UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SANTÉ, SCIENCES, TECHNOLOGIES

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte

THÈSE présentée par :

Aurélie BODIN

soutenue le : **31 octobre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François – Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

MODULATION DU COMPORTEMENT DE RECHERCHE DE L'HOTE CHEZ LES INSECTES HEMATOPHAGES :

Importance des facteurs endogènes

THÈSE dirigée par :

M. Lazzari Claudio	Professeur, IRBI, Université François – Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme Anton Sylvia	Directeur de Recherche, INRA, PISC, Versailles
M. Guerenstein Pablo	Chargé de Recherche, HDR, CONICET, Diamante, Argentine

---

JURY :

Mme Anton Sylvia	Directeur de Recherche, INRA, PISC, Versailles
M. Casas Jérôme	Professeur, IRBI, Université François – Rabelais, Tours
M. Guerenstein Pablo	Chargé de Recherche, HDR, CONICET, Diamante, Argentine
M. Lazzari Claudio	Professeur, IRBI, Université François – Rabelais, Tours
M. Lehane Michael	Professeur, School of Tropical Medicine, Liverpool, Angleterre
Mme Mondy Nathalie	Maître de Conférences, HDR, Université Claude Bernard - Lyon I

On peut espérer que, lorsqu'ils seront les maîtres du monde, les insectes se souviendront avec reconnaissance que nous les avons plutôt bien nourris lors de nos pique-niques

[Colette]

REMERCIEMENTS



La première personne à qui je dois bien plus que des remerciements est mon directeur de thèse Claudio Lazzari qui est beaucoup plus pour moi qu'un simple directeur. Je te remercie pour ta présence sans failles, ton soutient, tes encouragements, les nombreuses et diverses discussions (scientifiques et non scientifiques …). Merci aussi pour m'avoir donné la chance de participer aux cours d'Ecologie Sensorielle à Lund en Suède, à l'ISBE, l'ESITO, le congrès de Physiologie de l'Insecte et l'Ecole Doctorale Européenne. Merci pour cette formation doctorale que j'ai reçu. Merci aussi pour l'effet « Lazzari ».

Je remercie Sylvia Anton et Pablo Guerenstein de leur intérêt pour mon travail et d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Merci à Jérôme Casas, Michael Lehane et Nathalie Mondy d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Merci à Jérôme Casas puis à Jean-Paul Monge pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire, et Merci à la Région Centre pour avoir financé ce projet de thèse.

Merci également à Romina et Sebastian qui m'ont fait découvrir le monde merveilleux des punaises, pour leurs conseils et surtout leur amitié inébranlable. Viva Argentina !!!

Un énorme merci à Carole sans qui cette thèse aurait été beaucoup, beaucoup plus difficile. Merci pour ta perfection dans l'élevage des punaises mais également pour ton sens de l'humour et de la répartie, mais également pour tes problèmes informatiques. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi.

Mention spéciale à ma colocataire de bureau Fabienne, sans qui ce travail aurait été beaucoup moins drôle. Je te remercie pour ton amitié, toutes nos innombrables discussions, ta joie de vivre et le soleil que tu amènes avec ton accent… Tes qualités de chanteuse et tes connaissances en géographie m'ont beaucoup impressionnée… Merci aussi à toute l'équipe « Punaises » pour l'ambiance agréable et les réunions scientifiques enrichissantes.

Un très chaleureux merci à Sylvain, Jérémy (également appelé knacki) et Aurore devenus bien plus que des simples collègues, merci pour les soirées inoubliables de « petits chevaux » où

on a bien failli tous s'entretuer lol, les sorties naturalistes, les discussions entre blondes etc etc… Mercix beaucoux Sylvain d'avoir bien voulu (presque sous la contrainte) relire ce travail entre autre pour les fautes d'orthographe, cependant s'il en reste c'est de ma faute …

Un grand merci à Clément pour les deux stages effectués avec moi , je voulais te remercier pour ton travail, ta bonne humeur, les crises de rire et les expressions inventées (Tonysolant 1.0), mais tu m'as suggéré ces quelques phrases que je me dois d'écrire : « Merci à Clément mon stagiaire préféré dont la vivacité d'esprit n'a d'égale que son physique sculptural ».

Je voulais également remercier très chaleureusement Nathalie, auprès de qui j'ai réalisé mes stages de Master. C'est grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui car tu m'as enseigné cette rigueur que j'espère avoir bien appliqué. Tu m'as donné goût à la recherche et surtout aux insectes. Merci aussi à Bruno, pour ses conseils scientifiques et statistiques, sa bonne humeur, son humour et son couscous…

Merci aussi aux maîtres de conférences du labo que j'ai eu en cours durant mes années universitaires et qui m'ont donné le goût à la science et à aller plus loin. Je remercie principalement mes profs préférés : Dominique Pierre pour ses cours d'Ecologie, Fred Desroches pour la Biologie Animale et les dissections et Christelle Magal pour ses cours de Modélisation.

A tous les thésards du labo et assimilés (jeunes chercheurs, stagiaires…), merci pour les innombrables soirées, pique-nique, WE en Normandie…Sans cette ambiance amicale, la vie au labo serait moins drôle. Merci à Christine, Sonia et Dominique pour les ordres de missions et autres commandes (même celles passées au dernier moment). Merci également aux membres de l'Institut pour l'ambiance générale de travail et particulièrement celle du repas de midi.

Un merci tout particulier à mes amis dont l'amitié me tient très à cœur et dont l'intérêt pour ce travail de thèse m'a vraiment fait plaisir. Vive l'équipe nautique de sondage du Négron et les mini pizzas !!! Lynda, Mikael, Luc, Laurène, Mathieu, Pierre-Jean, Charlotte… (et maintenant bébé Lou et bébé Paul).

J'ai presque fini, mais il me faut encore remercier toute ma famille pour m'avoir permis d'arriver ici en ayant tout d'abord financé mes études et surtout pour leur soutient sans faille parce que ce n'est pas facile d'expliquer à ses parents à quoi ça sert d'étudier des punaises… Merci particulièrement à maman pour toujours savoir comment gérer les crises de doutes et

d'angoisses. Et merci à mon grand-père aussi surnommé « papou » pour son intérêt pour mon travail et ses interrogations scientifiques, mais également pour le cofinancement de mon cher et précieux ordinateur portable !!!

Finalement, mes plus sincères remerciements vont à mon « pacsé » David, merci de m'avoir toujours soutenue pendant cette thèse, je n'ai pas toujours été facile à vivre, surtout ces derniers temps. Merci pour ta patience, tes encouragements et ton amour.

RESUME

Dans la nature, les animaux doivent localiser des sources de nourriture pour acquérir les ressources énergétiques nécessaires à leur survie et/ou à leur reproduction. Pour un grand nombre d'espèces animales, localiser des ressources et s'alimenter représente un investissement en temps, en énergie, et implique de s'exposer à un risque de prédation. Les animaux ont donc développé des stratégies d'optimisation de recherche de nourriture afin de minimiser les risques de prédation. Chez les insectes hématophages, l'attraction pour leurs hôtes est fortement dirigée par la chaleur, et différents facteurs chimiques (odeurs émises par l'hôte). Chez ces insectes, une modulation importante des systèmes de perception associés à la localisation d'hôtes (olfaction, thermoperception, vision…) a été observée en fonction du comportement et des rythmes d'activité de leurs hôtes, qui jouent à la fois le rôle de proie et de prédateur. Le principal objectif de cette thèse est de caractériser les possibles facteurs endogènes capables de moduler le comportement de recherche de l'hôte chez la punaise hématophage *Rhodnius prolixus*. La sensibilité olfactive de cet insecte peut être modulée au cours de la journée. Nos résultats montrent qu'il existe une modulation spécifique de la réponse comportementale à différentes odeurs impliquées dans différents comportements présents à différents moments de la journée. De plus, le comportement de recherche de l'hôte peut être modulé par l'état physiologique des individus, l'état de développement et/ou l'état nutritif. Nous avons pu montrer que le comportement de recherche de l'hôte ne s'exprime pas immédiatement après la mue, mais que son développement est progressif. L'état nutritif des individus influe également sur leur comportement de recherche d'hôtes. Un seul repas à réplétion va entrainer une inhibition puis une répulsion des insectes face aux facteurs attractifs des hôtes. Des mécanismes physiologiques et comportementaux ont donc été sélectionnés, inhibant le comportement de recherche de l'hôte à des moments de la vie de l'insecte où il ne serait pas nécessaire de s'exposer aux hôtes. L'ensemble des résultats est discuté en intégrant les facteurs modulant le comportement de recherche de l'hôte chez les triatomines et les insectes hématophages en général, ainsi que l'impact que cela peut avoir sur la transmission des pathogènes.

Mots clés: Chronobiologie, CO_2, Etat de développement, Etat nutritif, Etat physiologique, Etat reproductif, Facteurs endogènes, Insectes hématophages, Maladie de Chagas, Modulation, Mue, Olfaction, Phéromone d'agrégation, Recherche de l'hôte, Repas sanguin, *Rhodnius prolixus*, Thermoperception.

ABSTRACT

In nature, animals have to locate food sources to acquire enough resources for survival and/or reproduction. Resource localization and feeding represent an important investment in time and energy for most animals, implying exposure to predation. Then, animals have evolved different optimal strategies to minimize predation risks while searching for food. In haematophagous insects, host-seeking is guided by different stimuli, like heat or chemical signals (host emanations). An important modulation of the perception systems associated to host localization (olfaction, thermoperception, vision…) has been observed as function of behaviour and activity rhythms of the host which can be a prey or a predator. The first goal of this thesis was to characterize the possible endogenous factors which could modulate the host-seeking behaviour in the haematophagous bug *Rhodnius prolixus*. In this bug, the olfactory sensitivity could be modulated as function of daytime. Our results show that there is a specific modulation of the behavioural response to different odours involved in distinct behaviours associated to different periods of the day. Furthermore, host-seeking behaviour could be modulated by the bug physiological state, molt cycle and/or nutritional state. We demonstrated that the host-seeking behaviour is not expressed immediately after the bugs' emergence but that there is a period with absence of response to host signals and that the development of the response is progressive thereafter. The nutritional state of the bugs also modulated the host-seeking behaviour. After a complete blood meal, bugs are first inhibited and they eventually enter a repulsion phase in response to host signals. Physiological and behavioural mechanisms have been selected to inhibit the host-seeking behaviour when it is not necessary for the bugs to be exposed to hosts/predators. All these results are discussed by incorporating the possible factors that could modulate host-seeking behaviour in triatomine bugs and haematophagous insects in general. The impact of these results on pathogens transmission is also discussed.

Mots clés: Aggregation pheromone, Blood meal, Chagas disease, Chronobiology, CO_2, Endogenous factors, Haematophagous insects, Host-seeking, Modulation, Molt, Nutritional state, Olfaction, Physiological state, Reproductive state, *Rhodnius prolixus*, Thermoperception.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **3**

RESUME **6**

ABSTRACT **7**

LISTE DES FIGURES **11**

INTRODUCTION GENERALE **18**

IMPORTANCE DES INSECTES HEMATOPHAGES DANS LES MALADIES HUMAINES 20

La Trypanosomiase Américaine : Découverte, Description et Contrôle *22*

COMPORTEMENT DE RECHERCHE ALIMENTAIRE CHEZ LES INSECTES HEMATOPHAGES 29

Indices sensoriels associés à la recherche alimentaire *30*

-Stimuli chimiques *31*

-Stimuli visuels *33*

-Stimuli thermique et hydrique *34*

MODULATION DU COMPORTEMENT DE RECHERCHE ALIMENTAIRE CHEZ LES INSECTES HEMATOPHAGES 36

Horloges internes et modulation du comportement de recherche de l'hôte *36*

Cycle de mue et modulation du comportement de recherche de l'hôte *37*

Etat nutritif / Etat reproductif et modulation du comportement de recherche de l'hôte .. *38*

INTRODUCTION AU COMPORTEMENT DES TRIATOMINES 42

Indices sensoriels associés à la recherche de refuges chez les triatomines *42*

Indices sensoriels associés à la recherche de l'hôte chez les triatomines *43*

-Stimuli thermique et hydrique *43*

-Stimuli chimiques *44*

OBJECTIFS DE LA THESE 46

CHAPITRE 1 : TEMPORAL MODULATION AND ADAPTIVE CONTROL OF THE BEHAVIOURAL RESPONSE TO ODOURS IN *RHODNIUS PROLIXUS* **48**

ABSTRACT 49

INTRODUCTION 50

MATERIAL AND METHODS 52

Insects *52*

Illumination regimes and recording times ... 52
Recording of walking pathways ... 53
Stimulus delivery ... 53
Data analysis ... 54
RESULTS ... 55
Daily modulation of the oriented response to odours ... 55
Endogenous vs. exogenous control of the response ... 56
Walking activity ... 56
DISCUSSION ... 59
The expression of odour sensitivity rhythms in insects ... 59
General vs. selective modulation of olfactory sensitivity ... 60
Endogenous and exogenous control of the response to odours ... 61
ACKNOWLEDGMENTS ... 62

CHAPITRE 2 : STATE DEPENDENCE OF HOST ORIENTATION IN *RHODNIUS PROLIXUS*: THE POST-ECDYSIS TIME ... 63
SUMMARY ... 64
INTRODUCTION ... 65
MATERIAL AND METHODS ... 66
Insects ... 66
Bioassay protocol ... 67
Response to CO_2 ... 67
Response to heat ... 69
RESULTS ... 70
Response to CO_2 ... 70
Response to heat ... 72
DISCUSSION ... 74
ACKNOWLEDGMENTS ... 77

CHAPITRE 3 : STATE DEPENDENCE OF HOST-SEEKING IN BLOOD-SUCKING INSECTS: BEHAVIOUR AND PHYSIOLOGY ... 78
SUMMARY ... 79
INTRODUCTION ... 80
MATERIAL AND METHODS ... 81

Insects *81*
Bioassay protocol *81*
Experiment 1: Nutritional state and host-seeking behaviour *81*
Experiment 2: Abdominal distension and host-seeking behaviour *82*
Experiment 3: The role of haemolymph-borne factors *83*
The response to CO_2 ..... *83*
The response to heat and feeding motivation *85*
RESULTS 85
Experiment 1: Nutritional state and host-seeking behaviour *85*
Behavioural response to CO_2 and heat in 5^{th} instar larvae *85*
Behavioural response to CO_2 and heat in females *87*
Behavioural response to CO_2 and heat in males *88*
Experiment 2: Abdominal distension and host-seeking behaviour *91*
Experiment 3: The role of haemolymph-borne factors *93*
DISCUSSION 95
Modulation of the responsiveness to host cues and feeding behaviour *95*
The physiological mechanisms *96*
ACKNOWLEDGMENTS 98

DISCUSSION 99
Modulation du comportement de recherche de l'hôte et importance des horloges internes *101*
Modulation du comportement de recherche de l'hôte après l'émergence *103*
Modulation du comportement de recherche de l'hôte après l'alimentation *104*
Une nuit dans la vie d'une nymphe de Rhodnius prolixus *108*
Transmission parasitaire et modulation de la recherche de l'hôte *112*

PERSPECTIVES 114

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 116

ANNEXE 1 : CARTES DE REPARTITIONS GEOGRAPHIQUES DES PRINCIPALES MALADIES HUMAINES ENGENDREES PAR DES INSECTES HEMATOPHAGES 135

ANNEXE 2 : ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE : LE COMPENSATEUR DE LOCOMOTION 140

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Photographie de Carlos Chagas (1879-1934) dans son laboratoire de L'Institut Oswaldo Cruz **23**

Figure 2 : Photographie de *Trypanosoma cruzi* parmi des hémocytes de vertébrés (d'après Coura (2007)) **23**

Figure 3 : Institut Oswaldo Cruz (Manguinhos, Brésil) (d'après Coura *et al.* (2000)) **23**

Figure 4 : Consultation médicale de Carlos Chagas (première découverte du parasite dans le sang d'une petite fille le 23 avril 1909) (d'après Coura *et al.* (2000)) **24**

Figure 5 : Cycle de vie du parasite *Trypanosoma cruzi* (d'après Rozendaal, J.A. (1999)) **24**

Figure 6 : Espèces de punaises hématophages majoritairement présentes dans les habitats domestiques (a : *Triatoma infestans* (♂ : 21 à 26mm / ♀ : 26 à 29mm) ; b : *Rhodnius prolixus* (♂ : 17 à 20mm / ♀ : 19 à 22mm); c : *Triatoma dimidiata* (♂ / ♀ : 24 à 35mm); d : *Panstrongylus megistus* (♂ : 26 à 34mm / ♀ : 29 à 38mm) ; e : *Triatoma brasiliensis* (♂ / ♀ : 22 à 26mm) (d'après Jurberg *et al.* (2005)) **26**

Figure 7 : Types d'habitats domestiques colonisés par les triatomines. Habitations humaines (a) à l'intérieur des toitures en chaume (c) et/ou dans les murs en torchis ou en adobe à l'intérieur des fissures (d). Milieu péri-domestiques (b) dans les clôtures des enclos d'animaux domestiques (d'après Rozendaal, J.A. (1999)) **27**

Figure 8 : L'amélioration des logements réduit le nombre d'endroits utilisables par les triatomines pour se réfugier. Les anfractuosités des murs peuvent être éliminées grâce au crépissage au moyen d'un enduit. Les lieux de repos offerts aux triatomines par le sol peuvent également être bouchés puis recouverts d'une chape de ciment. Enfin, les tuiles ou la tôle ondulée n'offrent pas d'habitat convenable à ces insectes (d'après Rozendaal, J.A. (1999)) . **28**

Figure 9 : Stratégies de coopérations politiques et techniques mises en place pour le contrôle de la maladie de Chagas en Amérique Centrale et Amérique du Sud. Ces programmes visent à surveiller les dons de sang pour les transfusions sanguines et veillent à éradiquer les vecteurs insectes (d'après Guhl, F. (2007)) **28**

Figure 10 : Réponse journalière de larves de *Triatoma infestans* en réponse à une stimulation de CO_2 et implication d'une horloge circadienne dans le contrôle de cette réponse. Les insectes ont été maintenus pendant 3 jours sous un cycle de lumière 12:12 (L/D) (représenté par la partie supérieur noire et blanche des barres horizontales) puis les 3 jours suivant : sous un cycle identique L/D (a) ou sous un cycle continu d'obscurité D/D (b) (représentés par la partie inférieure des barres horizontales). Les histogrammes représentent l'indice d'orientation des insectes (IO). Les astérisques indiquent une orientation préférentielle des insectes face au stimulus. L'indice d'orientation varie entre -1 (orientation à l'opposé du stimulus) et 1 (orientation en direction du stimulus) (d'après Barrozo *et al*. (2004))..... **37**

Figure 11 : Comportement de femelles *Anopheles gambiae* (alimentées et non alimentées) en réponse à des émanations d'un bras humain après l'alimentation (*d'après Takken et al.* (2001))..... **40**

Figure 12 : Expression du comportement de recherche de l'hôte chez *Aedes aegypti* depuis l'émergence de l'adulte jusqu'à l'oviposition. Immédiatement après l'émergence, une période de recherche de l'hôte est exprimée par les femelles. Après un large repas sanguin (courbe en trait plein), le comportement de recherche de l'hôte est inhibé pendant la période de maturation des œufs et ce jusqu'à l'oviposition. A la suite d'un faible repas sanguin (en dessous du seuil de distension inhibiteur), le comportement de recherche de l'hôte se maintient en attendant un deuxième repas (courbe en pointillés) (d'après Klowden (1995)) **. 40**

Figure 13 : Réponse de recherche de l'hôte chez le moustique *Aedes aegypti* en fonction du volume de sang ou de solution saline ingéré (a) et Réponse de recherche de l'hôte en fonction de la taille du repas et du temps après alimentation (b). Les barres verticales représentent l'erreur standard (d'après Klowden et Lea (1979b) et Klowden (1994)) **41**

CHAPITRE 1

Figure 1 : Orientation response of R. prolixus larvae to airstreams loaded with 1200 ppm of carbon dioxide above the background (500±30 ppm) (A) or aggregation pheromones (B), at different moments of the day, i.e. early and late scotophase and early and middle photophase. Asterisks denote a statistically significant preferred direction around stimulus location (0°) (V test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The circular histograms (rose diagrams) represent the frequency of the angles displayed by the animals, which is proportional to the area of the wedge (bar width of 10°). Open dots indicate control airstreams position and filled dots denote test airstream location. Number of insects tested is shown in brackets. The mean vector angle ± the circular mean deviation are indicated..... **58**

Figure 2 : Orientation response to CO2 (A) and aggregation pheromones (B) of R. prolixus larvae maintained under constant darkness (i.e., free-running). Bugs were entrained for 3 days in L/D cycles (12h:12h) and then transferred to D/D conditions for three more days. Asterisks denote a significant mean walking direction around stimulus location (0°) (V test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The circular histograms (rose diagrams) represent the frequency of the angles displayed by the animals, which is proportional to the area of the wedge (bar width of 10°). Open dots indicate control airstreams position and filled dots denote test airstream location. Number of insects tested is shown in brackets. The mean vector angle ± the circular mean deviation are indicated **59**

CHAPITRE 2

Figure 1 : Artificial feeder used to test the behavioural response to heat and the motivation to feed of 5th instar larvae of *Rhodnius prolixus* **71**

Figure 2 : Orientation response of *R. prolixus* larvae to airstreams loaded with 1200 ppm of carbon dioxide above the background (500 ± 100 ppm), at different times after their 5th instar ecdysis. Asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards stimulus location (0°) (*V* test, $p< 0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The circular histograms (Rose diagrams) represent the frequency of the angles displayed by the animals, which is proportional to the area of the wedge (bar width of 10°). Open dots indicate control airstreams position and filled dots denote test airstream location **72**

Figure 3 : Behavioural response to heat of *R. prolixus* larvae at different times after their ecdysis to the 5th instar. White bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The dot line represents the level of 50 % of response. The asterisk indicates a significant difference in the feeding response (Mann-Whitney test) **74**

Figure 4 : Feeding response of 5th instar larvae of *R. prolixus*. The feeding response is represented as the proportion of insects fed among the insects that were attracted by the heat source, as a function of the time elapsed from their 5th instar ecdysis. Each value corresponds to the mean response ± S.E.M. The dot line represents the threshold of 50 % of response. The asterisk indicates a significant difference in the feeding response (Mann-Whitney test) **74**

CHAPITRE 3

Figure 1 : Orientation response of *R. prolixus* larvae (A), adult females (B) and males (C) to airstreams loaded with 1200 ppm of CO2 above the background (500 ± 100 ppm), at different times after a complete blood-meal. Asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards or against the stimulus location (0°) (V test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The number of insects tested is shown in brackets..... **90**

Figure 2 : Behavioural response to heat and motivation to feed in *R. prolixus* larvae (A), adult females (B) and males (C) at different times after a complete blood-meal. White bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension response (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The dot line represents the level of 50 % of response. The number of insects tested is shown in brackets **91**

Figure 3 : Behavioural response of *R. prolixus* larvae to different host-emitting cues during three days after an artificial meal with a saline solution. (A) represents the behavioural response of the bugs to 1200 ppm of CO2 above the background (500 ± 100 ppm) before and after feeding on saline, asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards stimulus location (0°) (V test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). (B) represents the behavioural response of the bugs to heat and their motivation to feed before and after feeding on saline, white bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The number of insects tested is shown in brackets. The cross means that all insects dead before the day of experiment **93**

Figure 4 : Behavioural response of non-fed larvae of R. prolixus to different host-emitting cues at different times after injection of haemolymph of insects fed for 1 day (I1) or 4 days (I4). (A) represents the behavioural response of the bugs to 1200 ppm of CO2 above the background (500 ± 100 ppm), asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards the stimulus location (0°) (V test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). (B) represents the behavioural response of the bugs to heat and their motivation to feed, white bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The asterisk indicates a significant difference in the feeding response (Mann-Whitney test). The number of insects tested is shown in brackets. The cross means that all insects dead before the day of experiment..... **95**

DISCUSSION GENERALE

Figure 1 : Diagramme représentant la série d'événements se déroulant dans une nuit typique d'une nymphe de triatomines (adapté d'après Guerenstein et Lazzari, 2008). Cela représente l'effet de facteurs endogènes ou motivationnels (à l'intérieur de l'anneau de cercles) et exogènes (à l'extérieur) sur les différents comportements réalisés lorsque les punaises s'alimentent. Les différents paramètres étudiés pendant cette thèse sont représentés en rouge. Durant la journée, l'insecte reste immobile (i.e. en akinésie, Wigglesworth et Gillet, 1934) à l'intérieur de son refuge jusqu'à ce que le système circadien l'entraîne à se « réveiller » (Lazzari, 1992). L'animal va commencer à bouger, et éventuellement va quitter son refuge (Lorenzo et Lazzari, 1998). Une exposition à des odeurs provenant des hôtes active l'insecte et augmente ses chances de rentrer en contact avec d'autres facteurs attractifs le guidant vers une potentielle source de nourriture. La sensibilité olfactive pour des odeurs de l'hôte est modulée par une horloge circadienne (Barrozo *et al*., 2004 ; Bodin *et al*., 2008) et dépend de l'état physiologique de l'individu (Chapitre 2 et 3). La chaleur émanant du corps de l'hôte engendre la réponse d'extension du proboscis (PER), la chaleur est le seul facteur nécessaire et suffisant pour engendrer ce PER, qui peut être modulé par l'expérience (Lallement, 2007). A ce stade, l'animal doit trouver un vaisseau sanguin « caché » sous la peau de l'hôte, cette tâche est guidée par les thermorécepteurs antennaires (Ferreira *et al*., 2007). Le contact mécanique avec la surface chaude de la peau entraîne l'insertion des pièces buccales et la plasticisation de la cuticule de la larve qui permet à l'insecte de prendre un important repas sanguin (Ianowski *et al*., 1994). L'osmolarité et les composés chimiques permettent à l'insecte de reconnaître le sang et de commencer le repas (Friend et Smith, 1977; Guerenstein et Núñez, 1994; Lazzari et Núñez, 1989b). La stimulation des récepteurs de pression de l'abdomen (Anwyl, 1972; Chiang et Davey, 1988) arrête le repas quand l'animal est gorgé. Après le repas, l'insecte quitte son hôte en utilisant certains facteurs émanant de celui-ci comme de répulsifs (Chapitre 3). A la fin de la nuit, il retourne à l'intérieur de son refuge pour y passer la journée à l'abri, en étant guidé par des phéromones d'agrégation et d'arrêt (Lorenzo et Lazzari, 1996, 1998) sous l'influence du cycle naturel de lumière (Bodin *et al.*, 2008)..... **110**

ANNEXE 1

Figure 1 : Répartition mondiale de la Malaria en 2006..... **136**

Figure 2 : Répartition mondiale de la Filariose Lymphatique en 2006..... **136**

Figure 3 : Répartition mondiale de la Dengue en 2007..... **137**

Figure 4 : Répartition mondiale de l'Onchocercose..... **137**

Figure 5 : Répartition mondiale des Leishmanioses Cutanées en 2003..... **138**

Figure 6 : Répartition mondiale de la Trypanosomiase Américaine (Maladie de Chagas) .. **138**

Figure 7 : Répartition mondiale de la Trypanosomiase Africaine (Maladie du sommeil) en 2004..... **139**

ANNEXE 2

Figure 1 : Dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement du comportement locomoteur de *R. prolixus*. Le compensateur de locomotion consiste en une sphère creuse de polystyrène suspendue par un courant d'air vertical. Les punaises sont suspendues par l'abdomen à une pièce de métal pivotante au sommet de la sphère. Les insectes peuvent alors marcher et s'orienter librement sans jamais modifier leur distance au stimulus. Un capteur optique placé sous le pôle opposé de la sphère permet l'enregistrement des parcours par un ordinateur.**... 141**

Figure 2 : Parcours réalisés par six punaises *R. prolixus* (L5, 3 semaines de jeûne) confrontées à : (a,b,c) deux courants d'air de concentration ambiante en CO_2 (500 ± 50 ppm : contrôle vs contrôle); et (d,e,f), un courant d'air test enrichi de 1200 ppm de CO_2 et un courant d'air ambiant (test vs contrôle). Les points noirs représentent le départ de l'insecte, la flèche blanche le courant d'air contrôle et la flèche noire le courant d'air enrichi en CO_2. En présence de CO_2, les punaises marchent en direction du stimulus, mais on une orientation aléatoire en situation contrôle **..... 143**

Figure 3 : Schéma complet du dispositif d'enregistrement du comportement olfactif de *R. prolixus*. Une pompe propulse l'air ambiant dans un débitmètre. Le courant d'air est séparé en deux courants identiques passant dans des flacons en verre contenant 100 ml de H_2SO_4. Le CO_2 est généré dans l'un de ces flacons par addition de NA_2CO_3 tandis que l'autre sert de contrôle. Les courants sont présentés aux insectes mis en place sur le compensateur de locomotion**..... 145**

"…At night I experienced an attack (for it deserves no less a name) of the Benchuca*, a species of* Reduvius*, the great black bug of the Pampas. It is most disgusting to feel soft wingless insects, about an inch long, crawling over one's body. Before sucking they are quite thin, but afterwards they become round and bloated with blood, and in this state are easily crushed. One which I caught at Iquique, (for they are found in Chile and Peru,) was very empty. When placed on a table, and though surrounded by people, if a finger was presented, the bold insect would immediately protrude its sucker, make a charge, and if allowed, draw blood. No pain was caused by the wound. It was curious to watch its body during the act of sucking, as in less than ten minutes it changed from being as flat as a wafer to a globular form. This one feast, for which the benchuca was indebted to one of the officers, kept it fat during four whole months; but, after the first fortnight, it was quite ready to have another suck.…"*

Charles Darwin, *The voyage of the Beagle*; The Harvard Classics Volume 29, 1909.

Chagas' Disease Claimed an Eminent Victim (Charles Darwin's Illness)

As a naturalist aboard the frigate Beagle, Darwin spent five happy, strenuous years exploring some of the wildest places on earth. But once back in England, his health declined horribly. He suffered extreme lassitude and gastrointestinal pain, nausea, vomiting, sleeplessness and, ultimately, a fatal heart disease. Forced to give up field work and social life, he lived out the rest of his 71 years as a reclusive semi-invalid.

Not a few contemporaries dismissed Darwin's illness as hypochondria; later writers generally assumed it was psychosomatic, probably a reaction to an autocratic father or to the supposed theological implications of his theory of natural selection.

But science, belatedly, has vindicated Darwin. As Prof. Saul Adler of the Hebrew University, Jerusalem, a distinguished expert in tropical diseases, pointed out, Darwin had more than once met up with Triatoma infestans*, the "assassin bug," while in South America. One encounter, in a village at the foot of the Argentine Andes, he described vividly in The Voyage of the Beagle: "*At night I experienced an attack (for it deserves no less a name) of the Benchuca, a species of Reduvius, the great black bug of the Pampas. It is most disgusting to feel soft wingless insects, about an inch long, crawling over one's body. Before sucking they are quite thin but afterwards they become round and bloated with blood.*"*

T. infestans*, is now known to be the principal carrier of Chagas' disease, and though the trypanosome itself was not identified until decades after Darwin's death, his symptoms match the clinical portrait of chronic Chagas' disease. With hindsight, it seems clear that it was this protozoan, and not inner doubts or guilt, that reduced a vigorous adventurer to a frail, prematurely aged man who for 40 years (as his son put it) "never knew one day of the health of ordinary men."*

Peter Salwen
New York, 30 Mai 1989

The New York Times, "Letters," 15 Juin 1989

INTRODUCTION GENERALE

Le monde a radicalement changé depuis 1951, année où l'OMS a fait paraître sa première série de dispositions réglementaires juridiquement contraignantes qui avaient pour but d'éviter la propagation internationale des maladies. La situation était alors relativement stable de ce point de vue. On ne se préoccupait que des six maladies: le choléra, la fièvre jaune, la fièvre récurrente, la peste, le typhus et la variole. Les pathologies nouvelles étaient rares et, pour beaucoup d'affections des plus connues, des médicaments miracles avaient révolutionné le traitement. Pour leurs déplacements internationaux, les gens prenaient le bateau et les nouvelles, le télégraphe. Depuis cette époque, des changements profonds sont survenus dans l'occupation de la planète par l'espèce humaine. En ce qui concerne les maladies, la situation n'a plus rien de stable. L'accroissement démographique, le peuplement de territoires jusque-là inhabités, l'urbanisation rapide, l'agriculture intensive, la dégradation de l'environnement et l'utilisation malencontreuse des anti-infectieux ont bouleversé l'équilibre du monde microbien. Chaque année, une nouvelle maladie fait son apparition, ce qui ne s'était jamais vu dans l'histoire. Avec plus de 2 milliards de passagers transportés chaque année par les compagnies aériennes, les possibilités de dissémination internationale rapide des agents infectieux et de leurs vecteurs sont beaucoup plus importantes. Une autre tendance est particulièrement inquiétante, à savoir que les principaux anti-infectieux sont en train de perdre leur efficacité beaucoup plus vite que l'on ne parvient à en mettre au point de nouveaux. L'ampleur de ces menaces est beaucoup plus grande dans un monde caractérisé par une forte mobilité, l'interdépendance économique et l'interconnexion électronique. Les moyens de défense classiques aux frontières ne peuvent plus protéger d'une invasion par une maladie ou un vecteur. Avec la diffusion des nouvelles en temps réel, la panique peut gagner les populations tout aussi facilement. L'activité économique et commerciale subit les contrecoups des désastres sanitaires bien au-delà des lieux où ils se produisent. La vulnérabilité est universelle **(Dr Margaret Chan, Directeur général de l'Organisation Mondiale de la Santé, Rapport sur la santé dans le monde 2007 : la sécurité sanitaire mondiale au XXIe siècle : un avenir plus sûr)**.

Aujourd'hui, de nombreuses maladies humaines d'importance mondiale sont engendrées par des insectes hématophages (annexe 1). Ces espèces contractent l'agent infectieux lorsqu'elles se nourrissent du sang d'un hôte infecté (humain ou animal) et infectent de nouvelles victimes lors d'un repas subséquent. Parmi les maladies les plus importantes, on retrouve, pour ne citer que les principales :

La Malaria (également nommée Paludisme) est une parasitose due à un protozoaire (*Plasmodium falciparum*) transmis par la piqûre des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Avec 300 à 500 millions de malades et 1,5 à 2,7 millions de décès par an, le Paludisme demeure la parasitose tropicale la plus importante, avec 80 % des cas enregistrés en Afrique subsaharienne, où ils concernent majoritairement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (WHO, 2006).

La Filariose Lymphatique, ou Eléphantiasis, est le résultat de la transmission de vers parasites filiformes (filaires) *Wuchereria bancrofti* et *Brugia malayi* par plusieurs genres de moustiques (*Anopheles, Culex, Aedes*,...). Cette maladie menace plus d'un milliard de personnes dans à peu près 80 pays. Sur les quelques 120 millions de personnes déjà affectées, plus de 40 millions sont gravement handicapées ou défigurées par la maladie. Un tiers des personnes infestées vivent en Inde, un tiers en Afrique et le reste principalement en Asie du sud, dans le Pacifique et dans les Amériques (WHO, 2007).

La Dengue est une maladie infectieuse virale transmise par les moustiques femelles du genre *Aedes*. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'entre 50 et 100 millions de personnes sont infectées dans le monde chaque année. Entre 200 000 et 500 000 personnes souffrent de la forme hémorragique, qui tue 20 000 personnes par an. Environ deux cinquièmes de la population mondiale sont désormais exposés au risque de cette maladie. Alors qu'elle était présente uniquement en Asie du Sud-est, elle est depuis quelques années en pleine progression dans le reste de l'Asie, en Afrique et surtout en Amérique du Sud (WHO, 1997).

L'Onchocercose est une maladie causée par l'invasion de l'organisme humain par des vers filiformes appartenant à l'espèce *Onchocerca volvulus*, transmis par les mouches noires de la famille des Simuliidés. Elle touche plus de 25 millions de personnes principalement en Afrique et en Amérique centrale. Sa gravité tient surtout à la grande fréquence des cécités qu'elle provoque chez les populations vivant au bord des rivières d'où son nom de « cécité des rivières » (TDR, 2005).

Les Leishmanioses sont des affections cutanées ou viscérales dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* de la famille des Trypanosomidae, transmis par la piqûre de certaines espèces de diptères du genre *Phlebotomus* et du genre *Lutzomyia*. C'est une parasitose des zones intertropicales (hormis l'Océanie) et tempérées chaudes, signalée dans 88 pays répartis en 5 foyers : méditerranéen, chinois, indien, africain et d'Amérique latine. La prévalence de la maladie est estimée à 12 millions et l'incidence à 2 millions (1,5 millions de leishmanioses cutanées dont 90 % en Algérie, Afghanistan, Arabie Saoudite, Brésil, Iran, Pérou, Syrie et 500 000 leishmanioses viscérales dont 90 % au Bangladesh, Brésil, Inde, Népal, Soudan) (TDR, 2005).

La Trypanosomiase Américaine, couramment appelée « maladie de Chagas », est une maladie parasitaire résultant de la transmission d'un protozoaire, le trypanosome *Trypanosoma cruzi*, cet agent infectieux est transmis via les excréments de punaises hématophages appartenant à la sous-famille des triatomines. On estime à près de 18 millions le nombre de personnes infectées, et à 120 millions le nombre de personnes menacées. Cette maladie est endémique de l'Amérique Centrale et de l'Amérique du Sud (WHO, 2002).

La Trypanosomiase Africaine, couramment appelée « maladie du sommeil », est une maladie parasitaire provoquée par le trypanosome, *Trypanosoma brucei*, transmis par la piqûre de différentes mouches du genre *Glossina* (mouches couramment nommées « mouches tsé-tsé »), et qui affecte les Hommes et les animaux. Cette maladie est endémique de certaines régions de l'Afrique sub-saharienne, couvrant environ 36 pays et menaçant potentiellement 60 millions de personnes. On estime que 50 000 à 70 000 personnes sont actuellement infectées, le nombre ayant diminué légèrement ces dernières années (TDR, 2005).

Certaines de ces maladies ne possédant pas de traitements efficaces, il est donc nécessaire de poursuivre les recherches d'un point de vue appliqué en développant de nouvelles techniques de lutte vectorielle et/ou de nouveaux traitements médicaux. Mais il apparaît également essentiel, en parallèle, de continuer les études fondamentales afin de mieux connaître la biologie et l'écologie de chaque espèce et de mieux contrôler l'expansion des vecteurs.

La présente thèse doctorale concerne l'étude des vecteurs de la maladie découverte par Carlos Chagas il y a exactement un siècle et dont une description plus approfondie m'apparait ici nécessaire pour mieux comprendre l'importance de ce travail.

- *La Trypanosomiase Américaine : Découverte, Description et Contrôle.*

Au début du siècle, un médecin Brésilien, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) (figure 1), découvrit et décrivit une nouvelle trypanosomiase humaine dans la ville de Lassance, située dans la vallée du fleuve São Francisco, au Nord de l'état de Minas Gerais au Brésil (Chagas, 1909). A cette époque il étudiait les populations de moustiques vecteurs du paludisme, dont la présence rendait difficile la construction d'une voie ferrée dans la région. Il y remarqua rapidement la curieuse infestation des maisons rurales par un insecte hématophage, une sorte de punaise « assassine » ou punaise « embrassante » (*barbeiro* ou « barbier » en portugais, appelée ainsi parce qu'elle suce le sang la nuit en piquant le visage de ses victimes). Chagas découvrit que les intestins de ces insectes contenaient un protozoaire flagellé, une nouvelle espèce du genre *Trypanosoma*, et fut capable de prouver expérimentalement qu'il pouvait être transmis à des ouistitis piqués par un insecte infecté. Chagas nomma ce nouveau parasite *Trypanosoma cruzi* (figure 2) en l'honneur d'Oswaldo Cruz, alors directeur de l'Institut de Manguinhos au Brésil qui deviendra plus tard l'Institut Oswaldo Cruz (figure 3). Le parasite fut renommé *Schizotrypanum cruzi* puis à nouveau *Trypanosoma cruzi*. Cette trypanosomiase fut alors nommée maladie de Chagas (ou trypanosomiase américaine). La forte présence de l'insecte vecteur dans les habitations et sa capacité à piquer les humains laissent à penser, selon Chagas, que le parasite pourrait être la cause de maladies humaines. Certains animaux domestiques comme les chats et les chiens, puis sauvages, comme les tatous, furent identifiés comme porteurs du même agent pathogène. Enfin, des prélèvements



Figure 1 : Photographie de Carlos Chagas (1879-1934) dans son laboratoire de L'Institut Oswaldo Cruz.

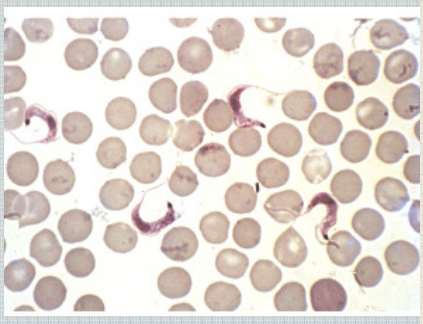


Figure 2 : Photographie de Trypanosoma cruzi *parmi des hémocytes de vertébrés (d'après Coura (2007)).*



Figure 3 : Institut Oswaldo Cruz (Manguinhos, Brésil) (d'après Coura et al. (2000)).

sanguins furent effectués et, le 23 avril 1909, Chagas découvrit pour la première fois le même parasite dans le sang d'une petite fille de deux ans, Bérénice, habitante de la région (figure 4). Le travail de Chagas et de ses collègues de l'Institut Oswaldo Cruz à Rio de Janeiro est unique dans l'histoire de la médecine, car il fut en effet le seul chercheur à décrire complètement une nouvelle maladie infectieuse en allant de l'insecte vecteur jusqu'à l'épidémiologie en passant par l'agent pathogène, l'hôte et les manifestations cliniques (Chagas, 1916; Romaña, 1963; Chagas-Filho, 1968; Guerra, 1970). Après une phase aiguë suivant l'infection, la maladie évolue vers la chronicité chez plus d'un tiers des personnes infectées. La phase chronique apparaît après 10 à 20 ans d'infection « silencieuse ». Des lésions irréversibles peuvent toucher le coeur, l'oesophage, le colon, et le système nerveux périphérique : 27 % des personnes infectées souffrent de symptômes cardiaques (cardiopathies chroniques), qui peuvent conduire à la mort subite, 6 % des individus sont atteints de lésions chroniques de l'appareil digestif et 3 % des personnes infectées ont des atteintes du système nerveux périphérique (troubles neurologiques) (figure 5). Entre 1913 et 1924, il devint évident que cette maladie n'était pas confinée au Brésil. Elle fut diagnostiquée au Venezuela, Pérou, Salvador et Argentine avec toutefois quelques variations épidémiologiques. L'importance de l'insecte hématophage *Rhodnius prolixus* (Heteroptera : Reduviidae) dans cette pathologie humaine fut montrée par Brumpt (1919) lorsqu'il obtint une infection expérimentale, avec le pathogène *Trypanosoma cruzi,* de larves et d'adultes récoltés au Venezuela et élevés dans son laboratoire. Tejera (1919), travaillant dans le bassin de Maracaibo dans l'ouest du Venezuela trouva quelques spécimens de *R. prolixus* infectés de trypanosomes de formes morphologiquement identiques à *T. cruzi* et réussit à les inoculer à des rongeurs via ces insectes. Ce même chercheur trouva des formes flagellées de *T. cruzi* dans le sang de patients de l'état de Zulia au Venezuela (Uribe, 1926). Depuis, presque tous les pays de l'Hémisphère Ouest présentent une large

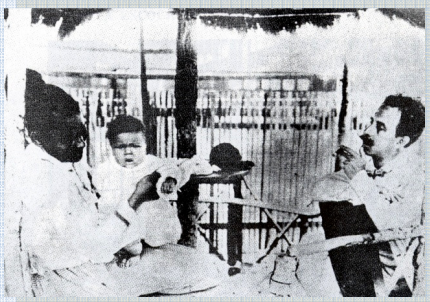


Figure 4 : Consultation médicale de Carlos Chagas (première découverte du parasite dans le sang d'une petite fille le 23 avril 1909) (d'après Coura et al. (2000)).

