence. Non seulement les vecteurs connus depuis longtemps et historiquement importants continuent leurs ravages, mais encore voit-on apparaître de nouveaux vecteurs ou des espèces « candidat-vecteurs » jusqu'alors cantonnées aux zones inhabitées et qui entrent en contact avec l'homme. Elles sont autant de menaces à plus ou moins long terme. Ainsi, les modifications du milieu par l'homme entraînent-elles des contacts homme-vecteur accrus chez des populations non immunes, aggravant d'autant les pathologies des diverses maladies à vecteurs. Ceci est vrai non seulement pour le paludisme, mais aussi pour les leishmanioses.

5.2.2. Le paludisme en Bolivie, une endémie localement mal connue et en forte recrudescence

En Bolivie, le système national de santé a sous-estimé depuis plus de 20 ans l'importance des maladies transmises par les vecteurs, et principalement du paludisme. En poursuivant un programme vertical basé sur l'éradication et la lutte anti-vectorielle, sans connaissance approfondie des problèmes (ne serait-ce que de la biologie des vecteurs), la Bolivie n'est pas arrivée à contrôler l'endémie : la crise économique a porté un coup fatal à ce système en réduisant les ressources assignées à la lutte, et le nombre de cas de paludisme recensés est passé de 4 425 en 1979 à 74 350 en 1998 (Arata *et. al.* 1999). Compte tenu des difficultés à évaluer précisément l'incidence de cette pathologie, on peut estimer à plus d'un quart de millions le nombre réel de cas annuels. La maladie s'est géographiquement dispersée et s'est étendue à des zones jusqu'alors indemnes (vallées inter-andines par exemple). Ainsi, actuellement, c'est plus de 3.3 millions de personnes qui sont exposées, et sur la période 1996-98, le paludisme a coûté plus de 6 500 000 US\$ à la Bolivie, ce qui est une charge énorme pour ce pays. De plus, la prévalence d'infection avec *Plasmodium falciparum*, jusqu'alors faible, atteint désormais plus de 15% des cas et est en augmentation constante (le reste des cas étant dû à *P. vivax*). De manière globale, l'incidence est forte et induit une prévalence élevée. A titre de comparaison, l'Indice Annuel Parasitaire (IAP) le plus élevé d'Amérique du Sud et notifié par l'OMS est de 310/1000 au Surinam. Or, des enquêtes (non officielles) menées dans des villes boliviennes frontalières du Brésil en 1988 ont montré un IAP de 423/1000 à Riberalta et 214/1000 à Guyaramerin (Mollinedo, comm. pers.).

La ré-émergence du paludisme bolivien s'explique par plusieurs facteurs. Tout d'abord l'abandon des campagnes d'aspersion intradomiciliaire de DDT a définitivement

permis la remontée de l'incidence (Roberts et al. 1997). Ces campagnes, initiées dès 1956 lors de la création du « *Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria* » (Moscoso, 1963) et continuées jusqu'en 1992 ont certes permis un contrôle de l'endémie. Malheureusement, avec le temps, certains auteurs ont pu remarquer des changements dans les comportements des vecteurs qui évitaient les traitements insecticides sans pour autant réduire significativement leur capacité vectorielle ; Des phénomènes de résistance aux insecticides sont apparus (Girona, 1999). La lutte insecticide n'était pas appuyée sur une étude approfondie de l'écologie des vecteurs, et avec l'apparition de ces problèmes difficiles à gérer sans connaissance spécifique, la lutte anti-vectorielle devenait de moins en moins efficace (Girona, 2000). Faute de connaissances de base en entomologie des vecteurs du paludisme en Bolivie (en 40 ans, il y a eu à peine 15 publications plus ou moins en rapport avec le sujet), la lutte anti-vectorielle n'a pas été suffisante pour maintenir une faible incidence de la maladie (Mollinedo & Mollinedo, 1999). Tout ceci contribue encore à l'échec du contrôle du paludisme en Bolivie et à la ré-émergence de cette endémie.

Un nouveau « *Plan de Control del Paludismo* » est en train d'être mis sur pied en Bolivie. Au contraire du précédent, il sera décentralisé, horizontal et intégré aux différents services de Santé (Mollinedo, com. pers.). Pour la réussite de ce plan, une meilleure connaissance des vecteurs est absolument nécessaire afin d'améliorer la lutte anti-vectorielle, alternative actuellement « rentable » contre le paludisme en Amérique du Sud (Baird, 2000), même si, comme partout ailleurs, l'accent doit (et sera) d'abord être mis sur le dépistage précoce et le traitement des malades.

5.2.3. Paludisme et Leishmanioses en Bolivie : Etat des connaissances

5.2.3.1. Etudes antérieures sur les anophèles et le paludisme

Seulement 15 publications et rapports écrits entre 1942 et 2000 traitent spécifiquement des anophèles de Bolivie. Toutes se réfèrent traditionnellement à deux espèces principales incriminées dans la transmission du paludisme : *Anopheles darlingi* et *An. pseudopunctipennis* (Arata et al., 1999 ; Cerqueira, 1942 ; Ferguson et al., 1997 ; Girona, 2000 ; Hackett, 1945 ; Lien et al., 1984 ; Moscoso, 1963 ; Ordonez & Avina, 1999 ; Pardo, 1951 ; Peredo & Gianella, 1997 ; Peredo, 1998 ; Peyton et al., 1983 ; Prosen, 1963 ; Suarez, 1945, 1958). Environ 42 espèces d'*Anopheles* ont été décrites en Bolivie, mais les données

restent parcellaires et ne sont, de toute façon, pas du tout actualisées ; le nombre réel d'espèces «nominales» d'anophèles n'est donc pas connu avec précision.

- *An. darlingi* est sans conteste le vecteur majeur du paludisme dans tout le bassin amazonien (Charlwood, 1996, Lounibos & Conn, 2000) où il sévit jusqu'à 550 m d'altitude. Les gîtes larvaires sont nombreux et variés, parfois difficiles d'accès, ce qui complique la lutte anti-larvaire. Ce vecteur est réputé se développer à proximité de l'homme et suivre ses implantations. En Bolivie, l'espèce se rencontre principalement dans le nord-est et l'est du pays (département du Pando, de la Paz, du Beni, Santa Cruz et Tarija). C'est le vecteur le plus fréquemment rencontré infecté par *P. vivax* ou *P. falciparum*, et le plus important vecteur de *P. falciparum* (Mollinedo, comm. pers.). Une récente mise au point sur les connaissances de l'espèce par Charlwood (1996) montre que : (1) c'est une espèce difficile à étudier, car en général peu dense dans les zones où elle sévit ; (2) sa dynamique est très mal connue, et semble dépendre de nombreux facteurs écologiques ; (3) les variations saisonnières et géographiques des taux de survie n'ont jamais été étudiés ; (4) L'espèce possède différents comportements de piqûre (tantôt exophile, tantôt endophile) avec un cycle nyctéméral variable selon les régions. Elle a des durées de séjour en intérieur variables, ce qui conditionne la plus ou moins bonne réussite des applications d'insecticides intra-domiciliaires ; (5) on ne connaît pas ses gîtes de repos en extérieur, ni ses réelles préférences trophiques mais l'homme reste cependant un hôte de prédilection. Le polymorphisme génétique d'*An. darlingi* est à l'image de sa plasticité phénotypique : de nombreuses inversions chromosomiques (fixes et/ou polymorphes) ont été décrites (Kreutzer et al., 1972 ; Tadei et al., 1982) et une variabilité génétique importante a été systématiquement reportée, quelque soit le type de marqueur utilisé [isoenzymes (Steiner et al., 1982 ; Rosa-Freitas et al., 1992), ADN mitochondrial (Freitas-Sibajev et al., 1995 ; Conn et al., 1999) ou séquences ITS2 (Malafronte et al., 1999)]. Cependant, l'espèce apparaît comme monophylétique et l'hypothèse d'un complexe d'espèces a récemment été réfutée par une étude combinant des marqueurs morphologiques, isoenzymes, RAPD et ITS2 (Manguin et al., 1999). Toutefois, une analyse de l'ADN mitochondrial a révélé une structuration génétique des populations d'*An. darlingi* en fonction de la distance géographique entre populations (Conn et al., 1999). L'isolement récent de marqueurs microsatellites (petites séquences d'ADN répétées en tandem, très résolutive car très polymorphes) chez cette espèce (Conn J, comm. pers.) permettra une analyse plus fine de la répartition de la variabilité génétique

entre et au sein des populations d'*An. darlingi*. Dans le cadre de ce projet, nous prévoyons notamment d'étudier la structuration génétique des populations d'*An. darlingi* à l'échelle microgéographique (de l'ordre du village) afin de caractériser l'unité de reproduction de base chez cette espèce (le dème, qu'on caractérisera en termes de nombre effectif d'individus et de surface géographique associée) et d'étudier les corrélations entre variabilité génotypique et phénotypique.

