



HAL
open science

Biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition de l'homme aux piqûres des moustiques Aedes et Culex : application à l'évaluation du risque de transmission des arboviroses

Bi Zamblé Hubert Zamble

► **To cite this version:**

Bi Zamblé Hubert Zamble. Biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition de l'homme aux piqûres des moustiques Aedes et Culex : application à l'évaluation du risque de transmission des arboviroses. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022MONTT017. tel-03881799

HAL Id: tel-03881799

<https://theses.hal.science/tel-03881799>

Submitted on 2 Dec 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2 n° 168 : Chimie Biologie pour la Santé

Unité de recherche MIVEGEC

'Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle'

Biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition de l'Homme aux piqûres des moustiques *Aedes* et *Culex* : application à l'évaluation du risque de transmission des arboviroses

Présentée par **Bi Zamblé Hubert ZAMBLE**

Le 25 Mars 2022

Sous la direction de **Françoise MATHIEU-DAUDE** et la co-direction de **Franck REMOUE**

Devant le jury composé de

Dr Sylvie MANGUIN

Directrice de Recherche IRD, PhD, HDR, UMR Hydrosciences,
Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

Présidente du Jury

Prof Anna-Bella FAILLOUX

Directrice de Recherche, PhD, HDR Laboratoire « Arboviroses et Insectes vecteurs »
Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France

Rapporteuse

Prof. Athanase BADOLO

Professeur titulaire en Entomologie
Université Prof. Joseph Ki-Zerbo OUAGA 1, Ouagadougou, Burkina Faso

Rapporteur

Dr Catherine CETRE-SOSSAH

Chercheuse Virologue, HDR
UMR ASTRE – CIRAD, Montpellier, France

Examinatrice

Dr Eric D'ORTENZIO

Médecin spécialiste de santé publique
ANRS – Maladies Infectieuses Emergentes
Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat-Claude Bernard,
GHU AP-HP Nord, Paris
Equipe IAME - UMR 1137 INSERM, Université de Paris

Examinateur

Prof. Mahama TOURE

Professeur Associé Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire
Université Alassane OUATTARA, Bouaké, Côte d'Ivoire

Examinateur

Dr Françoise MATHIEU-DAUDE

Chargée de Recherche IRD, HDR
UMR MIVEGEC, Institut Louis Malardé, Papeete, Tahiti, Polynésie française

Directrice de thèse

Dr Franck REMOUE

Chargé de Recherche IRD, UMR MIVEGEC, Centre IRD de Montpellier,
Délégation Régionale Occitanie, Montpellier, France

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

En Biologie Santé

École doctorale CBS2 n° 168 : Chimie Biologie pour la Santé

Unité de recherche MIVEGEC

'Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle'

Biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition de l'Homme aux piqûres des moustiques *Aedes* et *Culex* : application à l'évaluation du risque de transmission des arboviroses

Présentée par Bi Zamblé Hubert ZAMBLE

Le 25 Mars 2022

Sous la direction de Françoise MATHIEU-DAUDE et la co-direction de Franck REMOUE

Devant le jury composé de

Dr Sylvie MANGUIN

Directrice de Recherche IRD, PhD, HDR, UMR Hydrosciences,
Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

Présidente du Jury

Prof Anna-Bella FAILLOUX

Directrice de Recherche, PhD, HDR Laboratoire « Arboviroses et Insectes vecteurs »
Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France

Rapporteuse

Prof. Athanase BADOLO

Professeur titulaire en Entomologie
Université Prof. Joseph Ki-Zerbo OUAGA 1, Ouagadougou, Burkina Faso

Rapporteur

Dr Catherine CETRE-SOSSAH

Chercheuse Virologue, HDR
UMR ASTRE – CIRAD, Montpellier, France

Examinatrice

Dr Eric D'ORTENZIO

Médecin spécialiste de santé publique
ANRS – Maladies Infectieuses Emergentes
Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat-Claude Bernard,
GHU AP-HP Nord, Paris
Equipe IAME - UMR 1137 INSERM, Université de Paris

Examineur

Prof. Mahama TOURE

Professeur Associé Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire
Université Alassane OUATTARA, Bouaké, Côte d'Ivoire

Examineur

Dr Françoise MATHIEU-DAUDE

Chargée de Recherche IRD, HDR
UMR MIVEGEC, Institut Louis Malardé, Papeete, Tahiti, Polynésie française

Directrice de thèse

Dr Franck REMOUE

Chargé de Recherche IRD, UMR MIVEGEC, Centre IRD de Montpellier,
Délégation Régionale Occitanie, Montpellier, France

Co-directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Remerciements

Gloire soit rendu à notre Seigneur Jésus Christ pour sa grâce dans ma vie !!!!