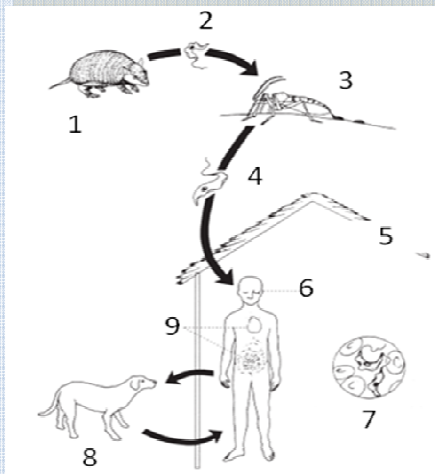


Figure 5 : Cycle de vie du parasite Trypanosoma cruzi *(d'après Rozendaal, J.A. (1999)).*

1 : Les tatous, les opossums et autres rongeurs constituent un réservoir naturel.

2 : Les triatomines ingèrent les trypanosomes lors d'un repas sanguin.

3 : Les trypanosomes parviennent à maturité et deviennent infectieux en 10-20 jours.

4 : Les triatomines piquent un hôte et déposent des trypanosomes sur la peau de celui-ci par leurs déjections.

5 : Les toits de chaumes et les fissures constituent un habitat idéal pour les triatomines

6 : Les premiers symptômes peuvent consister en un chagome (inflammation entourant la piqure) et un épisode fébrile.

7 : Les trypanosomes pénètrent dans la circulation sanguine et infectent les cellules du cœur de l'œsophage et du colon.

8 : Les chiens, les poules et les rats constituent d'importants réservoirs domestiques.

9 : Au bout de plusieurs années, l'infection peut entrainer d'importants troubles intestinaux et des cardiopathies.

distribution de cette maladie. Pendant les 50 dernières années, la maladie de Chagas a été reconnue comme un sérieux problème de Santé Publique, particulièrement dans certaines zones de l'Amérique du Sud. En 1960, le comité de l'OMS estimait à près de 7 millions le nombre de personnes infectées par la maladie de Chagas et à plus de 35 millions celles pouvant être exposées à l'infection. Actuellement on dénombre plus de 18 millions de personnes infectées et 120 millions courant le risque de l'infection (Lehane, 2005), ce qui représente 25 % de la population d'Amérique Latine. En l'absence de mesures de contrôle, l'incidence de la maladie est estimée à 500 000 nouveaux cas par an, 80 % à partir de fèces de triatomines, 16 % par transfusion sanguine, 2 % par transmission congénitale (de la mère au fœtus) et le reste par voie orale (aliments contaminés), implant d'organe ou accident de laboratoire (Schofield, 1994).

Les vecteurs du trypanosome *T. cruzi* sont des insectes hématophages appartenant à la sous-famille des triatomines (Heteroptera : Reduviidae). Ces insectes sont responsables de la transmission du parasite, qui est présent en grand nombre dans leurs déjections fécales qu'ils émettent lors de l'alimentation, ou juste après le repas sanguin. Les parasites sont alors déposés sur la peau de l'hôte, qu'ils vont pénétrer pour atteindre la circulation sanguine. Aujourd'hui, 136 espèces de triatomines sont connues (Galvão *et al.*, 2003; Forero *et al.*, 2004), appartenant à 5 tribus (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini, and Triatomini) et 16 genres (*Alberprosenia*, Martínez et Carcavallo, 1977 ; *Belminus*, Stål, 1859 ; *Bolbodera*, Valdés, 1910 ; *Cavernicola*, Barber, 1937 ; *Dipetalogaster*, Usinger, 1939 ; *Eratyrus*, Stål, 1859 ; *Hermanlentia*, Jurberg et Galvão, 1997 ; *Mepraia*, Mazza, Gajardo & Jörg, 1940 ; *Microtriatoma*, Prosen et Martínez, 1952 ; *Panstrongylus*, Berg, 1879 ; *Parabelminus*, Lent, 1943 ; *Paratriatoma*, Barber, 1938 ; *Psammolestes*, Bergroth, 1911 ; *Rhodnius*, Stål, 1859 ; *Torrealbaia*, Carcavallo, Jurberg et Lent, 1998 ; et *Triatoma*, Laporte, 1832) (WHO, 2002). Les triatomines ont une large distribution, depuis le nord des Etats-Unis jusqu'à la Patagonie dans le Sud de l'Argentine (Carcavallo *et al.*, 1995, 1999). Bien que toutes les espèces de triatomines puissent être des vecteurs potentiels de *T. cruzi*, et que la plupart sont impliquées dans sa transmission aux animaux en milieu naturel, seulement quelques espèces sont fortement impliquées dans la transmission du parasite à l'Homme (espèces domestiques). Ces espèces appartiennent à 3 genres : *Triatoma*, *Rhodnius*, et *Panstrongylus*. Ces trois genres sont largement distribués en Amérique centrale et Amérique du Sud, du Mexique à l'Argentine et au Chili.

La plupart des espèces de triatomines sont sylvatiques (forêts), et vivent dans divers écosystèmes (tempéré à tropical), leur habitat naturel étant en contact direct avec une variété d'hôtes vertébrés, particulièrement dans des nids d'oiseaux et de divers mammifères. Opossums, tatous et rongeurs apparaissent comme étant les plus importants réservoirs naturels de *T. cruzi* (Schofield, 2000). Certaines espèces de triatomines peuvent occuper des habitats sylvatiques et/ou péri-domestiques comme par exemple des poulaillers ou des bergeries, et seulement quelques unes sont associées à un habitat domestique. Certaines montrent une préférence d'hôtes, mais la plupart sont euriphages[1]. Les espèces épidémiologiquement liées à la maladie de Chagas chez l'Homme sont celles qui se sont adaptées à l'environnement humain. Cinq espèces sont majoritairement présentes dans les habitats domestiques : *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* et *Triatoma brasiliensis* (figure 6) (Schofield, 1994). Parmi ces espèces les plus domestiques, *T. infestans* acquiert 57 à 67 % de ses repas sanguin sur l'Homme et le reste sur une large gamme d'animaux domestiques (chiens, chats, poules…) (Corrêa et Aguiar, 1952; Mayer et Alcaraz, 1955). Des taux similaires furent obtenus pour *T. infestans* et *P. megistus,* et il fut observé que ces espèces vivaient en étroite association avec leurs hôtes (Freitas *et al.*, 1960). Ceci est également vrai pour les insectes vivant dans des conditions péri-domestiques où ils peuvent se nourrir sur d'autres hôtes. *R. prolixus* montre des habitudes similaires, avec un pourcentage plus important d'alimentation sur l'Homme (Zeledón et Rabinovich, 1981). Leur adaptation à l'habitat domestique, qui offre une alimentation abondante (e.g. sang humain, animaux domestiques, rongeurs…), un habitat facile à coloniser (e.g. fissures et crevasses dans les murs constitués de torchis, et toits de feuilles de palmiers et de racines) (figure 7) et des conditions climatiques plus stables (e.g. moins d'influence des changements

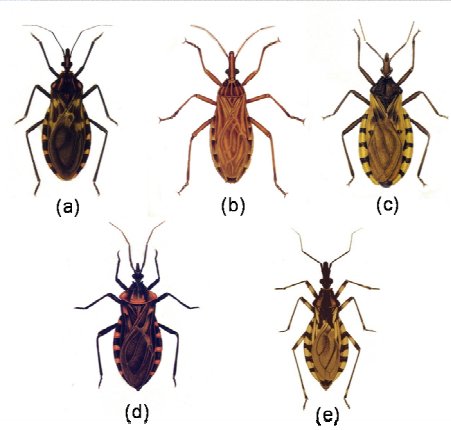


Figure 6 : Espèces de punaises hématophages majoritairement présentes dans les habitats domestiques (d'après Jurberg et al. (2005)).

a : Triatoma infestans *(♂ : 21 à 26mm / ♀ : 26 à 29mm)*

b : Rhodnius prolixus *(♂ : 17 à 20mm / ♀ : 19 à 22mm)*

c : Triatoma dimidiata *(♂ / ♀ : 24 à 35mm)*

d : Panstrongylus megistus *(♂ : 26 à 34mm / ♀ : 29 à 38mm)*

e : Triatoma brasiliensis *(♂ / ♀ : 22 à 26mm)*

[1] Euryphage: qui a un large régime alimentaire (omnivore, polyphage).

climatiques saisonniers) définit l'importance vectorielle de ces espèces.

Sans vaccin ou traitements spécifiques disponibles pour des interventions importantes de Santé Publique, la principale stratégie de contrôle repose sur la prévention de la transmission du parasite, principalement en éliminant les insectes vecteurs domestiques et en contrôlant la transmission par transfusions sanguines. Les activités de contrôle des vecteurs commencèrent dans les années 40, initialement par l'amélioration des habitations humaines (figure 8) et à travers la pulvérisation d'insecticides, dont les essais de terrain furent fructueux au Brésil (Centre de recherche de Bambui), avec des résultats similaires à São Paulo, en Argentine, au Venezuela et au Chili. Mais les programmes de contrôle nationaux furent appliqués uniquement après les années 70, quand les questions techniques furent résolues et que la démonstration scientifique de l'impact social de la maladie de Chagas fut utilisée pour encourager la détermination politique en faveur de campagnes nationales (principalement au Brésil). De façon similaire, le dépistage à grande échelle, en Amérique Latine, de donneurs de sang infectés, ne commença que dans les années 80 après l'émergence du SIDA. Vers la fin du siècle dernier, il devint clair qu'un contrôle continu dans les régions endémiques puisse conduire à l'élimination des plus importantes populations domestiques de vecteurs – spécialement *T. infestans* et *R. prolixus* – aussi bien que des réductions conséquentes d'autres espèces largement répandues comme *T. brasiliensis*, *P. megistus*, ou *T. dimidiata*, principalement en interrompant la transmission de la maladie aux populations rurales. L'impact social du contrôle de la maladie de Chagas peut facilement être démontré par la disparition de cas aigus et de nouvelles infections chez les jeunes, aussi bien que par une réduction progressive des taux de mortalité et de morbidité[2] dans les régions contrôlées. En

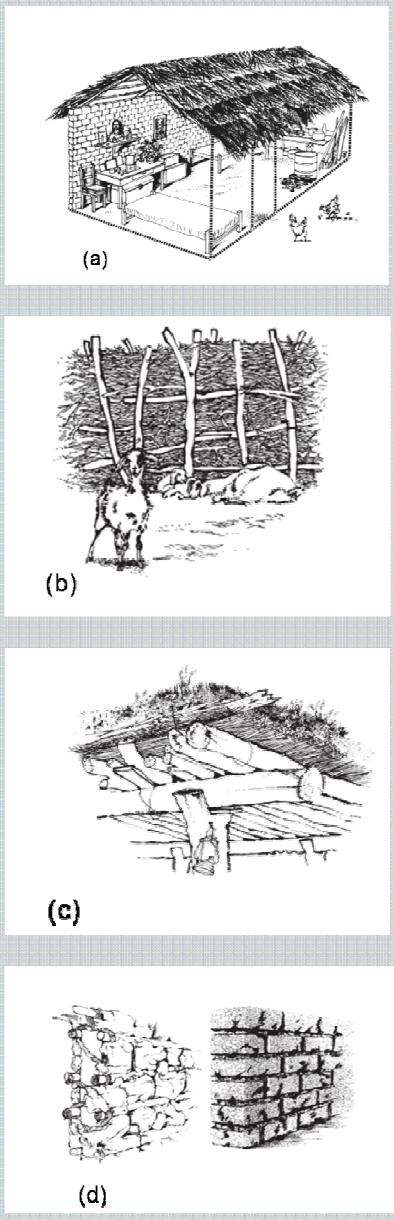


Figure 7 : Types d'habitats domestiques colonisés par les triatomines. Habitations humaines (a) à l'intérieur des toitures en chaume (c) et/ou dans les murs en torchis ou en adobe à l'intérieur des fissures (d). Milieu péri-domestiques (b) dans les clôtures des enclos d'animaux domestiques (d'après Rozendaal, J.A. (1999)).

[2] Taux de morbidité : Rapport qui mesure l'incidence et la prévalence d'une certaine maladie. Dans le cadre d'une période donnée (typiquement, mais pas nécessairement, un an), ce taux indique le nombre de personnes atteintes par cette maladie par unité de population. On l'exprime en général en nombre de personnes atteintes par 1 000, 10 000 ou 100 000 personnes.

termes économiques, la relation coûts-bénéfices entre l'intervention (pulvérisation d'insecticides, sérologie des banques de sang) et la réduction de la maladie de Chagas (en termes de protection médicale et sociale et de productivité améliorée) est hautement positive.

Un contrôle efficace de cette maladie est aujourd'hui un but atteignable qui dépend premièrement de la volonté politique, pour cela les contraintes majeures résultent de problèmes associés à la décentralisation des services de Santé Publique et du désintérêt politique progressif pour cette maladie. Des stratégies de coopérations politiques et techniques ont été mises en place pour contrebalancer ces problèmes, la « *Southern Cone Initiative* » lancée en 1991, la « *Andean Initiative* » lancée en 1993, la « *Central American Initiative* » lancée en 1993 et la « *Amazonian Initiative* » lancée en 2004 (figure 9). Ces programmes de lutte contre la maladie de Chagas comprennent deux phases de contrôle, la première visant à surveiller les dons de sang pour les transfusions sanguines, et la seconde veillant à éradiquer les insectes vecteurs. Ce n'est qu'à partir de 1997 que la « *Central American Initiative* » et la « *Andean Initiative* » mirent en place leur deuxième phase de contrôle. Grâce à la mise en place de ces stratégies, et par l'élimination de la maladie dans les pays du continent sud-américain, on espère à près de 70% la réduction de l'incidence de cette maladie en Amérique Latine. Cette approche internationale coordonnée par la « *Pan American Health Organisation* » (PAHO : Office régionale de l'OMS en Amérique), a été une large réussite, avec aujourd'hui l'élimination de la transmission de la maladie en Uruguay (1997), au Chili (1999) et dans certaines régions du Brésil et de l'Argentine. En parallèle, la DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*), une initiative pour lutter contre les maladies négligées comme la maladie de Chagas, a été créée (2003). Cette initiative regroupe l'Institut Pasteur, le Conseil Indien pour la Recherche Médicale (Inde), la Fondation Oswaldo Cruz (Brésil), l'Institut de Recherche Médicale du Kenya, Médecins Sans Frontières et le

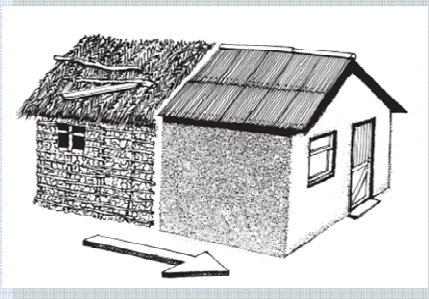


Figure 8 : L'amélioration des logements réduit le nombre d'endroits utilisables par les triatomines pour se réfugier. Les anfractuosités des murs peuvent être éliminées grâce au crépissage au moyen d'un enduit. Les lieux de repos offerts aux triatomines par le sol peuvent également être bouchés puis recouverts d'une chape de ciment. Enfin, les tuiles ou la tôle ondulée n'offrent pas d'habitat convenable à ces insectes (d'après Rozendaal, J.A. (1999)).



Figure 9 : Stratégies de coopérations politiques et techniques mises en place pour le contrôle de la maladie de Chagas en Amérique Centrale et Amérique du Sud. Ces programmes visent à surveiller les dons de sang pour les transfusions sanguines et veillent à éradiquer les vecteurs insectes (d'après Guhl, F. (2007)).

1: Central American Initiative (1993)

2: Andean Initiative (1993)

3: Amazonian Initiative (2004)

4: Southern Cone Initiative (1991)

Ministère de la Santé de Malaisie. Ces partenaires travaillent en étroite collaboration avec le Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD), la Banque Mondiale et le Programme Spécial de Recherche et de Formation sur les Maladies Tropicales de l'OMS (*TDR : Tropical disease research*) sur la recherche de nouveaux médicaments. Cependant, ce serait une erreur que d'imaginer cette maladie totalement maîtrisée. De hauts niveaux de transmission vectorielle restent présents dans différentes régions, et plusieurs pays ont besoin de développer de sérieuses surveillances et des programmes d'intervention à grande échelle.

La Guyane française, comme l'ensemble de l'Amazonie, a longtemps été considérée comme une zone à faible risque de maladie de Chagas, avec des vecteurs sylvestres et un réservoir animal sauvage. L'évolution de l'épidémiologie de cette parasitose en Amazonie, sur fond de bouleversements écologiques, et les signaux d'alerte provenant d'études préliminaires en Guyane ont motivé une mission d'évaluation épidémiologique et entomologique de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) en mars 2005, avec la coopération de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Cette évaluation confirme la présence de la maladie de Chagas en Guyane, avec une transmission autochtone qui n'est pas limitée aux zones de forêt. Neuf des 15 cas humains diagnostiqués de janvier 1990 à mars 2005 sont liés à une contamination en Guyane dans les régions fluviales. La circulation de *T. cruzi* est aussi démontrée sur le littoral, y compris dans la zone résidentielle de Cayenne et des communes adjacentes. En effet, on retrouve sans difficultés des triatomines installées dans l'environnement immédiat des habitations, avec un taux élevé d'infestation par *T. cruzi*. Les intrusions de vecteurs dans les habitations et les jardins sont fréquentes, en particulier près des îlots forestiers résiduels, et sont à l'origine de cas de Chagas chez des chiens domestiques. Ce bilan a porté sur l'ensemble des données disponibles, lesquelles sont loin d'être exhaustives. Ainsi, l'incidence et la prévalence de la maladie de Chagas sont inconnues. Les quelques études sérologiques réalisées ne permettent pas d'estimer la prévalence de l'infection à *T. cruzi* ; par conséquent, le risque transfusionnel ne peut être évalué. Le risque d'émergence d'une situation endémique dans les régions habitées et urbaines de Guyane est réel et justifie la mise en place d'un système de surveillance de la maladie de Chagas.

Une meilleure maitrise des maladies humaines résultant de la transmission de parasites par certains insectes hématophages nécessite une bonne connaissance de la biologie de ces vecteurs, mais celle-ci est loin d'être entièrement connue. Un des aspects important dans le contrôle de ces insectes est le comportement de recherche de l'hôte. Comment les insectes vont-ils localiser leur source de nourriture (le sang des hôtes vertébrés) ? Et comment ce

comportement de recherche peut-il être modulé par des facteurs propres de l'individu (facteurs physiologiques) ?

COMPORTEMENT DE RECHERCHE ALIMENTAIRE CHEZ LES INSECTES HEMATOPHAGES

Le comportement de recherche de l'hôte chez les insectes hématophages est défini par tous les comportements pouvant être associés à l'identification d'un hôte et à la prise d'un repas sanguin. Les difficultés que peuvent rencontrer ces insectes dans la localisation de leur repas sanguin dépendent principalement de leur association avec leurs hôtes. A une extrémité, se trouvent les ectoparasites permanents, comme par exemple les poux (Ordre: Phthiraptera) ou les puces (Ordre: Siphonaptera), qui sont dans une position d'acquisition de repas sanguin facilitée car ils vivent à quelques millimètres maximum de la peau de leurs hôtes. Et à l'autre extrémité, se trouvent les ectoparasites temporaires, comme par exemple les mouches noires (également appelée « *moutmout* » dans certaines régions d'Afrique Centrale) (Diptera : Simuliidae) ou les taons (Diptera : Tabanidae), qui ne restent pas de façon permanente à proximité de leurs hôtes. Ces différents modes de vie se reflètent dans le nombre de récepteurs antennaires que possèdent ces différents insectes hématophages. Sans surprise, une quantité plus importante de récepteurs sensoriels est retrouvée chez les insectes qui ne vivent pas en association permanente avec leurs hôtes (Chapman, 1982). Les poux et les puces possèdent seulement 10 et 50 récepteurs antennaires, respectivement, alors que la mouche des étables, *Stomoxys calcitrans*, qui passe la plupart de son temps à distance des hôtes, en possède 5000. La punaise hématophage *Cimex lectularius*, que l'on trouve principalement dans les literies en forte association avec son hôte humain, possède seulement 56 récepteurs antennaires en comparaison avec les 2900 que possède *Triatoma infestans*, qui vit en moins forte association avec ses hôtes (Lehanne, 2005). La sensibilité sensorielle de ces insectes serait alors conditionnée par leurs différents modes de vie.

Le niveau de dépendance vis-à-vis du repas sanguin est aussi un facteur important dans la localisation de l'hôte. Pour des hématophages obligatoires, comme la mouche tsé-tsé (Diptera : Glossinidae) ou les punaises hématophages, une recherche d'hôtes régulière est alors absolument nécessaire. Au contraire, les hématophages facultatifs peuvent se nourrir d'autres ressources (certains moustiques et la mouche des étables se nourrissent également de nectar). Ils sont donc moins contraints à une recherche régulière d'hôtes et à une exposition plus fréquente à la prédation. En effet, chez ces insectes hématophages, l'hôte joue à la fois le rôle de proie et de prédateur.

Ce comportement de recherche de l'hôte fut décrit comme une suite de comportements divisés en 3 phases (Sutcliffe, 1987; Lehane, 2005) :

- *Phase de recherche appétitive* : cette étape est modulée par la motivation de l'insecte. À mesure que le besoin alimentaire augmente, l'insecte devient plus sensible à certains stimuli, et l'activité de recherche non-orientée amène l'insecte en contact avec des stimuli associés à l'hôte. Les insectes peuvent présenter un comportement de recherche au hasard, ou ils peuvent également rester immobiles jusqu'à percevoir un signal de l'hôte dans leur environnement.

- *Phase d'activation et d'orientation* : une fois que l'insecte détecte un signal activateur, il peut alors modifier son état d'alerte en changeant son activité générale et en s'orientant vers l'hôte. Cependant, la détection d'un premier facteur attractif peut ne pas engendrer de réaction, l'insecte restera attentif à l'apparition d'autres signaux, ainsi, une seconde stimulation pourrait déclencher l'orientation. Pour s'orienter vers la source de nourriture, l'insecte peut alors utiliser plusieurs signaux comme informations fiables. Cette étape est associée à la recherche à moyenne et à longue distance, là où les signaux chimiques jouent un rôle prépondérant.

- *Phase d'attraction* : cette étape est l'approche finale où l'insecte prendra la décision d'un éventuel contact avec l'hôte après l'avoir localisé grâce à différents signaux. Cette phase est une orientation à courte distance où des facteurs comme la vision, la chaleur et l'humidité auraient un rôle plus important que les autres facteurs.

Indices sensoriels associés à la recherche alimentaire

Grâce à des expériences de terrain et de laboratoire, il a été montré qu'une variété de signaux émis par les hôtes peuvent potentiellement être utilisés par les insectes hématophages comme facteurs sensoriels d'orientation. Cependant, les informations concernant les processus impliqués dans leur perception ne sont pas toujours complètement connues. Ces signaux sont majoritairement de nature chimique, mais on retrouve également de la chaleur et de la vapeur d'eau. À ceci, il faut ajouter des repères visuels, comme le contraste entre l'environnement et les mouvements des hôtes. En général, les stimuli olfactifs et visuels, aidés par des réponses anémotactiques[3] et optomotrices[4], sont les principaux facteurs utilisés dans

[3] Réponse anémotactique : réponse orientée en direction d'un courant d'air en l'absence de tout stimulus.

[4] Réponse optomotrice : reflexe visuel de stabilisation en réponse aux mouvements d'objets de l'environnement.

la détection des hôtes à longue distance. À courte distance, d'autres stimuli deviennent également importants, particulièrement l'humidité et la chaleur.

- Stimuli chimiques

La peau humaine est la source d'une grande diversité de composés chimiques. Environ 350 substances de compositions chimiques différentes ont été identifiées, incluant l'acide lactique, des acides gras à courte et longue chaîne, des aldéhydes, des alcools, des composés aromatiques, des amines, des acétates et des cétones (Zeng *et al.*, 1991; Braks *et al.*, 1999; Bernier *et al.*, 2000). La plupart de ces composés, produits de métabolismes endogène (sécrétions des glandes de l'épiderme) ou exogène (métabolisme de la microflore), confèrent une signature chimique unique des vertébrés (Nicolaides, 1974). Ils jouent également un possible rôle de kairomones pour les arthropodes hématophages, en particulier, l'acide lactique et les acides gras (Acree *et al.*, 1968; Cork et Park, 1996; Enserink, 2002).

Différentes espèces de bactéries se rencontrent sur diverses régions du corps humain. L'oxydation des nutriments par la microflore de la peau résulte en la production d'eau et de CO_2. En général, l'oxydation incomplète produit d'autres volatiles excrétés, mais l'origine de ces molécules n'est connue que dans très peu de cas. Les êtres humains sont uniques par leur niveau élevé de triglycérides qui sont principalement transformés par les espèces du genre *Propionibacterium* en un large nombre d'acides gras libres à courte et longue chaine. Les espèces du genre *Corynebacterium* sont responsables de la modification des sécrétions apocrines (initialement inodores, incluant l'androstérone sulfate et la deshydroépiandostérone) en composés odorants (5-androst-16-en-3-one et des acides gras à chaine courte). *Brevibacterium epidermidis*, qui contribue à l'odeur âpre désagréable dégagée par les pieds de certains individus, est responsable, entre autre, de la production de méthanethiol et d'acide isovalérique. *Anopheles gambiae* répond positivement aux volatiles produits par une espèce bactérienne voisine, *Brevibacterium linens* (Braks *et al.*, 1999). Meijerink et Van Loon (1999) mirent en évidence que le fromage « *Limburger* », dont l'odeur est similaire à celle émanant des pieds, obtient son arôme par l'action microbienne de *B. linens* et qu'en présence de ce fromage, le taux de moustiques capturés dans les pièges olfactifs est multiplié par 2 ou 3. Des réponses similaires furent observées avec des fractions acides de ce fromage, des mélanges artificiels d'acides gras à chaine courte produits sur ces fromages, et des odeurs de pieds (De Jong et Knols, 1995, 1996; Knols *et al.*, 1997). De façon similaire, Schreck et James (1968) observèrent qu'*Aedes aegypti* était attiré par un courant d'air chargé en composés produits par une culture de bactéries, *Bacillus cereus,* également présentes sur la peau humaine. De nombreux auteurs ont montré que les sensilles

chémoréceptrices de divers insectes hématophages (moustiques, mouches des sables) répondaient à différents acides carboxyliques et à d'autres composés (alcool, cétones, etc…) (Knols *et al.*, 1997; Dougherty *et al.*, 1999; Meijerink et Van Loon, 1999; Park et Cork, 1999; Van der Broek et Den Otter, 1999; Costantini *et al.*, 2001). Des réponses électrophysiologiques furent obtenues chez *An. gambiae* par stimulation avec des acides gras à chaine courte (Cork et Park, 1996; Meijerink et Van Loon, 1999; Meijerink *et al.*, 2000). Ces divers composés ont été identifiés aussi bien dans les émanations de la peau humaine que chez divers vertébrés (e.g. chiens, renards, coyotes) (Preti *et al.*, 1976; Zeng *et al.*, 1991; Cork et Park, 1996; Dougherty *et al.*, 1999; Bernier *et al.*, 2000; Meijerink *et al.*, 2000).

En plus des molécules émanant de la peau, certains composés de la respiration des vertébrés comme l'H_2S (hydrogène sulfuré) ou certains aldéhydes (hexanal, nonanal, benzaldéhyde…) peuvent être attractifs, comme chez les tiques de l'espèce *Amblyomma variegatum* (Steullet et Guerin, 1992b, 1994). L'acétone, également un composé de la respiration humaine (Krotoszynski *et al.*, 1977), engendre une réponse comportementale chez la mouche *Stomoxis calcitrans* par une activité de vol dirigé vers la source émettrice (Warnes et Finlayson, 1985; Schofield *et al.*, 1997), ceci a été également observé chez la mouche tsé-tsé, *Glossina morsitans* (Bursell, 1984).

Des composés phénoliques présents dans l'urine de bovins ont également été identifiés comme composés attractifs chez différentes espèces de diptères hématophages, aussi bien en laboratoire qu'en milieu naturel (Hassanali *et al.*, 1986; Saini, 1986; Bursell *et al.*, 1988; Park et Cork, 1999; Van der Broek et Den Otter, 1999). L'ammoniac et l'urée font partie de ces composés attractifs et sont présents en grande quantité dans l'urine des hôtes, mais sont également des produits d'excrétion de la peau et de la respiration. L'urée présente à la surface de la peau est rapidement décomposée en ammonium par la microflore (Braks *et al.*, 1999). Pour sa part, l'ammoniac s'est révélé être une kairomone très importante chez les moustiques (Geier *et al.*, 1999b; Braks *et al.*, 2001).

L'un des plus importants composés olfactifs impliqués dans la recherche de l'hôte chez les hématophages est le dioxyde de carbone ou CO_2 (Lehane, 2005). L'haleine humaine contient un taux élevé de CO_2 (~ 45 000 ppm) en comparaison avec la valeur ambiante (~ 300 - 400 ppm). Du CO_2 est également produit par la peau des êtres humains, mais la quantité produite est relativement faible par rapport à la production par la respiration (en comparaison, cela représente 0,25 % de la production faite par les poumons (Frame *et al.*, 1972). Ce gaz est un puissant attractif et activateur pour la plupart des insectes hématophages. Les moustiques de l'espèce *Ae. aegypti* présentent un comportement de vol orienté vers un courant d'air enrichi d'une quantité de CO_2 de 500 ppm (Geier *et al.*, 1999a). Eiras et Jepson (1991)

démontrèrent que ce moustique augmente sa fréquence d'envol s'il est stimulé avec une concentration de 800 ppm de CO_2 et que son activité de vol est positivement corrélée avec la concentration présentée. Des observations similaires ont été faites au niveau comportemental chez la mouche *S. calcitrans* (Warnes et Finlayson, 1986; Schofield *et al.*, 1997) et chez le tique *A. variegatum* (Steullet et Guerin, 1992a). Cette attractivité du CO_2 a également été mise en évidence au niveau physiologique par une réponse des récepteurs antennaires de *Glossina palpalis* pour une stimulation des récepteurs sensoriels par plus de 300 ppm (Bogner, 1992) et chez *Ae. aegypti* pour 100 ppm (Kellogg, 1970). Gillies et Wilkes (1972) démontrèrent, chez les moustiques, que les odeurs émises par un hôte sont perçues à plus longue distance que le CO_2, suggérant leur importance dans l'orientation à longue distance. Ceci peut être expliqué par une différence de taux de dilution du CO_2 et des autres odeurs de l'hôte dans les courants d'air (Warnes et Finlayson, 1985 ; Barrozo et Lazzari, 2004a). Ainsi le taux de CO_2 retomberait à une valeur ambiante plus rapidement que les autres facteurs chimiques. Cependant, dans la plupart des cas, leur combinaison augmente considérablement la réponse comportementale d'orientation des insectes vers la source émettrice (Gillies, 1980), alors que certains facteurs chimiques présentés seuls, n'élicitent aucunes réponses ou des réponses très faibles. Par exemple, chez les moustiques, l'acide lactique engendre une réponse attractive s'il est présenté seul, cependant la réponse obtenue en présentant un mélange acide lactique/CO_2 est beaucoup plus importante (Eiras et Jepson, 1991; Steib *et al.*, 2001; Dekker *et al.*, 2002).

- Stimuli visuels

La vision est également importante dans l'activation et l'orientation de certains insectes hématophages. Cette modalité sensorielle est utilisée principalement chez les insectes diurnes vivant dans des habitats ouverts. Cela a été observé chez les mouches noires, espèces que l'on retrouve dans la savane ou dans des habitats ouverts. Ces mouches sont attirées par des pièges visuels en forme de silhouette humaine, même sans la présence de CO_2 ou de toute autre source d'odeur (Fredeen, 1961; Peschken et Thorsteinson, 1965). Il est probable que dans la plupart des cas, la vision ne soit pas utilisée seule dans la localisation d'un hôte, mais soit intégrée avec des informations perçues par d'autres systèmes sensoriels. L'insecte est initialement activé par les odeurs émises par l'hôte, puis utilise son odorat pour la localisation à distance. À proximité de l'hôte, un contact visuel peut alors être établi et l'information visuelle est alors utilisée pour les dernières phases d'orientation (Sutcliffe *et al.*, 1995). Cela explique l'augmentation de l'efficience des pièges où des stimuli visuels sont associés à des composés olfactifs chez la mouche tsé-tsé (en comparaison avec les mêmes pièges reposant

uniquement sur des stimuli visuels) (Politzar et Merot, 1984). Des estimations de la gamme d'efficacité visuelle des leurres sont disponibles pour certains insectes. Pour certaines espèces de moustiques, l'orientation visuelle vers des pièges fixes en contreplaqué (2,4 x 1,5 m) commence entre 5 et 20 m (Bidlingmayer et Hem, 1979). Chez les mouches noires, un piège en forme de silhouette de vache (1,1 m) devient visible à partir de 8m (Sutcliffe *et al.*, 1995). La mouche tsé-tsé répond à un écran en mouvement (1,3 x 1 m) à une distance de 50 m (Chapman, 1961) et à un troupeau de bétail en mouvement à partir de 183 m (Napier Bax, 1937). Théoriquement, il y a différents types d'information visuelle disponibles pour les insectes hématophages. La première série d'informations vient du contraste entre la cible et l'arrière plan, et de l'intensité de la lumière réfléchie par la cible. La seconde série d'information vient de la couleur de la cible, également par l'intensité et le contraste avec l'environnement. Le mouvement est également important dans la recherche de l'hôte. En plus de son importance chez la mouche tsé-tsé (Chapman, 1961), cela a été montré chez différentes espèces de moustiques (Sippel et Brown, 1953), mais l'évidence de son utilisation pour la localisation de l'hôte chez les tabanidés (Bracken *et al.*, 1962; Bracken et Thorsteinson, 1965; Browne et Bennett, 1980) et les simuliidés (Underhill, 1940; Thompson, 1976) n'est pas certaine.

- Stimuli thermique et hydrique

En addition à la vision et à l'olfaction, de nouveaux stimuli deviennent disponibles pour les insectes hématophages à mesure qu'ils s'approchent d'un hôte. Un des plus importants stimuli à courte distance est la chaleur (Lehane, 2005). Pour la plupart des espèces de moustiques et de mouches des sables, l'addition de chaleur augmente significativement la proportion d'insectes observés dans les pièges (Nigam et Ward, 1991; Kline et Lemire, 1995), mais très peu d'information est disponible sur la distance à laquelle la chaleur commence à être effective pour ces insectes. *Ae. aegypti* montre une réponse attractive à la chaleur d'un bras humain testé dans un olfactomètre (Eiras et Jepson, 1994). Les punaises de lit apparaissent au contraire moins sensibles, car elles s'orientent vers une source de chaleur de 37°C uniquement quand elle est placée à moins de 5 cm de distance (Marx, 1955; Overal et Wingate, 1976). La chaleur peut agir de différentes manières comme facteur signalant la présence d'un hôte. L'insecte peut répondre à la chaleur radiante émise par l'hôte, à des gradients de températures entre l'hôte et l'insecte (courants de convection) ou directement à la chaleur du corps de l'hôte une fois l'insecte en contact avec celui-ci (conduction thermique). Mais il est difficile de déterminer laquelle de ces voies de stimulation thermique est utilisée par l'insecte pour localiser son hôte. Des courants de convections, avec des différences

thermiques locales de 1°C ou plus, ont été observés jusqu'à 40 cm de distance d'un bras humain (Wright, 1968). *Ae. aegypti* semble utiliser les courants de convections pour s'orienter (Petersen et Brown, 1951). La puce du chat, *Ctenocephalides felis felis*, est attirée par des sources de chaleur avec un maximum de réponse pour des objets à 40°C, mais uniquement si ces objets sont en mouvement, créant ainsi des courants d'air chaud (Osbrink et Rust, 1985). Pourtant, le pouvoir attractif des pièges « colle-mouches » pour la mouche noire *Simulium venustum* (Fallis *et al.*, 1967) et pour les tabanidés (Bracken et Thorsteinson, 1965) n'est pas augmenté si les pièges sont associés à un stimulus chaleur. La chaleur peut également être utilisée pour obtenir des informations à propos de l'état de l'hôte. Le pou, *Pediculus humanus,* quitte son hôte lorsque celui-ci meurt ou est atteint d'une maladie le rendant très fébrile. Cet insecte répond aux changements de température de l'hôte, quittant celui-ci lorsqu'elle varie trop fortement. Il peut alors s'éloigner pour trouver un nouvel hôte en utilisant également la chaleur comme un facteur d'attraction et de localisation (Wigglesworth, 1941).

Un autre facteur pouvant être utilisé dans la localisation des hôtes est la vapeur d'eau. La plupart des études sur la perception de la vapeur d'eau par les insectes hématophages ont été des études électrophysiologiques ou morphologiques (Kellogg, 1970; Bernard, 1974; Altner et Loftus, 1985) plutôt que des études comportementales, c'est pourquoi le degré d'importance de la vapeur d'eau dans l'orientation à courte distance reste flou. Lorsque l'importance de la vapeur d'eau a été observée, c'est généralement en synergie avec un autre stimulus. *Ae. aegypti* montre un comportement d'orientation dirigée dans un courant d'air chaud. L'orientation vers la source émettrice de ce courant est accrue si l'humidité relative de l'air se situe entre 40 et 60 % (Bar-Zeev *et al.*, 1977; Eiras et Jepson, 1994). Des résultats similaires ont été observés chez les mouches des sables (Nigam et Ward, 1991). D'après Brown (1951), chez *Ae. aegypti*, l'humidité devient le facteur le plus attractif quand la température de l'air ambiant atteint certaines valeurs. Burgess (1959) suggéra que le comportement de recherche (*probing behaviour*) d'*Ae. aegypti* en réponse à la chaleur et à l'humidité dépend de la présence de l'hôte ou d'une augmentation artificielle de la concentration de CO_2 dans l'air.

MODULATION DU COMPORTEMENT DE RECHERCHE ALIMENTAIRE CHEZ LES INSECTES HEMATOPHAGES

Comme nous venons de le voir précédemment, la recherche alimentaire chez les insectes hématophages requière certaines capacités de détection de l'hôte (perception de signaux visuels, olfactifs, physiques ou mécaniques). Cependant, ce comportement peut être modulé par différents facteurs. Des facteurs internes (ou physiologiques), comme des horloges circadiennes, le cycle de mue, l'état nutritionnel ou encore l'état reproductif, ainsi que des facteurs externes comme les variations annuelles saisonnières de la photopériode ou d'autres conditions abiotiques de l'environnement, comme la température ou l'humidité relative peuvent intervenir dans cette modulation du comportement. Nous nous intéresserons ici uniquement à la modulation du comportement de recherche de l'hôte par des facteurs propres aux individus, des facteurs internes.

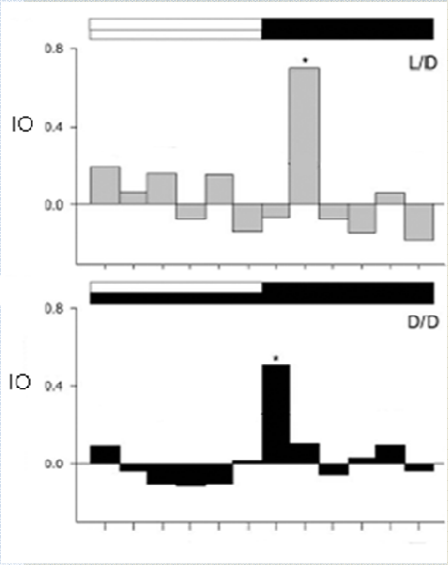


Figure 10 : Réponse journalière de larves de Triatoma infestans *en réponse à une stimulation de CO_2 et implication d'une horloge circadienne dans le contrôle de cette réponse. Les insectes ont été maintenus pendant 3 jours sous un cycle de lumière 12:12 (L/D) (représenté par la partie supérieur noire et blanche des barres horizontales) puis les 3 jours suivant : sous un cycle identique L/D (a) ou sous un cycle continu d'obscurité D/D (b) (représentés par la partie inférieure des barres horizontales). Les histogrammes représentent l'indice d'orientation des insectes (IO). Les astérisques indiquent une orientation préférentielle des insectes face au stimulus. L'indice d'orientation varie entre -1 (orientation à l'opposé du stimulus) et 1 (orientation en direction du stimulus) (d'après Barrozo et al. (2004)).*

- *Horloges internes et modulation du comportement de recherche de l'hôte.*

L'existence de rythmes circadiens, i.e. cycles de période spontanée d'à peu près 24h contrôlés par des oscillateurs internes, a été démontrée chez presque tous les types d'organismes. Un contrôle circadien de l'activité permet aux animaux de réaliser certains comportements, indépendamment des facteurs environnementaux, pour l'occupation de niches écologiques ou pour la coordination des activités entre individus ou entre espèces (Aschoff, 1989), notamment entre les ectoparasites et leurs hôtes. Ces rythmes endogènes permettent également aux individus d'ajuster et d'anticiper leur activité en relation avec celle de leurs prédateurs d'ainsi limiter les risques de prédation. Chez les insectes hématophages, ces rythmes circadiens ont été majoritairement observés pour l'activité locomotrice, comme chez les moustiques ou les mouches tsé-tsé (Taylor et Jones, 1969;

Jones *et al.*, 1972; Brady, 1972; Jones, 1976, 1982; Rowland, 1989; Pandian, 1994).

Les horloges circadiennes ne jouent pas seulement un rôle dans la régulation des comportements olfactifs, mais également dans le contrôle de la perception sensorielle des insectes (Krishnan *et al.*, 1999; Page et Koelling, 2003). Cependant, à ma connaissance, l'implication d'une réelle horloge circadienne (i.e. endogène) dans le rythme de réponse à un facteur chimique associé à la recherche d'hôte chez un insecte hématophage a été démontré uniquement chez *T. infestans* (Barrozo *et al.*, 2004) (figure 10). Les autres études concernant les rythmes de réponse aux odeurs de l'hôte chez les insectes hématophages se sont focalisées uniquement sur les rythmes journaliers de réponse et non sur l'implication possible d'horloges internes permettant l'expression de ces rythmes. Par exemple, des rythmes journaliers de sensibilité et d'orientation envers des facteurs associés aux hôtes ont été rapportés chez les mouches tsé-tsé (Brady, 1975; Van der Goes van Naters *et al.*, 1998). Une importante modulation des systèmes de perception, en relation avec les comportements de l'hôte et ses rythmes d'activité, permet d'augmenter la probabilité de rentrer en contact avec des signaux émanant de l'hôte (Hargrove et Brady, 1992). En revanche, l'implication d'horloges contrôlant des rythmes de réponse olfactive a été observée chez d'autres insectes non hématophages, comme des papillons de nuit, des blattes ou certaines mouches. Ces insectes montrent un contrôle endogène de leur rythme journalier de réponse aux phéromones (Baker et Cardé, 1979; Castrovillo et Cardé, 1979; Sybchev *et al.*, 1986; Liang et Schal, 1990; Pivnick, 1993; Zhukovskaya, 1995; Linn *et al.*, 1996).