- *An. pseudopunctipennis* est également un vecteur majeur du paludisme en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. Sa répartition géographique est l'une des plus étendue parmi les vecteurs de ce continent puisqu'on le retrouve du Kansas (Etats-Unis) jusqu'au nord de l'Argentine et du Chili (Fleming, 1986 ; Manguin et al., 1995). Les gîtes de développement larvaire sont variés, mais jamais artificiels, classiquement le long des cours d'eau dans de l'eau propre et peu profonde (Manguin et al. 1996). En Bolivie, *An. pseudopunctipennis* est présent surtout à l'ouest du pays, entre 500 et 2500 m d'altitude (départements de La Paz, Cochabamba, Beni, Chuquisaca, Potosi, Santa Cruz et Tarija). A l'image d'*An. darlingi*, le comportement et la capacité vectorielle d'*An. pseudopunctipennis* sont très différents d'une région à l'autre (Loyola et al. 1990 ; Martinez-Palacios & Zulueta, 1964 ; Rejmankova et al. 1991, 1993). La dynamique des populations, complexe et variée (Fernandez-Salas et al. 1993, 1994 a,b,c), reste très mal comprise et interdit toute généralisation. En cibler le contrôle en un pays donné suppose de bien connaître son écologie locale, qui est, jusqu'à présent, non étudiée en Bolivie. Au niveau génétique, là encore, des résultats discordants ont été obtenus : sur la base de profils de migration d'isoenzymes, Estrada-Franco *et al.* (1993a, b) suggèrent qu'*An. pseudopunctipennis* est composé d'au moins deux sous-espèces, différenciées génétiquement et géographiquement. Cette conclusion est nuancée par Manguin et al. (1995) qui, à la suite d'une étude extensive utilisant les mêmes marqueurs (isoenzymes) et comparant des échantillons prélevés sur la totalité de l'ère de répartition d'*An. pseudopunctipennis*, parlent de « 3 sous-populations géographiques » appartenant à la même espèce. Plus récemment, s'appuyant sur des observations cytogénétiques et l'étude des croisements entre ces populations allopatriques conduisant à une descendance stérile, Coetzee *et al.* (1999) ont démontré de façon formelle qu'*An. pseudopunctipennis* était un complexe d'au moins trois espèces morphologiquement identiques mais génétiquement isolées, pour le moment désignées sous la nomenclature *An. pseudopunctipennis* A, B et C. Selon ces auteurs, les résultats obtenus par Manguin *et al.* (1995) pourraient refléter un

biais d'échantillonnage dû à la présence, dans certaines localités, de plusieurs espèces sympatriques considérées comme une seule population homogène. Alternativement, ces résultats pourraient refléter le manque de puissance des marqueurs utilisés à mettre en évidence des différences significatives entre espèces proches ou ayant divergé dans un passé récent ou des artéfacts dus aux limitations des techniques statistiques de traitement des données utilisées [notamment la comparaison de populations séparées par une distance géographique très importante (Rousset, 2000)]. Afin d'élucider cette hypothèse, des études à une échelle microgéographique (de l'ordre du village) comparant des populations présentant *a priori* des différences phénotypiques identifiables sont nécessaires et seront conduites en utilisant des marqueurs moléculaires performants et résolutifs (séquençage, microsatellites si disponibles).

Ces deux vecteurs, *An. pseudopunctipennis* et *An. darlingi* sont eurygames, d'élevage difficile mais possible (Villareal et al. 1998 ; Darsie & Lopez, 1980 ; Burralli & Bergo, 1988 ; Bergo et al. 1990)

Vecteurs secondaires : ils sont mal connus, mais 6 espèces sont déjà identifiées comme telles : *An. oswaldoi*, *An. brasiliensis*, *An. strodei*, *An. albitarsis*, *An. trianulatus* et *An. trinkae*. Leur rôle dans la transmission du paludisme en Bolivie est mal connu, probablement localement important, à l'image de ce qui a été reporté dans les pays voisins (Lounibos & Conn, 2000).

En conclusion, pour la Bolivie, il y a une réelle méconnaissance de l'écologie des vecteurs principaux, de leur comportement, de leur répartition géographique exacte, ainsi que des espèces vectrices potentielles : six sont *a priori* identifiées, mais d'autres sont vraisemblablement à mettre en cause (*An. nuneztovari*, par exemple).

L'épidémiologie du paludisme apparaît sous deux faciès en Bolivie :

- Zones de paludisme à transmission permanente, dans les départements du Beni, Pando et Santa Cruz, qui forment l'essentiel de la zone amazonienne. C'est une zone où *An. darlingi* prédomine. Il peut aussi y avoir des flambées épidémiques, en mars avril, lors des déplacements de grandes populations de travailleurs saisonniers. Ces groupes sont les plus vulnérables et forment des réservoirs mobiles de dissémination du paludisme.

- Zones de paludisme à transmission saisonnière, généralement durant les 6 premiers mois de l'année, dans les vallées andines des départements de Chuquisaca, La Paz, Cochabamba et Tarija. Ces zones hébergent soit *An. darlingi*, soit *An. pseudopunctipennis* selon l'altitude.

5.2.3.2. Etudes antérieures sur les phlébotomes et les leishmanioses

En Bolivie, il existe au moins 89 espèces de phlébotomes, dont l'écologie est pour certaines mal connue (Le Pont et al., 1992). Quatre espèces de phlébotomes vecteurs ont été identifiées avec certitude : *Lutzomyia longipalpis*, *Psychodopydus carrerai carrerai*, *Ps. yucumensis*, et *Ps. llanosmartinsi*. D'autres espèces sont très fortement suspectées (comme *Lu. anglesi*) (Torrez et al. 1998 ; Martinez et al. 1999), soit sur des critères circonstanciels, soit parce qu'elles sont vectrices dans les pays voisins.

Plusieurs espèces de leishmanies cohabitent dans différents faciès écologiques. Cette variété des agents pathogènes reflète la variété de mammifères réservoirs et des phlébotomes vecteurs. L'ensemble des cycles parasitaires n'est d'ailleurs pas encore élucidé en Bolivie. La circulation selvatique est presque totalement inconnue. La transmission, selvatique à l'origine, peut devenir domestique à la disparition du biotope originel des phlébotomes, suite aux modifications anthropiques de l'environnement. Certaines espèces semblent s'adapter facilement ou modifier leur comportement en conséquence (endophagie associée à l'exophilie pour *Lu. anglesi*, par exemple). De même, le polymorphisme épidémiologique des parasites, comme *Leishmania braziliensis* prouve que cette espèce peut s'adapter facilement à diverses espèces de vecteurs et de réservoirs, et peut ainsi surmonter les modifications anthropiques de son environnement. Cette « domestication » conduit à des situations épidémiques qui dépassent les capacités de réponse des services de santé. La stratégie de lutte de type OMS (diagnostic précoce et traitement systématique) est inadaptée : coût prohibitif, système de surveillance et de détection des malades non adapté, problèmes de rechute ou de résistance secondaire lorsque le traitement n'est pas suivi en entier. La lutte anti-vectorielle pourrait être, là encore, une stratégie payante si elle est bien organisée, bien ciblée, et basée sur des données bio-écologiques solides.

En Bolivie, le phénomène de « domestication » lié aux modifications anthropiques de l'environnement, est acquis dans la région des Yungas. Il est en cours dans la région de l'Alto Beni. La « domestication » pose de nouveaux problèmes :

- Quel est le comportement du vecteur dans une telle situation ? Souvent, le vecteur peut changer ses habitudes alimentaires, ses rythmes de piqûre etc...(le comportement pouvant influencer sur la décision d'utiliser telle ou telle méthode de lutte)
- Quel est le réservoir animal dans cette situation ? Si l'animal est « domestique », une action sur ce réservoir pourrait être envisagée (le réservoir, peut lui aussi changer, ou se diversifier : de sauvage, il peut devenir « domestique » ou « secondairement domestique » etc.).

Par ailleurs, les leishmanioses sévissent dans les mêmes régions que la maladie de Chagas. Le traitement actuel préconisé pour les leishmanioses (à base de Glucantime par voie systémique) est formellement contre-indiqué en cas de cardiopathie chagasique. Cela peut donc être, là encore, un argument en faveur d'une stratégie de contrôle des vecteurs dans les zones « à risque ».

On peut estimer que 90% des leishmanioses boliviennes sont de type cutanéomuqueux (LC). En règle générale, les LC sont remarquablement adaptées à l'anthropisation du milieu, au point de devenir par endroits une endémie péri-urbaine.

La leishmaniose tégumentaire (à *Le. braziliensis*) est fréquente, jusqu'à 2000 m. Elle se contracte essentiellement lors de séjours en forêt primaire (ouvriers etc...) et touche donc principalement les hommes. Les réservoirs animaux sont totalement inconnus en Bolivie. Les foyers primaires sont les foyers naturels de forêt (diverses espèces de phlébotomes). Les foyers secondaires apparaissent à la suite de la déforestation. Le vecteur est, par ex : *Lu. anglesi*, vivant dans les caféières. La lutte intradomiciliaire semble avoir un fort impact, de même que la diminution des caféières avec l'introduction d'autres cultures (vivrières ou coca).