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses et bonnes personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier chaleureusement ma Directrice et mon Co-Directeur de thèse, Dr Françoise MATHIEU-DAUDE et Dr Franck REMOUE, pour leur aide. Je suis ravi d'avoir appris en votre compagnie car outre votre appui scientifique, vous avez toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse, ô combien importante pour ma future carrière de chercheur. Dr Franck merci pour ces années scientifiquement dosées.

« Maman Françoise merci pour votre surveillance nocturne pendant mes périodes d'insomnie, malgré le décalage horaire. Rire !!! ». Je peux le dire haut et fort « *Je suis biomarqué* » et cela grâce à vous.

Mention spéciale aussi à tous les membres de mes différents comités de thèse : Dr Ahidjo AYOUBA, Dr Thierry BALDET, Dr Albin FONTAINE et Dr Sylvie MANGUIN, merci pour vos orientations et conseils durant ces trois années dont 2 ont éprouvées par la pandémie du COVID-19.

Je tiens à remercier le Professeur Mahama TOURE et le Professeur Athanase BADOLO d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse malgré cette distance de 6000 km qui sépare l'Afrique de l'Ouest à la France.

Merci au Professeur Maurice A. AKRE, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé dans son laboratoire à l'Institut Pierre Richet de Bouaké. A tous les membres de ce laboratoire TRANS-RISK: un grand merci pour ces 5 années de collaboration, « ENTOMOLOGIQUEMENT merci ».

Merci au Professeure Anna-Bella FAILLOUX d'avoir accepté de porter son jugement sur mon travail. Quel honneur d'avoir une telle sommité en entomologie dans le jury de ma thèse !!!

Je remercie encore Dr Sylvie MANGUIN pour l'honneur qu'elle me fait d'être la présidente de mon jury de thèse. Je tiens à remercier particulièrement les Dr François D. TRAORE et Dr Ghislain AKA pour nos discussions et les conseils qui m'ont accompagné tout le long de la période de manipulations au laboratoire et à la rédaction de cette thèse.

Il m'est impossible d'oublier quelqu'un qui m'a initié pour la première fois aux techniques des tests ELISA au laboratoire de l'Institut Pierre Richet de BOUAKE. Car la première fois ne s'oublie jamais. Tel un enfant qui apprenait à marcher, vous avez su me guider pas à pas. C'est cet apprentissage qui m'a d'ailleurs ouvert les portes de cette thèse dans l'hexagone, dans la

prestigieuse Université de Montpellier. Merci Dr Andrée B. SAGNA !!! A votre suite je voudrais aussi remercier Dr Anne POINSIGNON, une personne merveilleuse qui a su me montrer sa disponibilité toutes les fois que j'ai eu recours à elle, et cela depuis la Côte d'Ivoire.

Votre qualité scientifique m'a toujours épaté. Un grand merci à ma Coordinatrice du Master Intertional d'Entomologie Médicale et Vétérinaire (MIE), le Dr Florence FOURNET « MAMA Africa » !!! Recevez ma profonde gratitude. Merci d'avoir eu confiance en moi. Merci à mon « ami » et voisin de bureau, le Docteur Frédéric DARRIET, l'un des précurseurs du développement de la moustiquaire imprégnée d'insecticide. Merci pour tes conseils et merci de m'avoir fait connaître une partie de tes activités conduites en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso. Cela donne des idées forcément!

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont aussi chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout le long de ces années :

-mon épouse, *mon Essentielle*, Dr Michaëlle Howélé A. C. TOURE, merci d'avoir été là pour moi durant ce temps passé loin de toi.