- *Cycle de mue et modulation du comportement de recherche de l'hôte.*

L'influence du cycle de mue sur le comportement de recherche de l'hôte chez les insectes hématophages a été très peu étudiée et uniquement chez les moustiques. Après l'émergence, les femelles moustiques de l'espèce *Ae. aegypti* ne répondent pas immédiatement aux signaux externes engendrant habituellement une orientation positive vers une plante (source de nectar) ou un hôte (source de sang) (Seaton et Lumsden, 1941; Bishop et Gilchrist, 1946; Laarman, 1955; Davis, 1984a). Pendant cette période, ces insectes initient leur comportement de recherche de partenaires sexuels pour l'accouplement, et développent leurs follicules ovariens. Chez cette espèce, les récepteurs antennaires sensibles à l'acide lactique, facteur attractif émanant des hôtes vertébrés, nécessitent un processus de maturation qui requière environ 3 jours à 28°C, c'est à dire qu'aucune activité sensorielle spontanée n'est enregistrée dans ces récepteurs durant les 3 jours suivants l'émergence (Davis, 1984a). Des résultats similaires ont été observés chez *Aedes atropalpus* avec une inhibition de la réponse

attractive aux facteurs de l'hôte pendant plusieurs jours. Cependant, à la différence d'*Ae. aegypti*, les récepteurs sensoriels à l'acide lactique chez *Ae. atropalpus* ont un taux de développement plus rapide (12h), et l'absence de réponse attractive ne peut pas être attribuée au délai de développement du système sensoriel périphérique (Bowen *et al.*, 1994a, 1994b). Pendant cette période d'inhibition, l'hormone juvénile (JH) est synthétisée par les corps allates afin de permettre une maturation folliculaire dans les ovaires (Gwadz et Spielman, 1973) et de rendre compétents d'autres tissus pour la formation de vitellogénines (Flanagan et Hagedorn, 1977). Chez certaines espèces du genre *Culex*, *Cx. quinquifasciatus* et *Cx. pipiens*, l'initiation du comportement de piqûre est dépendante de la présence de JH synthétisée par les corps allates immédiatement après l'émergence (Meola et Petralia, 1980). Ceci fut également observé chez *Anopheles freeboni* (Case *et al.*, 1977). Cependant, chez *Ae. aegypti*, ce développement de la réponse aux facteurs attractifs de l'hôte est concomitant, mais indépendant de la présence d'hormone juvénile (JH) (Bowen et Davis, 1989). Les raisons des différences entre les genres *Culex* et *Aedes* ne sont pour l'instant pas connues.

- *Etat nutritif / Etat reproductif et modulation du comportement de recherche de l'hôte.*

L'influence de l'état nutritif sur le comportement de recherche alimentaire chez les insectes hématophages a été très largement étudiée chez les moustiques femelles, et ces études ont également porté sur l'interaction entre état nutritif et état reproductif. Chez les insectes strictement hématophages, le repas sanguin est nécessaire et indissociable de l'ovogenèse, les femelles se nourrissant de sang dans le but d'acquérir des protéines à allouer au développement des œufs. Néanmoins, la quantité de sang ingéré serait plus limitante que la qualité du repas sur la reproduction (Kelly, 2001). En effet, la composition du repas sanguin en acide aminé n'affecte la production d'œufs que de 20 % (Chang et Judson, 1977), mais la probabilité d'obtenir un repas sanguin et la quantité de sang obtenu lors de ce repas varie fortement selon l'hôte attaqué (comportement de défense, etc...). Cependant, il existe des espèces d'insectes hématophages se nourrissant également de nectars. Le régime alimentaire de la mouche *Hydrotaea irritans* est composé de sang et de carbohydrates. Berlyn (1979) a montré chez cette espèce que les femelles ne produisent pas d'œufs matures si elles ne se nourrissent que de carbohydrates. Cet auteur a également observé que le repas sanguin est pris uniquement dans un contexte reproductif. Les fleurs de *Cirsium palustre* (chardons), sur lesquels ces mouches se nourrissent de nectar, et le miellat d'Aphides ne servent que de sources naturelles de carbohydrates permettant la maintenance de ces insectes.

Le repas sanguin n'a pas un rôle uniquement dans la procuration de nutriments à la femelle, mais il est aussi l'élément déclencheur des processus endocriniens de la reproduction (Klowden, 1997). D'après Klowden (1997), ce contrôle endocrinien de la fonction ovarienne pourrait être compris comme un système de sécurité. En effet, cela permettrait à la femelle d'éviter d'utiliser toutes ses ressources à des moments où la reproduction peut ne pas être appropriée. Chez les moustiques, après l'initiation du cycle gonotrophique par le repas sanguin, le comportement de recherche de l'hôte est inhibé jusqu'à, selon les espèces, la maturation des œufs ou l'oviposition (Klowden et Briegel, 1994) (figure 11 et 12). L'inhibition est le résultat de deux mécanismes, le premier transmis par voie nerveuse et le second reposant sur un facteur humoral. La distension de l'abdomen due à l'ingestion de sang entraîne dans un premier temps l'activation de mécanorécepteurs abdominaux (*distention-induced inhibition*). Il existe un volume seuil au delà duquel l'inhibition est déclenchée (Klowden et Lea, 1978), si le volume de sang ingéré est insuffisant, la recherche d'un nouvel hôte se met en place afin d'afin d'acquérir un nouveau repas. L'inhibition peut également être initiée lorsque de l'air ou du liquide physiologique, au delà du volume seuil, sont introduit dans le tube digestif via l'anus (Klowden, 1990). Ce comportement de recherche de l'hôte peut également être manipulé en réduisant sélectivement la distension des segments antérieurs ou postérieurs de l'abdomen (Klowden et Lea, 1979a). Dans un second temps, si le repas sanguin est suffisant pour initier la maturation des œufs, un mécanisme humoral se met en place (*oocyte-induced inhibition*) faisant intervenir une interaction complexe entre les ovaires, le corps gras et des cellules neurosécrétrices (Klowden et Lea, 1979b) (figure 13). Chez *Ae. aegypti*, dans les 12 heures suivant l'alimentation (*pbm : post blood-meal*), un facteur initiateur est libéré par les ovaires (Klowden, 1981). Ce facteur va activer le corps gras qui, aux environs de la 30ème heure *pbm*, va libérer, dans l'hémolymphe, un facteur humoral inhibiteur

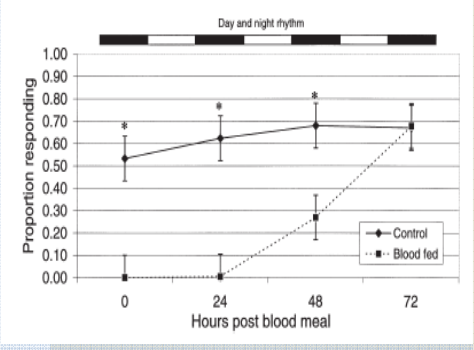


Figure 11 : Comportement de femelles Anopheles gambiae *(alimentées et non alimentées) en réponse à des émanations d'un bras humain après l'alimentation (d'après Takken et al. (2001)).*

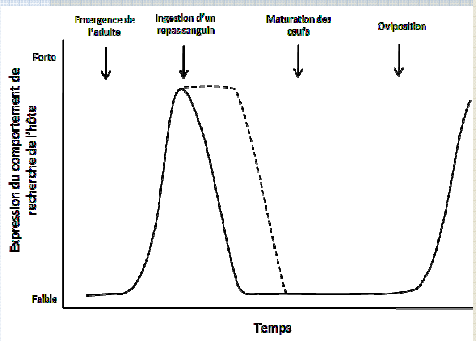
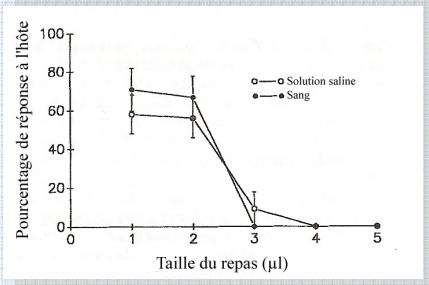


Figure 12 : Expression du comportement de recherche de l'hôte chez Aedes aegypti *depuis l'émergence de l'adulte jusqu'à l'oviposition. Immédiatement après l'émergence, une période de recherche de l'hôte est exprimée par les femelles. Après un large repas sanguin (courbe en trait plein), le comportement de recherche de l'hôte est inhibé pendant la période de maturation des œufs et ce jusqu'à l'oviposition. A la suite d'un faible repas sanguin (en dessous du seuil de distension inhibiteur), le comportement de recherche de l'hôte se maintient en attendant un deuxième repas (courbe en pointillés) (d'après Klowden (1995)).*

responsable de l'inhibition du comportement de recherche de l'hôte (Klowden *et al.*, 1987). L'inhibition comportementale est maximale entre 36 et 72 heures *pbm* (Klowden et Lea, 1979a). Pour Klowden (1981), le facteur inhibiteur ne serait libéré que lorsque le facteur ovarien initiateur aurait atteint une quantité seuil critique. L'inhibiteur du comportement agit sur les récepteurs périphériques impliqués dans la détection de l'hôte, en réduisant la sensibilité des neurones associés à la réponse à l'acide lactique, l'un des principaux signaux de l'hôte (Klowden et Lea, 1979b; Davis, 1984b; Klowden *et al.*, 1987; Lehane, 2005). Le facteur ovarien initiateur et le facteur inhibiteur produit par le corps gras n'ont pas encore été identifiés chez toutes les espèces de moustiques (Klowden, 1990; Takken *et al.*, 2001). Chez *Ae. aegypti*, Brown *et al.* (1994) ont mis en évidence le rôle d'un neuropeptide (*Aedes aegypti Head Peptide I*), synthétisé par les cellules neurosécrétrices du cerveau (de la *pars intercerebralis*) ou de l'intestin moyen, dans la régulation du comportement de recherche de l'hôte.

Chez *Ae. aegypti*, l'inhibition du comportement de recherche de l'hôte est levée par un signal nerveux associé à l'oviposition (Klowden, 1990). Cependant, l'oviposition, en soi, n'est pas suffisante pour lever cette inhibition. Le comportement de recherche de l'hôte est rétabli, chez cette espèce, lorsque les ovaires sont vides ou contiennent moins de deux ovocytes (Klowden, 1981). En revanche chez *An. gambiae*, le comportement de recherche de l'hôte est inhibé uniquement jusqu'à ce que les ovocytes aient atteint le cinquième stade de maturation (Takken *et al.*, 2001).

Pour Balashov (1984), le phénomène de rythme gonotrophique signifie, chez la plupart des hématophages libres (i.e. qui ne sont pas en association permanente avec l'hôte), une coordination entre la digestion du sang et le développement ovarien. Lors d'un repas sanguin, cela se traduit par la consommation d'une quantité de sang minimale et suffisante pour assurer le développement d'un lot d'œufs. Une fois le premier



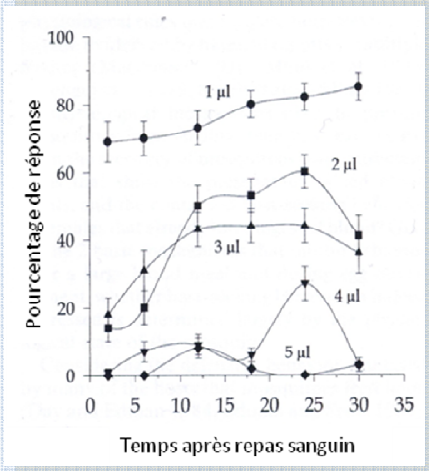


Figure 13 : Comportement de recherche de l'hôte chez le moustique Aedes aegypti *en fonction du volume de sang ou de solution saline ingéré face à un bras humain (a) et Comportement de recherche de l'hôte en fonction de la taille du repas et du temps après alimentation face à un bras humain (b) (d'après Klowden et Lea (1979b) et Klowden (1994)).*

repas sanguin ingéré et la maturation des œufs initiée, un second repas sanguin au cours du cycle gonotrophique n'entraînerait pas nécessairement une hausse de la fécondité (Lea *et al.*, 1978). Au contraire, s'exposer à un hôte au comportement défensif peut nuire à la survie de la femelle (Edman et Scott, 1987). Les individus qui prennent des risques n'apportant aucun bénéfice pour la reproduction devraient être contre sélectionnés. Cependant, des données de terrains de Klowden et Briegel (1994) indiquent que chez certaines espèces de moustiques (e.g. *An. gambiae*), plusieurs repas sanguins ont lieu au cours d'un même cycle gonotrophique. Des explications sont données par Klowden (1990) qui explique que le comportement défensif des hôtes pourrait empêcher les insectes de prélever suffisamment de sang pour déclencher l'inhibition due à la distension de l'abdomen. De plus, la capacité de distension et le taux de réduction de la distension varient avec l'âge et la taille du moustique chez *Ae. aegypti* et *An. gambiae* (Klowden et Lea, 1980; Takken *et al.*, 1998).

Du fait de leur mode d'alimentation particulier, les insectes hématophages sont contraints de développer des adaptations particulières. Pour ces insectes, la reproduction est dépendante de l'alimentation, et l'alimentation est en retour, influencée par les processus de reproduction. L'acquisition des ressources nutritives, nécessaires à la survie est en effet, chez la majorité des espèces, l'événement déclencheur des processus de reproduction, et nécessite une adaptation aux modes de vie des espèces d'hôtes. Il existe donc un compromis entre ces deux traits d'histoire de vie que sont la survie et la reproduction. Produire des œufs et s'accoupler implique de s'alimenter et donc s'exposer aux hôtes vertébrés, qui jouent aussi un rôle de prédateur. Des mécanismes physiologiques, hormonaux et comportementaux ont été sélectionnés, inhibant le comportement de recherche de l'hôte à des moments de la vie de l'insecte où il ne serait pas nécessaire de s'exposer aux hôtes.

Après avoir décrit la recherche de l'hôte chez les insectes hématophages en général, et comment ce comportement peut être modulé par des facteurs physiologiques, facteurs propres des individus, nous nous intéressons plus particulièrement aux triatomines, insectes vecteurs du parasite responsable de la maladie de Chagas.

Les triatomines sont des insectes grégaires nocturnes qui montrent une modulation journalière de leur comportement (Lorenzo et Lazzari, 1998). Ces insectes quittent leurs refuges (anfractuosités abritées de la lumière) durant la première moitié de la nuit à la recherche d'un hôte pour un repas sanguin (Lent et Wygodzinsky, 1979; Núñez, 1987; Schofield, 1994; Rose et Boeckh, 1996a, 1996b, 1998) et y reviennent à la fin de la nuit pour passer la journée à l'abri de toute prédation (Lazzari, 1992; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo, 1997). Durant la nuit les triatomines se dédient majoritairement à la recherche alimentaire, puis à l'oviposition et à la localisation de refuges (Núñez, 1987, Lorenzo et Lazzari, 1998). Lazzari montra en 1992, que le rythme journalier d'activité spontanée de *T. infestans* était bimodal et sous le contrôle de deux horloges internes indépendantes. Le premier pic d'activité se situe au début de la nuit et correspond au moment où les insectes quittent leurs refuges à la recherche de nourriture. Le deuxième pic d'activité se situe à la fin de la nuit au moment où les insectes reviennent à l'intérieur des refuges à la recherche de protection. Ceci fut également rapporté chez *R. prolixus* avec un léger décalage du deuxième pic d'activité qui apparaît à l'aube (transition jour/nuit) (Constantinou, 1979). De nombreuses études ont été menées sur les facteurs impliqués dans le comportement de recherche de refuges et le comportement de recherche de l'hôte chez ces insectes.

Indices sensoriels associés à la recherche de refuges chez les triatomines

Les fèces sont particulièrement importantes pour le fonctionnement des refuges, elles agissent comme repères chimiques de l'entrée des refuges (Lorenzo et Lazzari, 1996) et comme phéromone d'agrégation (Schofield et Patterson, 1977; Ondarza *et al.*, 1986; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994), avec un effet interspécifique chez certaines espèces (Lorenzo Figueiras et Lazzari, 1998b; Cruz-López *et al.*, 2001; Lorenzo Figueiras et Lazzari, 2002; Vitta *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2002). Le dépôt des fèces est réalisé quotidiennement par les insectes à l'extérieur des refuges, autour des entrées. La nature et l'origine des substances attractives présentes dans les fèces ne sont pas connues avec précision. Cruz Lopez et Morgan (1995) ont identifié différents composés dans les fèces de *T. infestans* et *T. mazzottii*, mais les équivalents synthétiques de ces composés n'ont pas eu d'effet attractif en olfactomètre. Les fèces fraichement déposées ont un caractère répulsif, qu'elles perdent au bout de 3h, devenant attractives pour une dizaine de jours. Passé ce délai, elles peuvent redevenir attractives par ré-humidification (Lorenzo Figueiras et Lazzari, 2000). Cette dernière propriété a été associée au

dégagement d'ammoniac qui se produit alors. L'attraction vers des sources ammoniaquées - comme l'urine- existe chez différents hématophages, où elle a surtout été observée dans un contexte de recherche d'hôte (Taneja et Guerin, 1997; Geier *et al.*, 1999b). De plus, un autre facteur intervenant dans la sélection des refuges a été identifié. Il s'agit d'empreintes chimiques issues de dépôts cuticulaires (*footprints*) déposés par les insectes sur le substrat à l'intérieur des refuges. Ce facteur élicite l'arrêt des insectes et l'agrégation de ceux-ci, mais n'attire pas les insectes à distance (Lorenzo Figueiras et Lazzari, 1998a; Vitta *et al.*, 2002). Pour la localisation des refuges à longue distance, les triatomines vont utiliser une phéromone d'agrégation émise par les fèces déposées autour des refuges. Les empreintes chimiques de contact déposées à l'intérieur des refuges induiront une agrégation des insectes uniquement à l'intérieur de ceux-ci. En plus des signaux chimiques de communication, d'autres facteurs ambiants, comme la température et l'humidité relative à l'intérieur des refuges, jouent un rôle important dans leur sélection (Lorenzo et Lazzari, 1999). Ces facteurs sont également utilisés par les triatomines dans le choix de sites d'oviposition (Lazzari, 1991; Roca et Lazzari, 1994).

› *Indices sensoriels associés à la recherche de l'hôte chez les triatomines*

Wigglesworth et Gillet (1934) étudièrent l'attraction vers l'hôte à courte distance chez *R. prolixus.* Ils montrèrent que ces insectes étaient attirés par un tube de verre chaud (34 à 39°C) ainsi que par un tube à température ambiante uniquement s'il était recouvert d'une peau de souris fraîchement morte. Wiesinger (1956) investigua le rôle du dioxyde de carbone durant la phase d'activation et d'orientation vers l'hôte chez *T. infestans*. Elle montra qu'un mélange chaud de CO_2 et d'air (36 à 40°C) était plus attractif pour les punaises qu'uniquement de l'air chaud. Núñez (1982) découvrit que l'espèce *R. prolixus* était attirée par des odeurs émises par un avant-bras humain, par un hamster ou simplement par du CO_2. L'attractivité de l'hôte chez *T. infestans* fut également investiguée par MacCord *et al*. (1986) en utilisant un olfactomètre. Les résultats montrèrent que les pigeons étaient plus attractifs que les souris. D'après les protocoles expérimentaux utilisés pour de telles expériences, il est difficile de discriminer entre les différents facteurs pouvant éliciter la réponse de ces insectes. Par exemple, le rôle de la chaleur a rarement pu être distingué des autres facteurs testés.

-Stimuli thermique et hydrique

Il fut montré, par la suite, que la chaleur radiante (radiations infrarouges émises pas un hôte) est un facteur important dans le processus de recherche de l'hôte à courte distance chez *T. infestans* (Lazzari et Núnez, 1989; Schmitz *et al.*, 2000). *T. infestans* montre un sens

thermique hautement développé (Lazzari, 1990; Flores et Lazzari, 1996; Flores, 2001) puisqu'elle est capable de percevoir la chaleur émanant d'un hôte et de reconnaître à distance une source potentielle d'alimentation par sa température (Flores, 2001). Cette espèce est considérée comme ayant la plus grande sensibilité thermique connue parmi les animaux (Lazzari, 1990). Lorsque les triatomines arrivent à proximité d'une source de chaleur, ils étendent leur proboscis. Ce réflexe rostral, qui ne se produit que dans le contexte de l'alimentation, i.e. immédiatement avant que l'insecte ne pique son hôte (Lazzari, 1990), ne requière pas un contact direct avec une surface chaude (Wigglesworth et Gillett, 1934).

Le rôle de l'humidité relative a été établi dans la distribution spatiale de *T. infestans* et d'autres triatomines (Roca et Lazzari, 1994; Guarneri *et al.*, 2002). Bien qu'étudié auparavant (Wigglesworth et Gillett, 1934; Wiesinger, 1956; Núñez, 1982), le rôle de la vapeur d'eau dans le comportement de recherche de l'hôte n'a été précisément confirmé que par Barrozo *et al.* en 2003. Quand les insectes sont confrontés à deux sources de température identique, l'une étant humide et l'autre sèche, l'intensité de la réponse attractive des insectes dépend de la quantité d'eau émanant de la source. De plus, *T. infestans* est capable de localiser et de s'orienter vers une source humide à température ambiante (24°C), ce qui n'est pas observé pour une source sèche ; ceci n'étant observable qu'à une faible distance de la source (5cm) (Barrozo *et al.*, 2003). La structure et la fonction des thermo- et hygrorécepteurs présents sur les antennes de ces insectes ont été décrites par Bernard (1974) et McIver et Siemicki (1985), et sont similaires à celles des autres insectes.

- Stimuli chimiques

Certaines expériences ont démontré que, testés seuls, certains facteurs chimiques pouvaient être importants durant le comportement de recherche de l'hôte chez les triatomines. Taneja et Guerin (1995) étudièrent, chez des adultes de *T. infestans* et *R. prolixus*, la réponse comportementale à différentes odeurs : souris, urine de lapin ou CO_2, en utilisant une servosphère[5]. Les odeurs étaient proposées dans un courant d'air sous des conditions contrôlées, en excluant toutes autres modalités sensorielles. *T. infestans* et *R. prolixus* montrèrent une forte attraction pour les 3 odeurs testées. Néanmoins, une réponse attractive plus forte fut observée pour des odeurs de souris que pour uniquement du CO_2. Cela suggère que des molécules odorantes émanant des souris, autres que le CO_2, jouent également un rôle dans l'attraction des punaises vers l'hôte, et que l'interaction de ces composés engendre une réponse plus forte qu'un composé unique. Il fut également mis en évidence que l'ammoniac, un composé présent dans l'haleine, l'urine, et les sécrétions de la flore microbienne de la peau

[5] Servospère : compensateur de locomotion motorisé.

des vertébrés, était aussi un facteur attractif pour les triatomines (Taneja et Guerin, 1997; Otalora-Luna *et al.*, 2004). Rose et Boeckh (1996a) rapportèrent que des larves de stade 2 de *T. infestans* étaient attirées par des extraits de « chaussettes déjà portées », ceci rappelant la réponse de certains moustiques *Anopheles* à l'odeur de pieds humains (Takken et Knols, 1999), le facteur attractif présent dans ces « extraits de chaussettes » n'a cependant pas été identifié. Par ailleurs, il a été montré que l'acide lactique (composé produit par la flore microbienne de la peau des mammifères et attractif chez les moustiques) agit en tant qu'attractif pour les triatomines uniquement s'il est associé au CO_2 ou à certains acides gras (Barrozo et Lazzari, 2004a, 2004b). Des expérimentations en conditions semi-naturelles suggèrent que l'haleine humaine joue un rôle majeur dans l'activation et l'attraction de *T. infestans*, tandis que les odeurs émises par le reste du corps humain sont d'importance moindre (Rose et Boeckh, 1996b). La réponse sensorielle aux odeurs de vertébrés chez les triatomines a été analysée par le biais de techniques d'électroantennogrammes (EAG) et d'enregistrements cellulaires (*SCR : single-cell recording*). Mayer (1968) montra que certains composés de l'haleine humaine, comme le méthanol, le méthane, le furane et la pyridine, élicitaient des réponses électrophysiologiques de l'antenne de *T. infestans*, mais plus faibles que l'haleine elle-même. Bernard (1974) découvrit que les sensilles sur les antennes de *T. infestans* répondaient à des odeurs complexes (e.g. sueur de l'hôte) aussi bien qu'à des composés simples comme l'acide lactique et l'acide butyrique. Guerenstein et Guerin (2001) obtinrent des résultats similaires pour différents composés émanant de divers vertébrés (acide isobutyrique, heptanal, octanal, nonanal) avec une réponse aussi bien au niveau physiologique qu'au niveau comportemental.

Comme décrit précédemment, de nombreuses études ont été menées sur la reconnaissance de l'hôte chez les triatomines, particulièrement sur la détermination des facteurs attractifs émanant des hôtes, comme le dioxyde de carbone, des acides gras ou encore de la chaleur et de la vapeur d'eau. Cependant, la réponse comportementale d'attraction vers l'hôte est la résultante d'une interaction entre ces signaux sensoriels externes de l'environnement et les facteurs propres des individus, des facteurs endogènes ou physiologiques. Une seule étude, chez *T. infestans*, a mesuré l'influence d'un facteur endogène (une horloge circadienne) pouvant contrôler la réponse comportementale à un facteur de l'hôte (CO_2) (Barrozo *et al.*, 2004). Le principal objectif de cette thèse sera alors de caractériser les possibles facteurs endogènes capables de modifier le comportement de recherche de l'hôte. Le modèle biologique sur lequel nous avons travaillé est *Rhodnius prolixus*. La physiologie de cet insecte, bien connue depuis les travaux de Wigglesworth et de ses collègues dans les années 30, en fait un bon modèle expérimental. Il est également important d'obtenir une meilleure compréhension de la biologie de ces vecteurs afin d'apporter de nouvelles données utilisables en lutte vectorielle. Les approches comportementales et physiologiques de cette thèse permettent d'identifier et de quantifier avec précision quels sont les facteurs importants permettant de moduler cette recherche d'hôte et indirectement la possibilité de transmettre le pathogène car le comportement alimentaire des punaises est une composante biologique avec un rôle clef dans la transmission du parasite.

Le **chapitre 1** s'intéresse principalement à comment la réponse comportementale aux odeurs de l'hôte et d'autres est modulée au cours de la journée. Il s'agit d'une question chronobiologique d'actualité au-delà de l'intérêt pour la maladie de Chagas. Différentes odeurs peuvent être associées à différents comportements alloués dans des fenêtres temporelles différentes. Il sera plus adaptatif pour l'insecte de moduler différentiellement sa sensibilité à chaque odeur selon le contexte comportemental, quand ces odeurs sont biologiquement importantes. Notre question est donc la suivante : la réponse comportementale de *R. prolixus* vis à vis de signaux olfactifs différents (CO_2 et phéromone d'agrégation) associés à deux comportements différents (recherche d'hôte et recherche de refuges) à deux moments différents de la journée (début de la nuit et fin de la nuit), change-t-elle de manière spécifique ou générale ? Et cette sensibilité est-elle contrôlée de manière endogène par des horloges internes ?

Les chapitres 2 et 3 expliquent comment le comportement de recherche de l'hôte peut être modulé par l'état physiologique des individus. Le **chapitre 2** explique quelle est

l'influence du cycle de mue sur le comportement de recherche de l'hôte, et comment se développe ce comportement après l'émergence. Notre problématique vise à expliquer d'un point de vue comportemental comment la réponse d'attraction à deux facteurs associés à la recherche alimentaire (le CO_2 et la chaleur) est modulée par le cycle de mue de l'insecte. Le **chapitre 3** explique l'influence de l'état nutritif sur la recherche de l'hôte. Un seul repas sanguin étant suffisant et nécessaire à ces insectes pour passer au stade suivant, nous nous sommes alors intéressés au comportement de recherche alimentaire après un repas à réplétion. Comment les insectes réagissent à différents stimuli de l'hôte (olfactifs et thermosensoriels) si l'acquisition d'un nouveau repas sanguin, alors qu'il n'est pas nécessaire, engendrerait un risque de prédation important et inutile ? Ces expérimentations ont porté sur des larves afin d'étudier uniquement l'effet de l'état nutritif, mais également sur des adultes afin d'étudier le compromis alimentation/reproduction.

L'intégration de tous ces résultats permettra de mieux comprendre un aspect fondamental de la transmission des parasites, car ils permettront de dévoiler les facteurs endogènes déterminants de la fréquence d'alimentation de ces insectes. L'ensemble de nos résultats sera alors discuté en intégrant tous les facteurs modulant le comportement de recherche de l'hôte chez les triatomines et les insectes hématophages en général, ainsi que l'impact que cela peut avoir sur la transmission des pathogènes.

CHAPITRE 1

TEMPORAL MODULATION AND ADAPTIVE CONTROL OF THE BEHAVIOURAL RESPONSE TO ODOURS IN *RHODNIUS PROLIXUS*

Aurélie Bodin, Romina B. Barrozo, Louise Couton & Claudio R. Lazzari

Journal of Insect Physiology, sous presse (DOI:10.1016/j.jinsphys.2008.07.004)

ABSTRACT

It has been demonstrated in several insect species that a circadian clock makes the whole of antennal chemoreceptors more sensitive during a particular temporal window every day. This assessment raises the question about how insects exhibiting bimodal activity handle their sensitivity to odours which are relevant at different moments of the day. To shed some light on this problem, we studied in *Rhodnius prolixu*s the daily dynamics of their responsiveness to CO_2 (host-associated cue) and aggregation cues (refuge-associated), which are relevant at dusk and dawn, respectively. We analysed: 1) whether a temporal modulation of the responsiveness to odours does exist in *R. prolixus*, 2) if this modulation is a general one or it is specific for each type of volatile, and 3) if it is controlled by exogenous or endogenous mechanisms. We found that the responsiveness to CO_2 only occurs at dusk and that to assembling odours is restricted to dawn. Experiments under free-running conditions revealed that only the responsiveness to CO_2 is controlled by a circadian clock, but not that to assembling signals. Thus, by combining endogenous and exogenous mechanisms, sensitivities to different odours are adjusted according to their associated behavioural context and moment of the day.

Key words: olfaction, CO_2, aggregation pheromone, chronobiology.

INTRODUCTION

In nature, animals are continuously exposed to a variety of physical and chemical cues perceived by different sensory systems (olfactory, visual, etc.). Many of these cues play a relevant role in animals' survival, helping them to find food, mates, refuges and other resources, to avoid predators, and also mediating communication with con-specifics. In particular, the detection of odours represents a crucial task for animals, provided the diversity, dispersion ability and informational value of volatile molecules. In many cases the presence of certain olfactory cues is limited to a certain time of the day. For instance, female moths release sexual pheromones at particular temporal windows every day, during which males become active (Baker and Cardé, 1979). In other cases, odours can be more or less continuously present, but the response occurs during a given daytime, as in the case of mosquitoes, which search for food when their hosts are resting (Brady and Crump, 1978).

Daily rhythms of olfactory responses have been repeatedly reported at both, the sensory and the behavioural levels (see Saunders *et al.*, 2002). In moths, for instance, numerous examples from studies on female release and male behavioural response to the pheromone indicate that the timing of this behaviour is governed by a circadian mechanism (Baker and Cardé, 1979; Cardé and Webster, 1981; Castrovillo and Cardé, 1979; Haynes and Birch, 1984; Linn *et al.*, 1996; Rosén *et al.*, 2003). In the cockroach, *Periplaneta americana*, males maintained in a light/dark cycle show a daily rhythm in responsiveness to the female sex pheromone with a peak of sensitivity during the early night hours (Hawkins and Rust, 1977; Zhukovskaya, 1995). Daily rhythms of behavioural response to different sensory stimuli have also been reported in tsetse flies. When stimulated with host-associated odours, flies show a daily bimodal pattern of responsiveness, with peaks at dawn and dusk (Brady, 1975). Furthermore, the chemoreceptors located on the antennae of *Glossina morsitans* and *G. fuscipes* seem to respond to host-related stimuli with a daily rhythm in synchrony with much of its behavioural repertoire (Van der Goes van Naters *et al.*, 1998). In another blood-sucking insect, the bug *Triatoma infestans*, it has been shown that the rhythm of behavioural responsiveness to host odours is under the control of an endogenous circadian clock (Barrozo *et al.*, 2004). Rhythms of sensory sensitivity have been also well established in *Drosophila melanogaster* (Krishnan *et al.*, 1999) and in *Leucophaea maderae* (Page and Koelling, 2003). In both species, a general modulation of chemosensitivity has been postulated, i.e., the animal's sensitivity does not depend on odour identity. Paradoxically, in both cases, maximal

sensitivity to odours does not occur at the time during which insects are behaviourally active (i.e., when a given odour becomes biologically relevant), but during their resting periods.

These findings raise some relevant chronobiological questions about how insects, many of which exhibit different discrete activity periods (i.e., bimodal activity), modulate their responsiveness to different odours which are relevant at different moments of the day. The first question is whether or not the behavioural responsiveness to odours is modulated. Second, if so, is it maximal during just one or both activity periods? Third, if different odours are associated to different activity periods, are specific sensitivities modulated together or selectively? Finally, if modulation occurs, is it controlled by an endogenous mechanism or is it under the direct influence of exogenous mechanisms?

Trying to shed some light on these questions, we analysed the chronobiological basis of the responsiveness to odours in a blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). Our choice lies on several biological characteristics of these insects, which make them particularly adequate for this kind of study. Triatomine insects exhibit a marked circadian organisation of many activities, *e.g.* locomotor activity, egg hatching, ecdysis, oviposition, thermopreference, visual sensitivity (Ampleford and Steel, 1982; Constantinou, 1984; Lazzari, 1991, 1992; Minoli and Lazzari, 2003; Reisenman *et al.*, 1998, 2002). These different physiological and behavioural processes take place at either one or two temporal windows, one at the beginning and the other at the end of the scotophase. They exhibit a maximal motivation to feed at dusk (Lorenzo and Lazzari, 1998), and during this time they left their shelters and seek for a blood meal guided by carbon dioxide, a main olfactory cue in host searching (Barrozo *et al.*, 2004). At dawn, the bugs return to their shelters using the aggregation pheromone present in their excrements as chemical landmarks to guide them back to refuges (Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994). For this, they deposit faecal drops at the entrance of their shelters (Lorenzo and Lazzari, 1996).

Given the bimodal activity pattern and the use of different olfactory signals guiding specific behaviours at different moments of the day (i.e. host finding at dusk and refuge search at dawn), triatomine insects constitute an appropriate model to analyse how olfactory sensitivities are organised in time and how are they controlled. To investigate these questions, we analysed the orientation response of *R. prolixus* to carbon dioxide and to the faeces, the source of the aggregation pheromone during different moments of the day under both, temporally synchronized and free-running conditions.

MATERIAL AND METHODS

Insects

Fifth-instar larvae of *R. prolixus* were used throughout the experiments. They were reared in our laboratory at 27°C, 50-70% RH, and maintained under an artificial 12/12h light/dark illumination regime. Insects were fed weekly with sheep heparinised blood, using an artificial feeder (Núñez and Lazzari, 1990). After their ecdysis to the fifth-instar, insects were starved for 20-30 days and then used for the experiments.

Illumination regimes and recording times

Bugs were entrained for 3 days in a 12:12 L/D regime and then kept another 3 days either under the same L/D regime or in constant darkness (D/D). The seventh day, the orientation response of *R. prolixus* to CO_2 (host-related odour) or to the aggregation pheromone was tested at different times (see below).

The behaviour of bugs was studied in different temporal windows along the day. The light onset was considered as Zt (*Zeitgeber* time)= 00:00h. In L/D conditions, four experimental time intervals were defined, i.e. *early* (Zt= 00:00 to 02:00h) and *middle* (Zt= 04:00 to 06:00h) photophase, and *early* (Zt= 14:00 to 16:00h) and *late* (Zt= 22:00 to 00:00h) scotophase. In D/D conditions, the 2 intervals corresponding to the *early* and *middle* (subjective) photophase were the same as for animals under L/D. However, when the response to CO_2 was tested, two intervals were considered for the *early* (subjective) scotophase, i.e. Zt= 12:00 to 14:00h and Zt= 14:00 to 16:00h. The *late* scotophase remained the same as for the L/D condition. When the response to the aggregation pheromone was studied, the interval *early* (subjective) photophase remained equal to the L/D condition, however the *late* (subjective) scotophase was divided in two recording intervals i.e. Zt= 20:00 to 22:00h and 22:00 to 00:00h. The time of both, the *early* and *late* (subjective) scotophase test periods, were adjusted to compensate for the expected shortening of the free running period under D/D conditions (Lazzari, 1992) and, to confirm that the absence of a response under D/D was not due to a more important shift of the rhythm under free-running conditions
.

Recording of walking pathways

A locomotion compensator was used to analyze the orientation behaviour of *R. prolixus* (Barrozo and Lazzari, 2004). Briefly, it consists of a hollow Styrofoam sphere (9.7 cm diameter, 2.5 g weight) suspended by a vertical air-stream generated by an air-pump. The bugs were maintained at the apex of the sphere attached by their dorsal abdomen to a freely rotating stiff steel wire, using double-sided sticky tape. The animals started to normally walk when contacting the surface of the sphere, thus displacing it with their legs. Bugs on the locomotion compensator could walk and rotate freely, changing its direction without modifying its relative distance to the stimulus location, i.e. in an open-loop condition for translation, but closed-loop for rotation. The sphere movement was detected by an optic sensor and the signal fed to a computer every 200 ms as *x*-, *y*-co-ordinates. The walking paths of the bugs were reconstructed and analyzed in their spatio-temporal components as previously described (Barrozo and Lazzari, 2004).

All the experiments were performed in an experimental room (25±2°C) under conditions of functional darkness for the insects (see below). Before starting an experiment the insects remained in still air on the locomotion compensator for 120s to habituate them to the experimental situation, after which the airstreams (control and stimulus) were presented during 180s. The assays were monitored from the outside of the experimental room using an infrared-sensitive camera with its own illumination system composed by IR-emitting LEDs (900 nm). It has been previously shown that this light is not perceived by the bugs (Reisenman *et al.*, 1998). Each individual insect was tested only once and discarded afterwards.

Stimulus delivery

Insects were confronted to two simultaneous opposite (180°) horizontal charcoal-filtered airstreams, one bearing the test stimulus while the other kept clean (test versus control) (Barrozo and Lazzari, 2004). Insects either walked towards one of the two streams or did not exhibit an odour-orientated behaviour, i.e. walked randomly when both currents had identical composition. The two airstreams, being at constant temperature (25±2°C) and relative humidity (40±5%), reached the insects through glass tubes (0.6 cm inner diameter, 14

cm length) whose were 3 cm from the insect. The velocity of the air measured at the exit of the glass tube was 4.2 $cm.s^{-1}$.

CO_2 was chemically generated ($Na_2CO_3 + H_2SO_4 \rightarrow NA_2SO_4 + H_2O + CO_2$). For this, a synchronous-motor driven syringe injected a 0.3 M solution of Na_2CO_3 at a rate of 0.08 $ml.min^{-1}$ into a glass bottle containing 100 ml of 1 M H_2SO_4. The mixture was continuously stirred to ensure a stable CO_2 production. An airstream (97.5 $ml.min^{-1}$) passed over the surface of the reaction mixture and thus loaded with CO_2, resulting in an increase of 1200 ppm of CO_2 over the ambient level (500±30 ppm). To measure the CO_2 concentration in the air, a non-dispersive infrared sensor was used (PP Systems, model EGM-3, range 0-5000 ppm, and accuracy 0.5 %). The control airstream, carrying ambient levels of CO_2 (500±30 ppm) was produced by an identical arrangement, but lacking from the injection of Na_2CO_3 (for further details see Barrozo and Lazzari, 2004). This arrangement made possible to keep in both currents an identical air speed, relative humidity and temperature.

Faeces from fed insects, the source of the aggregation pheromone (Lorenzo Figueiras *et al*., 1994), were collected on filter paper (Whatman paper N°1, 1 x 3 cm) by gently pressing their abdomen with forceps. Insects did not contact the filter paper to avoid contamination with cuticular cues. Collected faeces were stored in a chamber at 28°C and 50-70% humidity and used after 4 days. It has been previously shown that the aggregation signal remains attractive from 3h to 10 days (Lorenzo Figueiras and Lazzari, 2000). A filter paper impregnated with faeces was placed in one of the stimulation tubes, while in the opposite an identical but clean filter paper served as control. Every 5 insects tested, the paper impregnated with faeces was substituted by a new one, to avoid differences in the concentration of the aggregation pheromone between the insects along the assays. In all cases, to avoid eventual environment biases, the sides of the test and the control currents were changed between assays.

Data analysis

The pathways followed by the insects were analysed by means of circular statistics (Batschelet, 1965; Zar, 1984; Fisher, 1993), since standard "lineal" statistical analysis is not applicable. The mean walking angle (α_i) displayed by each insect along the experimental time was computed and subsequently, for every experimental group a mean angle (α_m) and the length of the resultant mean vector (r) were calculated. The relative position of the stimulus delivery current was conventionally designated as 0° and the control current as 180°. Whereas

α extends from 0 to 360°, r varies between 0 and 1 (0 indicating a non-defined mean direction and 1 a straight path to a given direction). The V-test (Zar, 1984) was carried out to assess whether the mean angle calculated from the sample was statistically distant from the stimulus direction (0°). Additionally, for an easier visualization of the data, an orientation index was calculated, multiplying the cosine of the mean angle (α_m) by the length of the mean resultant vector (r), as cos (α_m) × r. The orientation index varies between -1 and 1 (-1 indicates orientation away from the stimulus and 1 orientation towards the stimulus location). We also tested the pathways for eventual bimodal axial directions (i.e. opposite directions vs. uniformity) by means of the Rao's spacing test (Fisher, 1993).

RESULTS

Daily modulation of the oriented response to odours

R. prolixus larvae showed a daily variation in their orientation response to both, CO_2 and aggregation pheromones (Fig. 1). In both cases a preferred walking direction was observed at only one time of the day. Insects oriented towards the CO_2 only during the *early* scotophase, i.e. between the second and the third hour after lights-off (Fig. 1A, OI= 0.35, *V*-test, $u_{(21)}$= 2.3, p= 0.012). In the other intervals tested (i.e. *early* and *middle* photophase and *late* scotophase), the pathways of the insects were uniformly distributed between 0° and 360°, i.e. they showed no orientation tendency, walking randomly on the sphere (*V*-test not significant in all cases). The response to the aggregation pheromone was observed in a different temporal window as compared with the response to CO_2 (Fig. 1B). The bugs were attracted by the pheromone during the first two hours of daylight, i.e. the *early* photophase (OI= 0.38, *V*-test, $u_{(21)}$= 2.5, p= 0.006) but any oriented response was observed neither during the *middle* photophase, nor throughout the scotophase (*V*-test, p> 0.05 in all cases).

When the data of each experimental group were submitted to the Rao's spacing test some additional differences between groups appeared. The group of bugs tested at the end of the scotophase for their response to carbon dioxide evinced an axial distribution of their preferred orientation direction (p< 0.01); it means, bugs walked either towards or against the air-stream loaded with the stimulus. The same result was obtained for the group tested for their response to the odour of faeces at the beginning of the night (p< 0.01). This kind of

response was not observed for the rest of the temporal windows tested using the two stimuli ($p > 0.05$).

Endogenous vs. exogenous control of the response

Figure 2 depicts the orientation response of *R. prolixus* larvae maintained under constant darkness, to both CO_2 and the source of aggregation pheromones. Insects displayed a preferred walking direction to CO_2 during the first two hours of the *early* subjective scotophase (Fig. 2A) (OI= 0.37, V-test, $u_{(21)}= 2.4$, $p= 0.008$). The orientation towards CO_2 occurred about one hour earlier than in the group kept under the L/D regime, confirming the expected shortening in the period of the rhythm under free-running conditions. Like in L/D conditions, insects walked randomly on the locomotion compensator in the other intervals tested (*V*-test, all cases not significant). In contrast, no changes in the responsiveness towards the aggregation pheromone were observed for insects kept under D/D conditions (Fig. 2B), and the observed response during the *early* photophase in L/D disappeared.

When the data of each experimental group were submitted to the Rao's spacing test no difference among groups was observed, neither as a function of the stimulus (CO_2 or faeces), nor comparing temporal windows.

Walking activity

The comparison of the duration of walking among the different temporal windows, corresponding to each stimulus, revealed, in both cases, no significant differences, indicating that the activity on the locomotion compensator was similar for all the groups (ANOVA, n.s.).