La leishmaniose viscérale (à *Le. chagasi*) est transmise par *Lu. longipalpis* (pic d'abondance en saison sèche). Il y a à l'heure actuelle 2 foyers en Bolivie (Yungas et Puerto-Suarez) (Le Pont & Desjeux, 1985). Le cycle est essentiellement péri-domestique, avec des hôtes animaux (chiens, poulets...). C'est pourquoi l'incidence de la maladie reste faible, même si *Lu. longipalpis* pique parfois l'homme. Dans les Yungas, la disparition du couvert végétal, l'introduction de cultures basses (coca) et la modification générale de l'environnement risquent d'augmenter le contact homme-vecteur et donc d'amplifier la transmission du parasite.

Les données de prévalence et d'incidence de la maladie sont inexistantes en Bolivie. Malgré tout, de rares études, comme celle de David et al. (1992), ont montré que sur un peu

plus de 10 ans, plus de 4000 cas ont été rapportés sur le territoire bolivien. Dedet et al. (1995) ont mis en évidence près de 3 300 cas dans les seules régions de l'Alto-Beni, des Yungas et du Beni. Ce chiffre ne représente qu'une faible proportion de «l'iceberg», la maladie étant généralement largement ignorée des autorités sanitaires locales.

En ce qui concerne le contrôle des vecteurs, Le Pont et al. (1992) signalent que les traitements anti-anophéliens par pulvérisation intra-domiciliaire ont entraîné (en leur temps) dans la région des Yungas, un certain recul de la maladie. Des essais récents avec de la deltaméthrine ont montré un bon contrôle pendant plusieurs mois, et une réduction des contacts homme - vecteur de plus de 50 %, avant que les populations ne reviennent à leur niveau d'origine (Le Pont et al. 1989a). Le contrôle des vecteurs est donc possible et efficace. Ces résultats montrent qu'une lutte insecticide intra-domiciliaire peut permettre le contrôle des anophèles et des phlébotomes simultanément. Ces résultats très prometteurs, demandent à être approfondis, notamment en essayant de quantifier l'impact de tels traitements sur l'épidémiologie des maladies, les indices parasitaires, et les niveaux de transmission du paludisme et des leishmanioses. Le projet que nous proposons pourrait apporter les outils nécessaires à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques qui régulent les cycles parasitaires soumis à des pressions de lutte anti-vectorielle.

5.3. ACTIVITES ANTERIEURES DE L'EQUIPE DANS LE DOMAINE ET RESULTATS PRELIMINAIRES EVENTUELS

Ce projet associe étroitement deux laboratoires (un du nord, un du sud), qui font partie d'un réseau d'équipes susceptible d'apporter leur concours scientifique, pour l'analyse critique des résultats.

1. Laboratoire de Parasitologie de l'INLASA / IRD - Bolivie

Le laboratoire de Parasitologie de l'INLASA (Instituto Nacional de LA Salud), situé à La Paz (Bolivie) analyse toutes les données parasitologiques de Bolivie. C'est un laboratoire récent (quelques années) qui est chargé de procéder aux analyses biologiques, et qui depuis peu développe aussi des programmes de recherche où sont associés des chercheurs de l'IRD. Ces programmes portent sur les trois endémies majeures de Bolivie : paludisme,

leishmanioses et maladie de Chagas. Le laboratoire a entrepris une étude de l'écoépidémiologie du paludisme le long d'un transect altitudinal, afin d'étudier les causes des variations de prévalence observées dans les populations humaines. Il collabore sur ce transect, avec une autre UR de l'IRD : « Santé de la mère et de l'enfant en milieu tropical : épidémiologie périnatale et génétique » qui étudie la morbidité liée au paludisme chez la femme enceinte. Actuellement, en entomologie médicale, le laboratoire mène essentiellement des études sur la génétique des triatomes vecteurs de la maladie de Chagas et la caractérisation des espèces. Il possède toutes les compétences en matière de systématique des phlébotomes (analyse morphologique et génétique) et d'étude de leur écologie. En tant que seul laboratoire à traiter des maladies à vecteurs, des petits programmes d'études entomologiques ponctuels ont été mis en place, notamment sur les vecteurs du paludisme en Amazonie (tests de lutte insecticide à petite échelle).

2. IRD- LIN Montpellier

Le Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN) a le label de centre collaborateur OMS pour la lutte contre les vecteurs. Il mène des études sur la sensibilité des *Anophèles* aux insecticides, évalue de nouvelles molécules insecticides et formulations sur larves comme sur adultes de moustiques, teste de nouveaux concepts comme les moustiquaires en imprégnation permanente etc. Le LIN développe aussi un volet de caractérisation génétique des vecteurs du paludisme, notamment en Afrique et en Asie. Il étudie également la génétique de la résistance aux insecticides et développe des techniques moléculaires d'identification de la résistance, notamment aux pyréthroïdes. Les techniques utilisées en routine par le laboratoire sont : les tests de sensibilité aux insecticides (tous types de tests), les tests ELISA, l'électrophorèse des isoenzymes, la PCR pour l'identification des espèces du complexe *An. gambiae* et la recherche de la mutation *kdr*, la PCR-RAPD pour la caractérisation des vecteurs etc.

3. Réseau de laboratoires et équipes

a.) L'équipe « nord » du projet est localisée au LIN de Montpellier, base arrière de l'UR016 / IRD « Caractérisation et contrôle des populations de vecteurs ». A ce titre, elle bénéficie des compétences et de l'aide de l'ensemble des laboratoires associés, notamment :

- **Equipe de D. Fontenille** (OCEAC, Yaoundé, Cameroun) : compétences en caractérisation des vecteurs du paludisme, en études sur l'écologie des *Anophèles* et la transmission du paludisme en Afrique. Cette équipe est par ailleurs le noyau

central d'un réseau de 15 équipes, bâti autour d'un projet VIHPAL « Améliorer la lutte contre le paludisme en Afrique par la caractérisation biologique et génétique des populations de vecteurs ».

- **Equipe de F. Chandre** (Institut P. Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire) : compétence en matière de résistance aux insecticides : étude de sensibilité, caractérisation biochimique / génétique de la résistance etc.

b.) **B. & M. Killick-Kendrick** sont des spécialistes mondialement reconnus des phlébotomes. Ils collaborent à l'IRD-Montpellier avec l'équipe de J. Bruhnes (taxonomie des vecteurs) et développent des programmes de contrôle des phlébotomes vecteurs de leishmaniose viscérale au Maghreb. M. K-K est par ailleurs une spécialiste reconnue de l'élevage des phlébotomes.

c.) **F. Le Pont**. Ce chercheur fait actuellement partie intégrante de l'équipe IRD de l'INLASA à La Paz (équipe du sud). Il est le spécialiste des phlébotomes de Bolivie et possède des compétences en matière de contrôle de ces vecteurs. Il sera malheureusement à la retraite à partir d'avril 2001, mais restera un interlocuteur privilégié et un conseiller scientifique dans le cadre de ce projet.

d.) **Jan Conn** Collaboration informelle. Professeur Associé à l'Université du Vermont au département de Biologie. Elle est spécialiste de la systématique, de la phylogéographie, de la génétique et structure des populations de moustiques vecteurs, notamment des vecteurs sud américains.

5.4. EXPOSE DETAILLE DU PROGRAMME DE RECHERCHE ET DES METHODOLOGIES UTILISEES

5.4.1. Problématique de la recherche – Hypothèses de travail

On peut partir du constat suivant :

- En Bolivie, les modifications anthropiques du paysage s'étendent géographiquement. Ces zones écologiquement modifiées et perturbées voient leurs populations humaines augmenter considérablement en densité du fait des migrations engendrées par les « Plans Stratégiques de Développement ». Des populations non immunes de plus en plus nombreuses entrent en contact avec les

Plasmodium (transmis par les anophèles) et les *Leishmania* (transmis par les phlébotomes).

- Bien souvent, les zones impaludées sont aussi sujettes à la transmission de *Leishmania* par des phlébotomes.
- Or, il n'existe aucune information actualisée et quantifiée de la dynamique de transmission du paludisme en Bolivie. Les zones réputées impaludées n'ont fait l'objet d'aucune enquête épidémiologique complète et les indices épidémiologiques de base ne sont donc que partiellement connus.
- L'écologie, la dynamique de population et la caractérisation populationnelle des deux vecteurs principaux du paludisme *An. darlingi* et *An. pseudopunctipennis* sont encore mal comprises ; des thèmes entiers de recherche de base sur ces deux vecteurs sont même jusqu'à présent complètement ignorés, alors qu'ils serviraient une réflexion raisonnée pour un contrôle efficace.
- L'épidémiologie des leishmanioses et la dynamique des phlébotomes est beaucoup mieux connue. Toutefois, la dynamique de transmission par des populations d'insectes récemment « domestiqués » ou en voie de domestication reste encore incomplètement connue. Or, ce sont ces populations à comportement « domestique » qui cohabitent avec les *Anopheles* en milieu semi-urbain et induisent une augmentation importante des prévalences d'infection.
- La lutte anti-vectorielle contre les anophèles et les phlébotomes est le complément obligatoire des systèmes de santé dans la lutte contre le paludisme et les leishmanioses. Les deux types de vecteurs peuvent être atteints par les mêmes techniques de contrôle. Un contrôle simultané de ces deux types de vecteurs peut donc être envisagé, moyennant une bonne connaissance de leur bio-écologie.