-mes parents : Firmin ZAMBLE, Roseline ZAMBLE LOU, Irène ZAMBLE LOU (Paix à son âme, partie avant que je n'achève cette thèse), Serge ZAMBLE, Bernard ZAMBLE, Mathurin ZAMBLE, Marius ZAMBLE « le Capitaine », Thomas ZAMBLE, tous mes neveux et nièces qui n'ont cessé de me témoigner leur admiration, ma tante Viviane DO Lou, mes oncles Bernard TRA BI et Robert GOH BI, Olivier IRIE, Lazare IRIE, Kadi IRIE, Séraphin DOUBI IRIE

-mes amis Hervé Konan OUSSOU, Guy Pacôme Y. ADINGRA et son épouse Isabelle AMANI, Armand EKRA, Michel OBOUMOU, Karifa CAMARA, Dansy CAMARA, Olivier OUSSOU, Edwige KOFFI, Kadi ILBOUDO, Rodrique D. SIE, Jacques NAMBANI, Lison LAROCHE, Lemonde BOUAFU, Melaine DAHOU, Audric BEGER, Amidou K. COULIBALY, Dorgeles DJE KOUADIO, Michelle BENGUE, Amadou TRAORE Merci pour vos soutiens et encouragements. A tous les amis de 'BLACKEXCELLENCE', Merci !!!!

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour mes feux géniteurs. « *Papa, ton rêve il se réalise enfin. Toi qui a cru en moi très tôt alors que les choses semblaient à terre autour de nous* », « *Maman je n'avais pas encore franchi la classe de Cours Moyen 2 quand tu es partie, tu m'avais demandé d'être à la hauteur dans mes études comme ton frère l'a été. Maman j'y suis aujourd'hui avec à la clé un Doctorat* ». Merci à vous deux de m'avoir inculqué le goût de la persévérance dans le travail.

Résumé en français

Titre : Biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition de l'homme aux piqûres des moustiques *Aedes* et *Culex* : application à l'évaluation du risque de transmission des arboviroses

Résumé :

Les arboviroses, transmises par les moustiques *Aedes* et *Culex*, continuent de menacer la santé et la vie des populations des régions où elles sont endémiques. Le thème général de nos recherches concerne l'étude des relations immunologiques entre l'homme, les pathogènes et les moustiques vecteurs dans l'objectif général d'un meilleur contrôle des maladies à transmission vectorielle. L'objectif principal de nos travaux était d'utiliser les réponses anticorps à des antigènes salivaires de moustiques, comme biomarqueurs innovants d'exposition, pour estimer le niveau d'exposition des Hommes aux piqûres d'*Aedes* et de *Culex* dans différents contextes socio-environnementaux, et par conséquent estimer le risque de transmission des arboviroses. A cet effet, nous avons : i) mesuré les réponses IgG anti-peptide salivaire (peptide Nterm-34 kDa) d'*Aedes aegypti* et la séroprévalence d'arbovirus en milieu urbain en Afrique de l'Ouest chez les enfants de 3 quartiers d'Abidjan (Anoumabo, Bromakoté et Petit-Bassam) exposés à *Ae. aegypti*, ii) mesuré les réponses IgG et IgM anti-peptide Nterm-34 kDa dans le Sud de la France métropolitaine dans 4 régions : Corse, Occitanie et PACA, exposées à *Ae. albopictus*, et Auvergne, région non colonisée ; et iii) évalué le potentiel des réponses IgG anti-EGS (Extraits totaux de Glandes Salivaires) et anti-protéine recombinante le 30 kDa de *Culex quinquefasciatus* comme biomarqueurs d'exposition à *Culex* chez les enfants de 3 sites de Bouaké (Côte d'Ivoire) exposés différemment aux *Culex*.

A Abidjan, les réponses IgG anti-Nterm-34 kDa étaient significativement différentes entre les quartiers, avec un fort niveau observé à Bromakoté. L'étude du niveau d'exposition en fonction des données entomologiques de densité des *Aedes* a montré que le niveau des IgG spécifiques était associé uniquement aux résultats obtenus par méthodes des pièges collants. Les résultats de séroprévalence indiquaient que les arbovirus circulaient dans les 3 quartiers, avec une détection majoritaire de DENV3. Bromakoté et Petit-Bassam étaient les plus affectés. Ces résultats démontrent que l'exposition aux *Aedes*, et ainsi le risque de transmission, était variable entre quartiers au sein d'une même ville africaine.

En France métropolitaine, les niveaux des IgG anti-peptide salivaire d'*Aedes* étaient plus élevés dans les régions colonisées que dans la région non colonisée par *Ae. albopictus*. En revanche, aucune association entre les résultats biomarqueurs et les facteurs de risque sociologiques (habitats, protection individuelle, ...), n'a été observée. De plus, l'Auvergne bien que déclarée non colonisée en 2012, semblait abriter des individus anciennement ou nouvellement exposés aux piqûres d'*Ae. albopictus*. Le niveau des IgM anti-peptide salivaire *Aedes* présentait une différence significative entre les régions exposées à *Ae. albopictus*. Ces biomarqueurs IgG et IgM anti-Nterm-34 kDa permettent de discriminer les régions et les départements les plus exposés et différencient une ancienne exposition d'une récente à *Ae. albopictus*. Ces biomarqueurs peuvent ainsi discriminer les régions et les départements les plus exposés aux piqûres d'*Ae. albopictus* et ainsi permettent d'évaluer l'hétérogénéité des risques de transmission des arboviroses en France métropolitaine.