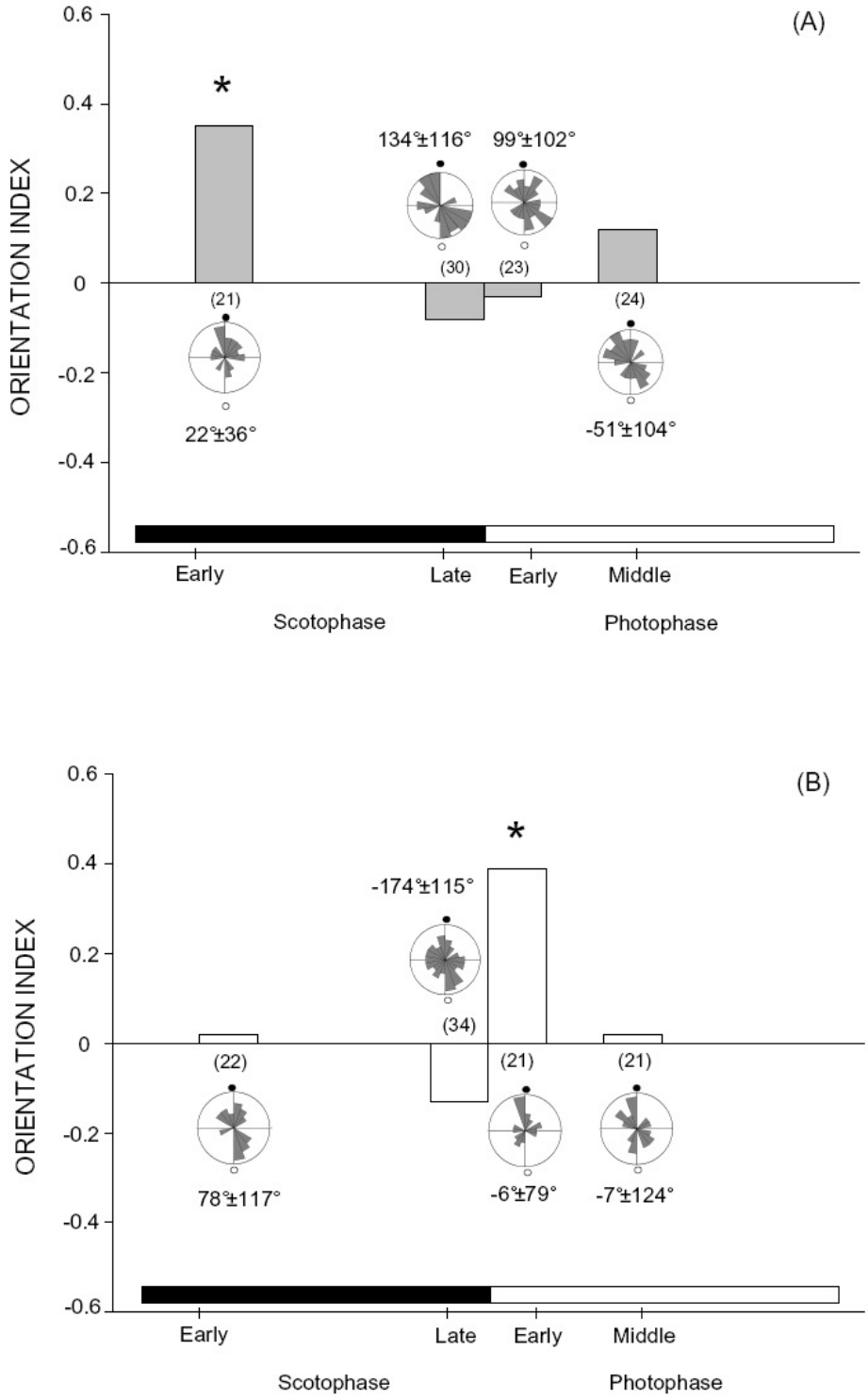


Figure 1. Orientation response of *R. prolixus* larvae to airstreams loaded with 1200 ppm of carbon dioxide above the background (500±30 ppm) (A) or aggregation pheromones (B), at different moments of the day, i.e. early and late scotophase and early and middle photophase. Asterisks denote a statistically significant preferred direction around stimulus location (0°) (*V* test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The circular histograms (rose diagrams) represent the frequency of the angles displayed by the animals, which is proportional to the area of the wedge (bar width of 10°). Open dots indicate control airstreams position and filled dots denote test airstream location. Number of insects tested is shown in brackets. The mean vector angle ± the circular mean deviation are indicated.

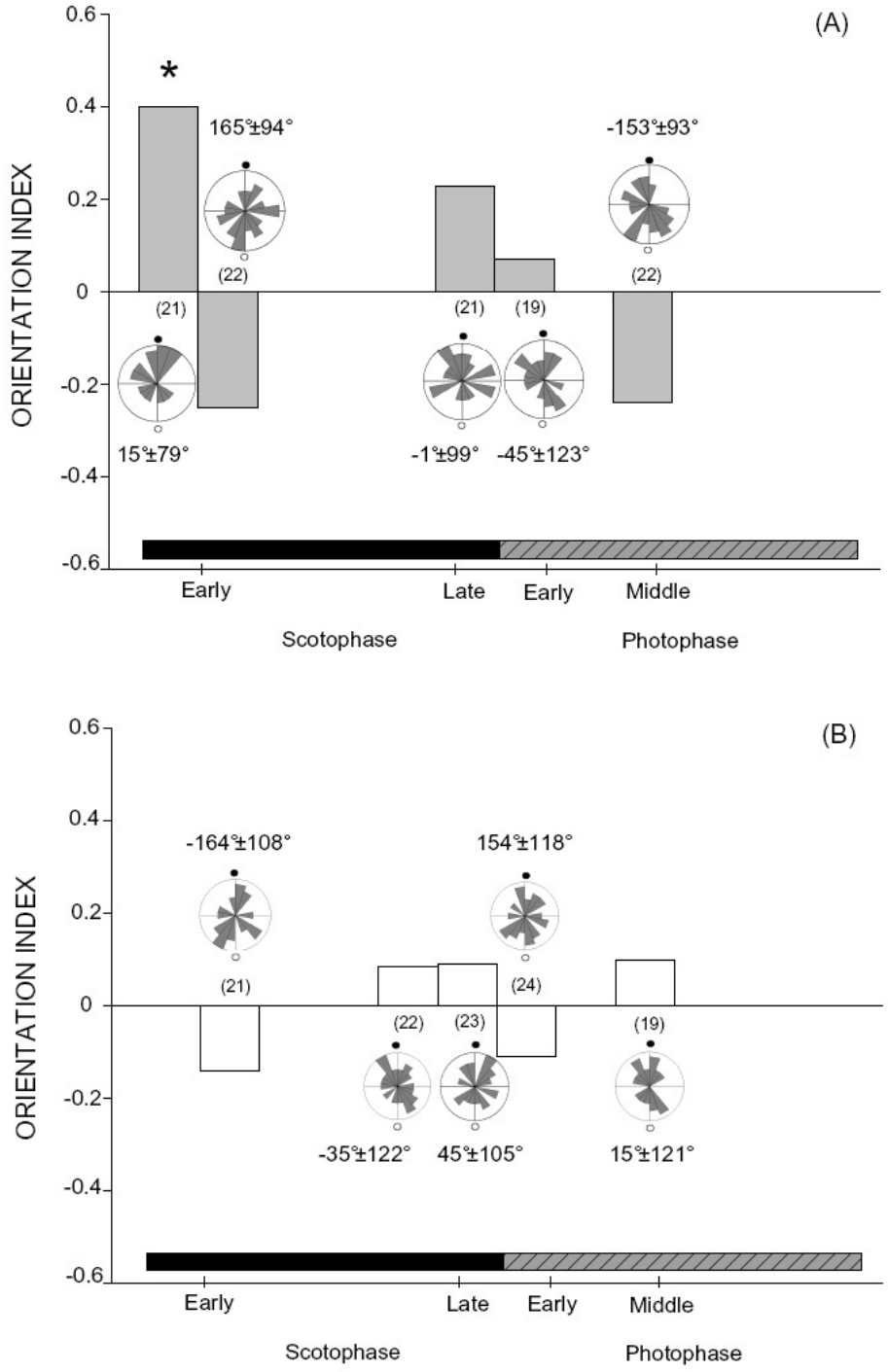


Figure 2. Orientation response to CO_2 (A) and aggregation pheromones (B) of *R. prolixus* larvae maintained under constant darkness (i.e., free-running). Bugs were entrained for 3 days in L/D cycles (12h:12h) and then transferred to D/D conditions for three more days. Asterisks denote a significant mean walking direction around stimulus location (0°) (*V* test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The circular histograms (rose diagrams) represent the frequency of the angles displayed by the animals, which is proportional to the area of the wedge (bar width of 10°). Open dots indicate control airstreams position and filled dots denote test airstream location. Number of insects tested is shown in brackets. The mean vector angle ± the circular mean deviation are indicated.

DISCUSSION

The expression of odour sensitivity rhythms in insects

Several studies at the peripheral sensory level revealed a daily rhythm of sensory sensitivity in insects. This modulation has been verified to occur in the olfactory and in the visual system (Reisenman *et al.*, 1998; Krishnan *et al.*, 1999; Reisenman *et al.*, 2002; Page and Koelling, 2003). Nevertheless, in the case of olfactory reception, paradoxically, in the few species studied up to now, insect chemoreceptors are consistently more sensitive during resting periods than when they are active (Krishnan *et al.*, 1999; Page and Koelling, 2003; Merlin *et al.*, 2007). In *Drosophila*, it has been proposed that this could also be the case for the behavioural responsiveness (Zhuo *et al.*, 2005), but again, this appears as quite paradoxical. Different hypotheses have been raised to explain this paradox, being the most accepted that insects need to be more sensitive to signals appearing during moments where their reactivity threshold is the lowest. It is argued that a higher olfactory sensitivity would be more adaptive for predator avoidance or opportunistic feeding at a time when the animals are normally asleep and another is that higher sensory sensitivity at resting is more likely to arouse the "sleeping brain" (Merritt, 2007). This hypothesis seems quite sound concerning food odours. Nevertheless, the same inconsistency between sensory sensitivity and behaviour has been recently observed in moths, concerning pheromone reception (Merlin *et al.*, 2007). This case is less easy to understand in adaptive terms, since moths use sexual communication in a highly synchronous fashion. Both, the release of sexual pheromones by the emitter and the search for the source by the receptor sex are finely tuned to be accomplished during the same temporal window (Saunders *et al.*, 2002). In the case of sympatric species using similar pheromonal blends, the temporal allocation of the sexual call even constitutes a reproductive barrier (Cardé *et al.*, 1977). Thus, to react to the right pheromonal odour, when it is present in the environment at a moment that is not the right one for the species represents a waste of effort and a risk of being predated, without a reproductive success assured. In other cases, however, when olfactory behaviour is analysed, this paradox is not present, being insects more responsive to odours at the right time to look for food, for mate or even in relation with olfactory learning (Decker *et al.*, 2007).

Thinking in terms of natural selection, it seems more adaptive that maximal responsiveness occurs during active periods and moreover, when a given odour becomes biologically relevant. This is what we have observed in *R. prolixus*, where maximal olfactory

responsiveness to different odours coincides with the precise temporal windows at which the behaviour is known to occur. In their natural habitat, triatomine bugs are permanently exposed to both host odours and long-persistence assembling pheromones. Nevertheless, we found that they respond to one or the other at a particular time of the day. Bugs spend daylight hours hidden in shelters. At dusk, they are attracted by host odours like CO_2 (Fig. 1A), at the time the insects leave their refuges to search for a blood meal. In contrast, insects are only attracted to the aggregation pheromone at dawn; even when host odours are also present (Fig. 1B). This temporal window corresponds to the moment at which bugs return to their refuges in order to remain hidden to predators. Therefore, the time at which the maximal behavioural responses to a given odour occurs, matches the behavioural context to which that odour is associated with.

General vs. selective modulation of olfactory sensitivity

In their natural environment, animals are confronted to different stimuli, whose presence or behavioural relevance may change along the day. For example, two behaviourally-relevant odours, A and B, could be each associated to two behavioural contexts allocated at different temporal windows. On the other hand, as indicate above enough evidence has been gathered showing that odour sensitivity does not remain constant along the day. Theoretically, two types of variation in chemosensitivity can be postulated. In the case of a *general* modulation of the responsiveness to chemical cues, the animals would exhibit the highest sensitivity to all odorants at a given daytime, thus remaining the relative sensitivity to A and B the same at any moment of the day. This is the kind of variation that has been revealed, for example, in the sensitivity of the antennae in *Drosophila* flies and *Leucophaea* cockroaches (Krishnan *et al.*, 1999; Page and Koelling, 2003). Conversely, if the response to odours is modulated in a *selective* fashion, the response to odours would be maximal to A only at the time when A is behaviourally relevant, but not to B, even if it is also present in the environment, and vice-versa. In other words, the animals would express a maximal sensitivity for each odorant at the time that the odour is present and behaviourally relevant. This kind of modulation has not been previously described or postulated in any insect species, even though it would be much more adaptive to modulate differentially the responsiveness to each odour according to a behavioural context, rather than to become more or less generally sensitive, i.e., increase their responsiveness to any given odour. Thus, insects could keep a maximal sensitivity to a given odour, without responding to other odours that albeit present in the environment, are relevant in a different behavioural and/or temporal context.

Rhodnius prolixus revealed as a good model to test general vs. specific modulation of responsiveness to odours, because its bimodal daily activity and since as indicated this species uses different chemical cues at different moments of the day. Our experiments evinced that the responsiveness to odours is modulated in this species in a specific fashion, being the insect behaviourally more sensitive to the odour corresponding to a given behavioural context only during the temporal window when such behaviour takes place, i.e. food-search at dusk and return to the refuge at dawn.

An interesting but puzzling result of our study is that insects responded to both odours at dusk and dawn either unimodaly (i.e., one preferred direction) or in an apparent bimodal way (i.e. towards and against). So, whereas the orientation towards a CO_2 source is maximal only at dusk, they did remain indifferent most, but not all, the rest of the time. The Rao's spacing test revealed that at dawn they seem to have responded in opposite directions; i.e., approaching and avoiding the odour source. Exactly the same result was obtained when bugs were tested against faeces odours, but inversing the temporal windows. This suggests, either that the sensitivity to one odour is not "switched-off' outside the specific window when this odour is behaviourally relevant, or that the anemotactic behaviour is not uniform along the day. To speculate about the exact mechanism, more data seem to be necessary.

Endogenous and exogenous control of the response to odours

Increasing amount of evidence supports the fact that the odour sensitivity in insects changes rhythmically, and may be endogenously controlled by circadian clocks (Krishnan *et al.,* 1999; Page and Koelling, 2003; Barrozo *et al.,* 2004). This temporal modulation has been demonstrated at the sensory level, expressed as a temporal change in the sensitivity of chemosensitive cells (Van der Goes van Naters *et al.,* 1998; Krishnan *et al.,* 1999; Tanoue *et al.,* 2004) and also at the behavioural level as the responsiveness of the insects to odours (Brady, 1975; Barrozo *et al.,* 2004).

Our results indicate that the rhythm of responsiveness of *R. prolixus* to CO_2 is under the control of an endogenous oscillator (Fig. 2A). The persistence of the rhythm of responsiveness to odours under constant darkness demonstrates that it is self-sustained and therefore truly circadian. As can be expected for a nocturnal animal (Aschoff, 1989) and as observed for other circadian rhythms already described in this species, the period of the rhythm under D/D is shorter than the period of the rhythm under L/D conditions. Our results are also in agreement with previous data on a related species of haematophagous bug

Triatoma infestans, which responsiveness to CO_2 is endogenously controlled and limited to a narrow temporal window at the beginning of the night (Barrozo *et al*., 2004). Contrarily to the responsiveness to CO_2, the olfactory response to the aggregation pheromone is not under the control of an endogenous circadian clock (since it disappears under constant darkness) but is under the direct influence of exogenous variables (e.g. the environmental light cycle).

In summary, the relationship between sensory sensitivity and behavioural response to stimuli is more complex than believed and deserves further work to be fully understood. Actually, before circadian rhythms of olfactory sensitivity were described by the first time in insects, Blaney *et al*. (1986) already pointed out concerning sensitivity variations in general that "…correlations between receptor changes and behavioural changes do not necessarily indicate direct relationships".

Acknowledgments. The authors express their gratitude to C. Reisenman and T. Insausti for critical reading of the manuscript and to C. Reisenman for improving the English. This investigation received support from the University François Rabelais (Tours, France) and from the CNRS (French National Research Council). The work of A.B., R.B. and L.C. was supported by grants from the Region Centre (France), the French Ministry of Education and the INRA (National Institute for Agricultural Research), respectively.

CHAPITRE 2

STATE DEPENDENCE OF HOST ORIENTATION IN *RHODNIUS PROLIXUS*: THE POST-ECDYSIS TIME

Aurélie Bodin, Clément Vinauger & Claudio R. Lazzari

Soumis

SUMMARY

The source of blood of most haematophagous insects plays at the same time the double role of host and predator. Thus, the insect motivation to feed should be modulated in trigger feeding behaviour only when necessary and occurring as fast as possible. From an epidemiological point of view, this modulation has an impact on the feeding frequency of disease vectors and, as a consequence, on the transmission of parasites. At present, not much data are available on the influence of the physiological state on the motivation to feed, and mostly limited to a few mosquito species. We analyzed the motivation to feed in *Rhodnius prolixus* after ecdysis, by testing the response of larvae to a blood source, and long- (CO_2) and short-range (heat) orientation cues associated to their vertebrate hosts. Our experiments demonstrated that during the first days following the ecdysis insects do not respond to any stimuli. The ability to follow chemical and physical cues increases either gradually (heat) or step-wise (CO_2) with post-ecdysis time. Insects feed as soon as seven days after ecdysis but showed the stronger feeding motivation at day 10^{th} after the ecdysis. The reasons for the "maturation period" in feeding behaviour of *R. prolixus* are discussed.

Key words: modulation, orientation, heat, odours, Chagas disease.

INTRODUCTION

In nature, haematophagous insects use different types of signals from their environment in order to communicate or to search for food or protected resting places. Because the blood within a host is not detectable from a distance, these insects have evolved the ability to detect host-emitted cues. For instance, they associate metabolic by-products of vertebrates with the presence of blood and use them to find a potential host. Many of these kairomones in several blood-sucking species have been identified, as well as their roles in long- and short-range attraction. CO_2 is the most universal cue mediating long-range attraction in blood-sucking insects, with changes in its concentration being in many cases mediating oriented searching behaviour (e.g. Barrozo and Lazzari, 2004a). In addition to chemical cues, haematophagous insects also use physical signals for the location of a host like heat and humidity (Lazzari and Núñez, 1989; Barrozo *et al.*, 2003; Lehane, 2005). Host-seeking behaviour is further controlled by endogenous mechanisms such as circadian clocks, with insects actively searching for blood when their hosts are asleep (e.g., Barrozo *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2008). Moreover, host-seeking behaviour should be regulated in such a way that insects search a host only when they are physiologically capable to obtain and handle a blood meal.

Factors affecting the motivation to feed have been analyzed only in a few species. Up to now, all the studies focusing on the impact of the physiological state on the host-seeking behaviour of blood-sucking insects were conducted in holometabolous insects that are haematophagous only in the adult stage, like mosquitoes (Davis, 1984a). Hemimetabolous blood-sucking insects, in contrast, are obligatory haematophagous during their whole life, i.e., through all the developmental stages. Thus, hemimetabolous blood-sucking insects can acquire pathogen parasites early in life and hence transmit them each time they subsequently feed, i.e. for many months. It is largely accepted that the frequency of feeding is an important factor determining the competence of disease vector insects for transmitting pathogens. This frequency is determined by the insect motivation to respond to host cues, which depends, in turn, on the physiological state. In hemimetabolous insects each moult is triggered by the nutritional stage of the individual and, conversely, moulting should itself affect the insect's feeding ability.

Triatomines are hemimetabolous insects and obligatory haematophagous during their whole life and thus constitute an appropriate model to study how the motivation to feed

changes throughout development. Many triatomine species are vectors of the parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas Disease, one of the most important sanitary problems in Latin America (WHO, 2002). Chagas Disease vectors feed mainly on humans and on domestic animals. During the day these insects display little activity and are usually found in a quiescent state or "akinesis" inside refuges. During the night they display most of their activity, e.g. they search for food, mate, oviposition sites, etc. (Lazzari, 1992; Lorenzo and Lazzari, 1996). Their locomotion activity is divided in two endogenously controlled temporal windows: one at dusk and another at dawn (Lazzari, 1992). These two peaks of activity are respectively associated with host seeking (dusk) and refuge search (dawn), (Lazzari, 1992; Lorenzo and Lazzari, 1998). Heat and carbon dioxide emitted by warm-blooded animals are among the most important cues guiding triatomines to their food source (Wigglesworth and Gillett, 1934; Lazzari and Núñez, 1989; Flores and Lazzari, 1996; Barrozo *et al.*, 2004). Up to date, several studies have focused on the identification of the chemical cues implicated in host location (e.g. Guerenstein and Guerin, 2001), but no data are available about the physiological modulation of the host-seeking behaviour, with the exception of the influence of circadian clocks on the response to host odours (Barrozo *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2008).

We investigated the effect of endogenous factors on the feeding behaviour of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae), namely the impact of the physiological state on the responsiveness to different host cues. Here we present a quantitative analysis of the behavioural response of *R. prolixus* larvae to two main host cues, carbon dioxide and heat, at different times after the ecdysis, as well as their motivation to feed.

MATERIAL AND METHODS

Insects

Fifth-instar larvae of *R. prolixus* were used throughout the experiments. Larvae were reared in our laboratory under a 12/12 h light/dark illumination regime, at 28°C and 60-70% of relative humidity (RH). Insects were fed weekly on sheep heparinised blood, using an artificial feeder (Núñez and Lazzari, 1990) until their ecdysis to the fifth-instar. Since insects hatch at the end of the night (Ampleford and Steel, 1982), we collected fifth-instar larvae (L5)

every morning (i.e., some hours after their ecdysis). Newly emerged bugs were recognizable by their characteristic pale-pink colour. Bugs were individualised and starved until the assays.

Bioassay protocol

We tested the insect's attractiveness to CO_2 and heat, as well as their motivation to feed at different times post-ecdysis. All the assays were conducted in a room maintained at 25 ± 2°C; 40-60% RH, 500 ± 100 ppm of CO_2 and under infrared illumination, i.e. under functional darkness for the insects (Reisenman *et al.*, 1998). The experiments were carried out only during the first hours of the scotophase, which corresponds to the time of the day during which insects leave their shelters to search for food (Lazzari, 1992; Lorenzo and Lazzari, 1998). The attractiveness to CO_2 in triatomines is also limited to this temporal window (Barrozo *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2008). Each individual was tested only once between the first (T0, the first night after ecdysis) and the 15^{th} day (T15) after ecdysis and discarded afterwards. A positive control of highly motivated bugs was tested using insects starved during 60 days after ecdysis (T60).

Response to CO_2

A locomotion compensator was used to analyze the walking behaviour of *R. prolixus* in response to CO_2 (Barrozo *et al.*, 2004; Barrozo and Lazzari, 2004a, Barrozo and Lazzari, 2004b; Bodin *et al.*, 2008). It consists of a hollow polystyrene sphere (9.7 cm diameter, 2.5 g weight) suspended by a vertical air-stream generated by an air-pump. Insects were tethered by their dorsal thorax using double-sided adhesive tape, to a freely rotating stiff steel wire and placed at the apex of the sphere. Insects started to walk as soon as their tarsi contacted the surface of the sphere, thus displacing it with their legs. Insects on the locomotion compensator could walk and rotate freely, changing its direction without modifying its relative distance from the stimulus location, i.e. in an "open-loop" condition for translation, but "closed-loop" for free rotation. The locomotion compensator included an optic sensor which detected the movements of the sphere and this signal was transferred to a computer every 200 ms as *x-y* co-ordinates. The walking paths of the bugs were reconstructed and analyzed in their spatio-temporal components as previously described by Barrozo and Lazzari (2004a). Before starting a test each insect remained in still air on the locomotion compensator

for 2 minutes to familiarize it to the experimental situation, after which the airstreams (control and stimulus) were presented during 3 minutes. The assays were monitored from the outside of the experimental room using an infrared-sensitive camera and an array of infrared LEDs (emission 900 nm). This light illuminated the scene without modifying the normal activity of insects, i.e., functional darkness (Reisenman *et al.*, 1998).

The insects were tested on a simultaneous-discrimination bioassay similar to that previously used (Barrozo *et al.*, 2004; Barrozo and Lazzari, 2004a, Barrozo and Lazzari, 2004b; Bodin *et al.*, 2008). Insects were exposed to two opposite horizontal charcoal-filtered airstreams (180°), one bearing 1200 ppm of CO_2 (over the environmental concentration of 500 ± 100 ppm) while the other was kept clean (control versus test). We used two airstreams (control vs. test) because insects exhibit spontaneous anemotaxis to odourless airstreams. In this way, insects exposed to two opposite identical airstreams will orient randomly, but if one of the streams is loaded with an attractive stimulus they will orientate their trajectory towards one of them (Barrozo *et al.*, 2003; Barrozo and Lazzari, 2004a, Barrozo and Lazzari, 2004b, Bodin *et al.*, 2008). In this situation, each bug could choose to walk towards one of the two streams or could exhibit a non-oriented behaviour, i.e. random walk. Two identical constant flow airstreams (4.2 $cm.s^{-1}$; 25 ± 2°C; 40 ± 5% relative humidity), were blown over the insects through glass tubes (0.6 cm inner diameter, 14 cm length) placed 3 cm in front of the insect. CO_2 was generated as previously described by Barrozo and Lazzari (2004a). In order to avoid any environmental asymmetry, the position of the stimulus and the control air-stream were changed randomly between tests. To test for any bias in our dispositive, a control experiment was performed with insects exposed to two opposite and identical odourless airstreams (control, 0 ppm of CO_2 over the ambient).

The insects walking trajectories were analyzed by means of circular statistics (Zar, 1984; Fisher, 1996). The mean walking angle (α_i) displayed by each insect along the experimental time was computed and subsequently, for every experimental group a mean angle (α_m) and the length of the resultant mean vector (r) were calculated. The angle α varied between 0 and 360° and r varied between 0 and 1 (0 indicating a non-defined mean direction and 1 a straight path to a given direction). The position of the stimulus-bearing current was conventionally designated as 0° and the control current as 180°. The V-test (Zar, 1984) was conducted to test if the mean angle (α_m) was significantly different from the stimulus direction (0°). Additionally, for an easier visualization of the data, an orientation index (OI) was calculated by multiplying the cosine of the mean angle (α_m) by the length of the vector (r), as $\cos(\alpha_m) \times r$. This index fluctuates between 1 and -1, respectively indicating orientation

directly towards or away from the stimulus position. We also tested the pathways for eventual bimodal axial directions (i.e. opposite directions vs. uniformity) using the Rao's Spacing test (Fisher, 1993).

Response to heat

In order to study the behavioural response to a thermal stimulus, we tested the bugs' ability to respond to heat and their motivation to feed after their moult to 5^{th} instar. We set up an artificial feeder which allowed us to individually test the response of 10 insects at a time. The artificial feeder (Fig. 1) consisted of ten 1 ml Eppendorf® tubes whose rear ends were cut and replaced with Parafilm® in order to allow insects to bit and feed on the blood contained in the tubes. The tubes contained 0.5 ml of fresh sheep heparinised blood and were placed in a tapped aluminium block (35 x 5 x 1.3 cm) equipped with a flat electric heater. A thermostat kept blood at a constant temperature, 33 ± 1°C, which corresponds roughly to the surface temperature of a host body. The underneath of the aluminium block was isolated with a polystyrene foam plate which held the tubes. Thus, the bottom surface of the feeder remained at ambient temperature (25 ± 2°C), except the Parafilm® surface. The insects were individually placed in plastic containers (11.7 cm height and 3 cm diameter). These tubes contained a filter paper which allowed insects to reach the blood; the top of the feeding tubes was covered with a fabric mesh that allowed them to bite through the Parafilm® of the blood containers. Before a test began, each insect was allowed to familiarize during 2 minutes with the experimental situation (i.e. without stimulation), during which the plastic containers with insects were placed in still air in the experimental room at 25 ± 2°C and 40 ± 5% relative humidity. The artificial feeder was then put in contact with the containers and insects were tested during 15 minutes. Three parameters were recorded: a) approaching to the feeding tubes; b) proboscis extension response (PER); and c) feeding.

Binary data (1 = behaviour observed and 0 = behaviour not observed) were collected and the proportion (p) of animals responding was calculated for the three behavioural parameters described above. For binary data, the standard deviation (s) was calculated as: $s = (p\,(1-p))^{½}$ (Le, 2003). The proportions of insects responding to heat were compared by means of the Mann-Whitney *U*-test.

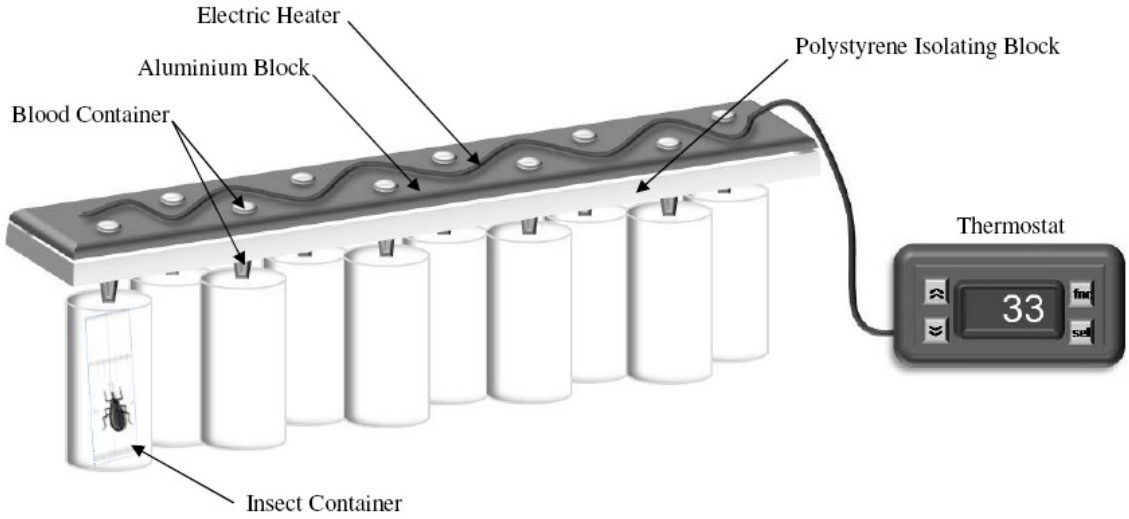


Figure 1. Artificial feeder used to test the behavioural response to heat and the motivation to feed of 5th instar larvae of *Rhodnius prolixus.*

RESULTS

Response to CO_2

The Fig. 2 shows that the orientation response of insects to CO_2, a long-distance cue, depends on the time elapsed since their ecdysis to the 5th stage. No data could be obtained from larvae at T0 (right after ecdysis) since they didn't move at all on the sphere. From T1 to T6, the pathways of the insects were uniformly distributed between 0° and 360°, i.e. they showed no orientation tendency, walking randomly on the sphere (V tests, $p>0.05$ in all cases). A statistically significant attraction response was observed at T7 and this response stayed constant until T60 (V tests, $p<0.05$ in all cases). When insects were stimulated with two opposite and identical odourless airstreams (control, 0 ppm of CO_2 over the ambient) no oriented behaviour was observed (V-test, $p>0.05$, Fig. 2; Table 1). When non-statistically significant data were re-analyzed using the Rao's Spacing test, we found that the insects tested at T5 and T6 showed an axial distribution of their preferred orientation direction (Rao's Spacing test, $p< 0.05$ for T5 and $p<0.01$ for T6), indicating that insects walked either towards or against the air-stream loaded with the stimulus, rather than randomly (Table 1). Comparison of the walking duration did not revealed significant differences, indicating that the activity on the locomotion compensator was similar for all groups (ANOVA, n.s.).

Table 1. Statistical analysis of the behavioural response to 1200 ppm of CO_2 of 5th-instar larvae of *R. prolixus* as a function of the post-emergence time. No insect walked at T0. RS, Rao's Spacing test; MA, mean walking angle; SMD, standard mean deviation.

	V-test			RS test	Walking angle
Time after ecdysis	n	u	p	p	MA ± SMD
control	70	-0.19	*n.s.*	*n.s.*	95 ± 107
T0	15	-	-	-	-
T1	12	-0.45	*n.s.*	*n.s.*	-125 ± 105
T2	13	-0.9	*n.s.*	*n.s.*	-139 ± 97
T3	12	-0.18	*n.s.*	*n.s.*	-99 ± 96
T4	13	0.46	*n.s.*	*n.s.*	-53 ± 111
T5	14	-0.29	*n.s.*	*p< 0.05*	111 ± 112
T6	23	0.35	*n.s.*	*p< 0.01*	9 ± 138
T7	15	2.49	*p< 0.01*	-	-33 ± 18
T8	16	1.86	*p< 0.05*	-	24 ± 81
T10	18	2.45	*p< 0.01*	-	-41 ± 63
T15	19	3.83	*p< 0.001*	-	-23 ± 51
T60	21	2.74	*p< 0.001*	-	-25 ± 56

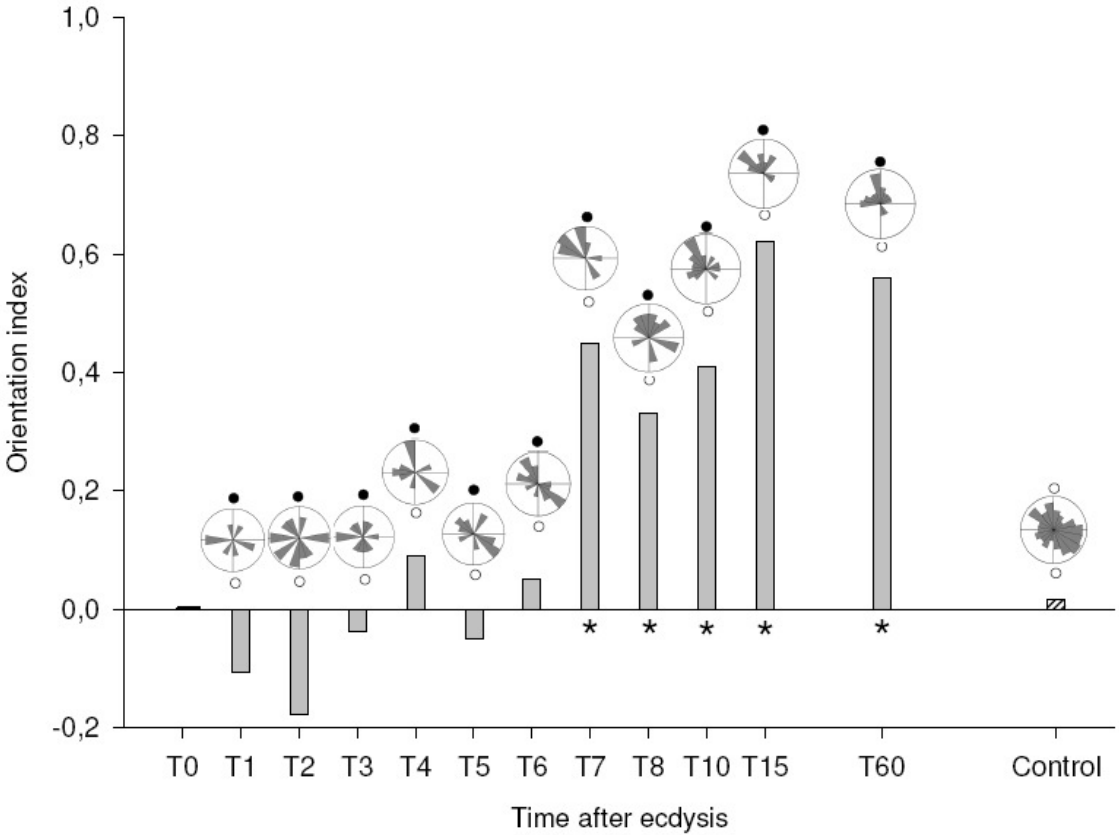


Figure 2. Orientation response of *R. prolixus* larvae to airstreams loaded with 1200 ppm of carbon dioxide above the background (500 ± 100 ppm), at different times after their 5th instar ecdysis. Asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards stimulus location (0°) (V test, p< 0.05). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The circular histograms (Rose diagrams) represent the frequency of the angles displayed by the animals, which is proportional to the area of the wedge (bar width of 10°). Open dots indicate control airstreams position and filled dots denote test airstream location.

Response to heat

The Fig. 3 shows the orientation response (approaching, PER and feeding) of insects to heat, a short-range host cue as a function of the time elapsed since the ecdysis. We found that all the insects that approached the thermal source (the feeder) extended their proboscis, indicating that these two behaviours are associated. The behaviour of insects after ecdysis could be divided in different phases: (1) no attraction was observed before T2 (insects did not move); (2) insects become progressively attracted between T2 and T4, with about 20% and 50% of the insects approaching the feeding in T2 and T4 respectively; (3) the attraction response remained constant at 50% between T4 and T7; (4) the attraction response reached a 90% level between T10 and T15 and stayed constant until T60.

Regarding the motivation of insects to feed, there was a progressive variation as a function of the time post-ecdysis (Fig. 3), and also different phases could be observed. First, no insect fed during the two first nights after ecdysis (0% in T0 and 0% in T1). Second, a progressive response was observed from T2 to T6 with a small increase in the proportion of insects that took a blood-meal (from 10% in T2 to 25% in T6). Finally, we observed a significant increase in the proportion of insects that fed after T7. The number of insects that took a blood-meal increased twice between T6 and T7 (25% to 50% respectively; U= 1.96, p= 0.016), and reached a maximum level between T10 to T60 (about 80% of insects took a meal).

The Fig. 4 depicts the proportion of insects that fed among those that were attracted to heat. Not every insect that was attracted to heat took a blood-meal. We observed two phases in the dynamics of the response, the first one, from T0 to T6, when about 45% of the insects attracted to heat took a blood meal and the second one from T7 to T60, where almost every insect attracted fed (90%). The number of insects that took a blood-meal after their moult increased twice between T6 and T7 (from approximately 45% to 90% respectively, U= 1.96, p= 0.004).

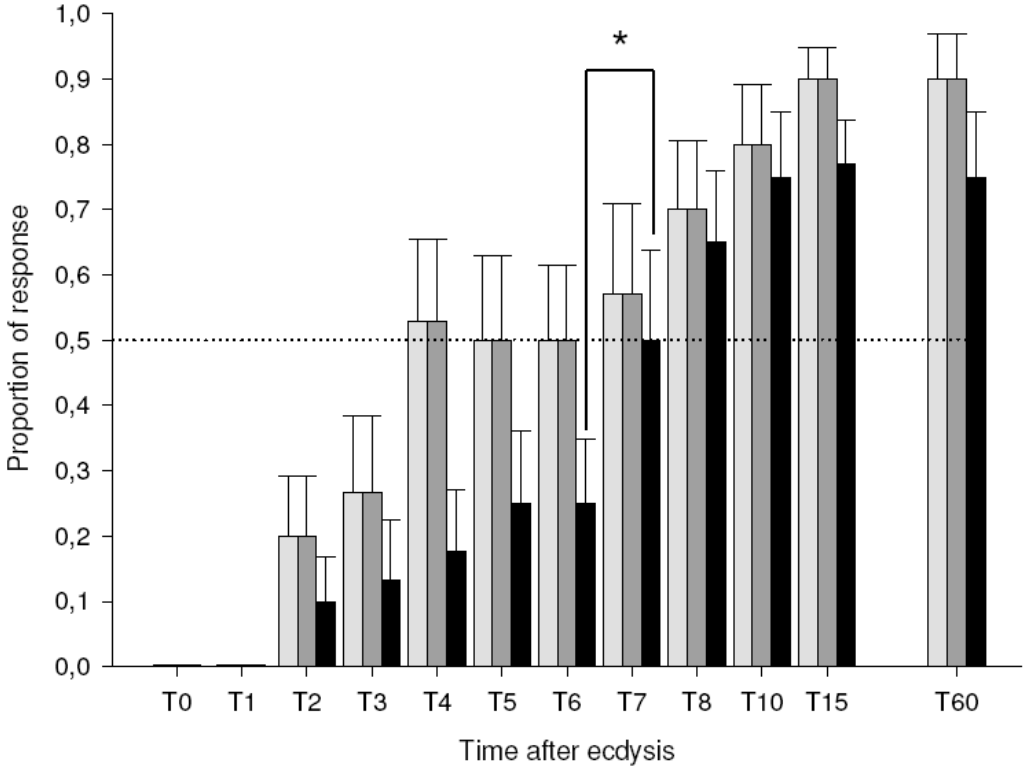


Figure 3. Behavioural response to heat of *R. prolixus* larvae at different times after their ecdysis to the 5th instar. White bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The dot line represents the level of 50 % of response. The asterisk indicates a significant difference in the feeding response (Mann-Whitney test).

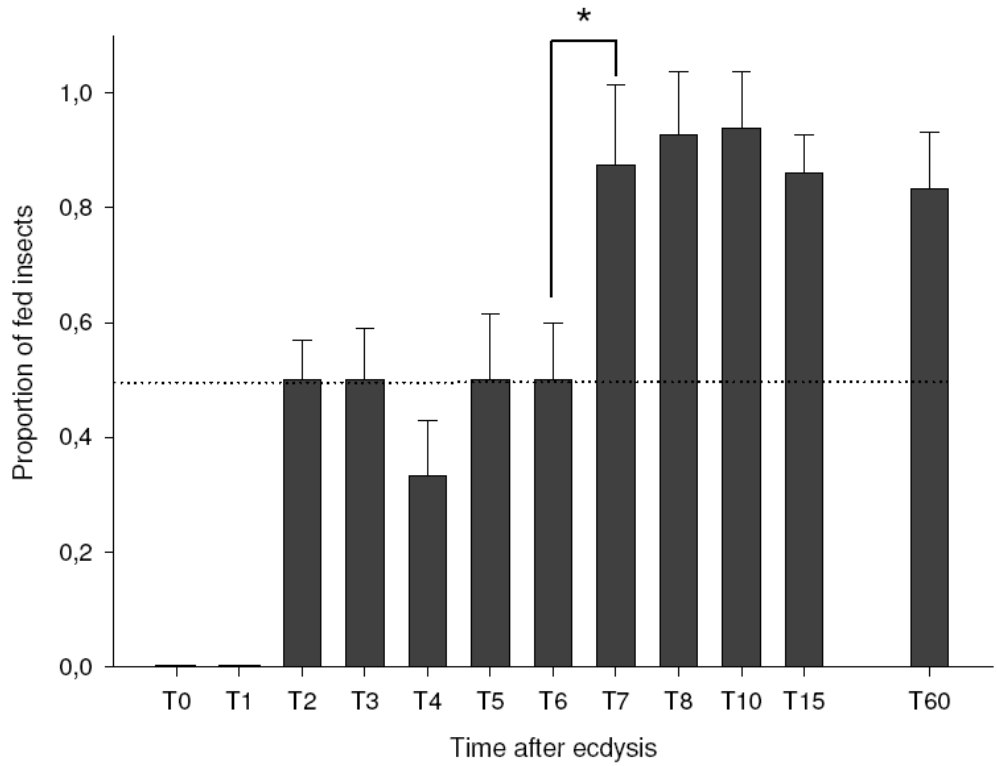


Figure 4. Feeding response of 5th instar larvae of *R. prolixus*. The feeding response is represented as the proportion of insects fed among the insects that were attracted by the heat source, as a function of the time elapsed from their 5th instar ecdysis. Each value corresponds to the mean response ± S.E.M. The dot line represents the threshold of 50 % of response. The asterisk indicates a significant difference in the feeding response (Mann-Whitney test).

DISCUSSION

In the present work, we studied the development of host-seeking behaviour in newly emerged 5th instar larvae of *R. prolixus*. We analyzed the behavioural response of insects to two different cues associated with host localization at long and short distance, as well as their motivation to feed on blood. Insects presented a simultaneous development of their behavioural response to both kinds of cues, i.e. long- (CO_2) and short-range (heat) host cues. Our results showed that the development of the insects' response to these cues is clearly age-dependent. We found that the evolution of the response to CO_2 is not gradual, but all-or-none instead. In other words, insects remained indifferent to this cue during the first week post-ecdysis, and become highly attracted afterwards. In contrast, the response to heat progressed gradually, with the attractiveness to heat increasing steadily for about 10 days until reaching a maximum level.