Le projet se propose donc :

- D'étudier la transmission du paludisme et de la leishmaniose dans des sites géographiques choisis en fonction des espèces vectrices principales (*An. darlingi* et *An. pseudopunctipennis*), notamment par des études parasito-cliniques et la caractérisation des systèmes vectoriels, la quantification des niveaux de transmission, l'étude du comportement des vecteurs, l'analyse génétique de ces populations.
- D'estimer le niveau de résistance aux insecticides des anophèles et des phlébotomes.

- D'apporter un appui à la formation entomologique des scientifiques boliviens, par cette recherche.
- D'établir un « point de référence initial » des connaissances en Bolivie afin de permettre l'ouverture, à moyen terme, d'autres problématiques scientifiques concernant le contrôle du paludisme et des leishmanioses.

5.4.2. Description générale du programme

Travaux dévolus aux deux laboratoires :

INLASA Bolivie : études de terrain, récolte d'échantillons, analyses *in situ* etc...

LIN Montpellier : analyses génétique, appui technique aux recherches sur la résistance.

Le programme s'articule autour de deux thèmes dont on développera les sujets suivants :

Thème 1 : Etude épidémiologique de la transmission du paludisme et des leishmanioses en zones écologiquement modifiées par l'action de l'homme

Parasitologie (paludisme et leishmanioses)

- Prévalence d'infection chez l'homme (paludisme et leishmaniose)
- Espèces plasmodiales / de leishmanies et importance relative
- Charges parasitaires, prévalence des infections mixtes
- Taux d'incidence des fièvres et des « accès palustres »

Caractérisation bioécologique des vecteurs (paludisme et leishmanioses)

- Variations temporelles des densités vectorielles
- Degré d'endo/exophilie
- Taux d'agressivité
- Prévalence d'infection chez les vecteurs
- Préférences trophiques
- Etude des gîtes larvaires

Génétique des populations des vecteurs du paludisme

- Niveau de variabilité génétique

- Répartition de cette variabilité en fonction des différences phénotypiques observées
- Structuration des populations à l'échelle microgéographique

Ce type d'étude doit permettre de préciser si les populations sont homogènes, ou au contraire structurées, dans l'espace et le temps. La connaissance de cette structuration influe sur les stratégies de contrôle vectoriel à adopter : contrôler une population homogène est souvent plus facile qu'une population constituée de plusieurs « groupes » plus ou moins indépendants.

Thème 2 : Etude de la résistance des vecteurs aux insecticides (Pyréthroïdes et DDT)

- Mise en évidence (si elle existe) d'une résistance, en comparant des souches capturées dans des zones *a priori* indemnes de tout traitement insecticide, et des zones où l'utilisation d'insecticides est importante (zones agricoles...)
- Si oui : Evaluation d'une dose diagnostique (non encore disponible pour les espèces étudiées)
- Mise au point d'un élevage d'*Anopheles (darlingi et pseudopunctipennis)* et de phlébotomes

5.4.3. Méthodologie employée et justification du matériel demandé

5.4.3.1. Thème 1. Etude épidémiologique de la transmission du paludisme et des leishmanioses en zones écologiquement modifiées par l'action de l'homme

a) Zones d'étude.

Cette étude sera réalisée dans deux régions géographiques distinctes, où existent les deux vecteurs majeurs du paludisme en Amérique du Sud: *An. darlingi* et *An. pseudopunctipennis*, en association avec des phlébotomes. Les deux sites identifiés sont :

- Une région de transmission palustre par *An. darlingi*, en zone amazonienne (région de la ville de Guayaramerin). Dans cette zone, l'INLASA dispose d'un laboratoire d'étude amené à se développer pour devenir, à terme, un « Centre d'Etude

Amazonien ». Il y a sur place des techniciens de santé qui travaillent déjà sur l'épidémiologie du paludisme (analyse de gouttes épaisses, traitement des personnes désirant une médication etc.). La région de Guayaramerin est typiquement une zone de transmission pérenne, mais où peuvent exister des foyers épidémiques en fonction de migrations importantes de travailleurs selon les saisons agricoles (exploitation de noix du Brésil etc.). Dans la région, le phlébotome *Lu. longipalpis* transmet *Le. braziliensis*.

- Une région de transmission palustre par *An. pseudopunctipennis*, dans la région des Yungas (vallées inter-andines), plus précisément autour de la ville d'Inicua (dept. du Beni). La transmission de *P. vivax* par l'anophèle y est saisonnière, et les phlébotomes *Lu. anglesi* et *Lu. longipalpis* transmettent la leishmaniose tégumentaire (Le Pont et al., 1992 ; Torrez et al., 1998 ; Martinez et al. 1999). *Lu. longipalpis* est un vecteur dont la domiciliation est avérée, et les foyers de développement de *Lu. anglesi* sont les caféières qui jouxtent les habitations (Le Pont et al., 1989b). La région d'Inicua est réputée pour être un des foyers les plus importants de transmission de *Le. braziliensis*. Contrairement à la transmission sylvestre qui, par définition, n'a lieu que lorsque les hommes entrent en forêt pour défricher; la transmission par *Lu. anglesi* est ici « domestique » (dans et autour des habitations) et toutes les classes d'âge sont touchées. On connaît peu l'écologie de ce vecteur (Le Pont et al. 1992). Le foyer d'Inicua est également une zone de transmission de la maladie de Chagas.

b) Parasitologie humaine

Les divers indices estimés seront récoltés à intervalle de temps régulier afin d'en suivre l'évolution saisonnière (tous les deux mois, par exemple).

Pour le paludisme, on déterminera :

- les indices gamétozytaires et densité gamétozytaire (sur goutte épaisse avec tubes hématocrites). Lecture des plaques au microscope.
- les taux d'incidence des fièvres et des « accès palustres » par enquêtes, qui pourront aussi servir d'enquête de type CAP (Connaissance – Attitude - Pratiques). Cela permettra de connaître le comportement des populations des zones étudiées face aux maladies à vecteurs et à leur contrôle. Ce type d'enquête permet, une fois

les conditions « entomologiques » de lutte optimale fixées, de moduler ces dernières en fonction des possibilités de pérennisation du contrôle anti-vectoriel, toujours dépendantes de la population humaine.

Pour les leishmanioses cutanées, la prévalence d'infection sera déterminée par l'examen des lésions. Un porteur de lésions est un porteur du parasite.

c) Caractérisation bioécologique des vecteurs (paludisme et leishmanioses)

Les enquêtes longitudinales se dérouleront selon les méthodes de terrain décrites dans WHO (1975) pour les anophèles, et Alexander (2000) pour les phlébotomes. L'échantillonnage des insectes se fera selon les techniques classiques (Service, 1993). Des sous-échantillons des anophèles collectés lors de ces missions sur le terrain seront archivés, stockés en tubes individuels contenant du silicagel et conservés à -80°C pour les analyses de génétique des populations ultérieures (nécessité de bombonnes de transport à azote liquide pour le terrain, et d'un réfrigérateur à -80°C au laboratoire)

Collecte des échantillons :

Les échantillons d'insectes adultes seront récoltés selon 3 techniques :

- Les captures sur appât humain : Les captures sur appât humain ont lieu en une station donnée par équipe de 2 personnes (une à l'intérieur de l'habitation, l'autre à l'extérieur pour échantillonner la faune endo- et exophage respectivement). De manière générale, sur chaque station sont disposées deux équipes qui se relaient en milieu de nuit. Pour un site donné, la disposition et le nombre des stations sont déterminés en fonction de la répartition, du nombre et de la productivité des gîtes larvaires. Un pré-échantillonnage est donc obligatoire afin de calculer le nombre de stations de capture nécessaires et de les disposer judicieusement pour avoir une image non biaisée de la dynamique de transmission sur le site étudié. D'une manière générale, un minimum de 4 stations (soit 16 captureurs) est nécessaire pour une zone donnée.
- Les captures par pièges lumineux : Des pièges lumineux (type CDC) seront aussi utilisés en complément des captures sur appât humain, notamment pour l'échantillonnage des phlébotomes pour lesquels cette technique est recommandée. L'échantillonnage d'un site nécessite souvent la mise en place de plusieurs

dizaines de pièges. Une vingtaine d'unités permettent d'envisager un échantillonnage correct.

- Les récoltes de faune résiduelle : La faune résiduelle endophile se récolte par pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides au pyrèthre. Les pièces d'habitation sont calfeutrées au mieux, et les insectes sont récoltés sur drap blanc étendu au sol. Une pulvérisation extérieure au niveau des fenêtres et autres interstices empêche la fuite des insectes.
- Remarque : Des captures sur animal (ovins, bovins) et la prospection des étables ou autres gîtes de repos extérieurs potentiels seront également réalisées afin d'évaluer le caractère zoophile et exophile des vecteurs.