A Bouaké, les réponses IgG anti-EGS et anti-30 kDa étaient significativement plus élevées chez les enfants vivant dans les sites de forte densité de *Culex quinquefasciatus*. Les réponses IgG anti-30 kDa étaient significativement plus élevées chez les enfants ne dormant pas sous les moustiquaires imprégnées d'insecticide par rapport à ceux dormant dessous. De plus, une corrélation positive a été observée entre les réponses IgG anti-EGS et les IgG anti-30 kDa au sein de la population d'étude. Les réponses IgG anti-EGS et anti-30 kDa représenteraient ainsi des candidats biomarqueurs potentiels de l'exposition humaine aux piqûres de *Culex*. Toutefois, leur validation, en particulier celle de la protéine recombinante 30 kDa, nécessite des études complémentaires. Ces biomarqueurs d'exposition aux moustiques *Aedes* et *Culex* apparaissent ainsi un indicateur pertinent de risque de transmission des arbovirus et de son hétérogénéité dans différents contextes : milieu urbain africain et en France métropolitaine.

Mots clés : Exposition, *Aedes*, *Culex*, biomarqueur immunologique, antigènes salivaires, arboviroses

Résumé en anglais

Title : Immuno-epidemiological biomarkers of human exposure to *Aedes* and *Culex* mosquito bites: Application to the assessment of the risk of transmission of arboviruses

Abstract

Arboviruses, transmitted by the *Aedes* and *Culex* mosquitoes, continue to threaten the health and lives of populations in regions where they are endemic. The general theme of our research is the study of the immunological relationships between humans, pathogens and mosquito vectors with the overall aim of better control of vector-borne diseases. The main objective of our work was to use antibody responses to mosquito salivary antigens, as innovative biomarkers of exposure, to estimate the level of human exposure to *Aedes* and *Culex* bites in different socio-environmental contexts, and consequently to estimate the risk of transmission of arboviruses. To this end, we: i) measured the anti-salivary peptide (Nterm-34 kDa peptide of *Aedes aegypti*) IgG responses and the seroprevalence of arboviruses in an urban setting in West Africa in children from 3 neighbourhoods of Abidjan (Anoumabo, Bromakoté and Petit-Bassam) exposed to *Ae. aegypti*, ii) measured IgG and IgM responses to Nterm-34 kDa peptide in the South of France in 4 regions: Corsica, Occitania and PACA, exposed to *Ae. albopictus*, and Auvergne, an uncolonised region; and iii) evaluated the potential of anti-SGE (Total Salivary Gland Extracts) and anti-*Culex quinquefasciatus* 30 kDa recombinant protein IgG responses as biomarkers of *Culex* exposure in children from 3 sites in Bouaké (Côte d'Ivoire) with varying exposure to *Culex*.

In Abidjan, anti-Nterm-34 kDa IgG responses were significantly different between neighbourhoods, with a high level observed in Bromakote. The study of the level of exposure according to entomological data on *Aedes* density showed that, the level of specific IgG was only associated with the results obtained by sticky trap methods. Seroprevalence results indicated that arboviruses were circulating in all 3 neighborhoods, with a majority detection of DENV3. Bromakote and Petit-Bassam were the most affected. These results demonstrate that exposure to *Aedes*, and thus the risk of pathogens transmission, varied between neighbourhoods within the same African city.

In metropolitan France, *Aedes* salivary anti-peptide IgG levels were higher in areas colonised by *Ae. albopictus* than in the area not colonised by *Ae. albopictus*. However, no association between biomarker results and sociological risk factors (habitats, personal protection) was observed. Moreover, the Auvergne, although not declared colonised in 2012, seemed to harbour individuals formerly or newly exposed to *Ae. albopictus* bites. The level of *Aedes* salivary peptide IgM showed a significant difference between regions exposed to *Ae. albopictus*. These anti-Nterm-34 kDa IgG and IgM biomarkers can be used to discriminate between the most exposed regions and departments and differentiate between old and recent exposure to *Ae. albopictus*. These biomarkers can thus discriminate the regions and departments most exposed to *Ae. albopictus* bites and thus make it possible to assess the heterogeneity of the risks of transmission of arboviruses in metropolitan France.