The development of the behavioural response to heat is thus different from the one to CO_2. In natural conditions, heat constitute a short-range host cue, acting during the final approach of the insect to its host, i.e. after having been guided to their proximity by host-derived chemical cues and anemotaxis. In our experiments, when the insects were exposed to heat, the chemical host-seeking step in the chain of responses preceding blood-feeding was bypassed. Thus, the stimulation with heat indicated to the insect that a host can be easily contacted, even in the case of insects that are not yet motivated to actively seek for a host. Thus, host-seeking *per se* is not necessary for feeding, if the food appears as easily accessible. This is in accordance with the fact that *R. prolixus* started to respond earlier to heat than to CO_2., with 50% of the insects responding by the 4th day (Fig. 3), but with a great increase in the response by the 7th day, when bugs start to be attracted to CO_2 (Fig. 3). When our results are compared to those obtained in mosquitoes, some similarities become evident, despite phylogenetic distances and the fact that *R. prolixus* is an hemimetabolous insect and obligatory haematophagous during all stages of development, whereas mosquitoes are holometabolous and only adult females feed on blood (but not exclusively). In *Culex* mosquitoes, Mitchell (1981, 1983) has shown the effect of the access to the host on feeding behaviour. He found that diapausing female *Culex* spp fed on a host animal when they were placed in a small cage but did not in a large cage. The author concluded that in a large cage most mosquitoes must engage in host-seeking behaviour in order to contact the host, whereas a small cage assures host contact even by mosquitoes that are not actively looking for a host. Roth (1957) observed that female *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* would not

orient to a human arm after bilateral antennectomy, but if they encountered the arm by chance, they would settle and feed.

An interesting observation concerning the development of the behavioural response to CO_2 was that during the two days previous to the establishment of a clear-cut attraction response (i.e., T5 and T6), insects displayed a bimodal response. The Rao's Spacing test revealed that insects oriented in opposite directions; i.e., both approaching and avoiding the odour source, rather than walking randomly (Table 1). This phenomenon has been recently reported to occur under similar stimulation conditions, when insects were exposed to CO_2 at a time of the day when they are not supposed to search for food but for refuge (Bodin *et al.*, 2008). So, three different phases could be observed in the insects' response to CO_2 after ecdysis. From T0 to T4, the insects displayed a non-oriented response being indifferent to this signal. At T5 and T6, insects displayed a bimodal axial orientation with half of the bugs oriented equally towards the stimulus and against it. Then, after T7 and until two months after ecdysis (T60), insects were highly motivated to find a host and strongly attracted to CO_2 (Fig. 2). The 7^{th} day appeared to be a transition day where the attraction to CO_2 clearly started.

In *R. prolixus*, the modulation of the response to different kinds of host signals (long and short-range cues) is consistent with the context in which they intervene. At a distance from a host, insects seek for host-emitted cues by means of a non-oriented behaviour which allow them to encounter these attractive signals in their environment. These cues trigger the searching behaviour, followed by a long-range orientation to the host. All these activities expose insects to the risk to be predated. We have recently shown that *R. prolixus* responds to CO_2 only during a narrow temporal window at the beginning of the night, when host and predators are resting (Bodin *et al.*, 2008). Besides, the host-seeking behaviour is costly in terms of energy. As a consequence, in cases in which taking a blood meal would not provide additional nutritional resources or if the insect is not physiologically ready to obtain and handle a blood meal, it would be adaptive not to respond to long-range host cues,. In the case of the experiments we present here, food is necessary to continue the development of the insect. Thus, the lack of response seems to be most probably related to the acquisition of morphological (e.g. the sclerotisation of mouth-pieces) and physiological (e.g. enzymes) abilities to obtain and handle a blood-meal.

Previous studies on holometabolous blood-sucking insects have shown that other activities that occur after adult emergence, such as reproduction, affect feeding behaviour. In this case, blood meals taken before a certain degree of ovarian maturation do not add to the

reproductive success of the insect, but visiting the host will increase the insect's chances of being damaged or killed. In mosquitoes, there is a one-two day period after adult emergence during which insects do not show seek for hosts. Blood-feeding has been reported to be initiated between 24 and 72h after a female mosquito emerges (Seaton and Lumsden, 1941; Bishop and Gilchrist, 1946; Laarman, 1955). A similar period of maturation appears to be required before the peripheral sensory organs are fully responsive (Davis, 1984a). It has been shown that the development of activity in the chemosensory afferent neurons sensitive to lactic acid in newly emerged virgin female *Aedes aegypti* mosquitoes is age-dependent, and in correlation with the development of host-seeking activity (Davis, 1984a). In *Ae. atropalpus* the receptors for lactic acid develop faster (12h), and the absence of attractive behavioural response to host components from emergence to the end of the first gonotrophic cycle in this species cannot be attributed to the delay of development of the peripheral sensory system (Bowen *et al.*, 1994a; Bowen *et al.*, 1994b). In this species, authors hypothesized that distension due to oocytes maturation in the ovaries inhibits host-seeking during the first gonotrophic cycle (Bowen *et al.*, 1994b).

Our experimental model allowed us to study, for the first time in a blood-sucking insect, the effect of the moult on feeding excluding the influence of reproduction, dispersion and other adult activities. So, the modulation of their response to host-associated cues is only due to morphological and physiological reasons associated to the insect's development. The available information does not allow us to speculate much about the mechanisms behind the inhibition of feeding behaviour following the ecdysis. As indicated above, the sclerotisation of mouthparts could need to be completed, the enzymatic machinery associated to digestion to be activated or even the sensory organs complete their development. It should be noted that the last has been shown to be the case of the simple eyes (ocelli), which complete their development only two weeks after the imaginal ecdysis, during the adult life (Insausti and Lazzari, 2000).

Another interesting result of our experiments is that the extension of the proboscis displayed by the insects is not dissociated from the approaching of the heat source. Every insect attracted by the heat source extended it proboscis. Nevertheless, proboscis extension was not necessarily associated with feeding. About 50% of the insects attracted by the heat source fed before the 7^{th} day. It's only after this day that we observed that nearly all the bugs attracted to heat took a blood meal (Fig. 4). Thus, the extension of the proboscis does not assure that the insects would take a meal.

From an epidemiological point of view, our results provide quantitative data for computational models of the feeding rate and parasite transmission, and also allow validating previous data. For example, Rabinovich *et al.* (1979) analysed the biting frequency and blood ingestion in domiciliary *R. prolixus* in Venezuela. These authors obtained from their model what they call the "time from moult to feed", a value of 6.8 days, which corresponds quite exactly to the 7 days necessary for bugs to respond to CO_2 and to reach their maximal motivation to feed.

Summarizing, our study allow us to drawn some interesting conclusions: 1) after their ecdysis, triatomines larvae need some days before starting to look for food; 2) feeding behaviour is modulated during this period by the responsiveness of insects to chemical cues and heat; 3) the response to thermal stimuli (host approaching) is strongly associated to the PER, reinforcing the idea about the crucial role of heat for biting (Flores and Lazzari, 1996); 4) PER is not fully associated with feeding, depending the later on other signals coming from blood itself. Further work already running in our laboratory should shed more light on the influence of the physiological state of the insect (e.g., the nutritional state and reproduction) on host-seeking and feeding in blood-sucking insects.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to C. Reisenman and T. Insausti for critical reading of the manuscript. C. Reisenman kindly improved the English. We acknowledge also C. Labrousse for rearing the insects and technical assistance. This investigation received support from the University François Rabelais (Tours, France) and from the CNRS (French National Research Council). The work of A.B. was supported by a PhD grant from the Region Centre (France).

CHAPITRE 3

STATE DEPENDENCE OF HOST-SEEKING IN BLOOD-SUCKING INSECTS: BEHAVIOUR AND PHYSIOLOGY

Aurélie Bodin, Clément Vinauger & Claudio R. Lazzari

Soumis

SUMMARY

Blood from vertebrates constitutes a resource necessary for growth and reproduction for haematophagous insects. Provided that hosts play the double role of food-sources and predators, feeding on their blood expose these insects to a high predation risk. So, host-seeking behaviour should be modulated in order to make the insect feed, only when it is necessary. In this work we analyze how the nutritional status affects the response to host-associated cues in the bug *Rhodnius prolixus*. We show that the responsiveness to CO_2 stimulation, to thermal stimulation and the motivation to feed depends on the time elapsed since a blood meal. In the case of CO_2, the same concentration may attract or repel, depending on the moment. As far as we know, this is the first time that a host-signal is shown to be repellent for an haematophagous insect. The response to heat is also modulated, but no repellence was observed. When blood was replaced by saline solution as food, a significant inhibition of the response to both signals was evinced, but not repellence. The injection of haemolymph of fed insects in starved bugs inhibited the response of receivers to both signals, but not the injection of saline solution or haemolymph of non-fed insects. This is the first time that the modulation of feeding behaviour is analyzed in an hemimetabolous blood-sucking insect, excluding any effect of other processes, such as reproduction.

Keywords: motivation, orientation, feeding behaviour, Chagas disease

INTRODUCTION

The transmission of diseases by blood-sucking insects depends on their ability to find a potential host and then to begin taking a blood meal from it. Indeed, host-seeking constitute a main activity in the life of haematophagous insects, which devote to it a high portion of their sensory abilities and much of their time. This activity allows them to obtain blood nutrients, necessary for growth and reproduction. The obtainment of a blood meal, however, constitutes a dangerous task, provided that hosts play the double role of food-sources and predators. To avoid unnecessary risks, the motivation to feed should be modulated in order to make the insect feed only when needed. This is the case, for example, of mosquito females, which are not sensitive to host cue during egg production and they recover their ability to seek for food, once eggs are mature or have already been laid. This alternance between feeding and reproduction expresses as a gonotrophic cycle which has been well characterised in different mosquito species (Klowden, 1981; Klowden, 1990; Klowden and Briegel, 1994; Klowden 1995; Takken *et al*., 2001). Actually, if a first meal is sufficient for the production of a batch of eggs, a supplementary one would not necessarily increase fecundity (Lea *et al*., 1978; Edman and Scott, 1987).

Concerning hemimetabolous insects, obligatory haematophagous along their whole life, to our knowledge, no information is at present available. Even when reproduction and ovarian activity may modulate the feeding activity of females, this would not be the case of males and larvae, which are submitted to the same trade-off between feeding and avoiding predation. To shed some light on this problem, we studied the response of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* to host-associated cues, as well as their motivation to feed, as a function of the time elapsed since the last meal. We have previously shown that internal factors, such as circadian clocks and the moult cycle affect the responsiveness of these bugs to host cues (Bodin *et al*., 2008; S. P. Bodin *et al*., unpublished).

First, we studied the response of larvae and adult males and females to carbon dioxide and thermal stimulation, as well as their motivation to feed, at different times after feeding and, in the case of the larvae, until their ecdysis. Then, we analysed the effect of abdominal distension on the modulation of the responses and, finally, we tested the influence of haemolymph-borne factors on the behavioural response to host-associated stimuli in these bugs.

MATERIAL AND METHODS

Insects

Larvae of *Rhodnius prolixus* were reared in the laboratory under 12/12 h light/dark illumination regime, at 28°C and 60 - 70 % RH. Insects were fed weekly, with sheep heparinised blood, using an artificial feeder (Núñez and Lazzari, 1990). Fifth instar larvae, adult males and females that had just moulted were isolated in individual plastic containers and starved until the tests. It has previously been shown that these bugs hatch at the end of the night (Ampleford and Steel, 1982). For our experiments, bugs were collected in the morning following ecdysis. They are recognizable by their characteristic pale-pink colour. In order to avoid any eventual interference of reproduction, adults of both sexes were kept virgin along the experiments.

Bioassay protocols

Experiment 1: Nutritional state and host-seeking behaviour

To investigate the potential modulation of the behavioural response of *R. prolixus* to host signals after a blood meal, we tested the behavioural response to CO_2 and heat, as well as the motivation to feed, at different times after a blood meal. Bugs were fed using an artificial feeder (Lazzari and Núñez, 1989), 15 days after their ecdysis either to the fifth instar or to the adulthood, in order to assure that they were highly motivated to feed. During the 24^{th} hours after feeding, bugs' weight varies rapidly because of the excretion of urine (Maddrell, 1963; Maddrell, 1964a; Maddrell, 1964b). Thus, in order to estimate the volume of ingested blood, insects were weighted 24 hours after feeding. Insects that had not fed at repletion were discarded in order to constitute homogenous groups.

After a complete blood meal in 5^{th} instar larvae, the behavioural responses to CO_2 and heat were tested each day during 8 days, and the 10^{th}, 15^{th}, 20^{th} and 27^{th} day, to characterize their responses during the entire larval stage. The 27^{th} day corresponds to the moment 5^{th} instar larvae start to moult to adults, i.e., imaginal ecdysis (Rabinovich *et al*., 1979). In male and female adults, the behavioural responses to CO_2 and heat after a complete blood meal were tested every 2 days during 20 days. The responses of the tested fed groups were compared with control, highly motivated bugs, which were starved for 15 days after ecdysis

(S. P. Bodin *et al.*, unpublished). Each insect was tested only once and discarded from experiments (N= 951).

All the assays were conducted in a room maintained at 25 ± 2°C; 40 – 60 % RH, 500 ± 100 ppm of CO_2 and under functional darkness for the insects, i.e. under infrared illumination (Reisenman *et al*., 1998). The experiments were carried out during the first hours of the scotophase, since triatomines display a peak of activity throughout this period, corresponding to the moment bugs get out from their refuges following host emitted cues in order to have a blood meal (Lazzari, 1992). Also their attractiveness to CO_2 is limited to this temporal window (Barrozo *et al*., 2004; Bodin *et al*., 2008).

Experiment 2: Abdominal distension and host-seeking-behaviour

To assess the potential role of the abdominal distension on the host-seeking modulation, we tested the response of 5th instar larvae of *R. prolixus* to CO_2 and heat during 3 days after feeding them on Ringer solution. As previously, an artificial feeder was used to feed the bugs 15 days after their ecdysis. The solution used was Ringer Locke (for 1 l of solution: 9 g NaCl; 0.42 g KCl; 0.24 g $CaCl_2$ $2H_2O$; 0.15 g $NaHCO_3$; 1 g glucose and distilled water to complete the volume). Just before feeding, adenosine triphosphate (ATP) was added to the solution to reach a concentration of 10^{-3} M. *R. prolixus* does not normally gorge on saline solutions (Friend and Smith, 1977) if not supplemented with ATP or some other related compound (Friend, 1965; Friend and Smith, 1977; Guerenstein and Núñez, 1994; Smith and Friend, 1982). These compounds are "phagostimulants" and a cue used by these insects to identify the presence of blood on the food source.

The rationale of this experiment was to test the unique intervention of the abdominal distension and not the presence of blood nutritive elements like proteins, lipids etc. in the gut. In order to estimate the volume of ingested solution, insects were weighted 24 hours after feeding and every experimental day. Bugs' weight was compared with that of blood-fed insects to assure identical abdominal distension, insects insufficiently fed were discarded to ensure a homogenous group of bugs. The experiments were carried out during the first hours of the scotophase because the attractiveness of the bugs to CO_2 is limited to this temporal window (Barrozo *et al*., 2004; Bodin *et al*., 2008). Each insect was tested only once then discarded from experiments (N= 95). We have chosen to feed bugs on saline solution to induce abdominal distension and not injecting the solution into the cavity of the insects body for the following reasons: 1) make the insects feed by themselves represents a non-invasive,

less deleterious manner to distend the abdomen (Wintle and Reinhardt, 2008) and 2) to get full distension, the abdomen of triatomines needs to be "plasticized" (i.e., to change its mechanical properties), a process triggered by stimuli associated to biting (Ianowsky *et al*., 1998).

Experiment 3: The role of haemolymph-borne factors

To explore the existence of humoral factors affecting the post-feeding modulation of the host-seeking behaviour, we analyzed the behavioural response to CO_2 and heat, as well as the motivation to feed in non-fed 5th instar larvae to which the haemolymph of fed donors was transferred. As previously, the non-fed insects were starved for 15 days for highly motivation to feed (S. P. Bodin *et al*., unpublished). Two groups of 15 fed donors were constituted, the first one composed of insects fed 1 day (I1) and the second composed of insects fed 4 days (I4) before haemolymph extraction. The collection of haemolymph for these groups was accomplished by securing the bugs by its back on adhesive tape, removing the legs, and applying a slight pressure to the abdomen until a drop of haemolymph extruded from the leg cuts. Collections were performed with a graduated micro-capillary connected to a manual pump, under a stereomicroscope. Using the same apparatus, non-fed insects were injected with 1 µl of I1-haemolymph or I4-haemolymph, and different groups of bugs were tested for their response either at day 1 (T1), 2 (T2) and 3 (T3) after the injection. The experiments were carried out during the first hours of the scotophase because the attractiveness of the bugs to CO_2 is limited to this temporal window (Barrozo *et al*., 2004; Bodin *et al*., 2008). Each insect was tested only once then discarded (N= 143). Three control experiments were conducted: 1) non-injected non-fed bugs (A group); 2) non-fed bugs injected with 1 µl of saline solution (B group) and 3) non-fed bugs injected with 1 µl of haemolymph obtained from non-fed bugs (C group).

Response to CO_2

The behavioural response of *R. prolixus* to CO_2 was recorded in an open-loop design for translation on a locomotion compensator and the walking paths of the bugs were reconstructed and analyzed in their spatio-temporal components as previously described by Barrozo and Lazzari (2004a). Before the beginning of each test, the insect remained in still air on the locomotion compensator for 2 minutes to familiarize to the experimental situation,

after which the airstreams (control and stimulus) were presented during 3 minutes. The assays were monitored from the outside of the experimental room thanks to an infrared-sensitive camera equipped with an array of infrared LEDs (emission 900 nm). This light illuminated the scene without being perceived by the bugs (Reisenman *et al*., 1998).

Provided that in these conditions triatomines exhibit spontaneous anemotaxis to odourless airstreams (Barrozo *et al*., 2003), a simultaneous-discrimination bioassay was conducted, similar to that previously used by us (Barrozo *et al*., 2004; Barrozo and Lazzari, 2004a, Barrozo and Lazzari, 2004b; Bodin *et al*., 2008; S. P. Bodin *et al*., unpublished). Individual bugs were exposed to two opposite horizontal charcoal-filtered airstreams (180°), one bearing 1200 ppm of CO_2, over the environmental concentration of 500 ± 100 ppm, while the other was kept clean (control versus test). Thus, each bug could choose to walk towards one of the two streams or could exhibit a non-oriented behaviour, i.e. to walk randomly. Both airstreams were blown over the insects through glass tubes (0.6 cm inner diameter, 14 cm length) placed at 3 cm from the insect at constant velocity (4.2 $cm.s^{-1}$), temperature (25 ± 2°C) and relative humidity (40 ± 5%). The production of CO_2 was achieved as previously described by Barrozo and Lazzari (2004a). To avoid eventual environmental biases, the positions of the stimulus and the control air-streams were changed randomly along the experiments.

The walking pathways described by the insects on the locomotion compensator were analyzed by means of circular statistics (Zar, 1984; Fisher, 1993). The mean walking angle (α_i) displayed by each insect along the experimental time was computed and subsequently, for every experimental group a mean angle (α_m) and the length of the resultant mean vector (r) were calculated. The angle α varied between 0 and 360° and r varied between 0 and 1 (0 indicating a non-defined mean direction and 1 a straight path to a given direction). The position of the stimulus-delivered current was conventionally designated as 0° and the control current as 180°. The V-test (Zar, 1984) was conducted to test if the mean angle (α_m) was significantly different from the stimulus direction (0°). Additionally, for an easier visualization of the data, an orientation index (OI) was calculated by multiplying the cosine of the mean angle (α_m) by the length of the vector (r), as cos (α_m) x r. This index fluctuates between 1 and -1, indicating orientation directly towards or away from the stimulus position, respectively. We also tested the pathways for eventual bimodal axial directions (i.e. opposite directions vs. uniformity) by means of the Rao's Spacing test (Fisher, 1993).

Response to heat and feeding motivation

In order to study the impact of a blood meal on the behavioural response to heat and the motivation to feed, we tested the bugs' ability to respond to a thermal source which also served as feeder. We set up an artificial feeder allowing us to observe independently 10 insects at a time (S. P. Bodin *et al*., unpublished). The artificial feeder consisted of ten 1 ml Eppendorf® tubes whose rear ends were cut and replaced by Parafilm® through which insects were able to bite. The tubes contained 0.5 ml of sheep heparinised blood and were placed in a tapped aluminium block (35 x 5 x 1.3 cm) equipped with a flat electric resistance. A thermostat kept blood at constant temperature, 33 ± 1°C, which roughly corresponds to the temperature of the surface of a host body. The aluminium block was isolated with a polystyrene foam plate which was pierced to let the tubes accessible. Thus, the lower side of the polystyrene plate was at ambient temperature (25 ± 2°C). The insects were placed in plastic containers (11.7 cm height and 3 cm diameter), which top was covered with a fabric mesh, allowing the insects to bite the blood containers. These tubes contained a piece of filter paper serving as substrate for the bugs and allowing them climbing up to approach the feeder. Before a test began, each insect was allowed to habituate for 2 minutes to the experimental situation without stimulation. After this time, the artificial feeder was placed over the containers and the response of the insects recorded for 15 minutes. Three parameters were recorded: a) approaching (the bug climbed up approaching the feeder), b) PER (proboscis extension response) and c) feeding (the bug increased noticeably its abdominal volume).

Binary data (1 = behaviour observed and 0 = behaviour not observed) were collected and a proportion of response (p) was calculated for each behaviour. The standard deviation (s) was calculated by the following mathematic formula for binary data: $s = (p\,(1-p))½$. When needed, a non-parametric Mann-Whitney U-test was performed for comparing groups adjusting the value of α in the case of multiple comparisons.

RESULTS

Experiment 1: Nutritional state and host-seeking behaviour

Behavioural response to CO_2 and heat in 5th instar larvae

The Fig. 1A represents the response to CO_2 in 5th instar larvae of *R. prolixus*. A variation in the orientation response of the bugs to this long-range host cue could be observed,

as a function of the time elapsed since the blood-meal. Before taking a meal, bugs showed a strong attraction response to CO_2 (V-test, $p<0.05$), displaying a preferred walking direction to the stimulus. Then, after feeding we have observed 4 phases of response. First, during the two first days following feeding (T1 and T2), bugs showed a behavioural inhibition phase. They walked randomly on the sphere showing no orientation preference, i.e. the pathways of the insects were uniformly distributed between 0° and 360° (V-test not significant in all cases). Second, during the tree following days (T3, T4 and T5), bugs showed a behavioural repulsion phase, displaying a preferred walking direction opposite to the stimulus (V-test, $p<0.05$ in all cases). Third, from T6 to T15, bugs displayed again behavioural inhibition, with no orientation preference on the locomotion compensator (V-test not significant in all cases). Finally, in both cases, at T20 and T27 bugs displayed once more a preferred walking direction opposite to the stimulus (V-test, $p<0.05$), showing another behavioural repulsion phase. The comparison of the walking duration among all the different groups, revealed in all cases, no significant differences, indicating that the activity on the locomotion compensator was similar for all the groups (ANOVA not significant). The Rao's Spacing test did not revealed axial orientation in any case, i.e., non-significant.

The Fig. 2A represents the behavioural response of 5th instar larvae of *R. prolixus* to a short-range stimulation by heat. It represents the proportion of the different behaviours realized by the bugs, a) approaching the heat source, b) PER, and c) feeding, as a function of the time elapsed since the blood-meal. For each day, the number of insects that presented one of the behaviours studied was expressed as a proportion of the total number of bugs tested. Our results showed that approaching and PER are associated, since all the insects that approached the thermal source (the artificial feeder), extended their proboscis. Before feeding, we observed a great proportion of insects approaching the heat source and extending their proboscis (90 ± 4.8 %), and an important proportion fed (77.5 ± 6.8 %). Then, after feeding and during all the experiments, there was an important decrease in the proportion of insects responding to heat and in the motivation to feed. The proportion of insects approaching the heat source and displaying the PER has never exceeded 35 %. The maximum responses were observed between T7 and T15. Concerning the proportion of insects that fed from the artificial feeder, it never exceeded 15 %, with maximum responses also between T7 and T15, corresponding to the inhibition phase of the response to CO_2 that follows the repulsion period.

Behavioural response to CO_2 and heat in females

The Fig. 1B represents the response to CO_2 in females of *R. prolixus*. As for larvae, a variation in the orientation response of the bugs to this cue could be observed as a function of the time elapsed since the blood-meal. Before taking a meal, bugs showed a strong attraction response to CO_2 (V-test, $p<0.05$), displaying a preferred walking direction to the stimulus. As for 5th instar larvae, we observed different phases of response during the days after feeding. First, during the four first days following feeding (T2 and T4), females showed a behavioural inhibition phase. The pathways of the insects were uniformly distributed between 0° and 360° (V-test not significant in all cases), i.e. they walked randomly on the sphere showing no orientation preference. Second, between T6 and T10, bugs showed a behavioural repulsion phase, displaying a preferred walking direction opposite to the stimulus (V-test, $p<0.05$ in all cases). Third, from T12 to T18, females displayed no orientation preference on the locomotion compensator (V-test not significant in all cases) suggesting a behavioural inhibition phase. Finally, in T20 they displayed a preferred walking direction to the stimulus (V-test, $p<0.05$), showing a behavioural attraction response. These results revealed that virgin females needs at least 20 days before responding to CO_2 after a blood-meal. The comparison of the walking duration among all the different groups, revealed in all cases, no significant differences, indicating that the activity on the locomotion compensator was similar for all the groups (ANOVA not significant). The Rao's Spacing test did not revealed axial orientation in any case, i.e., non-significant.

The Fig. 2B represents the behavioural response of females of *R. prolixus* to heat. As in the case of larvae, all the insects that approached the thermal source extended their proboscis. Before feeding, we observed a great proportion of insects approaching the heat source and extending their proboscis (65 ± 12.5 %), and an important proportion of insects that fed (60 ± 9.6 %). These proportions were statistically different to those observed in larvae (U= 2.84, $p<0.05$ and U=-2.17, $p<0.05$, respectively for the proportion of insects attracted (approaching and PER) and for insects that fed through the feeder). Then, after the blood-meal and during all the experiments, there was a great decrease in the proportion of insects responding to heat. The proportion of insects approaching the heat source and displaying the PER has never exceeded 30 %. The maximum responses were observed between T6 and T10. Concerning feeding motivation, no insect was observed trying to feed from the artificial feeder during the experimental time.

Behavioural response to CO_2 and heat in males

The Fig. 1C represents the response to CO_2 in males of *R. prolixus*. As for larvae and females, we observed a variation in the orientation response of the bugs as a function of the time elapsed since the blood-meal. Males showed a strong attraction response to CO_2 before taking a blood-meal (V-test, $p<0.05$), displaying a preferred walking direction to the stimulus. Contrary to what observed in larvae and females, males showed no orientation response along the experiments, i.e., neither attraction, nor repulsion. The pathways of the insects were uniformly distributed between 0° and 360° (V-test not significant in all cases), i.e. they walked randomly on the sphere showing no orientation preference. The comparison of the walking duration among all the different groups, revealed in all cases, no significant differences, indicating that the activity on the locomotion compensator was similar for all the groups (ANOVA not significant). The Rao's Spacing test did not revealed axial orientation in any case, i.e., non-significant.

The Fig. 2C represents the behavioural response of males of *R. prolixus* to heat. All the insects that approached the thermal source extended their proboscis. Our results are similar to those obtained with females. Before feeding, we observed most insects to approach the heat source and to extend their proboscis (62 ± 10.2 %), as well as an important proportion that fed (59 ± 9.3 %). These proportions were statistically different to what observed in larvae (U= 2.15, $p<0.05$ and U=-2.29, $p<0.05$, respectively for the proportion of insects attracted (approaching and PER) and for insects that fed through the feeder) but not from females (Mann-Whitney not significant for all behaviours observed). Then, after the blood-meal, there was a great decrease in the proportion of insects responding to heat. The proportion of insects approaching the heat source and displaying the PER has never exceeded 20 %. The maximum responses were observed between T8 and T16. As for females, we never observed insects trying to feed from the artificial feeder.

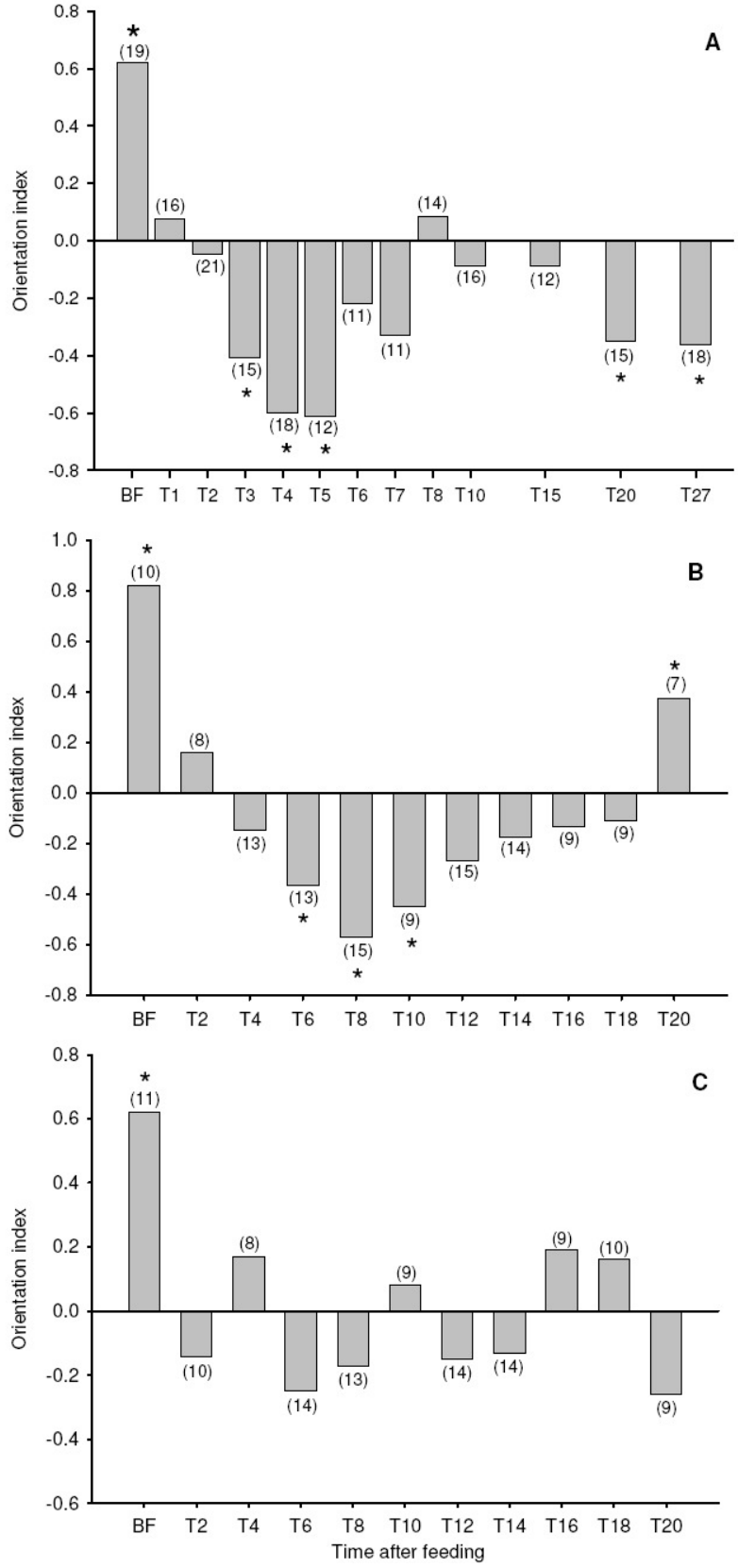


Figure 1: Orientation response of *R. prolixus* larvae (A), adult females (B) and males (C) to airstreams loaded with 1200 ppm of CO_2 above the background (500 ± 100 ppm), at different times after a complete blood-meal. Asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards or against the stimulus location (0°) (*V* test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). The number of insects tested is shown in brackets.

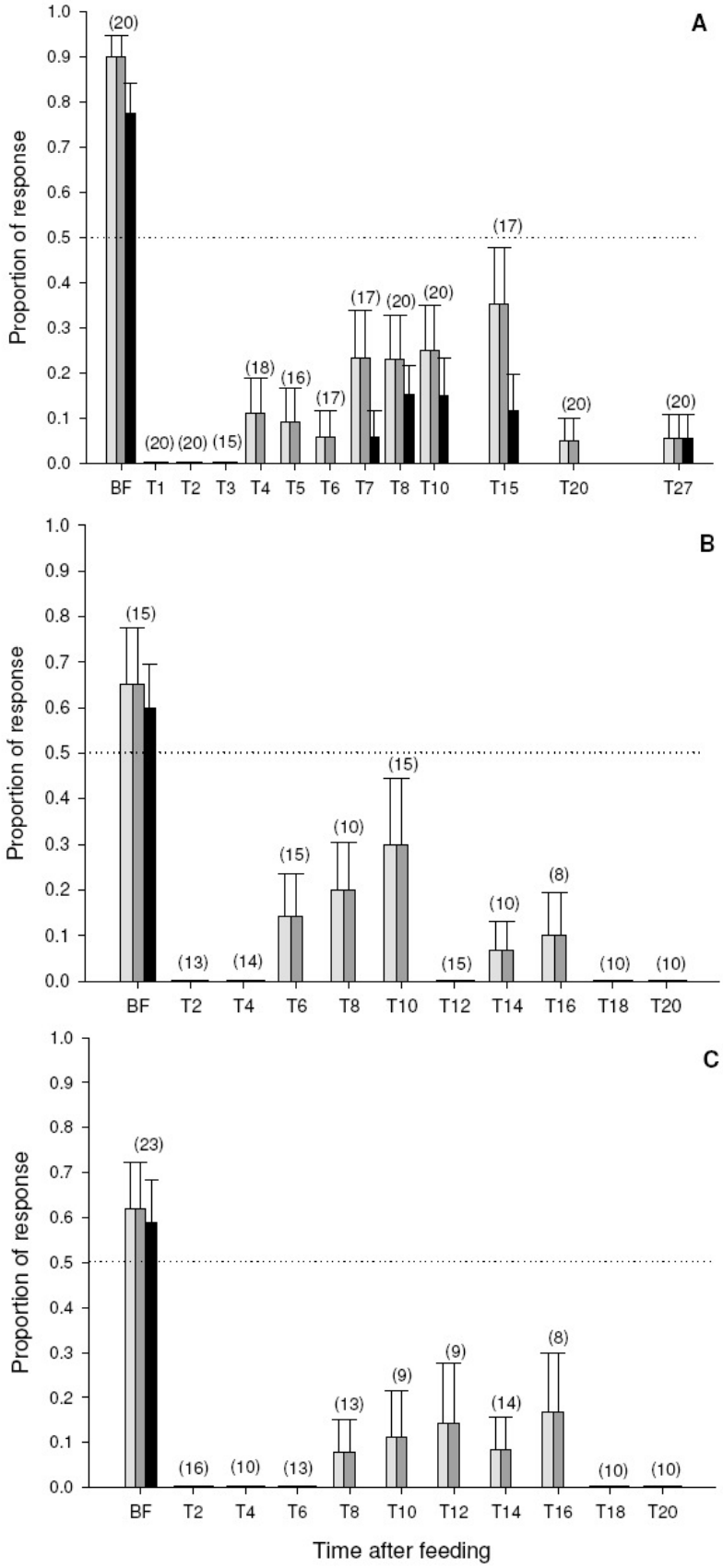


Figure 2: Behavioural response to heat and motivation to feed in *R. prolixus* larvae (A), adult females (B) and males (C) at different times after a complete blood-meal. White bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension response (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The dot line represents the level of 50 % of response. The number of insects tested is shown in brackets.

Experiment 2: Abdominal distension and host-seeking-behaviour

One day after feeding with both, blood or saline solutions, the weight of the insects had increased by a factor of approximately 6.5 (29.7 ± 1.4 mg before feeding and 195.9 ± 3.6 mg after) and stayed constant during the three days of experiment and no statistically difference between the weights of the two groups of insects were observed (Mann-Whitney not significant in all cases).

The Fig. 3A represents the response to CO_2 after feeding with saline solution in 5th instar larvae of *R. prolixus*. The results obtained before feeding correspond to those obtained in the experiment 1 (see above). During the three first days after feeding, they showed no orientation tendency towards the stimulus (V-test not significant in all cases). The comparison of the walking duration among all the different groups, revealed in all cases, no significant differences, indicating that the activity on the locomotion compensator was similar for all the groups (ANOVA not significant). The Rao's Spacing test did not revealed axial orientation in any case, i.e., non-significant.

The behavioural response to heat after an artificial feeding with saline solution is represented in Fig. 3B. The results before feeding are the same as in the experiment 1 (see above). After the artificial meal, we observed no response during the 3 days of experiments. The bugs even didn't move in their containers.

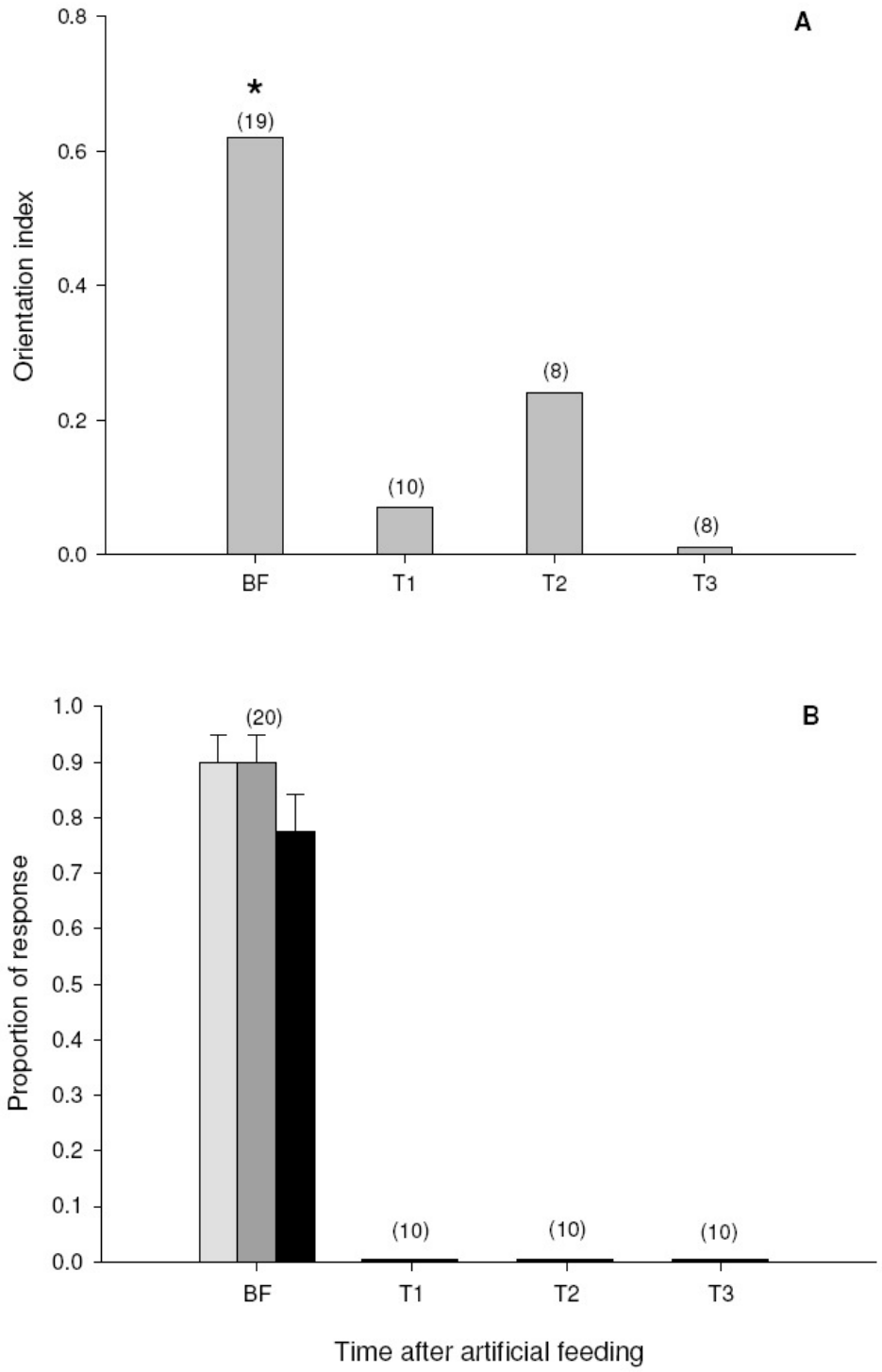


Figure 3: Behavioural response of *R. prolixus* larvae to different host-emitting cues during three days after an artificial meal with a saline solution. (A) represents the behavioural response of the bugs to 1200 ppm of CO_2 above the background (500 ± 100 ppm) before and after feeding on saline, asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards stimulus location (0°) (*V* test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). (B) represents the behavioural response of the bugs to heat and their motivation to feed before and after feeding on saline, white bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The number of insects tested is shown in brackets.

Experiment 3: The role of haemolymph-borne factors

The Fig. 4A represents the behavioural response to CO_2 of non-fed 5th instar larvae of *R. prolixus* injected with haemolymph of fed ones. Larvae were injected with haemolymph of insects fed for 1 day (I1) or with haemolymph of insects fed for 4 days (I4). The results of the control A (non-fed insects without injections) corresponds to that obtained in the experiment 1 before feeding (see above). The two other controls, B (non-fed insects injected with saline solution) and C (non-fed insects injected with haemolymph of non-fed insects), showed that bugs displayed an orientation preference to the stimulus after being injected (V-test, $p<0.05$ in all cases) excluding any possible negative effect of the injections.

It should be noted that all the bugs of group I1 died between 24 and 48 hours after injection. So, data could only be obtained for day 1 after injection (I1-T1) and showed that the bugs were not attracted to the stimulus. A certain tendency to repulsion by the stimulus was observed, but it revealed as statistically not significant (V-test not significant). Results obtained from the group I4 are quite different from I1. All injected bugs survived during experiments and beyond, indicating that the haemolymph rather than the injection itself was the deleterious factor. In I4-T1, I4-T2 and I4-T3 after injections, bugs showed no orientation preference when confronted to the stimulus (V-test not significant in all cases). The comparison of the walking duration among all the different groups (I1 and I4) and days, revealed in all cases, no significant differences, indicating that the activity on the locomotion compensator was similar for all the groups (ANOVA not significant). The Rao's Spacing test did not revealed axial orientation in any case, i.e., non-significant.

The Fig. 4B represents the behavioural response to heat of non-fed 5th instar larvae of *R. prolixus* injected with haemolymph of fed ones. The results of the control A (before injections) are the same of the experiment 1 (see above). For the control B (non-fed insects injected with saline solution) and C (non-fed insects injected with haemolymph of non-fed insects), the three behavioural responses (approaching, PER and feeding) did not differ from those of the control A (Mann-Whitney, not significant in all cases). As explained before, data from the group I1 were obtained only for 1 day after injection (T1) and showed that the bugs were not attracted to heat. Insects even didn't move in their containers. Results obtained from the group I4 are very different, a progressive attraction response to heat was observed. Observations revealed that few insects responded to the heat stimulus 1 day after injection. These proportions of response increased during the following days (I4-T2 and I4-T3) to nearly reach the proportions of response of the control A. In I4-T1 and I4-T2, the proportions of insects that responded to heat and fed from the feeder were statistically different from those

obtained for the control A (Mann-Whitney, $p<0.05$ in all cases). The proportions of response obtained in I4-T3 were not different from the control A (Mann-Whitney, not significant). Our results also show that all the insects that approached the thermal source (the feeder), extended their proboscis.