Les captures de vecteurs sur homme nécessitent une équipe de « captureurs » et du petit matériel : montres, tubes de verre borosilicatés, aspirateur à bouche, lampe monochromatique (rouge).

- Collecte de larves : par méthodes classiques (dipping).

Variations temporelles des densités vectorielles : Des échantillons mensuels de vecteurs (larves et adultes) seront récoltés sur 2 ans afin de comprendre la dynamique temporelle des espèces et estimer les paramètres démographiques des populations. Ces paramètres, variables dans le temps selon les saisons, seront corrélés aux données météorologiques récoltés sur place (nécessité d'implanter une mini station météo de terrain sur chacune des deux zones permettant de relever les précipitations journalières, les minima et maxima de température ainsi que le degré moyen d'hygrométrie).

Degré endo/exophilie : Il sera évalué par le ratio du nombre d'insectes capturés à l'intérieur et à l'extérieur des habitations.

Prévalence d'infection chez les vecteurs : Pour les anophèles, calcul de l'indice sporozoïtique par test ELISA (« ELISA- CSP » Burkot et al. 1984 ; Wirtz et al. 1987, Boudin et al., 1988). Pour les phlébotomes, utilisation de PCR diagnostique de *Le. braziliensis* sur lots d'insectes, ou dissection (examen microscopique)

Préférences trophiques : identification des repas de sang de l'hôte par test ELISA (Burkot et al., 1981). (un lecteur de plaques ELISA est nécessaire, de même que pour les tests CSP décrits précédemment).

Taux de parturité : détermination sur le terrain de l'âge physiologique selon la méthode de Dětínova (1963) (nécessité d'une loupe binoculaire pour la dissection et d'un microscope de terrain pour la lecture),

Prélèvements de larves : l'étude des gîtes larvaires est importante, surtout chez les moustiques, car les captures d'adultes sont dépendantes de la distance géographique aux gîtes et de leur productivité. Le recensement et la cartographie des gîtes seront réalisés, leur productivité sera estimée en fonction des saisons.

Taux de survie quotidiens ainsi que les taux de survie par cycle gonotrophique : les méthodes de choix sont celles de marquage-recapture (Seber, 1992), ou par des méthodes dérivées, si applicables (Lardeux & Cheffort, sous presse). Ces méthodes dérivées supposent de pouvoir estimer la durée du cycle gonotrophique à diverses températures. Ces études se font en laboratoire, par élevage de moustiques dans des enceintes climatiques où température et humidité sont contrôlées. (3 enceintes sont nécessaires pour effectuer ces expérimentations).

Estimation de l'âge calendaire par dosage des ptéridines (spectrofluorescence) (Lehane & Mail, 1985 ; Lardeux et al. 2000), qui permettront d'estimer plus correctement bon nombre de paramètres dépendant du temps (durée de cycles, taux de survie etc.). La méthode doit d'abord être validée en laboratoire sur des individus d'élevage d'âge connu, puis extrapolée aux individus sauvages (qui doivent être conservés dans l'azote liquide depuis leur capture sur le terrain : une bonbonne de transport est nécessaire). En plus de ce matériel, un spectrofluorimètre est nécessaire.

d) Génétique des populations des vecteurs du paludisme

En complément de la caractérisation bio-écologique des vecteurs rencontrés dans les deux sites d'études, une étude de la structuration génétique de ces populations vectorielles sera réalisée en parallèle sur les 2 espèces d'anophèle (on comparera les résultats obtenus chez *An. darlingi* et *An. pseudopunctipennis*). L'étude de la variabilité génétique et de sa répartition entre et au sein des populations naturelles est en effet primordiale car les forces régissant la structure génétique des populations de vecteurs et son évolution vont également jouer un rôle principal dans la répartition de la capacité à transmettre l'agent pathogène ou à résister à un moyen de contrôle. Il est par exemple indispensable de savoir si, dans un lieu donné en un moment donné, le système vectoriel est homogène génétiquement (population en panmixie où les croisements sont aléatoires) ou, au contraire, si ce qui apparaît comme une seule et même espèce morphologique aux caractéristiques comportementales variables est en fait un amalgame de sous-populations génétiquement différenciées et indépendantes les unes

des autres. Ainsi, nous proposons d'étudier la génétique des populations d'*An. darlingi* et *An. pseudopunctipennis* en Bolivie selon deux grands axes :

- l'étude de la structure génétique des populations à l'échelle du village (microgéographique), sur les échantillons collectés par pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide. On étudiera plus particulièrement les déviations par rapport à la panmixie dans l'optique de caractériser l'unité de reproduction de base (dème) chez ces deux espèces.
- l'étude de la corrélation génotype/phénotype, de manière indirecte, en quantifiant et caractérisant la variabilité génétique dans des échantillons collectés par des méthodes différentes. On comparera par exemple la nature et la distribution des allèles, génotypes ou haplotypes chez des spécimens collectés à l'intérieur ou à l'extérieur, sur homme ou sur bœuf, etc... (allèles privés / allèles présents dans toutes les populations, etc...)

Afin d'obtenir une description objective du niveau de variabilité génétique existant au sein de ces populations naturelles, nous utiliserons plusieurs types de marqueurs moléculaires qui fourniront des informations complémentaires. Nous étudierons ainsi le polymorphisme observé au niveau :

- des séquences ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) des ARN ribosomiaux (Manguin et al., 1999): l'effectif des différents échantillons à comparer sera fixé au minimum à 20 individus, permettant ainsi d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.
- de la région variable du gène COI (Cytochrome Oxydase I) situé sur l'ADN mitochondrial (Conn, 1998).
- des marqueurs microsatellites : 8 loci microsatellites ont récemment été isolés chez *An. darlingi* et 6 loci sont en cours de caractérisation (J. Conn, comm. pers.). Nous utiliserons ces marqueurs très résolutifs pour l'étude de la génétique des populations d'*An. darlingi*. Nous prévoyons de déterminer le génotype de 50 individus par échantillon, sur une sélection d'au moins 10 loci microsatellites. Ce type de marqueurs pourra être isolé chez *An. pseudopunctipennis*, au vu des résultats obtenus chez *An. darlingi*.

Les techniques utilisées au laboratoire pour déterminer le génotype des spécimens sont l'extraction d'ADN à partir du moustique entier, d'une patte ou d'une aile, son amplification

par PCR (Polymerase Chain Reaction) et la séparation des produits de PCR sur gel d'acrylamide (Simard et al., 1999). L'extraction d'ADN et la PCR seront réalisées au laboratoire du LIN à Montpellier. L'électrophorèse sur gel d'acrylamide pour la détermination des génotypes aux loci microsatellites, nécessitant un appareillage important, sera réalisée par sous-traitance (Genome express, 2336 FF / 96 échantillons). La détermination de la séquence nucléotidique des régions ITS2 et COI sera également réalisée par sous-traitance (Genome Express, 65 FF / 500 paires de bases). Les amorces utilisées pour l'amplification de ces régions d'ADN seront celles décrites par Lunt et al. (1996) pour le gène COI et par Porter & Collins (1991) pour la région ITS2 (ces amorces ont été définies dans des régions très conservées chez plusieurs espèces d'anophèles). Toutes ces études seront réalisées à Montpellier, au LIN, où les techniques citées ci-dessus sont actuellement utilisées sur les anophèles d'Afrique.

Les données ainsi collectées seront analysées selon les méthodes classiques de la génétique des populations, et on étudiera notamment :

- *Le niveau de variabilité génétique entre et au sein des différentes populations*: on comparera pour chaque population le nombre d'allèles ou haplotypes par locus, l'hétérozygotie ou la variabilité génique, et le profil de distribution des fréquences alléliques. Ces paramètres seront estimés grâce aux logiciels Biosys ou Genepop pour les microsatellites, et Mega pour les données de séquence. Le niveau de différenciation génétique entre populations sera estimé par une analyse de variance moléculaire (logiciel : Arlequin) et les statistiques F (logiciel : Genepop).
- *Les relations diversité génétique / phénotype* : plusieurs approches seront utilisées dont l'analyse en composantes principales, l'estimation de la différenciation génétique (F_{st}) entre populations échantillonnées en fonction d'un phénotype particulier (ex : comparaison des échantillons capturés sur homme et sur bœuf), le « mapping » du caractère phénotypique sur un arbre phylogénétique construit à partir des marqueurs moléculaires, ...
- *L'estimation de la taille effective des populations* sera réalisée à partir de l'hétérozygotie observée en un moment donné ou à partir des variations temporelles de fréquences alléliques (voir Simard et al., 2000).
- *Recherche d'éventuelles signatures moléculaires* caractéristiques d'évènements démographiques récents (expansion de population, goulots d'étranglement ou

effets fondateurs) grâce à plusieurs tests statistiques fournis par les logiciels Mega et Bottleneck.