In Bouaké, anti-SGE and anti-30 kDa IgG responses were significantly higher in children living in sites with high *Culex quinquefasciatus* density. Anti-30 kDa IgG responses were significantly higher in children not sleeping under insecticide-treated nets compared to those sleeping under them. In addition, a positive correlation was observed between anti-SGE IgG and anti-30 kDa IgG responses in the study population. Anti-SGE IgG and anti-30 kDa IgG responses would thus represent potential biomarker candidates for human exposure to *Culex* bites. However, their validation, particularly the 30 kDa protein, requires further studies.

These biomarkers of exposure to *Aedes* and *Culex* mosquitoes, thus appear to be a relevant indicator of the risk of arbovirus transmission and its heterogeneity in different contexts: urban Africa setting and metropolitan France.

Key words: Exposure, *Aedes*, *Culex*, immunological biomarker, salivary antigens, arboviruses

Table des matières

Remerciements	i
Résumé en français	iii
Résumé en anglais	iv
Listes des figures	viii
Liste des tableaux	x
Listes des abréviations.....	xi
Introduction	1
I. LES MOUSTIQUES <i>Aedes</i> ET <i>Culex</i> VECTEURS D'ARBOVIRUS HUMAINS	4
1.1. Répartition géographique, d' <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> et <i>Culex quinquefasciatus</i>	4
1.2 Facteurs de distribution des moustiques <i>Aedes</i> et des <i>Culex</i> à travers le monde	6
1.3 Bio-écologie des <i>Aedes</i> et <i>Culex</i>	8
II. LES PRINCIPALES ARBOVIROSES	12
2.1 Les arboviroses à l'échelle du globe	12
III LA LUTTE CONTRE LES ARBOVIROSES HUMAINES	28
3.1 Lutte contre les virus pathogène	28
3.1.1 Le diagnostic	28
3.1.2 Les thérapies contre les arboviroses : état des lieux.....	29
IV.INDICATEURS ENTOMOLOGIQUES ACTUELS DANS L'EVALUATION DU CONTACT HOMME-VECTEURS D'ARBOVIROSES.....	35
4.1 Estimation de la densité des stades immatures.....	35
4.2 Estimation de la densité des moustiques adultes.....	36
V. INTERACTIONS PHYSIOLOGIQUES DU CONTACT HOTE-VECTEUR : ROLE DES PROTEINES SALIVAIRES DU VECTEUR AU COURS DU REPAS SANGUIN	39
5.1 Rôle des protéines salivaires des vecteurs dans le bon déroulement du repas sanguin... 40	
VI. INDUCTION DE REPONSES ANTICORPS ANTI-PROTEINES SALIVAIRES DES ARTHROPODES : APPLICATIONS POTENTIELLES DANS LE CONTRÔLE DES INFECTIONS TRANSMISES PAR LES ARTHROPODES.....	50
6.1 Réponse Ac anti-protéines salivaires des arthropodes : un marqueur immunologique d'exposition aux piqûres de vecteurs hématophages	50
6.1.1 Identification et caractéristiques d'un biomarqueur pertinent d'exposition aux piqûres de moustiques.....	54
6.2 Applications du biomarqueur d'exposition d' <i>Aedes aegypti</i> dans le contrôle des arboviroses	56