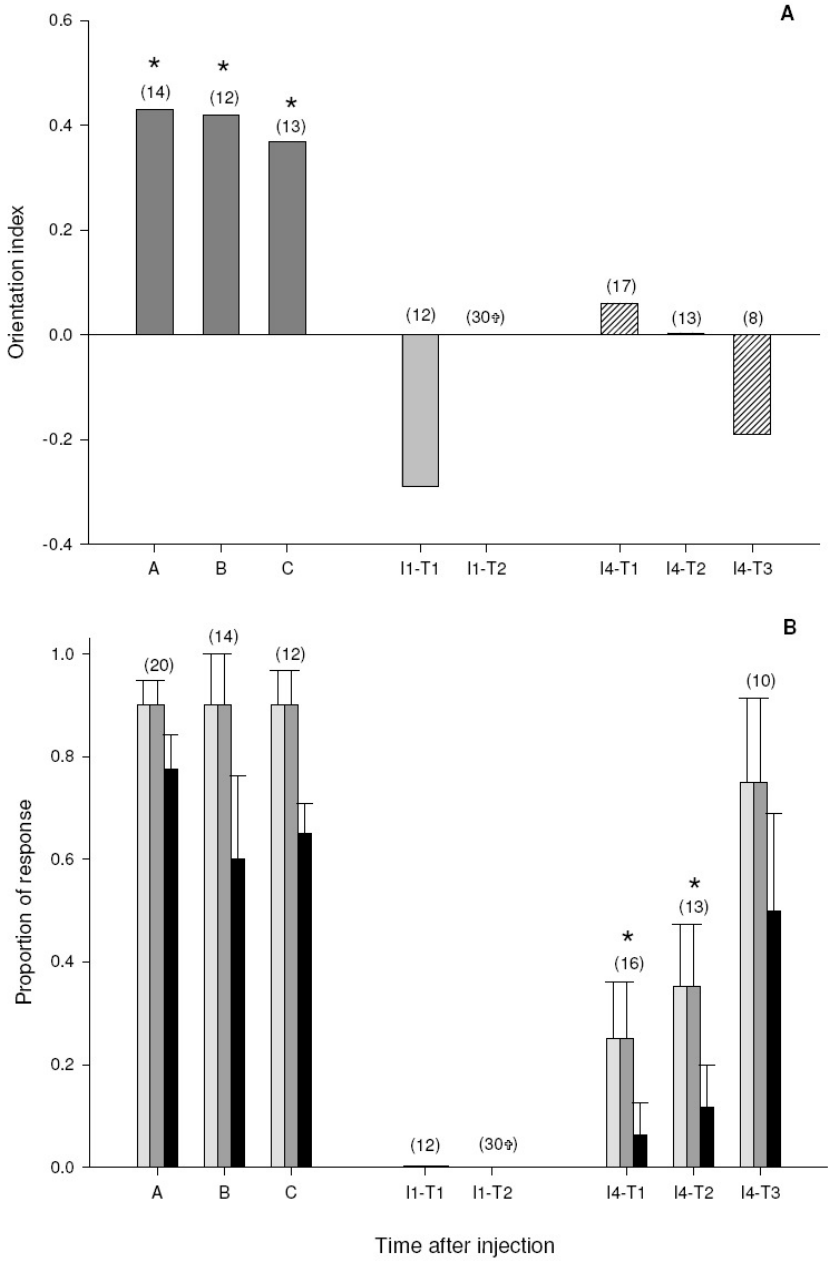


Figure 4: Behavioural response of non-fed larvae of *R. prolixus* to different host-emitting cues at different times after injection of haemolymph of insects fed for 1 day (I1) or 4 days (I4). (A) represents the behavioural response of the bugs to 1200 ppm of CO_2 above the background (500 ± 100 ppm), asterisks denote a statistically significant preferred walking direction towards the stimulus location (0°) (*V* test, $p<0.05$). Orientation index varies from -1 (orientation against the stimulus position) to 1 (orientation towards the stimulus location). (B) represents the behavioural response of the bugs to heat and their motivation to feed, white bars represent the proportion of insects that approached the heat source, gray bars represent the proportion of insects that performed proboscis extension (PER) and the black ones represent the proportion of insects that fed. Each bar represents the mean response ± S.E.M. The asterisk indicates a significant difference in the feeding response (Mann-Whitney test). The number of insects tested is shown in brackets. The cross means that all insects dead before the day of experiment.

DISCUSSION

Modulation of the responsiveness to host cues and feeding behaviour

Our experiments have shown that the responsiveness of blood-sucking insects to host cues is modulated by the nutritional state of the animal. This modulation affects the response of the insect to cues of different modalities, as well as the motivation to feed. So, the oriented response to CO_2 varied as a function of the time elapsed since the last blood-meal, as did the approaching to a thermal source and the motivation to feed.

A very interesting finding of our work was that the response to a host cue may be attraction, indifference or, quite surprisingly, a significant repellence. As far as we know, this is the first time that a repellent effect to a host-associated cue is demonstrated for an haematophagous insect. The theoretical analysis of mechanisms of spatial orientation (Jander, 1963) indicates that a same stimulus may mediate responses of opposite signs, as indicated by Núñez (1985): "The possibility that some of the sensory cues that served to locate the host would be used to escape or to move away from it, given a change of the sign of the orientation vector (see Jander, 1963). No experimental data are at present available on this aspect". This behaviour became evident in *R. prolixus* at different moments or "physiological contexts". In larvae, repulsion appeared about 72hs after feeding lasting for two days (Fig. 1A, T3 to T5), and also in the proximity of the ecdysis (Fig. 1A, T20 - T27; Lent and Valderrama, 1977; Rabinovich *et al*., 1979). In females, it appeared between T6 and T10 (Fig. 1B), when their motivation to oviposit is expected to be maximal (Davey, 1965). The fact that males did not show repellence to CO_2 seems to be consistent with the fact that in females it could only be related to oviposition and not to feeding as in larvae.

Only a reduction of the motivation to approach, but not repulsion to heat was observed in the bugs. In all cases, larvae, males and females, a strong reduction of both, the responsiveness to heat and to feeding motivation was verified (Fig. 2). In all cases, a complete inhibition of the response occurred just after a blood-meal (i.e., during the repulsion phase to CO_2), to recover gradually along the following days. It should be noted that approaching and PER were associated in 100 % of the cases (i.e. every time the bugs approached the heat source, they extended their proboscis), evincing once more the crucial role of heat for biting in triatomines (Flores and Lazzari, 1996). Nevertheless, PER did not necessarily implicate feeding. In contrast to chemical stimulation, which relies on

anemotaxis, heat orientation occurred in close proximity (Lazzari and Núñez, 1989). So, it is not surprising that bugs responded trying to bite (i.e., PER) a heat source when they are in contact or almost, even when their motivation to feed repress them from taking blood.

The physiological mechanisms

To explore the physiological basis of the state-depence to feed, we performed two further experimental series. The first one was addressed to test whether the change was induced by the mechanical distension of the abdomen or by chemical composition of food. For this, we fed a group of bugs on saline solution enriched with phagostimulants. A strong inhibition of both, the response to CO_2 and to heat was verified, as shown in Fig. 3. Nevertheless, no repulsive response was observed; only a blood meal was able to induce repellence, but not saline, suggesting that negative orientation to CO_2 is triggered by one or more chemical components of blood.

The last experiment tested whether the factors responsible for the modulation of the response to host cues are transported by the haemolymph. By injecting the haemolymph of just fed insects to starved ones, we were able to reduce their responsiveness to both, CO_2 and heat (Fig. 4). The duration of this effect on the receivers could not be measured because all of them indefectibly died 48hs after receiving the injection. Neither the change in the response, nor death occurred when the starved insects received saline solution or the haemolymph of non-fed insects (Fig. 4). The reason for the death of receivers of the haemolymph of just fed insects could be related to the important physiological changes occurring at feeding. To handle blood meals making several times their own body weight, these bugs experience dramatic physiological modifications, including the flow of a big amount of blood components and water through the crop wall towards the haemolymph. At the same time, diuretic hormones assure the rapid elimination of many of them during the hours following feeding (Maddrell, 1963). We can imagine that receivers got all this factors, including some toxic ones, without being able to eliminate them, because, even though diuretic hormones were also transferred, they do not suffice to induce diuresis in starved insects (Gomez and Balderrama, 1986).

In the last experiment we injected to starved insects, the haemolymph of donors fed 4 days before. This experiment allowed us to test two things. The first one was whether during the repulsive phase to CO_2, this response could be reproduced in receivers. The second aim was to test whether the lethal effect on receivers of the haemolymph of just fed donors

persisted. The receivers of this haemolymph were inhibited in their response to both, CO_2 and heat (Fig. 4), but no significant repulsion could be verified (Fig. 4B). These receiver bugs did not die after the injection and their response could be followed, revealing a recovering of the responsiveness to heat and the persistence of the lack of response to CO_2 for at least 3 days. These results show that the haemolymph-borne factors are responsible for the inhibition of the behavioural response of the bugs and also that these factors persist for several days to slowly lose their activity. The survival of these receivers supports the idea that what caused the death of receivers of the haemolymph of just fed insects was some factor associated to physiological changes occurring just after feeding.

The influence of the nutritional state on host-seeking by haematophagous insects has been analysed in detail in female mosquitoes and particularly concerning the interaction between the nutritive and the reproductive state. In the female mosquito, feeding triggers endocrine processes controlling the ovarian function (Klowden, 1997). After the initiation of a gonotrophic cycle by a blood meal, host-seeking is inhibited until egg maturation or oviposition (Klowden and Briegel, 1994). The inhibition is the result of the interplay of two mechanisms, one nervous and one humoral. The distension of the abdomen stimulates abdominal mechanoreceptors ("distension induced inhibition", Klowden and Lea, 1979a). If the blood meal suffices for triggering egg production, the humoral mechanism is activated ("oocyte-induced inhibition", Klowden and Lea, 1979b), where different organs are involved, such as the ovary, fat body and neurosecretory cells. In contrast to our findings, no repulsion seems to occur. Concerning the physiological mechanism, it has been shown in *Aedes aegypti* that the response of lactic-acid receptors is inhibited by humoral factors present in the haemolymph after feeding (Brown *et al.*, 1994).

In conclusion, we have shown that the response of haematophagous insects to their host is modulated by their physiological state. Feeding, moult and oviposition seem all three to be affecting the responsiveness to both, chemical and physical cues associated to vertebrate hosts. This modulation seems to be triggered by both, the distension of the abdomen and also chemical components of the blood ingested. Only a blood meal is able to induce repulsion and could be directly or indirectly responsible of the release of haemolymph-borne factors, which can be transferred from an insect to another. Further work should reveal the exact origin and targets of this factor.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to M. Greenfield, C. Reisenman and T. Insausti for critical reading of the manuscript, to C. Labrousse for technical assistance and to F. Soulard for previous preliminary tests. This investigation received support from the University François Rabelais (Tours, France) and from the CNRS (French National Research Council). The work of A.B. was supported by a PhD grant from the Region Centre (France).

DISCUSSION GENERALE

La grande richesse nutritive du sang fait du mode de vie hématophage une solution évolutive avantageuse. Ceci est bien illustré par les apparitions multiples du mode de vie hématophage au cours de l'évolution, y compris au sein d'un même ordre (Ribeiro, 1996) ou par le fait que chez ces insectes, les femelles, aux besoins nutritifs plus élevés, ont généralement acquis ce caractère les premières (Klowden, 1996). Cependant, ce mode de vie possède aussi des inconvénients puisque l'hôte vertébré qui représente une source de nourriture, joue également le rôle de prédateur potentiel. Ce rôle de prédateur que peut jouer l'hôte est un risque important pour l'insecte hématophage, qui doit optimiser le temps passé au contact du « danger ». La survie est donc étroitement liée au comportement de recherche alimentaire et il parait nécessaire pour les individus d'adapter de nombreux traits d'histoire de vie à leur mode d'alimentation, qu'il s'agisse de la réponse aux signaux de l'hôte, de l'ingestion et de la digestion du sang, de la transformation des nutriments en œufs ou de la coévolution avec les parasites sanguins (Ribeiro, 1987, 1989).

Le comportement de recherche de l'hôte des insectes hématophages, bien que souvent considéré comme une simple séquence d'événements stéréotypés, est en réalité un système comportemental complexe pouvant être influencé par un grand nombre de facteurs agissant seuls ou combinés (Friend et Smith, 1977 ; Lehane, 2005). L'alimentation requière d'une part des capacités de détection de l'hôte (perception de signaux visuels, olfactifs, thermiques ou mécaniques) mais également la prise en compte du statut physiologique de l'individu (état de développement, état nutritif ou état reproductif). De plus, on observe chez plusieurs espèces hématophages, une importante modulation des systèmes de perception, en relation avec les comportements de l'hôte et ses rythmes d'activité. Ceci leur permettant d'augmenter la probabilité de rentrer en contact avec des signaux émanant de l'hôte (Hargrove et Brady, 1992). Bien que l'activation du comportement de recherche de l'hôte soit nécessaire à l'acquisition de nutriments pour la survie et la reproduction, il y a certains moments dans la vie de ces insectes où il serait plus avantageux que ce comportement ne s'exprime pas. Nous discuterons ici les résultats obtenus durant cette thèse en détaillant l'importance de l'état physiologique dans la modulation du comportement de recherche de l'hôte chez les insectes hématophages. Cela inclut une absence de recherche de l'hôte à l'extérieur d'une fenêtre spécifique d'activité (chapitre 1), immédiatement après la mue (chapitre 2), mais également après un repas sanguin (chapitre 3). Cette modulation de la fréquence d'ingestion de sang est également importante d'un point de vue épidémiologique parce que cela détermine la fréquence potentielle de transmission de parasites.

Modulation journalière du comportement de recherche de l'hôte et importance des horloges internes

L'alimentation des insectes hématophages est soumise à de très fortes contraintes temporelles liées à l'accessibilité des hôtes et à l'évitement des prédateurs et des parasites. Une des manières de s'exposer la moins possible à la prédation, est de se synchroniser avec la période de repos de ces hôtes / prédateurs. En termes de sélection naturelle, il apparaît plus adaptatif que le comportement de recherche alimentaire soit observé durant des périodes d'activité maximale des insectes coïncidant avec la période de repos des leurs hôtes. Selon Edman et Scott (1987), le comportement défensif de l'hôte est une force de sélection importante, impliquée dans l'évolution des mécanismes inhibant le comportement de recherche de l'hôte à des moments inappropriés pour les insectes. En effet, les hôtes ont développé diverses réactions de défense contre les parasites. Ces défenses consistent en un complexe d'adaptations visant à prévenir l'attaque, réduire les capacités de reproduction, ou augmenter la mortalité des parasites. Parmi ces réactions, plusieurs sont d'ordre comportemental (migrations saisonnières ou journalières, toilettage (*grooming*), et d'autres moyens mécaniques d'élimination des ectoparasites) ou d'ordre immunologique (Klowden, 1979; Wikel, 1982). Les études menées sur les mouches des sables (Kelly *et al.*, 1996), le moustique (Edman *et al.*, 1972), les taons (Waage et Davies, 1986), la mouche tsé-tsé (Vale, 1977), et les punaises hématophages (Schofield, 1982), ont en effet montré que plus l'hôte est défensif, plus la probabilité que l'insecte soit interrompu avant d'avoir pu se nourrir ou avant d'être alimenté à réplétion, augmente.

Chez *R. prolixus*, nous avons montré que la réponse comportementale associée à des odeurs impliquées dans le comportement de recherche de l'hôte est modulée de façon spécifique, et coïncide avec la période d'inactivité de leurs hôtes / prédateurs. Durant la journée, période de repos des hôtes, les triatomines sont principalement inactives et souvent trouvées dans un état quiescent ou d'akinésie, agrégées à l'intérieur de leurs refuges. Durant la nuit, ces insectes effectuent la majeur partie de leur activité quotidienne, i.e. recherche de nourriture, de partenaires sexuels, de sites d'oviposition etc… (Lazzari, 1992 ; Lorenzo et Lazzari, 1998). Dans leur milieu naturel, ces insectes sont exposés en permanence aussi bien à des odeurs émanant de leurs hôtes qu'à des phéromones d'agrégation émanant des fèces déposées à l'entrée des refuges. Néanmoins, nous avons observé qu'ils montrent une variation journalière spécifique de leur réponse comportementale à ces odeurs. Au crépuscule, moment où les punaises quittent leurs refuges à la recherche d'un repas sanguin, elles sont uniquement

attirées par des odeurs émanant des hôtes comme le CO_2 (Barrozo *et al*., 2004 ; Bodin *et al.*, 2008). A l'aube, ces insectes sont uniquement attirés par les phéromones d'agrégation contenues dans leurs fèces, même si des odeurs émanant des hôtes sont également présentes (Bodin *et al.*, 2008). Cette fenêtre temporelle correspond au moment où les insectes retournent dans leurs refuges afin d'y passer la journée à l'abri des prédateurs. Par conséquent, le moment où la réponse maximale pour une odeur spécifique est observée correspond au contexte comportemental auquel cette odeur est associée. Moduler la réponse à ces signaux est donc crucial pour la survie de ces insectes. De plus, nos expériences ont permis de mettre en évidence l'existence d'une horloge circadienne (horloge interne) gouvernant la réponse comportementale de *R. prolixus* au CO_2. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été démontré précédemment sur une espèce voisine, *T. infestans* (Barrozo *et al.*, 2004). Chez d'autres insectes hématophages, ces rythmes journaliers ont été majoritairement observés pour l'activité locomotrice, comme chez les moustiques ou les mouches tsé-tsé (Taylor et Jones, 1969; Jones *et al.*, 1972; Brady, 1972; Jones, 1976, 1982; Rowland, 1989; Pandian, 1994), mais pas pour des odeurs associées à la recherche alimentaire.

Hormis l'avantage d'être actif durant une période de repos des hôtes, quel est la signification biologique pour les triatomines de limiter leur réponse comportementale aux odeurs de l'hôte dans une seule fenêtre temporelle ? Après un repas sanguin et à l'extérieur de leurs refuges, ces insectes vont subir une importante diurèse (Maddrell, 1963, 1964a, 1964b). Ils vont ensuite retourner dans leurs refuges pour y passer la journée à l'abri de la prédation, dans un état inactif. Si leur motivation pour répondre à des odeurs émanant des hôtes et pour s'alimenter restaient les mêmes, et élevées, pendant leurs deux pics d'activité (début et fin de nuit), ces insectes pourraient alors s'alimenter durant la fin de la nuit. Par conséquence, ils pourraient être surpris par le jour et le réveil de leur hôtes / prédateurs et s'exposeraient à un risque de prédation important. De plus, ils élimineraient leurs fèces et urines à l'intérieur de leurs refuges. L'importance de l'élimination des produits de l'excrétion à l'extérieur des refuges a été préalablement discutée par Lorenzo et Lazzari (1996). En effet, les fèces jouent le rôle de marques chimiques déposées à l'entrée des refuges pour aider les punaises à les localiser. De plus, une excrétion à l'extérieur de ces refuges évite la présence de déchets toxiques et d'éventuels parasites à l'intérieur de ceux-ci. De ce fait, la limitation de la réponse comportementale aux stimuli de l'hôte pendant la première partie de la nuit prendrait son sens.

L'existence de rythmes circadiens, i.e. cycles auto-soutenus de période spontanée d'à peu près 24h (entre 20 et 28h), contrôlés par des oscillateurs internes, a été démontrée chez

presque tous les organismes (Aschoff, 1989). Chez les insectes, de nombreuses études ont été menées sur la variation de la sensibilité sensorielle au niveau périphérique, et ont révélé l'existence de rythmes journaliers de réponse sensorielle. Chez *R. prolixus*, le contrôle circadien de la réponse comportementale aux odeurs émanant des hôtes (comme le CO_2) se traduit par la possibilité, pour ces insectes, de renforcer la synchronisation de leur période d'activité de recherche alimentaire avec la période de repos de leur hôtes, indépendamment de toutes modifications environnementales. Cela permet alors aux insectes d'anticiper la période de repos des hôtes et de diminuer les risques important de prédation lors de la recherche et de l'acquisition d'un repas sanguin. Néanmoins, pour d'autres odeurs, comme les phéromones d'agrégation, intervenant dans un contexte comportemental différent, cette réponse est apparue sous le contrôle de variables externes (i.e. le cycle environnemental de lumière). C'est la première fois qu'il est observé un contrôle différentiel (horloge circadienne et variable environnementale) de l'olfaction (Bodin *et al.*, 2008).

Modulation du comportement de recherche de l'hôte après l'émergence

L'apparition du comportement de recherche de l'hôte dans une fenêtre temporelle spécifique et une synchronisation avec la période de repos des hôtes / prédateurs n'est pas forcement suffisant pour assurer un succès alimentaire et un évitement total de la prédation chez les insectes hématophages. Encore faut-il être apte physiologiquement pour acquérir et digérer un repas sanguin. En effet, il existe certains moments dans la vie de ces insectes où certaines modifications physiologiques pourraient entraîner une difficulté de recherche de l'hôte. Après l'émergence, il existe, chez de nombreux insectes, une période de maturation morphologique et physiologique terminant le processus de mue (e.g. durcissement des pièces buccales, préparation de la voie enzymatique pour la digestion des aliments…). Chez les moustiques femelles de l'espèce *Ae. aegypti*, il a été mis en évidence un développement progressif des récepteurs antennaires à l'acide lactique retardant de 2 à 3 jours l'initiation du comportement de recherche de l'hôte (Davis, 1984a). Une absence de recherche alimentaire a également été observée chez *Ae. atropalpus,* cependant les récepteurs à l'acide lactique se développent plus rapidement (12h). L'absence de réponse attractive aux composés de l'hôte depuis l'émergence jusqu'à la fin du premier cycle gonotrophique ne pourrait pas être attribué au délai de développement du système sensoriel périphérique (Bowen *et al*., 1994a; Bowen *et al*., 1994b). Chez cette espèce, les auteurs proposent que la distension de l'abdomen due à la maturation des ovocytes dans les ovaires inhibe le comportement de recherche de l'hôte

pendant le premier cycle gonotrophique (Bowen et *al.*, 1994b) et ne peuvent donc pas conclure sur le rôle potentiel de la mue dans cette modulation. Les moustiques étant hématophages uniquement durant leur stade adulte, il est donc difficile de différencier l'influence de la mue de celle d'autres facteurs physiologiques. En effet, immédiatement après l'émergence, ces insectes initient leur comportement de recherche de partenaires sexuels pour l'accouplement, et développent leurs follicules ovariens sous influence hormonale.

R. prolixus s'est avéré être un bon modèle expérimental pour étudier comment est modulé le comportement de recherche de l'hôte après la mue en s'affranchissant de l'influence potentielle de la reproduction, de la dispersion et des autres activités se réalisant durant le stade adulte. En effet, ces insectes hématophages sont hémimétaboles et se nourrissent de sang durant tout leur développement (stades larvaires et stade adulte). Chez cette espèce, nous avons montré qu'il existe, immédiatement après la mue larvaire, une période d'absence de réponse comportementale aux principaux signaux émanant des hôtes que sont le CO_2 et la chaleur. Cette inhibition comportementale est néanmoins différente selon le facteur testé. Les punaises ne deviennent attirées par le CO_2 qu'à partir d'une semaine après leur mue, alors que le développement de la réponse à la chaleur se fait graduellement, pour atteindre une réponse maximale à partir de 10 jours après la mue. Durant chaque stade de développement chez *R. prolixus*, un repas sanguin est obligatoire et nécessaire pour le développement futur de l'insecte. Ainsi, une absence de réponse aux facteurs attractifs de l'hôte semble être probablement liée à l'acquisition de capacités morphologiques (e.g. la sclérotinisation des pièces buccales) ou physiologiques (e.g. synthèse d'enzymes de digestion du sang) pour obtenir et digérer un repas sanguin. Cette inhibition permettrait aux punaises de compléter leur développement physiologique à l'intérieur de leurs refuges à l'abri de toute prédation. De plus, des réserves alimentaires étant encore présentes dans le tube digestif de l'insecte après sa mue, l'assimilation de ses réserves permettrait à l'insecte de gagner du temps avant un prochain repas sanguin en terminant sa préparation physiologique.

Modulation du comportement de recherche de l'hôte après l'alimentation

La taille du repas sanguin est un compromis entre deux impératifs : limiter les risques et les coûts d'un part – donc contacter le nombre minimal d'hôtes pour satisfaire ses besoins – et conserver l'aptitude à se déplacer et à préserver l'équilibre hydrique de l'organisme d'autre part. Différentes façons de résoudre ce compromis ont été développées. La mouche Tsé-tsé vit

associée à un troupeau qu'elle suit lors de ses déplacements et absorbe de manière répétée de petites quantités de sang. Les femelles Tsé-tsé sont des insectes vivipares et ces nombreux repas sont indispensables au développement de la larve dans l'oothèque de la femelle. Les triatomines, au contraire, peuvent se contenter d'un unique repas d'intermue, qui représente plus de 5 fois leur propre poids (Soares *et al.*, 2000 ; Guarneri *et al.*, 2003). Après ce repas, ces punaises vont s'abriter dans un refuge et limiter leurs déplacements. Chez les insectes hématophages, un système de diurèse adapté permet de gérer de grandes quantités de liquide et de déchets azotés. Chez *R. prolixus,* les larves de dernier stade, qui pèsent environ 60 mg à jeun, produisent 150 mg d'urine au cours des 6h qui suivent l'alimentation (Maddrell, 1963, 1964a, 1964b). Cette importante augmentation de poids après le repas sanguin fait que l'insecte aura des difficultés à se déplacer et sera donc plus vulnérable à la prédation. Il semble alors important pour ces insectes de ne pas s'engager dans une nouvelle recherche de l'hôte pendant un stade vulnérable, c'est-à-dire, avant d'avoir digéré une quantité maximale de sang. Une modulation de comportement de recherche de l'hôte par l'état nutritif apparaît alors adaptative.

L'influence de l'état nutritif sur le comportement de recherche alimentaire chez les insectes hématophages a été très largement étudiée chez les moustiques femelles, mais ces études ont principalement porté sur l'interaction entre état nutritif et état reproductif (Klowden, 1981, 1990, 1995, 1997 ; Klowden et Briegel, 1994 ; Klowden et Lea, 1979a, 1979b ; Klowden *et al.*, 1987). Chez ces insectes, le repas sanguin est pris uniquement durant le stade adulte et est nécessaire et indissociable de l'ovogenèse. Les femelles se nourrissent de sang dans le but d'acquérir des protéines à allouer au développement de leurs œufs. Après l'initiation du cycle gonotrophique par le repas sanguin, le comportement de recherche de l'hôte est alors inhibé jusqu'à, selon les espèces, la maturation des œufs ou l'oviposition (Klowden et Briegel, 1994). Pour ces femelles, la reproduction est dépendante de l'alimentation, et l'alimentation est en retour, influencée par les processus de reproduction. Produire des œufs et s'accoupler implique de s'alimenter et donc s'exposer aux hôtes vertébrés, qui jouent aussi un rôle de prédateur. Il existe donc un compromis entre deux traits d'histoire de vie que sont la survie et la reproduction. Une fois le premier repas sanguin ingéré et la maturation des œufs initiée, un second repas sanguin au cours du cycle gonotrophique n'entraînerait pas nécessairement une hausse de la fécondité (Lea *et al.*, 1978) et s'exposer à un hôte au comportement défensif influerait directement sur la *fitness* des femelles (Edman et Scott, 1987). Il est alors important pour les femelles de ne pas s'engager dans la recherche d'un hôte si un nouveau repas sanguin n'est pas nécessaire.

Chez les insectes hématophages hémimétaboles, hématophages obligatoires durant toute leur vie, aucune information n'est disponible concernant la modulation de la recherche de l'hôte par l'état nutritif. Même si la reproduction et l'activité ovarienne peuvent moduler l'activité de recherche alimentaire chez les femelles, cela ne sera pas le cas pour les mâles ou les larves qui sont soumis au même compromis entre survie (éviter la prédation) et alimentation, puisqu'ils se nourrissent également de sang. Nos expériences ont montré que l'état nutritif module le comportement de recherche de l'hôte chez cet insecte. Cette modulation affecte la réponse comportementale des individus à des facteurs de modalités différentes (CO_2 et chaleur), mais également leur motivation à s'alimenter, et ceci à la fois chez les larves et les adultes. Une découverte intéressante de notre travail a été que les insectes testés peuvent montrer une réponse attractive, indifférente ou répulsive face aux facteurs de l'hôte. C'est la première fois qu'il est clairement établi chez un insecte hématophage, que des facteurs attractifs de l'hôte dans certains contextes peuvent devenir, dans d'autres contextes, des facteurs répulsifs.

Chez les larves, un seul repas sanguin à réplétion est suffisant et nécessaire pour le passage des insectes au stade suivant. Après un repas sanguin à réplétion, ces insectes vont présenter différentes phases comportementales en réaction aux facteurs testés. Immédiatement après le repas, ces larves présentent une phase d'inhibition comportementale aussi bien pour le CO_2 que pour la chaleur. Dans les jours suivants, les larves vont montrer une phase de répulsion pour le CO_2, tout en restant inhibées pour répondre à la chaleur. Cela montre que ces insectes ne s'engagent pas dans une activité de recherche alimentaire s'ils ont préalablement obtenus un important repas sanguin. Le CO_2 va donc devenir un facteur répulsif pour ces insectes, qui vont s'en servir pour s'éloigner de leurs hôtes s'ils s'en approchent par inadvertance. Durant son dernier stade larvaire, *R. prolixus* ne s'engage donc plus dans une nouvelle recherche alimentaire après un important repas sanguin. De plus à proximité de la mue adulte (20 à 27 jours après un repas, Lent et Valderrama, 1977), ces insectes montrent également une phase de répulsion comportementale face au CO_2. Ces insectes vont alors rester à l'intérieur de leurs refuges, à l'abri de la prédation, pour se préparer à la mue adulte qui va demander un investissement important en ressources.

Des résultats similaires à ceux des larves, à savoir différentes phases d'inhibition et de répulsion, ont été obtenus chez les adultes femelles. Cependant, un retour à une attraction pour le CO_2 a été observé 20 jours après un important repas sanguin. Bien que les femelles testées soient restées vierges, il n'est pas possible d'exclure, en plus de l'intervention de l'état nutritif, un potentiel rôle du développement ovarien et de la maturation des œufs dans la

modulation du comportement de recherche de l'hôte, puisqu'il est établi, chez cette espèce, que l'alimentation déclenche la mise en place des processus hormonaux liés à la vitellogenèse (Davey, 2007). En effet, la phase de répulsion comportementale face au CO_2 observée chez ces femelles coïncide avec le moment où leur motivation pour l'oviposition est supposée être maximale (Davey, 1965). Chez les adultes mâles, au contraire, une inhibition comportementale face aux deux facteurs testés (CO_2 et chaleur) a été observée tout au long des expériences. Un seul repas sanguin serait alors suffisant pour que les mâles survivent pendant plusieurs semaines sans devoir se réexposer à la prédation. Ils pourraient alors pendant cette période entreprendre uniquement une recherche de partenaires sexuels. De plus, ils auraient besoin d'une quantité de sang moins importante que les femelles puisqu'ils n'ont pas d'œufs à développer. Lorsque ces insectes ont été nourris à réplétion avant les expériences, les femelles ont ingéré une quantité de sang significativement plus importante que les mâles (44 % en plus, le poids moyen des mâles alimentés étant de 135,1 ± 15,4 mg contre 181,7 ± 55,7 mg pour les femelles). La consommation par les femelles d'un plus grand volume de sang est expliquée par les besoins en énergie qu'implique la production d'œufs. Uribe (1926) a observé que les femelles sont plus actives et s'alimentent plus régulièrement que les mâles.

En explorant les bases physiologiques de cette modulation de la recherche alimentaire par l'état nutritif, nous avons pu montrer l'intervention de deux mécanismes physiologiques indépendants. La distension abdominale engendrée par l'acquisition d'un grand volume de sang et des facteurs humoraux transportés par l'hémolymphe participeraient à la modulation de ce comportement. En effet, après un repas artificiel composé de solution saline, les larves ont montré une inhibition comportementale aux facteurs attractifs de l'hôte (CO_2 et chaleur). Cependant, aucune phase répulsive n'a été observée suggérant le rôle d'un ou de plusieurs composés du sang dans le déclenchement de la répulsion. Les mêmes résultats ont été obtenus en transférant de l'hémolymphe de larves préalablement alimentées dans des larves à jeun. Ces larves à jeun, normalement attirées par le CO_2 et la chaleur, ont montré une inhibition pour ces deux facteurs durant plusieurs jours, suggérant une intervention persistante dans le temps, d'un ou de plusieurs facteurs humoraux transportés via l'hémolymphe.

Ces résultats montrent le caractère adaptatif de la modulation du comportement de recherche de l'hôte par l'état nutritif, qui limite les expositions à la prédation. Des mécanismes physiologiques, hormonaux et comportementaux ont été sélectionnés, inhibant le comportement de recherche de l'hôte à des moments de la vie de l'insecte où il ne serait pas nécessaire de s'exposer aux hôtes.

La vie en association avec un hôte vertébré apporte de nombreux avantages aux insectes hématophages. Les refuges dans lesquels s'abritent ces insectes (nids d'oiseaux, terriers de rongeurs, habitations humaines…) offrent des environnements stables en termes de température et d'humidité, et les insectes sont moins exposés aux prédateurs tout en étant proche de leurs sources alimentaires potentielles. Cependant, adopter l'hématophagie implique d'être capable de résoudre quelques problèmes majeurs, principalement, obtenir un repas sanguin qui n'est pas directement accessible et jamais au même endroit. En effet, le sang circule à l'intérieur de vaisseaux sanguins sous la peau d'hôtes mobiles, qui peuvent jouer, à la fois, le rôle de source de nourriture et de prédateurs. Se nourrir de sang demande également de nombreuses adaptations physiologiques : l'habilité à digérer du sang, gérer un stress oxydatif produit par les radicaux hèmes issus de l'hémoglobine, et établir des associations symbiotiques afin d'obtenir des éléments essentiels absents, ou en quantité inférieur à celles nécessaires. Le volume hydrique est également un problème important à résoudre. Un repas sanguin est riche en eau et peut représenter plusieurs fois le poids de l'insecte. De ce fait, les insectes hématophages sont soumis à un stress hydrique important dû à l'excès d'eau après un repas sanguin et à l'opposé, un déficit hydrique, en cas de jeun prolongé. Différentes stratégies comportementales ont été mises en place par ces insectes afin de faire face à ces différents problèmes, et pouvoir se nourrir efficacement sur un hôte vertébré vivant. L'état physiologique modulant de manière importante le comportement de recherche de l'hôte chez *R. prolixus* (figure 1), comment se déroule une journée typique dans la vie de cet insecte ?

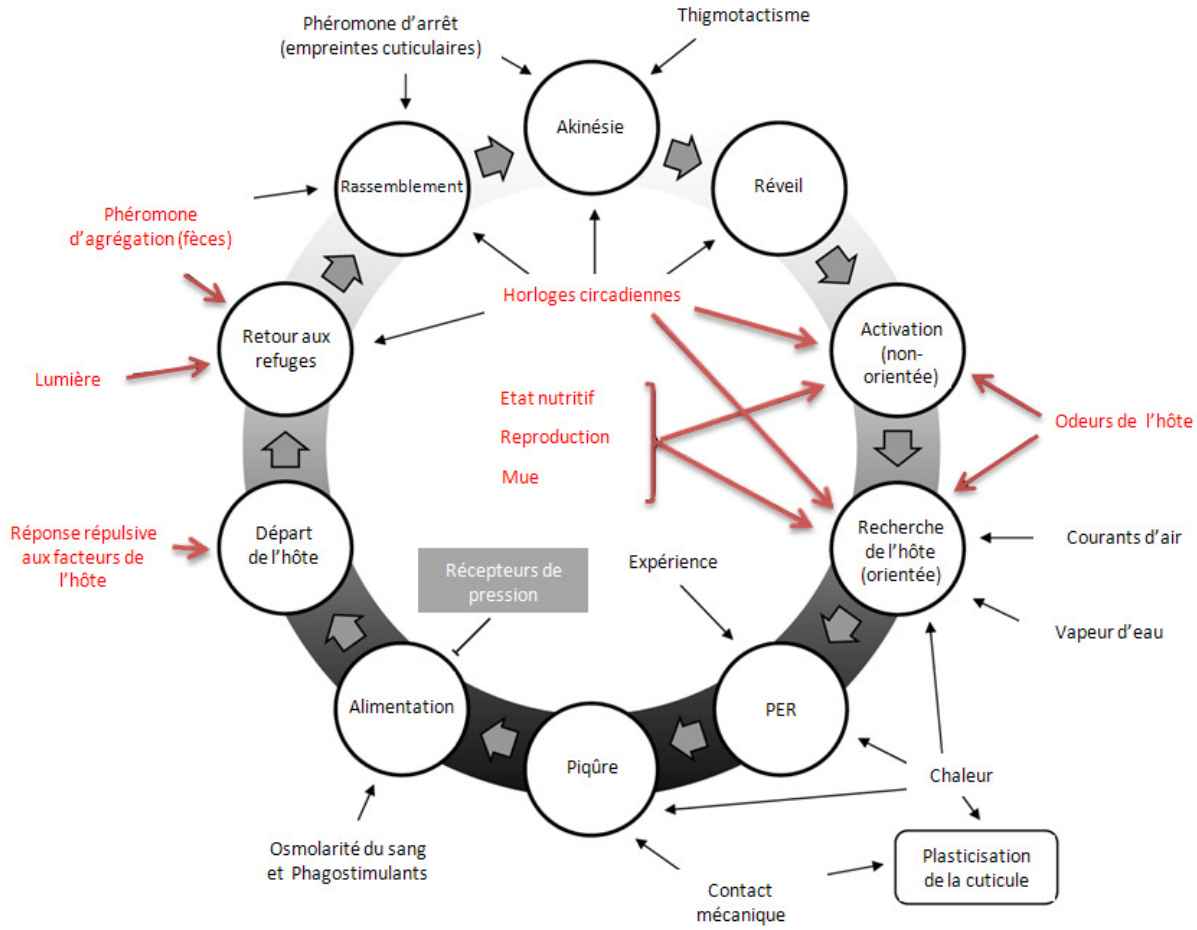


Figure 1 : Diagramme représentant la série d'événements se déroulant dans une nuit typique d'une nymphe de triatomines (adapté d'après Guerenstein et Lazzari, 2008). Cela représente l'effet de facteurs endogènes ou motivationnels (à l'intérieur de l'anneau de cercles) et exogènes (à l'extérieur) sur les différents comportements réalisés lorsque les punaises s'alimentent. Les différents paramètres étudiés pendant cette thèse sont représentés en rouge. Durant la journée, l'insecte reste immobile (i.e. en akinésie, Wigglesworth et Gillet, 1934) à l'intérieur de son refuge jusqu'à ce que le système circadien l'entraîne à se « réveiller » (Lazzari, 1992). L'animal va commencer à bouger, et éventuellement va quitter son refuge (Lorenzo et Lazzari, 1998). Une exposition à des odeurs provenant des hôtes active l'insecte et augmente ses chances de rentrer en contact avec d'autres facteurs attractifs le guidant vers une potentielle source de nourriture. La sensibilité olfactive pour des odeurs de l'hôte est modulée par une horloge circadienne (Barrozo *et al.*, 2004 ; Bodin *et al.*, 2008) et dépend de l'état physiologique de l'individu (chapitre 2 et 3). La chaleur émanant du corps de l'hôte engendre la réponse d'extension du proboscis (PER), la chaleur est le seul facteur nécessaire et suffisant pour engendrer ce PER, qui peut être modulé par l'expérience (Lallement, 2007). A ce stade, l'animal doit trouver un vaisseau sanguin « caché » sous la peau de l'hôte, cette tâche est guidée par les thermorécepteurs antennaires (Ferreira *et al.*, 2007). Le contact mécanique avec la surface chaude de la peau entraîne l'insertion des pièces buccales et la plasticisation de la cuticule de la larve qui permet à l'insecte de prendre un important repas sanguin (Ianowski *et al.*, 1998). L'osmolarité et les composés chimiques permettent à l'insecte de reconnaître le sang et de commencer le repas (Friend et Smith, 1977; Guerenstein et Núñez, 1994). La stimulation des récepteurs de pression de l'abdomen (Anwyl, 1972; Chiang et Davey, 1988) arrête le repas quand l'animal est gorgé. Après le repas, l'insecte quitte son hôte en utilisant certains facteurs émanant de celui-ci comme de répulsifs (chapitre 3). A la fin de la nuit, il retourne à l'intérieur de son refuge pour y passer la journée à l'abri, en étant guidé par des phéromones d'agrégation et d'arrêt (Lorenzo et Lazzari, 1996, 1998) sous l'influence du cycle naturel de lumière (Bodin *et al.*, 2008).

Trouver un hôte et se nourrir sont des comportements faisant parti d'un répertoire comportemental complexe que les triatomines réalisent durant la nuit. Ces insectes, particulièrement ceux en association étroite avec l'habitat humain, passent une grande partie du jour dans un état d'akinésie à l'abri dans leurs refuges. Pendant ce temps, leurs hôtes diurnes sont actifs. Ce comportement d'akinésie est contrôlé par des variables externes, comme les phéromones de rassemblement et les stimulations tactiles du substrat et des congénères (i.e. ces insectes montrent un thigmotactisme), en combinaison avec un état motivationnel interne d'inactivité contrôlé par le système circadien de l'insecte (i.e. horloge interne). Au crépuscule, quand les hôtes entrent dans leur période de repos, ces insectes se « réveillent » et quittent leur refuges pour s'infiltrer dans un environnement extérieur abondant en facteurs attractifs révélant la présence d'hôtes. Ce comportement d'activité spontanée est sous l'influence d'une horloge interne (Lazzari, 1992). Des composés volatiles émanant de la peau des hôtes et de leur respiration (majoritairement le CO_2) se diffusent et sont transportés via des courants d'air. Ces composés chimiques vont activer les insectes et les entraîner à la recherche d'autres éléments pouvant les orienter vers un hôte potentiel. Cette réponse comportementale aux odeurs de l'hôte est directement influencée par un facteur endogène, i.e. sous le contrôle d'une horloge interne (chapitre 1). Cependant, l'état physiologique des individus va moduler ce comportement de recherche. Les insectes venant tout juste de muer ne s'engageront pas immédiatement dans une recherche alimentaire, ils termineront leur maturation physiologique à l'intérieur des refuges pendant près d'une semaine (chapitre 2). De la même manière, les insectes déjà entrés dans le processus de mue ne s'engagent pas dans une recherche alimentaire, ils se préparent à passer au stade suivant à l'abri dans les refuges (chapitre 3). Enfin, le temps écoulé depuis le précédent repas est important pour déterminer si l'insecte s'engage ou non dans une nouvelle recherche alimentaire (chapitre 3).

Les insectes qui vont s'engager dans la recherche d'un hôte, rencontre, à mesure qu'ils se déplacent (principalement par la marche), d'autres facteurs (e.g. chaleur) pouvant renforcer la valeur appétitive des émanations. Une fois à proximité d'un hôte, l'insecte doit trouver un endroit adéquat pour piquer et trouver un vaisseau sanguin. Pour cela, la chaleur joue un rôle clé. La chaleur est le seul facteur à la fois nécessaire et suffisant pour induire une extension du proboscis (PER), amenant l'insecte en contact direct avec la peau de l'hôte via ses pièces buccales. Cependant comme nous avons pu le voir à plusieurs reprises lors de nos expérimentations, l'extension du proboscis n'induit pas forcément que l'insecte va s'alimenter. L'état physiologique des insectes influence également ce comportement de prise de repas. Afin de trouver un vaisseau sanguin, l'insecte peut répéter une série de piqûre au

hasard jusqu'à ce qu'il trouve un vaisseau. Cependant, cette stratégie augmente le risque d'être détecté par l'hôte. Les triatomines sont alors capables de détecter des discontinuités de chaleur à la surface du corps d'un hôte, pour ne piquer que dans un vaisseau sanguin (Ferreira *et al*., 2007). Quand le proboscis d'une nymphe rentre en contact avec une source de chaleur, un changement des propriétés mécaniques de la cuticule de l'abdomen intervient et l'insecte se « plasticise » (Bennet-Clark, 1962). Ce processus se déroule à chaque fois que l'insecte essai de s'alimenter, même s'il n'ingère pas de sang (Ianowski *et al*., 1998 ; Melcón *et al*., 2005). Cela permet à l'abdomen d'accueillir une importante quantité de sang.