5.4.3.2. Thème 2 : Etude de la résistance des vecteurs aux insecticides (Pyréthroïdes et DDT)

Zones d'étude

Les insectes seront récoltés dans deux types de situations écologiques différentes : (1) dans une zone où l'utilisation de pesticides est avérée (zone agricole par exemple..), et (2), dans une zone isolée, *a priori* indemne de tout traitement insecticide passé. La première zone est celle où les possibilités d'apparition de résistance sont les plus fortes, la deuxième zone est celle où les possibilités de récolte d'une souche « sensible » est la plus forte.

La comparaison de ces deux situations écologiques doit permettre de mettre en évidence (si il existe), un phénomène de résistance. Dans la mesure du possible, les tests seront conduits sur des souches d'insectes issus de plusieurs zones d'une même situation écologique, afin de contrôler l'homogénéité des résultats.

Récolte des insectes

Des adultes gorgés ou gravides seront récoltés sur le terrain, dans chaque type de zone, par capture à l'aspirateur « entomologique », et les pontes seront mises à éclore en insectarium pour l'obtention des adultes qui serviront aux tests.

Insecticides utilisés

Les pyréthroïdes sont les insecticides actuellement préconisés dans la lutte contre les anophèles, notamment en imprégnation de moustiquaire. Ces insecticides ont aussi une action efficace contre les phlébotomes (Le Pont et al. 1989a, 1992). Il est donc important de connaître le niveau de résistance des espèces que l'on étudie pour cette famille d'insecticide. Par ailleurs, la Bolivie a utilisé par le passé le DDT en aspersion intra-domiciliaire. Le DDT est un organochloré de même mode d'action que les pyrèthres et induit donc le même type de résistance, notamment la résistance dite Kdr. Trois insecticides seront donc testés, deux pyréthroïdes sensiblement différents (la perméthrine et la deltaméthrine) et le DDT.

Puisque les doses diagnostiques pour *An. darlingi* et *An. pseudopunctipennis* ne sont pas déterminées, les doses utilisées pour les tests seront basées sur les doses diagnostiques d'*An. gambiae*. Pour augmenter les chances de détection d'une résistance, des doses plus faibles

seront également utilisées. Pour la perméthrine : 0.25% (0.091 g m.a./m²), 0.5% (0.182g m.a./m²) et 1% (0.364g m.a./m²) ; pour la deltaméthrine : 0.025% (0.0091 g m.a./m²) et 0.05% (0.0182g m.a./m²), et le DDT 4% (1.456g m.a./m²). Pour les phlébotomes, les mêmes doses seront utilisées, auxquelles on ajoutera du DDT 2% (Maroli, comm. pers.).

A terme, il faudra déterminer précisément les doses diagnostiques de ces insecticides sur ces vecteurs, en utilisant un protocole comme celui présenté par Koffi et al. (1999).

Les papiers tests seront imprégnés au LIN de Montpellier (Laboratoire de référence OMS pour les insecticides).

Méthode de test

La méthode de test est celle préconisée par l'OMS (1970, 1998) (tests en cylindres). Le protocole de laboratoire sera identique à celui présenté par Darriet et al. (1997) : pour chaque test, on mesurera avec la plus grande précision l'effet knock-down (effet KD), ainsi que la mortalité à 24 heures.

L'effet KD est un indicateur très sensible de la résistance. L'analyse de cet effet permet de détecter un début de résistance alors que les mortalités à 24h pourraient laisser croire que la résistance n'est pas encore révélée. Il est donc très important d'obtenir des courbes d'effet KD très précises. L'analyse des résultats KD se fait par analyse probit (avec un logiciel PROBIT). Les KD 50 et 95 sont ensuite comparés entre les zones où la situation de résistance est probable et les zones où elle ne l'est pas. Une résistance est suspectée si les KD sont différents entre les zones.

La mortalité à 24 heures est simplement comparée entre ces zones. Une résistance est détectée, si la mortalité est 100% dans la zone « *a priori* sans résistance » et inférieure dans la zone « *a priori* résistante ».

Conséquences

Si une résistance est suspectée (analyse KD) ou confirmée, il devient intéressant de la caractériser génétiquement pour mettre au point un outil génétique de détection de la résistance (test diagnostique basé sur la PCR). Pour cela, la première étape consiste à sélectionner progressivement cette souche. On peut, par exemple le faire en mettant artificiellement une pression insecticide sur la souche que l'on maintient en élevage, et tester toutes les 4 ou 5 générations l'évolution de la résistance. Une fois cette souche résistante obtenue, son analyse génétique peut être entreprise au LIN (études similaires déjà effectuées sur *An. gambiae* (Martinez-Torres, 1998)).

Par ailleurs, la mise en évidence de zones de résistance permettra à moyen terme la mise en place d'études en phase II pour tester, par exemple, l'efficacité d'insecticides en pulvérisations intradomiciliaires, ou des moustiquaires imprégnées, en fonction des faciès de résistance observés. A plus long terme, il sera même possible d'envisager des études de phase III, à l'échelle de villages entiers.

Matériel : la mise en place des tests de sensibilité nécessite, outre l'achat des kits « cylindres tests » de l'OMS, une étuve, des balances de précision (à 0.01g et 0.1g pour peser l'insecticide), un réfrigérateur à 4°C pour la conservation des solutions, une étuve close à 25°C en atmosphère régulée (saturation d'humidité) pour la maintenance des adultes pendant le test à 24h.

Mise en place d'élevages des vecteurs

Au delà des tests de sensibilité, la mise en place d'élevages permettra :

- De sélectionner des souches résistantes
- De tester d'autres molécules insecticides, d'autres formulations
- Sur le long terme, de maintenir des souches de référence sensibles ou résistantes
- Dans d'autres domaines que la résistance, d'étudier par exemple la susceptibilité des vecteurs aux parasites (infection expérimentale), de comparer des souches selon de tel ou tel paramètre entomologique (rendement parasitaire etc.), d'étudier « in vitro » les cycles parasitaires etc.

L'élevage d'*An. darlingi*, comme d'*An. pseudopunctipennis* est difficile, mais possible. Les études publiées à ce sujet montrent que ces deux espèces sont eurygames. Bien souvent, les élevages n'arrivent à survivre que quelques générations en raison des difficultés d'accouplement. Une méthode de s'affranchir des difficultés liées à la copulation de telles espèces est de pratiquer l'accouplement forcé, ce qui n'a jamais été fait sur ces deux espèces d'*Anopheles*, et que l'on propose de tester dans le cadre de ce projet. La méthode de base de l'élevage sera calquée sur Burralli & Bergo (1988) et Bergo et al. (1990), mais les accouplements seront faits selon les techniques classiques d'insémination artificielle d'insectes.

La mise en place d'un élevage d'*Anopheles* nécessite :

- Une pièce équipée pour l'élevage des larves : eau osmosée (générateur d'eau osmosée), cuvettes et plateaux pour les larves, des étagères, un système de chauffage thermostaté (28-30°C) (radiateur à bain d'huile, par exemple), un système d'aération afin d'éviter la condensation de vapeur sur les murs (un extracteur d'air, par exemple) ; un temporisateur de lumière pour entretenir une photopériode correcte.
- Une pièce équipée pour recevoir les cages d'adultes : étagères, système d'humidificateur d'air (dans un premier temps, des « humidificateurs de salon »), système d'aération, système de chauffage thermostaté, temporisateur de lumière. Un minimum de 50 cages pour démarrer l'élevage et permettre une rotation correcte des cages (exploitation/ lavage/ réparation).
- Du petit matériel d'entretien : aspirateurs à bouches, aspirateur « normal », pinces, pots –poids, tulle moustiquaire de rechange etc...

Mise en place d'un élevage de phlébotomes :

Les phlébotomes seront élevés selon les méthodes décrites par Killick-Kendrick et al. (1977).

Pour élever les phlébotomes, les exigences sont du même ordre, mais les larves, terrestres, ne nécessitent pas autant de place que les larves de moustiques. Elles peuvent être élevées dans la même pièce que les adultes. Il faut une pièce climatisée (chaleur, humidité, extracteur d'air, temporisateur lumineux). Les cages à phlébotomes sont plus petites que celles pour moustiques, avec des moustiquaires beaucoup plus fines. Cependant, si les espèces mises en élevage sont eurygames, la reproduction devra avoir lieu dans une grande cage spéciale (plusieurs m³). Contrairement aux anophèles eurygames, les phlébotomes peuvent se « contenter » de quelques m³ d'espace pour assurer leur accouplement.

Remarque : le matériel servant à la « climatisation » de l'élevage, notamment le chauffage, ne sera nécessaire que si les insectes sont élevés hors de leur zone de développement naturel, ce qui sera le cas si ces élevages sont mis en place à La Paz, où la température nocturne peut descendre sous zéro à certains moments de l'année. De manière générale, on prévoit un appareillage de secours afin d'assurer la pérennité de l'élevage en toutes circonstances.

La technique d'élevage de ces insectes nécessite un travail soigné, précis et planifié. Une formation spécifique sera dispensée. Des techniques particulières seront mises en place,

comme la copulation forcée (*An. darlingi* et *An. pseudopunctipennis*), ou le gorgement sur membrane artificielle (il faut alors un appareillage particulier disposant d'un circuit d'eau chauffée et des cupules de gorgement).