Une fois les stylets à l'intérieur d'un vaisseau sanguin, l'osmolarité du sang et la présence de phagostimulants (comme l'ATP) confirme à l'insecte que le sang est acceptable et que l'ingestion de sang peut commencer (Friend et Smith, 1977 ; Guerenstein et Núñez, 1994). S'il n'est pas perturbé, un repas sanguin peut atteindre 5 à 10 fois le poids de l'insecte à jeun, et parfois plus. Le signal impliqué dans l'arrêt du repas provient des mécanorécepteurs de pression de l'abdomen (Anwyl, 1972 ; Chiang et Davey, 1988). Une fois détaché de son hôte, l'insecte s'enfuit pour ne pas être détecté ou tué par celui-ci. Nous avons pu montrer que les mêmes facteurs servant d'attractifs pour ces insectes vers les hôtes (i.e. le CO_2), sont utilisés comme répulsif pour s'en éloigner (chapitre 3).

Une fois alimentés, les insectes vont subir une diurèse importante puis retourner dans leurs refuges. Ce retour s'effectue à la fin de la nuit où les insectes sont uniquement attirés par des repères chimiques contenus dans les fèces, déposées à l'entrée des refuges pour en indiquer la localisation (Lorenzo et Lazzari, 1996). Ces substances constituent une des phéromones d'agrégation des triatomines (Schofield et Patterson, 1977 ; Lorenzo Figueiras *et al*., 1994). Ce comportement de réponse aux phéromones d'agrégation est apparu sous l'influence directe du changement environnemental journalier d'intensité lumineuse (chapitre 1). Une seconde phéromone d'agrégation, associée à des molécules cuticulaires de l'insecte, est déposée à l'intérieur des refuges et permet aux insectes de rester agrégé les uns à coté des autres par thigmotactisme (Lorenzo Figueiras et Lazzari, 1998b). Les insectes restent alors inactifs à l'intérieur des refuges durant toute la journée. Une horloge interne déterminera le moment où les insectes se « reveilleront » pour réaliser un nouveau cycle d'activité (Lazzari, 1992). Les insectes nourris à réplétion durant le précédent cycle ne ressortiront pas. En effet, le comportement de recherche d'hôtes sera inhibé par la distension de l'abdomen de ces insectes nourris, et la présence d'un facteur transporté dans l'hémolymphe prolongera cette inhibition (chapitre 3).

D'un point de vue épidémiologique, nos résultats apportent de nouvelles données quantitatives pour les modèles mathématiques de prédiction du taux d'alimentation et du taux de transmission parasitaire, cela permet également de valider des données précédentes. Par exemple, Rabinovich *et al*. (1979) analysèrent les fréquences des piqûres et de l'ingestion de sang chez des punaises domestiques de l'espèce *R. prolixus* au Venezuela. Ces auteurs obtinrent de leur modèle un temps minimal de 6,8 jours entre la mue et la première alimentation, ce qui correspond exactement aux 7 jours observés dans le délai de la réponse au CO_2 et de la motivation maximale pour s'alimenter.

Cependant, les données que nous avons obtenues ne vont pas dans le sens d'une transmission optimale des parasites. En effet, dans nos conditions expérimentales, de nombreux facteurs physiologiques modulent la recherche alimentaire chez ces insectes. Cela se traduit alors par une exposition minimale à la prédation, avec, dans le cas des larves, un seul repas sanguin par stade pour passer au suivant. Ceci ne maximise donc pas les chances de transmission pour les parasites.

Chez d'autres insectes hématophages, des données de terrains de Klowden et Briegel (1994) indiquent que chez certaines espèces de moustiques (e.g. *An. gambiae*), plusieurs repas sanguins ont lieu au cours d'un même cycle gonotrophique. Des explications sont données par Klowden (1990) qui explique que le comportement défensif des hôtes pourrait empêcher les insectes de prélever suffisamment de sang pour déclencher l'inhibition due à la distension de l'abdomen. En effet, le succès d'alimentation peut varier en fonction de l'intensité des piqûres sur l'hôte. Plus la densité d'insectes se nourrissant sur un même hôte par unité de temps est grande, plus l'hôte devient défensif et plus l'alimentation *per capita* est faible (Edman *et al.*, 1972). De plus, la capacité de distension et le taux de réduction de la distension varient avec l'âge et la taille du moustique chez *Ae. aegypti* et *An. gambiae* (Klowden et Lea, 1980; Takken *et al.*, 1998). Chez ces espèces, l'hôte pourrait donc participer, à son insu, à une augmentation du taux de transmission parasitaires en augmentant le nombre de contacts entre hôte et vecteur.

L'étude des stratégies employées par les parasites afin d'être transmis d'un hôte à un autre est un sujet central en parasitologie. Comprendre de telles stratégies est fondamental pour tous les aspects appliqués de la parasitologie comme l'épidémiologie et la médecine. L'une des stratégies de transmission parasitaire les plus fascinantes est certainement la

manipulation de l'hôte, observée quand un parasite accroît sa transmission en altérant le comportement ou la morphologie de son hôte. Par exemple, de nombreux parasites transmis de manière trophique altèrent le comportement de leur hôte intermédiaire afin d'augmenter leur chance d'être mangé par l'hôte définitif prédateur. Aucunes données n'existent concernant l'impact des parasites sur la modification du comportement chez les triatomines. Il serait extrêmement intéressant d'étudier comment les parasites peuvent augmenter leur chance d'être transmis à un hôte. Modifient-ils le comportement de ces insectes en augmentant leur fréquence d'alimentation indépendamment de leur état physiologique ? Elargissent-ils leur fenêtre d'activité de recherche alimentaire et de réponse aux odeurs des hôtes ? Ces études permettraient un meilleur contrôle de ces populations infectées et donc de la maladie de Chagas en elle-même.

PERSPECTIVES

Je voudrais conclure cette Thèse en évoquant deux aspects que je considère importants par rapport aux efforts présents et futurs dédiés à l'étude de la transmission de parasites par les insectes vecteurs de maladies, et dont l'importance a été mise en évidence au long de ce travail.

Le premier point concerne l'importance capitale de prendre en compte et de standardiser l'état physiologique des individus lors de l'analyse expérimentale de leur comportement vis-à-vis de divers stimuli. Nos expériences ont révélé clairement qu'un stimulus particulier peut avoir des effets différents ou même opposés selon le contexte temporel ou l'état physiologique de l'insecte. C'est-à-dire, le non prise en compte de ces paramètres compromettra non seulement la reproductibilité des expériences par d'autres, mais aussi la validité des conclusions. Par exemple, des stimuli fortement attractifs sont susceptibles d'être classés comme indifférents, i.e. des faux négatifs. Je crois que cette recommandation est valable pour tous les insectes hématophages, étant donnée les résultats obtenus précédemment chez les moustiques et maintenant chez les triatomines.

Le deuxième point que je voudrais signaler s'avère important pour les chercheurs intéressés à l'étude d'un aspect crucial de la transmission de parasites par les insectes vecteurs : la manipulation du comportement du vecteur. Le présent travail de thèse décrit comment la recherche de l'hôte est modulée par des facteurs endogènes, autrement dit, comment elle varie en fonction de l'état physiologique de l'insecte. Cette modulation agit de manière très adaptative, en optimisant les chances de l'insecte de se nourrir efficacement, tout en minimisant les risques de prédation. Du point de vue du parasite, par contre, cette stratégie ne maximise pas ses chances d'infecter de nouveaux hôtes. Cependant, tout décalage temporel ou déclanchement du comportement de recherche alimentaire lorsque l'insecte n'a pas besoin de se nourrir, les expose à être repérés par les hôtes / prédateurs. Il faut signaler que la piqûre ou les événements associés à celle-ci, comme la défécation, ne constituent pas les seuls moyens de transmission des parasites. L'écrasement ou l'ingestion de l'insecte constituent également des mécanismes capables de mettre en contact le parasite avec la peau ou la muqueuse buccale de l'hôte. Ces deux types de contact peuvent engendrer une infection de l'hôte vertébré. Il est alors possible que les mécanismes physiologiques impliqués dans la modulation de la réponse aux stimuli de l'hôte constituent des cibles pour les parasites afin de manipuler leurs hôtes. Ce travail de thèse permet d'identifier certaines de ces cibles potentielles (e.g. horloges circadiennes, facteurs transportés par l'hémolymphe) dont l'altération par les parasites mérite, à mon avis, une étude approfondie dans l'avenir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acree, F.Jr., Turner, R.B., Gouck, H.K., Beroza, M. et Smith, N. (1968). L-Lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. *Science*, 161: 1346-1347.

Altner, H. et Loftus, R. (1985). Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Annual Review of Entomology*, 30: 273-295.

Ampleford, E.J. et Steel, C.G.H. (1982). Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Physiology A*, 147: 281-286.

Anwyl, R. (1972). The structure and properties of an abdominal stretch receptor in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 18: 2143-2153.

Aschoff, J. (1989). Temporal orientation: circadian clocks in animals and humans. *Animal Behavior*, 37: 881-896.

Baker, T.C. et Cardé, R.T. (1979). Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholitha molesta* (Busck). *Journal of Insect Physiology*, 25: 943-950.

Balashov, Y.S. (1984). Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. *Annual Review of Entomology*, 29: 137-156.

Bar-Zeev, M., Maibach, H.I. et Khan, A.A. (1977). Studies on the attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to man. *Journal of Medical Entomology*, 12: 113-120.

Barrozo, R.B. et Lazzari, C.R. (2004a). The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chemical Senses*, 29: 319-329.

Barrozo, R.B. et Lazzari, C.R. (2004b). Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chemical Senses*, 29: 833-41.

Barrozo, R., Manrique, G. et Lazzari, C. (2003). The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug Triatoma infestans (Hemiptera, Reduviidae). *Journal of Insect Physiology*, 49: 315-321.

Barrozo, R.B., Minoli, S.A. et Lazzari, C.R. (2004). Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology*, 50: 249-254.

Batschelet, E. (1965). *Statistical methods for the analysis of problems in animal orientation and certain biological rhythms*. The American Institute of Biological Sciences, Washington, DC.

Bennet-Clark, H.C. (1962). Active control of the mechanical properties of insect endocuticle. *Journal of Insect Physiology*, 8: 627–633.

Berlyn, A.D. (1979). The effect of diet on the life-span and egg maturation of caged adult sheep headflies, *Hydrotaea irritans* (Fallen) (Diptera: Muscidae). *Bulletin of Entomological Research*, 69: 299-307.

Bernard, J. (1974). Etude électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hématophage chez un hémiptère: *Triatoma infestans*. Thèse de doctorat, Université de Rennes, France.

Bernier, U.R., Kline, D.L., Barnard, D.R., Schreck, C.E. et Yost, R.A. (2000). Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Analytical Chemistry*, 72: 747-756.

Bidlingmayer, W.L. et Hem, D.G. (1979). Mosquito (Diptera: Culicidae) flight behaviour near conspicuous objects. *Bulletin of Entomological Research*, 69: 691-700.

Bishop, A. et Gilchrist, B.M. (1946). Experiments on the feeding of *Aedes aegypti* through animal membranes with a view to applying this method to the chemotherapy of malaria. *Parasitology*, 37: 85-100.

Blaney, W.M., Schoonhoven, L.M. et Simmonds, M.S.J. (1986). Sensitivity variations in insect chemoreceptors; a review. *Experientia*, 42: 13-19.

Bogner, F. (1992). Response properties of CO_2-sensitive receptors in tse-tse flies (Diptera: *Glossina palpalis*). *Physiological Entomology*, 17: 19-24.

Bodin, A., Barrozo, R.B., Couton, L. et Lazzari, C.R. (2008). Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* doi:10.1016/j.jinsphys.2008.07.004, *in press*.

Bowen, M.F. et Davis, E.E. (1989). The effects of allatectomy and juvenile hormone replacement on the development of host-seeking behaviour and lactic-acid receptor sensitivity in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 3: 53-60.

Bowen, M.F., Davis, E.E., Haggart, D. et Romo, J. (1994a). Host-seeking behavior in the autogenous mosquito Aedes atropalpus. *Journal of Insect Physiology*, 40: 511-517.

Bowen, M.F., Davis, E.E., Romo, J. et Haggart, D. (1994b). Lactic Acid Sensitive Receptors in the Autogenous Mosquito *Aedes atropalpus*. *Journal of Insect Physiology*, 40: 611-615.

Bracken, G.K., Hanec, W. et Thorsteinson, A.J. (1962). The orientation of horseflies and deerflies (Tabanidae: Diptera). II. The role of some visual factors in the attractiveness of decoy silhouettes. *Canadian Journal of Zoology*, 40: 685-695.

Bracken, G.K. et Thorsteinson, A.J. (1965). The orientation behaviour of horse flies and deer flies (Tabanidae: Diptera). IV. The influence of some physical modifications of visual decoys on orientation of horse flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 8: 314-318.

Brady, J. (1972). Spontaneous, circadian components of tse-tse fly activity. *Journal of Insect Physiology*, 18: 471-484.

Brady, J. (1975). Circadian changes in central excitability - the origin of behavioural rhythms in tse-tse flies and other animals? *Bulletin of Entomological Research*, 50: 79-95.

Brady, J. et Crump, A.J. (1978). The control of circadian activity rhythms in tsetse flies: environment or physiological clock? *Physiological Entomology*, 3: 177-190.

Braks, M.A.H., Anderson, R.A. et Knols, B.G.J. (1999). Infochemicals in mosquito host selection human skin microflora and *Plasmodium parasites*. *Parasitology Today*, 15: 409-413.

Braks, M.A.H., Meijerink, J. et Takken, W. (2001). The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and l-lactic acid, in an olfactometer. *Physiological Entomology*, 26: 142-148.

Brown, A.W.A. (1951). Studies of the responses of the female *Aedes* mosquito. Part IV. Field experiments on Canadian species. *Bulletin of Entomological Research*, 42: 575-583.

Brown, M.R., Klowden, M.J., Crim, J.W., Young, L., Shrouder, L.A. et Lea, A.O (1994). Endogenous regulation of mosquito host-seeking behavior by a neuropeptide. *Journal of insect physiology*, 40: 399-406.

Browne, S.M. et Bennett, G.F. (1980). Colour and shape as mediators of hostseeking responses of simuliids and tabanids (Diptera) in the Tantramar marshes, New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Medical Entomology*, 17: 58-62.

Brumpt, E. (1919). *Précis de parasitologie.* Masson & Cie, Paris.

Burgess, L. (1959). Probing behaviour of *Aedes aegypti* (L.) in response to heat and moisture. *Nature*, 184: 1968-1969.

Bursell, E. (1984). Effects of host odour on the behaviour of tse-tse. *Insect Science and Its Application*, 5: 345-349.

Bursell, E., Gough, A.J.E., Beevor, P.S., Cork, A., Hall, D.R. et Vale, G.A. (1988). Identification of components of cattle urine attractive to tse-tse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, 78: 281-291.

Carcavallo, R.U., Curto de Casas, S.I., Galíndez Girón, I., Jurberg, J. et Mena Segura, C.A. (1995). Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion of genera and species of the tribes Alberproseniini, Bolboderini and Cavernicolini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Entomologia y Vectores*, 2: 127-144.

Carcavallo, R.U., Galíndez Girón, I., Jurberg, J. et Lent H. (1999). *Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas*. *Vol. 1, 2, 3.* Fiocruz, Rio de Janeiro.

Cardé, R.T., Cardé, A.M., Hill, A.S. et Roelofs, W.L. (1977). Sex pheromone specificity as a reproductive isolating mechanism among the sibling species *Archips argyrospilus* and *A. mortuanus* and other sympatric tortricine moths (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Chemical Ecology*, 3: 71-84.

Cardé, R.T., Webster, R., (1981). Endogenous and exogenous factors controlling insect sex pheromone production and responsiveness, particularly among the Lepidoptera. In: Scientific Papers of the Institute of Organic and Physical Chemistry of Wroclow Technical University, N°22, Conference 7 pp. 978-991.

Case, T.J., Washino, R.K. et Dunn, R.L. (1977). Diapause termination in *Anopheles freeborni* with juvenile hormone mimics. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 21: 155-162.

Castrovillo, P.J. et Cardé, R.T. (1979). Environmental regulation of female calling and male pheromone response periodicities in the codling moth (Laspeyresia pomonella). *Journal of Insect Physiology*, 25: 659-667.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana. Estudos sôbre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp.; ajente etiolojicode nova entidade mórbida do homen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218.

Chagas, C. (1916). Tripanosomiase americana. Forma aguda da molestia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 8: 37-60.

Chagas-Filho, C. (1968). Histórico sobre doença de Chagas. In *Doença de Chagas*, J.R.Cançado.Belo Horizonte, Brasil: Estado Minas Gerais. pp 5-21.

Chang, H.Y. et Judson, C.L. (1977). The role of isoleucine in differential egg production by the mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera : Culicidae) following feeding on human or guinea pig blood. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 57: 23-28.

Chapman, R.F. (1961). Some experiments to determine the methods used in host finding by tsetse flies, *Glossina medicorum*. *Bulletin of Entomological Research*, 52: 83-97.

Chapman, R.F. (1982). Chemoreception: the significance of receptor numbers. *Advances in Insects Physiology*, 16: 247-356.

Chiang, R.G. et Davey, K.G. (1988). A novel receptor capable of monitoring applied pressure in the abdomen of an insect. *Science*, 241: 1665-1667.

Constantinou, C. (1979). *Circadian Rhythms in Insects.* Thèse de Doctorat, Department de Zoologie, Faculté des Sciences, University de Londres.

Constantinou, C. (1984). Circadian rhythm of oviposition in the blood sucking bugs, *Triatoma phyllosoma*, *T. infestans* and *Pastrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 15: 203-212.

Cork, A. et Park, K.C. (1996). Identification of electrophysiologically-active compounds for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, in human sweat extracts. *Medical and Veterinary Entomology*, 10: 269-276.

Corrêa, R.R. et Aguiar, A.A. (1952). O teste de precipitina na identificaçao da fonte alimentar do *Triatoma infestans*. *Arq Hig Saúde Públ*, 17: 3-8.

Costantini, C., Birdett, M.A., Gibson, G., Ziesmann, J., Sagnon, N.F., Mohammed, H.A., Coluzzi, M. et Pickett, J.A. (2001). Electroantennogram and behavioural responses of the malaria vector *Anopheles gambiae* to human-specific sweat components. *Medical and Veterinary Entomology*, 15: 259-266.

Coura, J.R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 113-122

Coura, J.R.; Ferreira, L.F. et Paraense, W.L. (2000). *Centenário do Instituto Oswaldo Cruz 1900-2000.* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Cruz-López, L., Malo, E.A., Rojas, J.C. et Morgan, E.D. (2001). Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Medical and Veterinary Entomology*, 15: 351-357.

Cruz-López, L. et Morgan, E.D. (1995). Chemical investigation of aggregation behavior of *Triatoma* bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Chemical Ecology*, 21: 2069-2078.

Dahmen, H.J. (1980). A simple apparatus to investigate the orientation of walking insects. *Experientia*, 36: 685-687.

Davey, K.G. (1965). Copulation and egg-production in *Rhodnius prolixus*: the role of the spermatecae. *Journal of Experimental Biology,* 42: 373-378.

Davey, K.G. (2007). The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg-production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 208-215.

Davis, E.E. (1984a). Development of lactic acid-receptor sensitivity and host-seeking behaviour in newly emerged female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology,* 30: 211-215.

Davis, E.E. (1984b). Regulation of sensitivity in the peripheral chemoreceptor systems for host-seeking behaviour by a haemolymph-borne factor in *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 30: 179-183.

De Jong, R. et Knols, B.G.J. (1995). Olfactory responses of host-seeking *Anopheles gambiae* s.s. Giles (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 59: 333-335.

De Jong, R. et Knols, B.G.J. (1996). Limburger cheese as an attractant for the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s.s. *Parasitology Today*, 12: 159-161.

Decker, S., McConnaughey, S. et Page, T.L. (2007). Circadian regulation of insect olfactory learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104: 15905–15910.

Dekker, T., Steib, B., Carde, R.T. et Geier, M. (2002). L-lactic acid: a human-signifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 91-98.

Dougherty, M.J., Guerin, P.M., Ward, R.D. et Hamilton, J.G.C. (1999). Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpos* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. *Physiological Entomology*, 24: 252-262.

Edman, J.D. et Scott, T.W. (1987). Host defensive behaviour and the feeding success of mosquitoes. *Insect Science and Its Application*, 8: 617-622.

Edman, J. D., Webber, L. A. et Kale, H. W. (1972). Effect of mosquito density on the relationship of host behavior and mosquito feeding success. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21: 487-491.

Eiras, A.E. et Jepson, P.C. (1991). Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bulletin of Entomological Research*, 81: 151-160.

Eiras, A.E. et Jepson, P.C. (1994). Responses of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to host odours and convection currents using an olfactometer bioassay. *Bulletin of Entomological Research*, 84: 207-211.

Enserink, M. (2002). What Mosquitoes Want: Secrets of Host Attraction. *Science*, 298: 90-92.

Fallis, A.M., Bennett, G.F., Griggs, G. et Allen, T. (1967). Collecting *Simulium venustum* female in fan traps and on silhouettes with the aid of carbon dioxide. *Canadian Journal of Zoology*, 45: 1011-1017.

Ferreira, R.A., Lazzari, C.R., Lorenzo, M.G. et Pereira, M.H. (2007). Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? *PLoS One* 2, e932. doi:10.1371/ journal.pone.0000932.

Fisher, N.I. (1993). *Statistical analysis of circular data*. Cambridge University Press, Cambridge.

Flanagan, T.R. et Hagedorn, H.H. (1977). Vitellogenin synthesis in the mosquito: the role of juvenile hormone in the development of responsiveness to ecdysone. *Physiological Entomology*, 2: 173-178.

Flores, G.B. (2001). Las antenas y el sentido térmico de la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Thèse de doctorat, Université de Buenos Aires, Argentine.

Flores, G.B. et Lazzari, C.R. (1996). The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. *Journal of Insect Physiology*, 42: 344-440.

Forero, D., Weirauch, C. et Baena, M. (2004). Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, 670: 1-12.

Frame, G.W., Strauss, W.G. et Maibach, H.I. (1972). Carbon dioxide emission of the human arm and hand. *Journal of Investigative Dermatology*, 59: 344-440.

Fredeen, F.J.H. (1961). A trap for studying the attacking behaviour of black flies *Simulium articum* Mall. *Canadian Entomologist*, 93: 73-78.

Freitas, J.L.P., Siqueira, A.F. et Fereira, O.A. (1960). Investigaçöes epidemiológicas sobre triatomineos de hábitos domésticos e silvestres con auxilio da reação de precipitinas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2: 90-99.

Friend, W.G. (1965). Gorging response in *Rhodnius prolixus* Ståhl. *Canadian Joural of Zoology,* 43: 125-132.

Friend, W.G. et Smith, J.J.B. (1977). Factors affecting feeding by blood-sucking insects. *Annual Review of Entomol*ogy, 22: 309-331.

Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D.S. et Jurberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202: 1-36.

Geier, M., Bosch, O.J. et Boeck, J. (1999a). Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. *Journal of Experimetal Biology*, 202: 1639-1648.

Geier, M., Bosch, O.J. et Boeckh, J. (1999b). Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chemical Senses*, 24: 647-653.

Gillies, M.T. (1980). The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. *Bulletin of Entomological Research*, 70: 525-532.

Gillies, M.T. et Wilkes, T.J. (1972). The range of attraction of animal baits and carbon dioxide for mosquitoes. Studies in a freshwater area of West Africa. *Bulletin of Entomological Research*, 61: 389-404.

Gomez, I. et Balderrama N. (1986). Mecanismo antidiurético en *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). *Memorias do. Instituto Oswaldo Cruz,* 81: 443-452.

Guarneri, A.A., Lazzari, C.R., Diotaiuti, L. et Lorenzo, M.G. (2002). The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). *Physiological Entomology*, 27: 142-147.

Guarneri, A.A., Diotaiuti, L., Gontijo, N.F., Gontijo, A.F. et Pereira, M.H. (2003). Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. *Acta Tropica*, 87: 361-370.

Guerenstein, P.G. et Guerin, P.M. (2001). Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *Journal of Experimental Biology*, 204: 585-597.

Guerenstein, P.G. et Lazzari, C.R. (2008). Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Tropica,* in press.

Guerenstein, P.G. et Núñez, J.A. (1994). Feeding response of the haematophagous bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to saline solutions: a comparative study. *Journal of Insect Physiology*, 40: 747-752.

Guerra, F. (1970). American trypanosomiasis. An historical and a human lesson. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 105-119.

Guhl, F. (2007). Chagas disease in Andean countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 29-37.

Gwadz, R.W. et Spielman, A. (1973). Corpus allatum control of ovarian development in *Aedes aegypti. Journal of Insect Physiology*, 19: 1441-1448.

Hargrove, J.W. et Brady, J. (1992). Activity rhythms of tsetse flies (*Glossina spp*.) (Diptera: Glossinidae) at low and hight temperature in nature. *Bulletin of Entomological Research*, 82: 321-326.

Hassanali, A., Mc Dowell, P.G., Owaga, M.L.A. et Saini, R.K. (1986). Identification of tse-tse attractants from excretory products of a wild host, *Syncerus caffer*. *Insect Science and Its Application*, 7: 5-9.

Hawkins, W.A. et Rust, K.M. (1977). Factors influencing male sexual response in the American cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Chemical Ecology*, 3: 85-99.

Haynes, K. et Birch, M. (1984). The periodicity of pheromone release and male responsiveness in the artichoke plume moth. *Physiological Entomology*, 9: 287-295.

Ianowski, J.P., Manrique G., Núñez J.A. et Lazzari C.R. (1998). Feeding is not necessary for triggering plasticization of the abdominal cuticle in haematophagous bugs. *Journal of Insect Physiology,* 44: 379-384.

Insausti, T.C. et Lazzari, C.R. (2000). An ocellar "pupil" that does not change with light intensity, but with the insect age in *Triatoma infestans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 743-746.

Jander, R. (1963). Insect orientation. *Annual Review of Entomology,* 8: 95-114.

Jones, M.D.R. (1976). Persistence in continuous light of a circadian rhythm in the mosquito *Culex pipiens fatiganus* Wied. *Nature*, 261: 491-492.

Jones, M.D.R. (1982). Coupled oscillators controlling circadian flight activity in the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. 7, 281-289. *Physiological Entomology*, 7: 281-289.

Jones, M.D.R., Cubbin, C.M. et Marsh, D. (1972). The circadian rhythm of flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae*: the light-response rhythm. *Journal of Experimental Biology*, 57: 337-346.

Jurberg, J., Galvao, C., Noireau, F., Carcavallo, R.U., Rocha, D. et Lent, H.(2005). *Uma iconografia dos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae)*. Gama Filho, Rio de Janiero.

Kellogg, F.E. (1970). Water vapour and carbon dioxide receptors in Aedes aegypti. *Journal of Insect Physiology*, 16: 99-108.

Kelly, D.W. (2001). Why are some people bitten more than others? *Trends in Parasitology*, 17(12): 578-581.

Kelly, D.W., Mustafa, Z. et Dye, C. (1996). Density-Dependent Feeding Success in a Field Population of the Sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Animal Ecology*, 65: 517-527.

Kline, D.L. et Lemire, G.F. (1995). Field evaluation of heat as an added attractant to traps baited with carbon dioxide and octenol for *Aedes taeniorhynchus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11: 454-456.

Klowden, M.J. (1979). Blood intake by *Aedes aegypti* not regulated by insemination, *Journal of Insect Physiology*, 25: 349–351.

Klowden, M.J. (1981). Initiation and termination of host-seeking inhibition in *Aedes aegypti* during oocyte maturation. *Journal of Insect Physiology*, 27: 799-803.

Klowden, M.J. (1990). The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia*, 46: 660-670.

Klowden, M.J. (1995). Blood, Sex, and the Mosquito, The mechanisms that control mosquito blood-feeding behavior. *Bioscience*, 45: 326-331.

Klowden, M.J. (1996). Vector behaviour. In *The Biology of Disease Vectors.* (ed. By B. J. Beaty and W.C. Marquardt), pp. 34-50. University Press of Colorado, Niwot, CO, U.S.A.

Klowden, M.J. (1997). Endocrine aspects of mosquito reproduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35: 491-512.

Klowden, M.J. et Briegel, H. (1994). Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between Anopheles and Aedes (Diptera: Culicidea). *Journal of Medical Entomology*, 31: 618-622.

Klowden, M.J. et Lea, A.O. (1978). Blood Meal Size as a Factor Affecting Continued Host-Seeking by Aedes Aegypti (L.). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27: 827-831.

Klowden, M.J. et Lea, A.O. (1979a). Abdominal distention terminates subsequent host-seeking behaviour of *Aedes aegypti* following a blood meal. *Journal of Insect Physiology*, 25: 583-585.

Klowden, M.J. et Lea, A.O. (1979b). Humoral inhibition of host-seeking in *Aedes aegypti* during oocyte maturation. *Journal of Insect Physiology*, 25: 231-235.

Klowden, M.J. et Lea, A.O. (1980). "Physiologically old" mosquitoes are not necessarily old physiologically. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 1460-1464.

Klowden, M.J., Davis, E.E. et Bowen, M.F. (1987). Role of the fat body in the regulation of host-seeking behaviour in the Mosquito *Aedes aegypti. Journal of Insect Physiology*, 33: 643-646.

Knols, B.G.J., Van Loon, J.J.A., Cork, A., Robinson, R.D., Adam, W., Meijerink, J., De Jong, R. et Takken, W. (1997). Behavioural and electrophysiological responses of the female malaria mosquito *Anopheles gambiae* s. s. Giles (Diptera: Culicidae) towards Limburger cheese volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 87: 151-159.

Krishnan, B., Dryer, S.E. et Hardin, P.E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 400: 375-378.

Krotoszynski, B., Gabriel, G. et O'Neil, H. (1977). Characterization of human expired air: a promising investigative and diagnostic technique. *Journal of Chromatographic Science*, 15: 239-244.

Laarman, J.J. (1955). The host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles maculipennis atroparvus*. *Acta Leidensia*, 25: 1-144.

Lallement, H. (2007). Habituation et conditionnement classique aversif de la réponse d'extension du proboscis chez un insecte hématophage, *Rhodnius prolixus*. Rapport de stage M2, Université de Tours, 66 pp.

Lazzari, C.R. (1990). Fisiología del comportamiento de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Heteroptera: Reduviidae). Orientación térmica. Thèse de doctorat, Université de Buenos Aires, Argentine.

Lazzari, C.R. (1991). Circadian rhythm of egg hatching in Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 28

Lazzari, C.R. (1992). Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*, 38: 895-903.

Lazzari, C.R. et Núnez, J. (1989). The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in Triatoma infestans. *Journal of Insect Physiology*, 35: 525-529.

Le, C.T. (2003). *Introductory Biostatistics*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. U.S.A.

Lea, A.O., Briegel, H. et Lea, H.M. (1978). Arrest, resorption, or maturation of oocytes in *Aedes aegypti* : dependence on the quantity of blood and the interval between blood meals. *Physiological Entomology*, 3: 309-316.

Lehane, M. (2005). *The biology of blood-sucking in insects*. *Second edition*. Cambridge university press, Cambridge.

Lent, H. et Valderrama, A. (1977). Observações, em laboratorio, sobre o ciclo evolutivo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, *R. pictipes* Stal, 1872 e *R. nevai* Lent, 1953. *Revista Brasileira de Biologia,* 37: 325-344.

Lent, H. et Wygodzinsky, P. (1979). A revision of the Triatominae (Hemiptera; Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' Disease. *Bulletin of American Museum of Natural History*, 163: 1-520.

Liang, D. et Schal, C. (1990). Circadian rhythmicity and development of the behavioural response to sex pheromone in male brown-banded cockroach, *Supella longipalpa*. *Physiological Entomology*, 15: 355-361.

Linn, C.E., Campbell, M.G., Poole, K.R., Wu, W.Q. et Roelofs, W.L. (1996). Effects of photoperiod on the circadian timing of pheromone response in male Trichoplusia ni: Relationship to the modulatory action of octopamine. *Journal of Insect Physiology*, 42: 881-891.

Lorenzo, M.G. (1997). Factores que Afectan la Distribución Espacial de la Vinchuca Triatoma infestans y Búsqueta de Nuevas Herramientas para su Control. Thèse de doctorat, Université de Buenos Aires, Argentine.

Lorenzo, M.G. et Lazzari, C.R. (1996). The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *Journal of Insect Physiology*, 42: 903-907.

Lorenzo, M.G. et Lazzari, C.R. (1998). Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica*, 70: 163-170.

Lorenzo, M.G. et Lazzari, C.R. (1999). Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Acta Tropica*, 72: 241-249.

Lorenzo Figueiras, A.N., Kenigsten, A. et Lazzari, C.R. (1994). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *Journal of Insect Physiology*, 40: 311-316.

Lorenzo Figueiras, A.N. et Lazzari, C.R. (1998a). Aggregation in the haematophagous bug Triatoma infestans: a novel assembling factor. *Physiological Entomology*, 23: 33-37.

Lorenzo Figueiras, A.N. et Lazzari, C.R. (1998b). Aggregation behaviour and interspecific responses in three species of Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 133-137.

Lorenzo Figueiras, A.N. et Lazzari, C.R. (2000). Temporal change of the aggregation response in Triatoma infestans. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 889-892.

Lorenzo Figueiras, A.N. et Lazzari, C.R. (2002). Aggregation behaviour and interspecific responses in Rhodnius prolixus stal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 569-571.

MacCord, J.R., Jurberg, P. et Gomes-Carneiro, M.R. (1986). Stimuli capable of attracting *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Annales de Sociedad Entomologica do Brasil*, 15: 27-37.

Maddrell, S.H.P. (1963). Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Ståhl. I. The control of diuresis. *Journal of Experimental Biology,* 40: 247-256.

Maddrell, S.H.P. (1964a). Excretion in the Blood-Sucking Bug, *Rhodnius Prolixus* Ståhl: II. The Normal Course of Diuresis and the Effect of Temperature. *Journal of Experimental Biology,* 41: 163-176.

Maddrell, S.H.P. (1964b). Excretion in the Blood-Sucking Bug, *Rhodnius Prolixus* Ståhl: III. The Control of the Release of the Diuretic Hormone. *Journal of Experimental Biology,* 41: 459-472.

Marx, R. (1955). Uber die wirtsfindung und die Bedeutung de artspezifischen duftstoffes bei *Cimex lectularius* Linne. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 17: 41-72.

Mayer, M.S. (1968). Response of single olfactory cell of *Triatoma infestans* to human breath human. *Nature*, 220: 924-925.

Mayer, H.F. et Alcaraz, I.L. (1955). Estudios relacionados con las fuentes alimentarias de *Triatoma infestans*. *Annales del Instituto de Medicina Regional, Tucuman*, 4: 195-201.

McIver, S. et Siemicki, R. (1985). Fine structure of antennal putative thermo/hygrosensilla of adult Rhodnius prolixus Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of morphology*, 183: 15-23.

Meijerink, J., Braks, M.A.H., Brack, A., Adam, W. et Dekker, T. (2000). Identification of olfactory stimulants for *Anopheles gambiae* from human sweat samples. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 1367-1382.

Meijerink, J. et Van Loon, J.J.A. (1999) Sensitivities of antennal olfactory neurons of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to carboxylic acids. *Journal of Insect Physiology*, 45: 365-373.

Melcón, M.L., Lazzari, C.R. et Manrique, G. (2005). Repeated plasticization and recovery of cuticular stiffness in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* in the feeding context. *Journal of Insect Physiology*, 51: 989-993.

Meola, R.W. et Petralia, R.S. (1980). Juvenile hormone induction of biting behaviour in Culex mosquitoes. *Science*, 209: 1548-1550.

Merlin, C., Lucas, P., Rochat, D., François, M.C., Maïbèche-Coisne, M. et Jacquin-Joly, E. (2007). An antennal circadian clock and circadian rhythms in peripheral pheromone reception in the moth *Spodoptera littoralis*. *Journal of Biological Rhythms*, 22: 502-514.

Merritt, D.J. (2007). The organule concept of insect sense organs: sensory transduction and organule evolution. *Advances in Insect Physiology*, 33: 192-241.

Minoli, S.A. et Lazzari, C.R., (2003). Chronobiological basis of thermopreference in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology,* 49: 927-932.

Mitchell, C.J. (1981). Diapause termination, gonoactivity and differenciation of host-seeking behavior from blood-feeding behaviour in hibernating *Culux tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology,* 18: 386-394.

Mitchell, C.J. (1983). Differenciation of host-seeking behavior from blood-feeding behaviour in overwintering *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and observations on gonotrophic dissociation. *Journal of Medical Entomology,* 20: 157-163.

Napier Bax, S. (1937). The senses of smell and sight in *Glossina swynnertoni*. *Bulletin of Entomological Research*, 28: 539-582.

Nicolaides, N. (1974). Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science*, 186: 19-26.

Nigam, Y. et Ward, R.D. (1991). The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Physiological Entomology*, 16: 305-312.

Núñez, J.A. (1982). Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research*, 72: 253-262.

Núñez, J.A. (1985). Comportamiento de triatominos. In *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Tomo I: Epidemiología – Vectores*, (ed. Carcavallo, Rabinovich and Tonn), pp. 113-120. Ministerio de Salud y Acción Social, República Argentina.

Núñez, J.A. (1987). Behaviour of Triatominae bugs. *Chagas' disease vectors*, vol. II Anatomic and physiological aspects, pp 1-28, ed Brenner R.R et Stoka A.M, CRC Press Florida.

Núñez, J.A. et Lazzari, C.R. (1990). Rearing of Triatoma infestans Klug (Heteroptera: Rediviidae) in the absence of a live host. I. some factors affecting the artificial feeder. *Journal of Applied Entomology*, 109: 87-92.

Ondarza, R.N., Gutierrez-Martinez, A. et Malo, E.A. (1986). Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from Triatoma mazzottii (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Economic Entomology*, 79: 688-92.

Osbrink, L.A. et Rust, M.A. (1985). Cat flea (Siphonaptera: Pulicidae): factors influencing host-finding behaviour in the laboratory. *Annals of the Entomological Society of America*, 78: 29-34.

Otalora-Luna, F., Perret, J.L. et Guerin, P.M. (2004). Appetence behaviours of the triatomine bug Rhodnius prolixus on a servosphere in response to the host metabolites carbon dioxide and ammonia. *Journal of Comparative Physiology A*, 190: 847-54.

Overal, W.L. et Wingate, L.R. (1976). The biology of the batbug *Strictimex antennatus* (Hemiptera: Cimicidae) in South Africa. *Annals of the Natal Museum*, 22: 821-828.

Page, T.L. et Koelling, E. (2003). Circadian rhythm in olfactory response in the antennae controlled by the optic lobe in the cockroach. *Journal of Insect Physiology*, 49: 697-707.

Pandian, R.S. (1994). Circadian rhythm in the biting behavior of a mosquito *Armigeres subalbatus* (Coquillet). *Indian Journal of Experimental Biology*, 32: 254-260.

Park, K.C. et Cork, A. (1999). Electrophysiological responses of antennal receptor neurons in female Australian sheep blowflies, *Lucilia cuprina*, to host odours. *Journal of Insect Physiology*, 45: 85-91.

Peschken, D.P. et Thorsteinson, A.J. (1965). Visual orientation of black flies (Simuliidae: Diptera) to colour, shape and movement of targets. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 8: 282-288.

Petersen, D.G. et Brown, A.W.A. (1951). Studies of the responses of female *Aedes* mosquito. III. The response of *Aedes aegypti* (L.) to a warm body and its radiation. *Bulletin of Entomological Research*, 42: 535-541.

Pires, H.H., Lorenzo, M.G., Diotaiuti, L., Lazzari, C.R. et Lorenzo Figueiras, A.N. (2002). Aggregation behaviour in Panstrongylus megistus and Triatoma infestans: inter and intraspecific responses. *Acta Tropica*, 81: 47-52.

Pivnick, K.A. (1993). Response of males to female sex pheromone in the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Chemical Ecology*, 19: 1677-1689.

Politzar, H. et Merot, P. (1984). Attraction of the tsetse fly *Glossina morsitans submorsitans* to acetone, 1 octen-3-ol, and the combination of these compounds in west Africa. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 37: 468-473.

Preti, G., Muetterties, E.L., Furman, J.M., Kennelly, J.J. et Johns, B.E. (1976). Volatile constituents of dog (*Canis familiaris*) and coyote (*Canis latrans*) anal sacs. *Journal of Chemical Ecology*, 2: 177-186.

Rabinovich, J.E., Leal, J.A. et Feliciangeli de Piñero, D. (1979). Domiciliary biting frequency and blood ingestion of the Chagas's disease vector *Rhodnius prolixus* Sthål (Hemiptera: Reduviidea), in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 73: 272-283.

Reisenman, C.E., Insausti, T.C. et Lazzari, C.R. (2002). Light-induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Experimental Biology*, 205: 201-210.

Reisenman, C.E., Lazzari, C.R. et Giurfa, M. (1998). Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Comparative Physiology A*, 183: 533-541.

Ribeiro, J.M.C. (1987). Role of saliva in blood feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology*, 32, 463-478.

Ribeiro, J.M.C. (1989). Vector saliva and parasite transmission. *Experimental Parasitology*, 69: 104-106.

Ribeiro, J.M.C. (1996). Salivary thiol oxidase activity of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 899–905.

Roca, M.J. et Lazzari, C.R. (1994). Effects of relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Hygropreference and eclosion success. *Journal of Insect Physiology*, 40: 901-907.

Romaña, C. (1963). *Enfermedad de Chagas.* L Libreros, Buenos Aires.

Rose, A.M. et Boeckh, J. (1996a). Host-finding of the bloodsucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), vector of Chagas' disease: observations under conditions resembling the natural environment. Proceedings of the 2nd International Conference on Insect Pest in the Urban Environment, p. 612.

Rose, A.M. et Boeckh, J. (1996b). Host-finding of the bloodsucking bug Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae), vector of Chagas' disease: an olfactometer study. Proceedings of the XX International Congress of Entomology, Florence, p. 768.

Rose, A.M. et Boeckh, J. (1998). The effect of host stimuli on the host-finding behaviour of the blood sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), under quasi-natural conditions. Proceedings of the VI European Congress of Entomology. Ceské Budejovice, p. 680.

Rosén, W.Q., Han, G.B. et Lofstedt, C. (2003). The circadian rhythm of the sex-pheromone-mediated behavioral response in the turnip moth, *Agrotis segetum*, is not controlled at the peripheral level. *Journal of Biological Rhythms*, 18: 402-408.

Roth, L.M. (1951). Loci of sensory end-organs used by mosquitoes (*Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles quadrimaculatus* Say) in receiving host stimuli. *Annals of the Entomological Society of America,* 44: 59-74.

Rowland, M. (1989). Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. *Physiological Entomology*, 14: 77-84.

Rozendaal, J.A. (1999). La lutte anti-vectorielle : méthodes à usage individuel et communautaire, Organisation Mondiale de la Santé, Geneva.

Saini, R.K. (1986). Antennal responses of *Glossina morsitans morsitans* to buffalo urine, a potent olfactory attractant of tse-tse. *Insect Science and Its Application*, 7: 771-775.

Saunders, D.S., Steel, C.G.H., Vafopoulou, X. et Lewis, R.D. (2002). *Insect Clocks*, *Third edition*. Elsevier Science, Amsterdam.