5.5. Echancier de la recherche

Mise en place des techniques de laboratoire ; formation préliminaire :

La mise en place des élevages (anophèles, phlébotomes) se fera la première année, ainsi que la formation du personnel bolivien (technique et scientifique) aux techniques de base en entomologie, transfert de technologie, avec notamment des stages d'étudiants/chercheurs boliviens au LIN de Montpellier. Durant cette première année, les études de terrain commenceront (études longitudinales et études de la résistance) et la formation se poursuivra « in situ ».

Etudes de terrain :

La première année du projet sera essentiellement consacrée aux études de terrain (études longitudinales et étude de la résistance). Le suivi longitudinal des deux sites de terrain sera poursuivi tout au long de la deuxième année, durée nécessaire pour déterminer avec précision la dynamique des populations vectorielles et de la transmission, et tester la reproductibilité d'une année sur l'autre des profils observés. Un échantillonnage scrupuleux basé sur des observations écologiques fiables est en effet une condition primordiale pour le développement des études de génétique des populations qui sera initié au cours de cette deuxième année de fonctionnement.

La troisième année sera essentiellement consacrée à l'étude génétique des populations, à des échantillonnages complémentaires pour affiner si besoin les données « écologiques », et à l'analyse générale de l'ensemble des résultats.

Au cours de l'étude, les résultats seront valorisés dans des publications internationales.

Bibliographic

- Alexander, B., 2000.** Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 14, 109-122.
- Arata, A., Ruebush, T., Rubio-Palis, Y.Y., Lans, D., 1999.** Control de la malaria en la zona amazonica de Bolivia y oportunidades para el apoyo de USAID. Report 225, Environmental Health Project, Arlington, VA, USA.
- Baird, J. K. 2000.** Resurgent malaria at the millenium. Control strategies in crisis. *Drugs* 59(4), 719-743.
- Bergo, E.S., Burralli, G.M., Santos, J.L.F., Gurgel, S.M., 1990.** Avalliacao do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratorio sob diferentes dietas. *Rev. Saude Publ. S. Paulo.* 24(2), 95-100.
- Boudin, C., Bonnet, S., Tchuinkam, T., Gouagna, L.C., Gounoue, R., Manga, L. 1998.** L'évaluation des niveaux de transmission palustre : méthodologies et paramètres. *Med. Trop.* 58(1), 69-75.
- Burkot, T.R., Goodman, W.G., DeFoliart, G.R., 1981.** Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(6), 1336-1341.
- Burkot, T.R., Zavala, F., Gwadz, R.W., Collins, F.H., Nussenzweig, R.S., Roberts, D.R. 1984.** Identification of malaria-infected mosquitoes by a two site enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(2), 227-231.
- Burralli G.M., Bergo, E. S., 1988.** Manutença de colonia de *Anopheles darlingi* Root, 1926, em laboratorio. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo,* 30(3), 157-164.
- Cerqueira, N.L., 1942.** Lista dos mosquitos da Bolivia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 39(1), 15-16.
- Charlwood, J.D., 1996.** Biological variations in *Anopheles darlingi* Root. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 97(4) : 391-398.
- Coetzee, M., Estrada-Franco, J.G., Wunderlich, C.A., Hunt, R.H., 1999.** Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(4), 649-653.
- Conn, J.E., 1998.** Systematics and population level analysis of *Anopheles darlingi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93(5): 647-650.
- Conn, J.E., Freitas-Sibajev, M.G.R., Luz, S.L.B., Momen, H., 1999.** Molecular population genetics of the primary Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 15: 468-475.
- Cot, M., Hougard, J.M., Lardeux, F., Brutus, L. 1999.** Rapport de mission en Bolivie, novembre 1999. (document LIN/ IRD)
- David, C., Dimier-David, L., Vargas, F., Torrez, M., Dedet, J.-P., 1992.** Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 87, 7-9.
- Darriet, F., Guillet, P., Chandre, F., N'Guessan, R., Doannio, J.M.C., Rivière, F., Carnevale, P. 1997.** Présence et évolution de la résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT chez deux populations d'*Anopheles gambiae* s.s. d'Afrique de l'Ouest. WHO/CTD/VBC/97.1001.
- Darsie, R.F., Lopez, G.A., 1980.** Studies on colonization of El Salvador strains of *Anopheles pseudopunctipennis* in northern Argentina. *Amer. J. Trop. Med.* 5, 443-447.
- Dedet, P.-P., Melogno, R., Cardenas, F., Valda, L., David, C., Fernandez, V., Torrez, M.E., Dimier-David, L., Lyevre, P., Villareal, M.E., 1995.** Rural campaign to

- diagnose and treat mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. VII. W.H.O. 73(3), 339-345.
- Détinova, 1963.** Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les diptères présentant une importance médicale. Monographie OMS n°47, 220 p.
- Estrada-Franco, J.G., Lanzaro, G.C., Ma, M.C., Walker-Abbey, A., Romans, P., Galvan-Sanchez, C., Cespedes, J.L., Vargas-sagarnaga, R., Laughinghouse, A., Columbus, I., Gwadz, R.W., 1993a.** Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato from three countries of neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. Am. J Trop. Med. Hyg. 49: 735-745.
- Estrada-Franco, J.G., Ma, M.C., Lanzaro, G.C., Gwadz, R., Calvan-Sanchez, C., Cespedes, J.L., Vargas-sagarnaga, R., Rodriguez, R., 1993b.** Genetic evidence of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato. Bull. Pan Am. Health Org. 27 (1) : 26-31.
- Ferguson, B., Peredo, C., Gianella, A., Van der Stuyft, P., 1997.** Conocimiento de mosquitos y malaria en los barrios del Plan 3000, ciudad de santa Cruz, Bolivia. Bol. Cientif. De CENETRP 16 : 31-36.
- Fernandez-Salas, I., Roberts, D.R., Rodriguez, M.H., Marina-Fernandez, C.F., 1994a.** Bionomics of larval populations of *Anopheles pseudopunctipennis* in the Tapachula Foothills area, southern Mexico. J. Amer. Control Assoc. 10 : 477-486.
- Fernandez-Salas, I., Roberts, D.R., Rodriguez, M.H., Marina-Fernandez, C.F. 1994b.** Host selection pattern of *Anopheles pseudopunctipennis* under insecticide spraying situations in southern Mexico. J. Amer. Control Assoc. 9 : 375-384.
- Fernandez-Salas, I., Roberts, D.R., Rodriguez, M.H., Rodriguez, M.C., Wirtz, R.A., 1993.** Bionomics of adult *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) in the Tapachula Foothills area of southern Mexico. J. Med. Entomol. 31, 663-670.
- Fernandez-Salas, I., Rodriguez, M.H., Roberts, D.R., 1994c.** Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera : Culicidae) in the Tapachula Foothills of southern Mexico. J. Med. Entmol. 31, 340-347.
- Fleming, G., 1986.** Biology and Ecology of Malaria Vectors in the Americas. Whashington, DC : Pan American Health Organization. PNSP/86.72 .
- Freitas-Sibajev, M.G.R., Conn, J., Mitchell, S., Cockburn, A.F., Seawright, J.A., Momen, H., 1995.** Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil. Mosq. Syst. 27 : 79-85.
- Gironda, W., 1999.** Eficacia de insecticidas piretroides contra *Anopheles darlingi*, vector de malaria en el distrito de salud de Guayaramerin, del departamento del Beni. Rapport de l'INLASA (La paz, Bolivie). 44 p.
- Gironda, W., 2000.** Biodiversidad de *Anopheles* (Diptera : Culicidae) en Guayaramerin. Rapport technique de l'INLASA (La Paz, Bolivie).
- Hackett, L.W., 1945.** The malaria of the Andean region of South America. Rv. Inst. Salub. Enferm. Trop. 6(4) .
- Killick-Kendrick, A.J., Leaney, A.J., Ready, P.D. 1977.** The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae). J. med. Entomol. 13(4-5) : 429-440.
- Koffi, A.A., Darriet, F., N'Gessan, R., Doannio, J. M., Carnevale, P. 1999.** Evaluation au laboratoire de l'efficacité de l'alfa-cypermethrine sur des populations d'*Anopheles gambiae* de Côte d'Ivoire, résistants à la perméthrine et à la deltaméthrine. Bull. Soc. Path. Exot. 92(1) : 62-66.
- Kreutzer R.D., Kitzmiller J.B., Ferreira, E., 1972.** Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi*. Mosq. News 32: 555-565.