Schilman, P.E., Núñez J.A. et Lazzari C.R. (1996). Attributes of oviposition substrates affect fecundity in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology,* 42: 837-841.

Schmitz, H., Trenner, S., Hofmann, M.H. et Bleckmann, H. (2000). The ability of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae) to approach a thermal source solely by its infrared radiation. *Journal of Insect Physiology*, 46: 745-751.

Schofield, C.J. (1982). The role of blood intake in density regulation of population of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera : Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research*, 72: 617-629.

Schofield, C.J. (1994). *Triatominae: Biología y Control.* Eurocommunica Publications, West Sussex, UK.

Schofield, C.J. (2000). Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos Saúde Pública*, 16: 89-92.

Schofield, C.J. et Patterson, J.W. (1977). Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 13: 727-34.

Schofield, S., Witty, C. et Brady, J. (1997). Effects of carbon dioxide, acetone and 1-octen-3-ol on the activity of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Physiological Entomology*, 22: 256-260.

Schreck, C.E. et James, J. (1968). Broth cultures of bacteria that attract female mosquitoes. *Mosquito News,* 28: 33-38.

Seaton, D.R. et Lumsden, W.H.R. (1941). Observations on the effects of age, fertilization and light on biting by Aedes aegypti (L.) in a controller microclimate. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 35: 23-36.

Sippel, W.L. et Brown, A.W.A. (1953). Studies on the responses of the female *Aedes* mosquito. Part V. The role of visual factors. *Bulletin of Entomological Research*, 43: 567-574.

Smith, J.J.B. et Friend, W.G. (1982). Feeding behaviour in response to blood fractions and chemical phagostimulants in the blackfly, *Simulium venustum*. *Physiological Entomology,* 7: 219-226.

Soares, R.P.P., das Graças Evangelista, L., Naranja, L.S. et Diotaiuti, L. (2000). Population dynamics and feeding behavior of *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata*, main vectors of Chagas disease in northeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85: 151-155.

Steib, B.M., Geier, M. et Boeckh, J. (2001). The effect of lactic acid on odour-related host preference of yellow fever mosquitoes. *Chemical Senses*, 26: 523-528.

Steullet, P. et Guerin, P.M. (1992a). Perception of breath components by the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). I. CO_2-excited and CO_2-inhibited receptors. *Journal of Comparative Physiology A*, 170: 665-676.

Steullet, P. et Guerin, P.M. (1992b). Perception of breath components by the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). II. Sulfide-receptors. *Journal of Comparative Physiology A*, 170: 677-685.

Steullet, P. et Guerin, P.M. (1994). Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). II. Receptors outside the Haller's organ capsule. *Journal of Comparative Physiology A*, 174: 39-47.

Sutcliffe, J.F. (1987). Distance orientation of biting flies to their hosts. *Insect Science and Its Application*, 8: 611-616.

Sutcliffe, J.F., Steer, D.J. et Beardsall, D. (1995). Studies of host location behavior in the black fly *Simulium arcticum* (Iis-10.11) (Diptera, Simuliidae) - aspects of close range trap orientation. *Bulletin of Entomological Research*, 85: 415-424.

Sybchev, M.A., Stamenova, M.B. et Borisova, Y.A. (1986). Effect of the time of the day, age of insects and pheromone dose on the sexual reaction *of Musca domestica* (Dipter; Muscidae). *Ekologiya (Sofia)*, 1: 62-67.

Takken, W., Klowden, M.J. et Chambers, G. (1998). Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae): the disadvantage of being small. *Journal of Medical Entomology*, 35: 639-645.

Takken, W. et Knols, B.G.J. (1999). Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 44: 131-157.

Takken, W., van Loon, J.J. et Adam, W. (2001). Inhibition of host-seeking response and olfactory responsiveness in *Anopheles gambiae* following blood feeding. *Journal of Insect Physiology*, 47: 303-310.

Taneja, J. et Guerin, P.M. (1995). Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphère. *Journal of Comparative Physiology A*, 176: 455-464.

Taneja, J. et Guerin, P.M. (1997). Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *Journal of Comparative Physiology A*, 181: 21-34.

Tanoue, S., Krishnan, P., Krishnan, B., Dryer, S.E. et Hardin, P.E. (2004). Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Current Biology*, 14: 638-649.

Taylor, B. et Jones, M.D.R. (1969). The circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes aegypti* (L.). The phase-setting effects of light-on and light off. *Journal of Experimental Biology*, 51: 59-70.

TDR (2005). 17ème rapport du Programme, Progrès de la Recherche 2003-2004.

Tejera, E. (1919). La trypanomosis americana o Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Anales Dir. Sanidad Nac., Caracas*, Vol. 1.

Thompson, B.H. (1976). Studies on the attraction of *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) to its hosts. I. The relative importance of sight, exhaled breath and smell. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 27: 455-473.

Underhill, G.W. (1940). Some factors influencing feeding activity of simuliids in the field. *Journal of Economic Entomology*, 33: 915-917.

Uribe, C. (1926). On the biology and life history of *Rhodnius prolixus* Stahl. *Journal of Parasitology*, 13: 129-136.

Vale, G.A. (1977). Feeding responses of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) to stationary hosts. *Bulletin of Entomological Research*, 67: 635-649.

Van der Broek, I.V.F. et Den Otter, C.J. (1999). Olfactory sensitivities of mosquitoes with different host preferences (*Anopheles gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus*, *An. m. atroparvus*) to synthetic host odours. *Journal of Insect Physiology*, 45: 1001-1010.

Van der Goes van Naters, W., Den Otter, C.J. et Maes, F.W. (1998). Olfactory sensitivity in tsetse flies: a daily rhythms. *Chemical Senses*, 23: 351-357.

Vitta, A.C., Figueiras, A.N., Lazzari, C.R., Diotaiuti, L. et Lorenzo, M.G. (2002). Aggregation mediated by faeces and footprints in Triatoma pseudomaculata (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 865-867.

Waage, J.K. et Davies, C.R. (1986). Host-mediated competition in a bloodsucking insect community. *Journal of Animal Ecology*, 55: 171-180.

Warnes, M.L. et Finlayson, L.H. (1985). Responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae), to carbon dioxide and host odours. I. Activation. *Bulletin of Entomological Research*, 75: 519-527.

Warnes, M.L. et Finlayson, L.H. (1986). Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to carbon dioxide and other host odours. *Physiological Entomology*, 11: 469-473.

WHO (1997). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Second Edition. *World Health Organisation, Geneva*.

WHO (2002). Control of Chagas' disease, Technical Report 905, *World Health Organisation, Geneva*.

WHO (2006). Guildeness for the treatment of malaria. *World Health Organisation, Geneva*.

WHO (2007). Global programme to eliminate lymphatic filariasis: annual report on lymphatic filariasis. *Weekly Epidemiological Record*, 82: 361-380.

Wiesinger, D. (1956). Die Bedeutung der Umweltfaktoren für den Saugakt von *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, 13: 97-141.

Wigglesworth, V.B. (1941). The sensory physiology of the human louse *Pediculus humanus corporis* de Greer (Anoplura). *Parasitology*, 33: 67-109.

Wigglesworth, V.B. et Gillett, J.D. (1934). The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. *Journal of Experimental Biology*, 11: 120-139.

Wintle, K. et Reinhardt, K. (2008). Temporary feeding inhibition caused by artificial abdominal distension in the bedbug, *Cimex lectularius*. *Journal of Insect Physiology,* doi:10.1016/j.jinsphys.2008.05.005, *in press.*

Wikel, S.K. (1982). Immune responses to arthropods and their products. *Annual Review of Entomology*, 27: 21-48.

Wright, G.A. (1968). Tunes to which mosquitoes dance. *New Scientist*, 37: 694-697.

Zar, J.H. (1984). *Biostatistical analysis.* Prentice-Hall, New Jersey.

Zeledón, R. et Rabinovich, J.E. (1981). Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annual Review of Entomology*, 26: 101-133.

Zeng, X.-N., Leyden, J.J., Lawley, H.J., Sawano, K., Nohara, I. et Preti, G. (1991). Analysis of characteristic odors from human male axillae. *Journal of Chemical Ecology*, 17: 1469-1490.

Zhou, X.,Yuan, C. et Guo, A. (2005) *Drosophila* olfactory response rhythms require clock genes but not pigment dispersing factor or lateral neurons. *Journal of Biological Rhythms* 20: 237 - 244.

Zhukovskaya, M.I. (1995). Circadian rhythm of sex pheromone perception in the male American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Journal of Insect Physiology*, 41: 941-946.

ANNEXE 1

CARTES DES REPARTITIONS GEOGRAPHIQUES DES PRINCIPALES MALADIES HUMAINES ENGENDREES PAR DES INSECTES HEMATOPHAGES

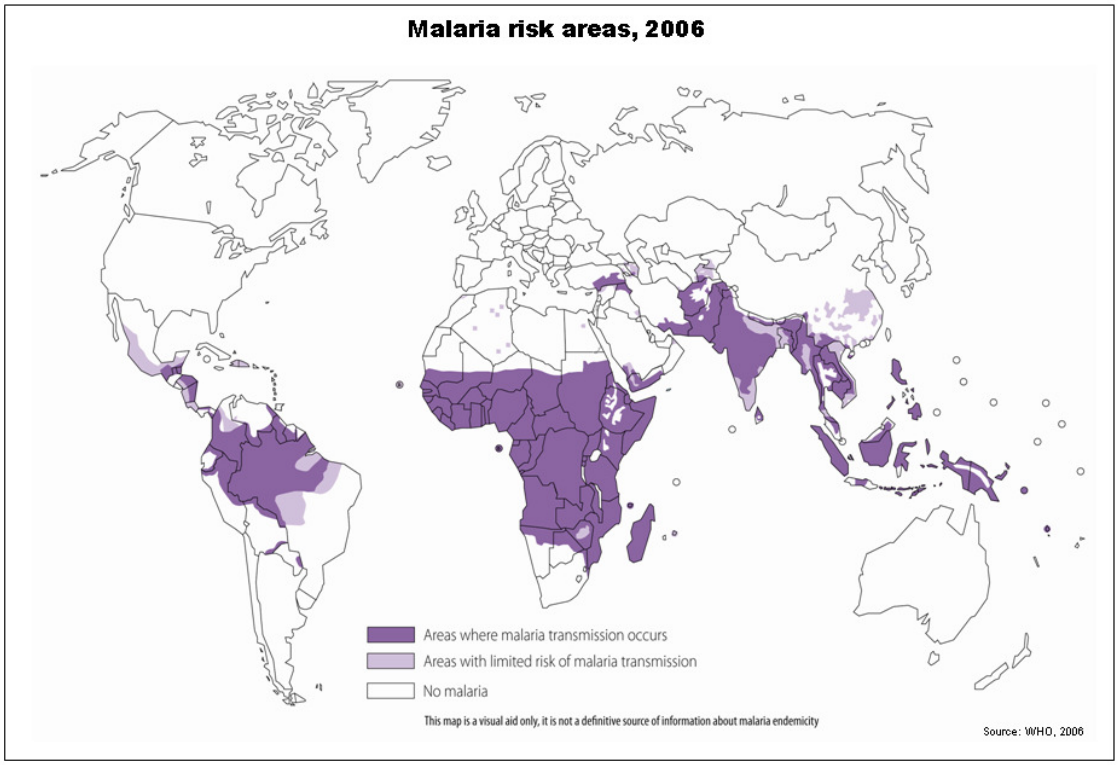


Figure 1 : Répartition mondiale de la Malaria en 2006

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_RiskAreas_2006.png).

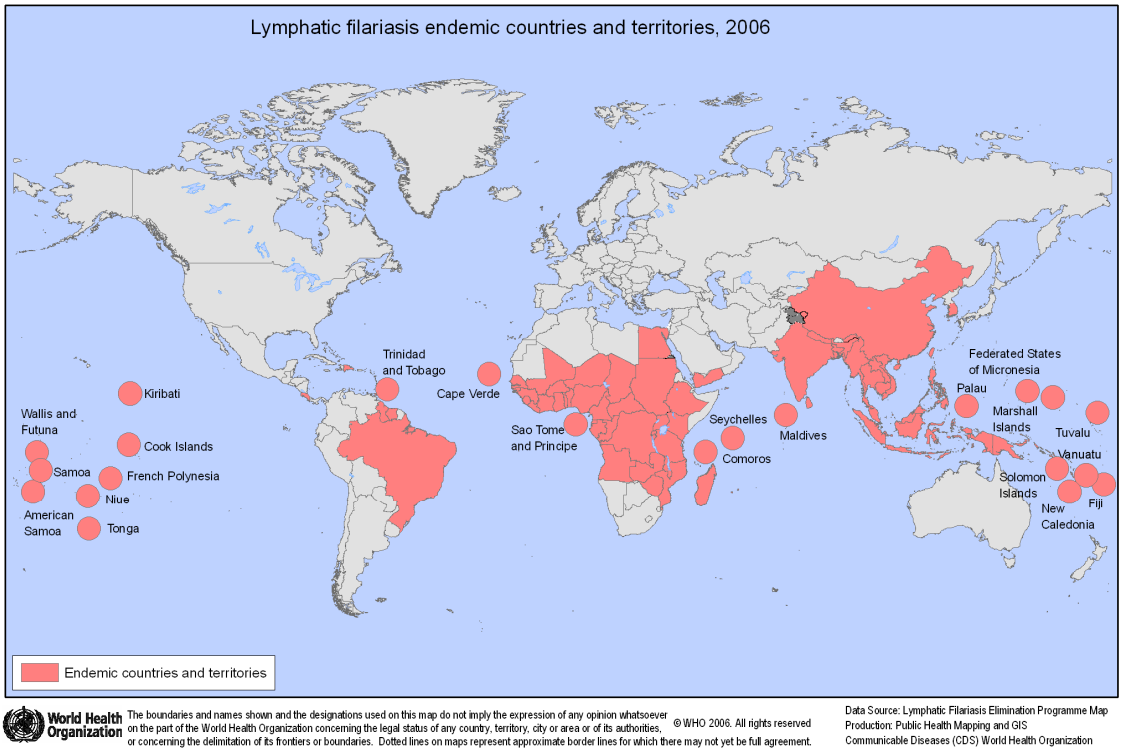


Figure 2 : Répartition mondiale de la Filariose Lymphatique en 2006

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_endemic(2).png).

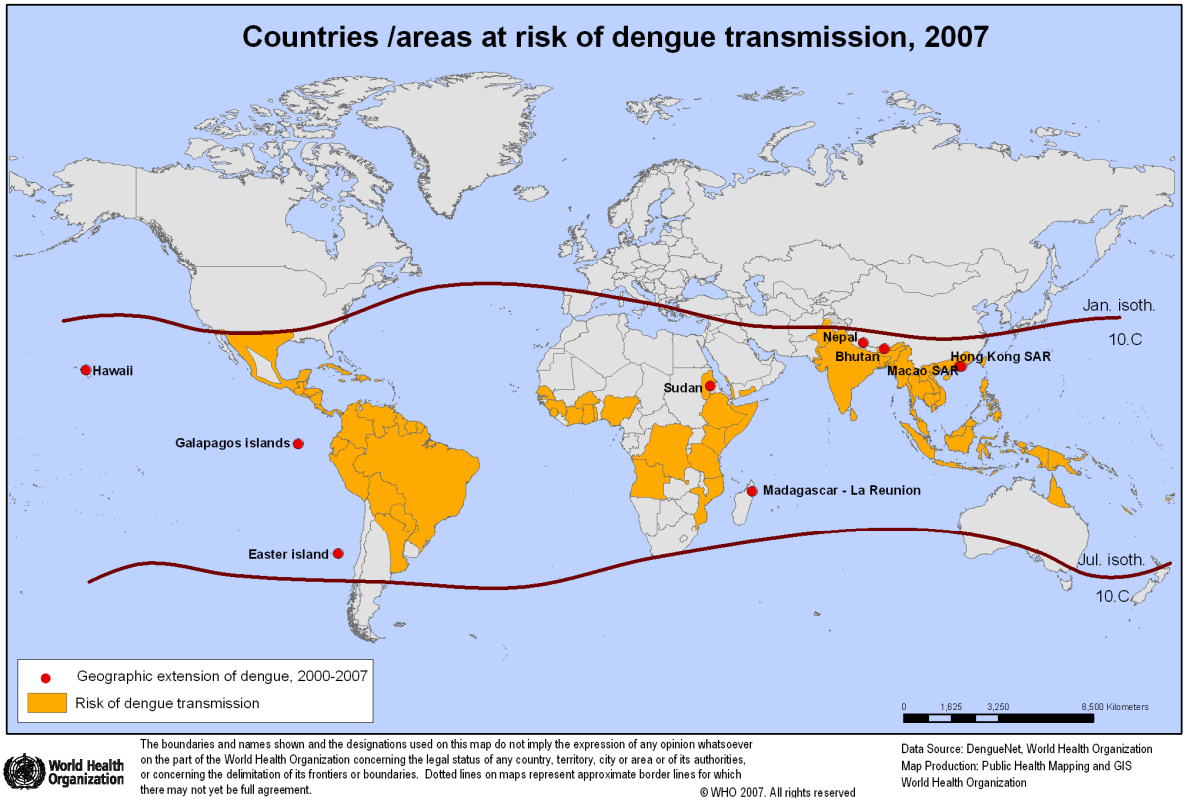


Figure 3 : Répartition mondiale de la Dengue en 2007

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_DengueTransmission_Extension_2007.png).

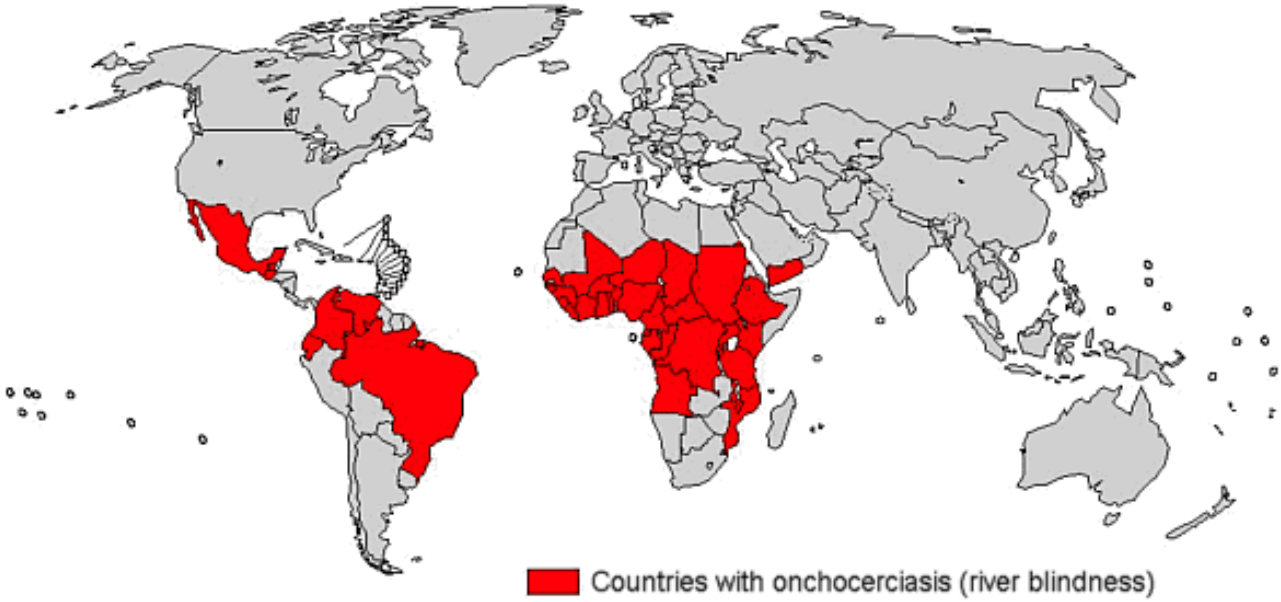


Figure 4 : Répartition mondiale de l'Onchocercose

(http://www.who.int/blindness/partnerships/onchocerciasis_disease_information/en/index.html).

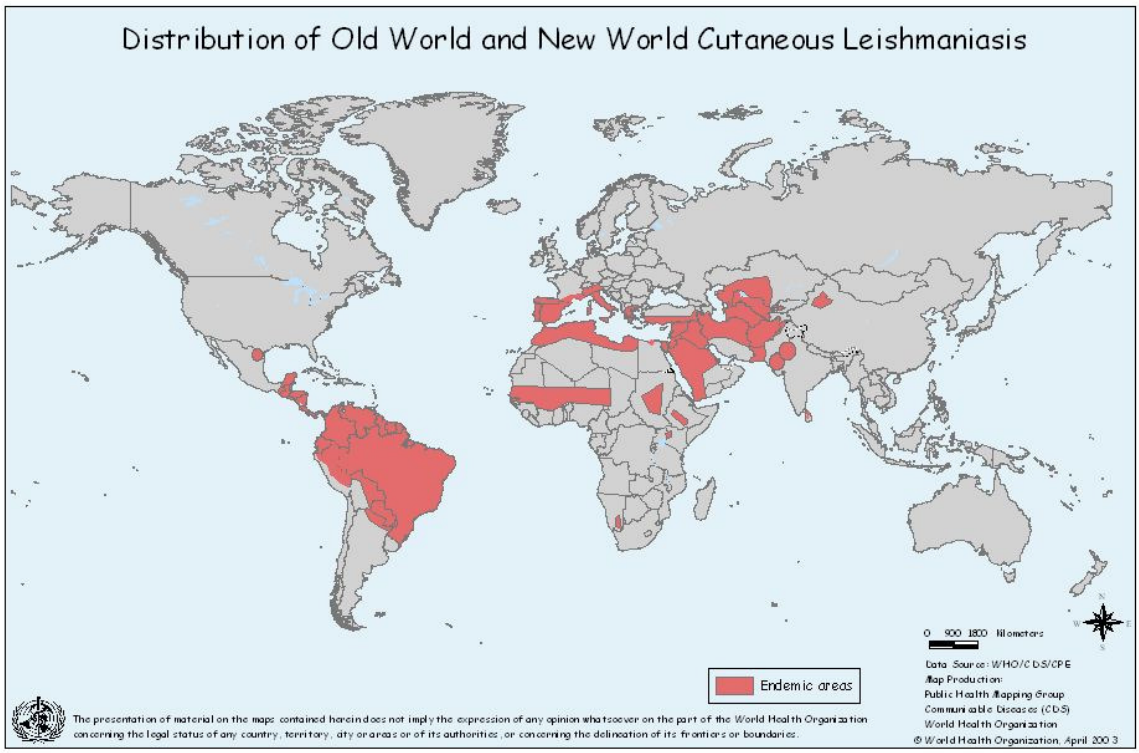


Figure 5 : Répartition mondiale des Leishmanioses Cutanées en 2003

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/cutaneous_leish.jpg).



Figure 6 : Répartition mondiale de la Trypanosomiase Américaine (Maladie de Chagas)

(http://www.who.int/tdr/dw/images/chagas_map.gif).

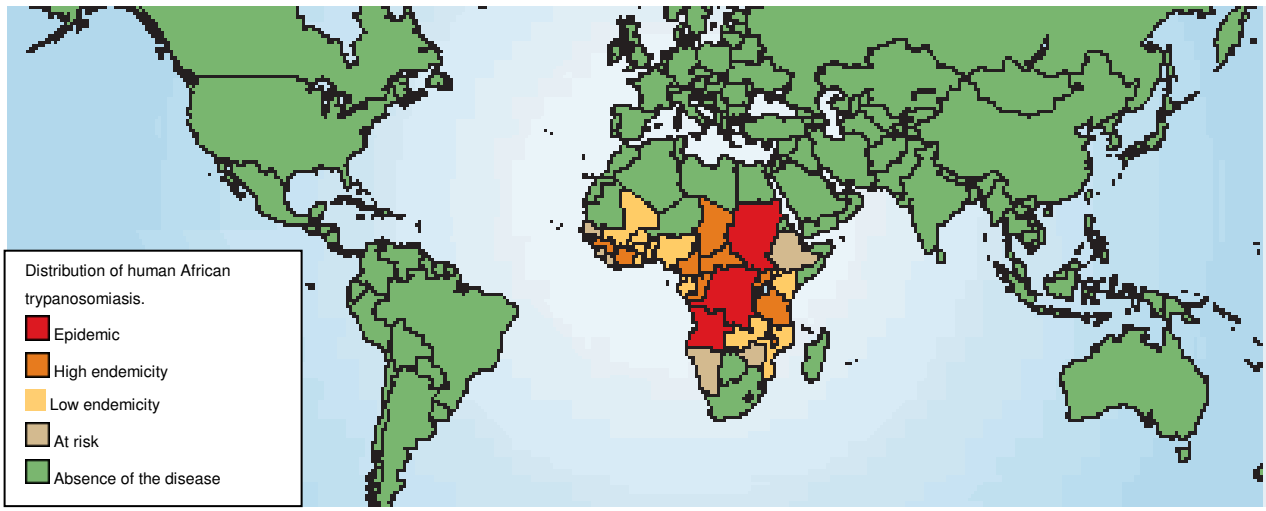


Figure 7 : Répartition mondiale de la Trypanosomiase Africaine (Maladie du sommeil) en 2004 (http://www.who.int/tdr/dw/tryp2004.htm).

ANNEXE 2

ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE :

LE COMPENSATEUR DE LOCOMOTION.

Enregistrement des déplacements

Le comportement olfactif des triatomines a été étudié grâce à l'utilisation d'un compensateur de locomotion (Dahmen, 1980; Barrozo et Lazzari, 2004). Cet appareil permet d'analyser le comportement locomoteur et l'orientation des punaises en réponse à divers stimuli (signaux chimiques, thermiques, visuels …). Ce dispositif est constitué d'une sphère creuse en polystyrène (9.7 cm de diamètre ; 2.5 g) suspendue par un faible courant d'air vertical dans un socle métallique (en forme de demi-sphère) dont le diamètre est de 2 mm supérieur à celui de la sphère afin de permettre une rotation sans frottements (Figure 1). C'est par deux ouvertures de 5 mm de diamètre percées au fond du socle que le courant d'air, généré par une pompe à air, maintient la sphère dans une position stable. Etant donné que le diamètre du socle est légèrement plus large que celui de la sphère, le courant supportant la sphère sera plus large dans le plan équatorial que vers le fond du socle. En conséquence, le faible courant d'air subit une perte de vélocité importante et n'engendre pas de courants détectables au sommet de la sphère (en addition aux courants déjà présents dans la pièce d'expérimentation).

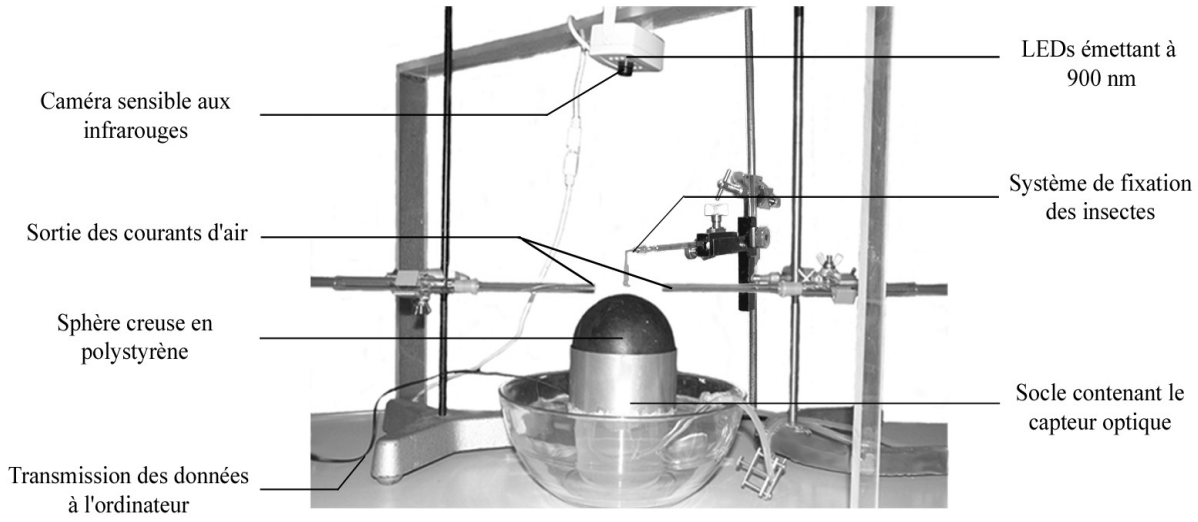
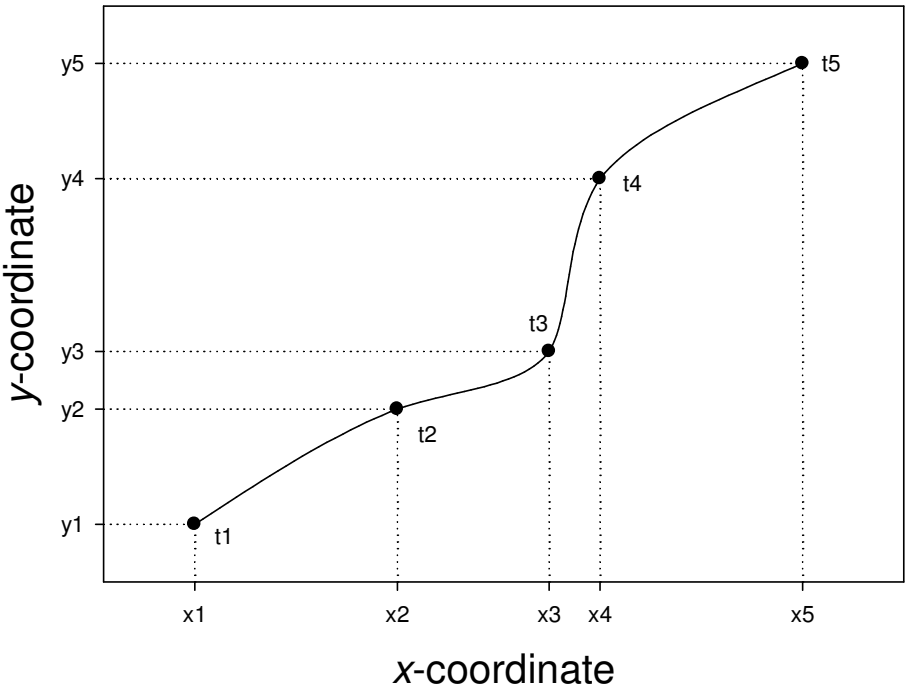


Figure 1 : Dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement du comportement locomoteur de R. prolixus*. Le compensateur de locomotion consiste en une sphère creuse de polystyrène suspendue par un courant d'air vertical. Les punaises sont suspendues par l'abdomen à une pièce de métal pivotante au sommet de la sphère. Les insectes peuvent alors marcher et s'orienter librement sans jamais modifier leur distance au stimulus. Un capteur optique placé sous le pôle opposé de la sphère permet l'enregistrement des parcours par un ordinateur.*

Fixés par l'abdomen à un support métallique rotatif au moyen de Scotch® double face, les insectes sont maintenus au sommet de la sphère, à une distance fixe du stimulus. Au contact de la surface, les punaises présentent un comportement de locomotion normal et spontané et vont déplacer la sphère sous l'action de leurs pattes. Elles peuvent alors marcher et se réorienter librement mais ne peuvent modifier leur distance relative les séparant du stimulus (i.e. expérience en boucle ouverte pour la distance et en boucle fermé pour la direction). Elles perçoivent donc le stimulus sous une intensité constante tout au long des expérimentations.

Les trajectoires des insectes sont détectées par un senseur optique inclus dans le socle soutenant la sphère. Ce senseur, obtenu à partir d'une souris d'ordinateur, est distant d'1 mm du pôle inférieur de la sphère dans le même axe que la position des insectes. Les mouvements de la sphère, induits par les déplacements des insectes, sont transférés à un ordinateur situé à l'extérieur de la pièce. Les données sont enregistrées toutes les 200 ms (fréquence d'échantillonnage) en tant que coordonnées x- et y- à l'aide d'un logiciel conçu *ad hoc* (Diego Anfossi, non publié). Les trajectoires des punaises sont reconstruites et les composantes spatio-temporelles peuvent être analysées (Figure 2). Le graphique et la formule suivante illustrent la reconstruction des trajectoires des insectes :



$$\alpha_i = \text{atg}\ \{(y_{i+5} - y_i)\ (x_{i+5} - x_i)^{-1}\}\ ;\ \alpha_{i+1} = \text{atg}\ \{(y_{i+6} - y_{i+1})\ (x_{i+6} - x_{i+1})^{-1}\}$$

$$\alpha_m = \Sigma\alpha_i\ (n)^{-1}$$

Les tests sont suivis par l'expérimentateur depuis l'extérieur de la pièce à l'aide d'une caméra sensible à la lumière infrarouge et équipée de LEDs émettant à 900 nm. La lumière émise permet d'éclairer le dispositif, mais elle n'est pas perçue par les punaises, i.e. les expérimentations ont lieu dans une obscurité fonctionnelle pour les insectes (Reisenman *et al.*, 1998). Le fait de suivre les expérimentations depuis l'extérieur de la pièce permet de supprimer le biais lié à l'expérimentateur puisqu'il peut être lui-même une source attractive pour les insectes.

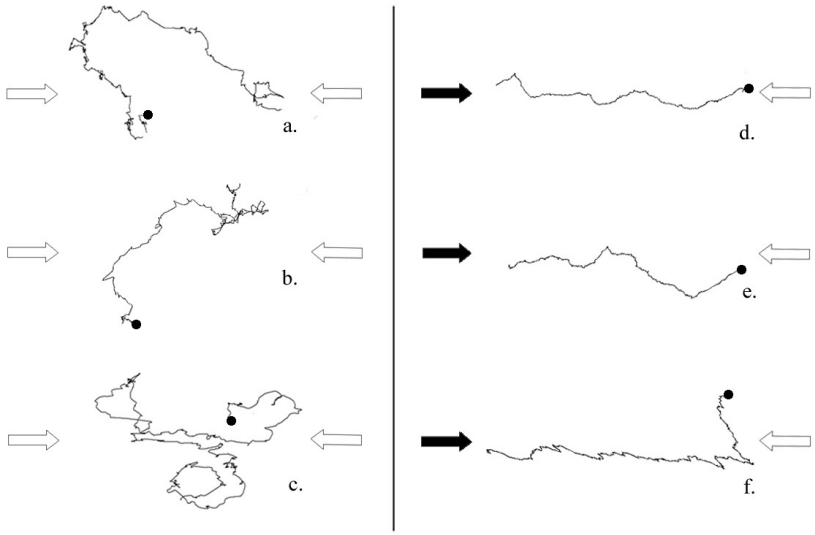


Figure 2 : Parcours réalisés par six punaises R. prolixus *(L5, 3 semaines de jeûne) confrontées à : (a,b,c) deux courants d'air de concentration ambiante en CO_2 (500 ± 50 ppm : contrôle vs contrôle); et (d,e,f), un courant d'air test enrichi de 1200 ppm de CO_2 et un courant d'air ambiant (test vs contrôle). Les points noirs représentent le départ de l'insecte, la flèche blanche le courant d'air contrôle et la flèche noire le courant d'air enrichi en CO_2. En présence de CO_2, les punaises marchent en direction du stimulus, mais on une orientation aléatoire en situation contrôle.*

Obtention et présentation du stimulus

Afin de mettre en évidence un effet comportemental des stimuli chimiques à tester, un dispositif de discrimination simultané à été développé en confrontant les insectes à deux courants d'air opposés (180°) (Figure 3). Ce dispositif est nécessaire puisque les triatomines réagissent spontanément aux courants d'air par une anémotaxie positive (Barrozo *et al.*, 2003). De cette façon, un individu exposé à deux courants d'air opposés « contrôle » (concentration ambiante en CO_2) peut choisir de s'orienter vers l'un ou l'autre des courants,

résultant d'une orientation non-préférentielle. Ceci est clairement distinguable des réponses comportementales obtenues en présence d'une source d'odeur attractive. D'un autre coté, l'utilisation de deux courants d'air positionnés à des angles différents de 180°, dans des conditions « contrôle », engendrerait une orientation moyenne entre les deux courants, i.e. différent d'une orientation aléatoire. Par conséquent, ce dispositif permet de clairement différencier une réponse aléatoire d'une réelle orientation positive face au stimulus et d'augmenter la puissance des analyses statistiques.

Chaque individu a donc été exposé simultanément à deux courants d'air opposés, continus et indépendants (25 ± 2 °C ; 50 ± 10 % HR ; 500 ± 50 ppm). Ils sont obtenus par le courant généré par une pompe à air reliée à un débitmètre afin d'en régler précisément le flux (4.2 $cm.s^{-1}$ en sortie de tube). Ces deux courants d'air sont soit maintenus à concentration ambiante en CO_2 (contrôle vs contrôle), soit l'un des deux courants est enrichi en CO_2 et l'autre reste à concentration ambiante (test vs contrôle). L'air ambiant aspiré par chacune des pompes, passe au travers d'un filtre à charbon permettant le piégeage des particules en suspension dans l'air. Un système de tubes en silicone (0,6 cm de diamètre interne) relie les pompes à des flacons en verre (250 ml) contenant ou non la source de l'odeur (CO_2). Des tubes en verre (0,6 cm de diamètre interne, 14 cm de longueur) placés à 3 cm des insectes testés, sont reliés à ces flacons et représentent la sortie de l'odeur. Dans une position normale, la distance moyenne entre les deux extrémités des antennes des insectes est de 0,9 cm, et une punaise peut couvrir avec ses antennes une distance maximale de 1,85 cm en scannant l'air pendant sa libre orientation sur la sphère (Barrozo *et al*., 2003). Les tubes en verre sont régulièrement nettoyés à l'aide d'une solution d'acide nitrique 0,5 M ou d'acétone (Sigma). Pour écarter tout biais lié à une éventuelle asymétrie de l'environnement, les positions des tubes « test » et « contrôle » ont été inversées de manière aléatoire au cours des expérimentations.

Un des deux flacons en verre enrichit le courant d'air en CO_2, préalablement généré selon la réaction chimique suivante : $Na_2CO_3 + H_2SO_4 \rightarrow CO_2(g) + H_2O + Na_2SO_4$. À l'aide d'un pousse-seringue motorisé, une solution de NA_2CO_3 à 0,3 M est injectée à un flux constant de 0,08 $ml.min^{-1}$ à l'intérieur du flacon contenant 100 ml d'H_2SO_4 1 M. Ce mélange génère une concentration de CO_2 de 1200 ppm au dessus de la concentration ambiante (500 ± 50 ppm.), et la production est maintenue constante par agitation. Cette concentration sera utilisée dans toutes les expérimentations, car, selon les expériences de Barrozo et Lazzari de 2004, 1200 ppm est une concentration en CO_2 largement attractive pour les triatomines. Le courant contrôle consiste en un courant d'air ambiant passant dans un flacon en verre

identique à celui utilisé pour la production du CO_2, mais contenant uniquement 100 ml de H_2SO_4 (1 M). Cela permet de maintenir les mêmes conditions thermiques et hygrométriques que pour le courant test. La vérification de la concentration obtenue est réalisée à l'aide d'un analyseur infrarouge d'échange gazeux (modèle EGM-3, mesure : 0 - 5000 ppm, précision 0,5% ; PP Systèmes).

Avant le début des tests, chaque individu est maintenu à l'air libre sur le compensateur de locomotion pendant 2 min, permettant aux insectes de s'habituer au dispositif. La mise en marche des pompes à air est réalisée depuis la pièce voisine et les données de déplacement de la sphère enregistrées durant 3 min. Chaque test où l'insecte s'immobilise plus de 30 secondes consécutives est arrêté, et les insectes mis à l'écart.

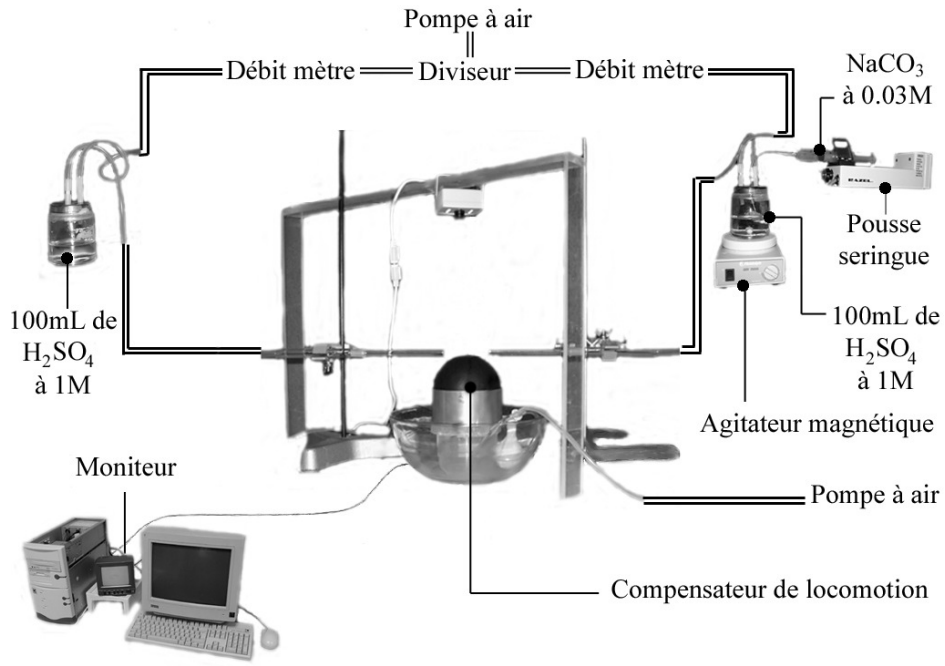


Figure 3 : Schéma complet du dispositif d'enregistrement du comportement olfactif de R. prolixus. *Une pompe propulse l'air ambiant dans un débitmètre. Le courant d'air est séparé en deux courants identiques passant dans des flacons en verre contenant 100 ml de H_2SO_4. Le CO_2 est généré dans l'un de ces flacons par addition de NA_2CO_3 tandis que l'autre sert de contrôle. Les courants sont présentés aux insectes mis en place sur le compensateur de locomotion.*

Aurélie BODIN

Modulation du comportement de recherche de l'hôte chez les insectes hématophages : Importance des facteurs endogènes

Résumé

Les animaux ont développé des stratégies d'optimisation de recherche de nourriture afin de minimiser les risques d'exposition aux prédateurs. Chez les insectes hématophages, l'attraction pour leurs hôtes, qui sont également leurs prédateurs, est dirigée par la chaleur et des facteurs chimiques. Cette thèse caractérise les facteurs endogènes modulant le comportement de recherche de l'hôte chez *Rhodnius prolixus*. Il existe une modulation spécifique de la réponse comportementale à différentes odeurs au cours de la journée. De plus, la recherche de l'hôte est modulée par l'état physiologique des individus (état de développement et état nutritif). Des mécanismes physiologiques et comportementaux ont donc été sélectionnés, inhibant le comportement de recherche de l'hôte à des moments de la vie de l'insecte où il n'est pas nécessaire de s'exposer aux hôtes.

Mots clés : Recherche de l'hôte, *Rhodnius prolixus,* Etat physiologique, Chronobiologie, Facteurs endogènes, Insectes hématophages, Maladie de Chagas, Olfaction.

Résumé en anglais

Animals have evolved different optimal strategies to minimize predation risks while searching for food. In haematophagous insects, host-seeking is guided by different host stimuli. An important modulation of the perception systems associated to host localization has been observed as function of behaviour and activity rhythms of the host which can be a prey or a predator. We characterize the endogenous factors which could modulate the host-seeking behaviour in the haematophagous bug *Rhodnius prolixus*. There is a specific modulation of the behavioural response to different odours as function of daytime. Furthermore, host-seeking could be modulated by the physiological state of the bugs (developmental and nutritional state). Physiological and behavioural mechanisms have been selected to inhibit the host-seeking when it is not necessary for the bugs to be exposed to hosts.

Key words : Host-seeking, *Rhodnius prolixus,* Physiological state, Chronobiology, Endogenous factors, Haematophagous insects, Chagas disease, Olfaction.