- Lardeux, F. & Cheffort, J.** (In press) Age grading of *Wuchereria bancrofti* (Filariidae : Onchocercidae) larvae by growth measurements, and its use for estimating blood meal intervals of the vector *Aedes polynesiensis* (Diptera : Culicidae). Intern. J. Parasitol.
- Lardeux, F., Ung, A., Chebret, M.** 2000. Spectrofluorometers are not adequate for aging *Aedes* and *Culex* (Diptera : Culicidae) using pteridine fluorescence. J. Med. Entomol. 37(5) : 769-773.
- Lehane, M.J., Mail, T.S.**, 1985. Determining the age of adults male and female *Glossina morsitans morsitans*, using a new technique. Ecol. Entomol. 10, 219-224.
- Le Pont, F., Desjeux, P.**, 1985. Leishmaniasis in Bolivia. I. *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as a vector of visceral leishmaniasis in Los Yungas. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79(2), 227-231.
- Le Pont, F., Mariscal-Padilla, J., Desjeux, P., Ruchard, A., Mouchet, J.** 1989a. Impact de pulvérisations de delthamétrine dans un foyer de leishmaniose de Bolivie. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 69, 223-232.
- Le Pont, F., Mouchet, J., Desjeux, P.**, 1989b. Leishmaniose en Bolivie. VI. Observations on *Lutzomyia nuneztovari anglesi* Le Pont & Desjeux, 1984 the presumed vector of tegumentary leishmaniasis in the Yungas focus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84, 277-278.
- Le Pont, F., Desjeux, P., Torres-Espero, J. M., Fournet, A., Mouchet, J.** 1992. Leishmanioses et phlébotomes en Bolivie. Editions ORSTOM – INSERM, Paris.
- Lien, J.C., Tsai, T.S., Yu, J.J., Hsiao, T.M., Yeh, C.C.**, 1984. Informes mesuales : mission tenica medico entomologia de la Republica de China. Doc. Miméogr., Ministerio de Salud, Bolivia.
- Lounibos, L.P., Conn, J.E.**, 2000. Malaria vector heterogeneity in South America. American Entomologist 46(4) : 238-249.
- Loyola, E.G., Rodriguez, M.H., Gonzalez, J.I., Arredondo, D.N., Bown, D.N., Vaca, M.A.**, 1990. Effect of indoor residual spraying of DDT and bendiocarb on the feeding patterns of *An. pseudopunctipennis* in Mexico. J. Amer. Control Assoc. 6 : 635-640.
- Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M.**, 1996. The insect cytochrome oxidase I gene : evolution patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Mol. Biol. 5 : 153-165.
- Malafrente, R.S., Marrelli, M.T., Marinotti, O.**, 1999. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera : Culicidae). J. Med. Entomol. 36 : 631-634.
- Manguin, S., Roberts, D.R., Peyton, E.L., Fernandez-Salas, I., Barreto, M., Fernandez-Loyaza, R., Spinola, R.E., Granaou, R.M., Rodriguez, M.H.**, 1995. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53(4) : 362-377.
- Manguin, S., Roberts, D.R., Peyton, E.L., Rejmankova, E., Pecor, J.** 1996. Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* larval habitats. J. Am. Control Assoc. 12 : 619-626.
- Manguin, S., Wilkerson, R.C., Conn, J.E., Rubio-Palis, Y., Danoff-Burg, J.A., Roberts, D.R.**, 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60 : 364-376.
- Martinez, E., Le Pont, F., Torreez, M., Telleria, J., Vargas, F., Dujardin, J.C., Dujardin, J.C.**, 1999. *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (Le Pont & Desjeux, 1984) as a vector of *Leishmania amazonensis* in a sub Andean leishmaniasis focus of Bolivia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(5), 846-849.

- Martinez-Palacios, A., Zulueta, J., 1964.** Ethological changes in behavior of *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico after prolonged use of DDT. *Nature* 203 : 940-941.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D., 1998.** Molecular characterisation of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 7, 179-184.
- Mollinedo, S., Mollinedo, R., 1999.** La malaria en Bolivia. Rapport de l'INLASA (La Paz, Bolivie). 33 p.
- Moscoso, C., 1963.** Bolivia elimina su malaria. SNEM, Ministerio de Salud Publica, Bolivia.
- Ordóñez, G.J., Avina, A., 1999.** Estudio entomológico en Guayaramerin y Riberalta, Provincia Vaca Díez, departamento del Beni, Bolivia. Rep. Consultoria Pop. Serv. Intern. Proyecto « Social Marketing », Colombia.
- Pardo, V.N., 1951.** Chinchona versus malaria : Historia, economía y ciencia. Edition Universo, La Paz, Bolivia.
- Peredo, C., Gianella, A. 1997.** Biología, ecología y comportamiento de los vectores de la malaria presentes en Bolivia. *Bol. Científ. de CENETROP* 16 : 57-64.
- Peredo, C., 1998.** Anopheline situation in Bolivia : Background knowledge for an effective malaria control program. Fel. Thesis, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Belgique
- Peyton, E.L., Roberts, R.D., Pinheiro, F.P., Vargas, R., Balderrama, F., 1983.** Mosquito collections from a remote unstudied area of southeastern Bolivia. *Mosq. Syst.* 15(2), 61-89.
- Porter, C.H., Collins, F.H., 1991.** Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *An. hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 271-279.
- Prosen, A.F., 1963.** Culicidae in Bolivia. *Ann. Inst. Med. Reg.* 6(1/2) : 59-124.
- Rejmankova, E., Savage, H.M., Rejmanek, M., Arredondo-Jimenez, J.I., Roberts, D.R., 1991.** Multivariate analysis of relationships between habitats, environmental factors and occurrence of anopheline mosquito larvae *Anopheles albimanus* and *An. pseudopunctipennis* in southern Chiapas, Mexico. *J. Appl. Ecol.* 28 : 827-841.
- Rejmankova, E., Roberts, D.R., Harbach, R.E., Pecor, J., Peyton, E.L., Manguin, S., Krieg, R., Polanco, J., Ledgers, L.J., 1993.** Environmental and regional determinants of *Anopheles* (Diptera : Culicidae) larval distribution in Belize, Central America. *Environ. Entomol.* 22 : 978-992.
- Roberts, D.R., Laughlin, L.L., Hsueh, P., Legters, L.J., 1997.** DDT, global strategies, and malaria control crisis in South America. *Emerging Infectious Diseases* 3(3), 295-302.
- Rosa-Freitas, M.G., Broomfield, G., Priestmann, A., Milligan, P., Momen, H., Molyneux, D.H., 1992.** Studies on cuticular components, isoenzymes and behaviour of 3 populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 8: 357-366.
- Rousset, F., 2000.** Inferences from spatial population genetics. In *Handbook of Statistical Genetics*. Eds Balding, D., Bishop, M., Cannings. Wiley.
- Seber, G.A.F. 1992.** A review of estimating animal abundance. II. *Intern. Stat. Rev.* 60, 129-166.
- Service, M.W., 1993.** Mosquito Ecology. Field Sampling Techniques (2nd Edition). Chapman & Hall, London.
- Simard, F., Fontenille, D., Lehman, T., Girod, R., Brutus, L., Gopaul, R., Dournon, C., Collins, F.H., 1999.** High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and eastern outer islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(6): 1000-1009.

- Simard, F., Lehman, T., Lemasson, J.J., Diatta, M., Fontenille, D., 2000.** Persistence of *Anopheles arabiensis* during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. *Insect Mol. Biol.* 9(5): 467-479.
- Steiner, W.W.M., Narang, S., Kitzmiller, J.B., Swofford, D.L., 1982.** Genetic divergence and evolution in Neotropical *Anopheles* (*Nyssorhyncus*). In: *Recent developments in the genetics of insect disease vectors*. Eds Steiner WWM, Tabachnick WJ, Rai KS, Narang S. Stripes, Champaign, IL.
- Suarez, J., 1945.** Estudio y clasificacion de los Dipteros del Beni, Tribu Anophelini. *Epidemiologia de la malaria*, Accion Medica n°7, La paz, Bolivia.
- Suarez, J., 1958.** Clasificacion de los Dipteros de Yungas. *Rev. Med. La Paz, Bolivia.* Vol 11.
- Tadei, W.P., Dos Santos, J.M.M., Rabbani, M.G., 1982.** Biologia de anofelinos amazônicos. V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera : Culicidae). *Acta Amazônica* 12 : 353-369.
- Torrez, M., Lopez, M., Le Pont, F., Martinez, E., Munoz, M., Hervas, D., Yaksic, N., Arevalo, J., Sossa, D., Dedet, J.P., Dujardin, J.P., 1998.** *Lutzomia nunetzovari* anglesi (Diptera : Psychodidae) as a probable vector of *Leishmania braziliensis* in the Yungas, Bolivia. *Acta Tropica* 71(3), 311-316.
- Villareal, C., Arredondo-Jimenez, J.I., Rodriguez, M.H., Ulloa, A., 1998.** Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from Mexico. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* 14(4), 369-372.
- WHO, 1970,** Résistance aux insecticides et lutte anti-vectorielle. Série de rapports techniques n°443, 306 p.
- WHO, 1975,** Manual on practical entomology in malaria. (2 vol.), WHO offset publication n°13.
- WHO, 1998.** Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12, 43p.
- Wirtz, R.A., Burkot, T.R., Graves, P.M., Andre, R.G., 1987.** Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J. Med. Entomol.* 24, 433-437.
-