DEUXIEME PARTIE : OBJECTIFS ET CADRE DE LA THESE

1. Objectifs.....	63
-------------------	----

1.1 Objectif général.....	63
1.2 Objectifs spécifiques.....	63
2. Cadre de la thèse.....	63
3. Financement.....	66

TROISIEME PARTIE : RESULTAS DE LA THESE

I. ETUDE DU RISQUE DE TRANSMISSION D'ARBOVIRUS DANS UN CONTEXTE URBAIN AFRICAIN PAR L'UTILISATION DU BIOMARQUEUR IMMUNOEPIDEMIOLOGIQUE D'EXPOSITION HUMAINE AUX PIQURES D' <i>Aedes Aegypti</i> A ABIDJAN, COTE D'IVOIRE.....	67
a) Etude du niveau d'exposition des enfants à Abidjan aux piqures d' <i>Ae. aegypti</i>	67
b) Etat des lieux retrospectifs d'infection des enfants aux arbovirus à Abidjan.....	95
II. ETUDE DU NIVEAU D'EXPOSITION DES POPULATIONS HUMAINES AUX PIQURES D' <i>Ae. Albopictus</i> DANS LE SUD DE LA FRANCE METROPOLITAINE PAR L'UTILISATION DU BIOMARQUEUR IMMUNO-EPIDEMIOLOGIQUE D'EXPOSITION.....	97
2.1 Contexte de nos travaux.....	99
2. 2 Caractéristiques de la population d'étude.....	100
3. Résultats.....	104
3.1 Réponses IgG et IgM anti-34 kDa en fonctions des régions.....	104
3.2. Réponses IgG et IgM anti-Nterm-34 kDa d' <i>Ae. aegypti</i> en fonction des départements des régions Occitanie et PACA.....	105
3.3 Réponses IgG et IgM anti-Nterm-34 kDa en fonctions des années de colonisation des départements.....	107
3.4 Effets des facteurs socio-environnementaux sur les réponses IgG et IgM anti-peptide salivaire.....	108
4. Discussion.....	111
III. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN BIOMARQUEUR IMMUNEPIDEMIOLOGIQUE D'EXPOSITION AUX PIQURES DE <i>Culex</i> : ETUDE PILOTE.....	116

IV. DISCUSSION GENERALE.....	138
4.1 Evaluation du niveau d'exposition des hommes aux piqûres d' <i>Aedes</i> en milieu urbain en Afrique.....	139
4.2 Evaluation du niveau d'exposition des hommes aux piqûres d' <i>Aedes</i> au Sud de la France.....	142
4.3 Développement et validation du biomarqueur immuno-épidémiologie d'exposition aux piqûres de <i>Culex quinquefasciatus</i> : étude pilote en milieu urbain et semi urbain à Bouaké.....	144
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	149
PERSPECTIVES.....	150
REFERENCES.....	151

Listes des figures

Figure 1: Vecteurs d'arbovirus impliqué dans notre étude (A) <i>Aedes aegypti</i> , (B) <i>Aedes albopictus</i> et (C) <i>Culex quinquefasciatus</i>	6
Figure 2: Distribution potentielle mondiale de trois vecteurs majeurs d'arboviroses. (A) <i>Aedes aegypti</i> et (B) <i>Aedes albopictus</i> dans le monde.....	8
Figure 3: Œufs des moustiques <i>Aedes</i> et <i>Culex</i>	9
Figure 4: Gîtes larvaires artificiels d' <i>Aedes</i> et de <i>Culex</i> (Di Luca et al. 2017b).....	10
Figure 5: Cycle général de la reproduction et de la vie des moustiques	11
Figure 6: Distribution mondiale de cinq (5) arbovirus (transmission actuelle ou passée).	13
Figure 7: Distribution de l'incidence de la fièvre jaune depuis 1948 en Amérique du Sud et en Afrique.	20
Figure 8: Chronologie d'utilisation des outils de diagnostic d'une arbovirose. Exemple de la dengue	29
Figure 9 : Pondoir piège pour capturer les femelles d' <i>Aedes</i> contenant de l'insecticide.....	35
Figure 10: Pièges à moustiques . (A) Mosquito Magnet Pioneer. (B) BG-Sentinel 2.....	39
Figure 11: Schéma des étapes de l'interaction entre l'Homme et le vecteur.....	40
Figure 12: Représentation schématique des mécanismes d'inhibition de la réaction hémostatique des vertébrés dûe à des protéines salivaires d'arthropodes hématophages.....	41
Figure 13: Représentation schématique des mécanismes de modulation de la réponse immunes des vertébrés dûe à des protéines salivaires d'arthropodes hématophages au moment du repas sanguin de ces derniers.....	45
Figure 14: Intensité de réponses Anticorps (DO) en fonction de l'intensité d'exposition des Hommes à des vecteurs (Poinignon et al., 2008).....	51
Figure 15 : Evolution de la réponse IgG anti-salive des individus avant et après l'implémentation de la lutte anti-vectorielle (VCI) contre l' <i>Ae. albopictus</i> sur l'Île de la Réunion.	53
Figure 16 : Critères d'un candidat biomarqueur pertinent d'exposition des vertébrés aux piqûres des vecteurs	54
Figure 17: Schéma synoptique de recherche de candidat biomarqueur spécifique aux piqûres des vecteurs	55
Figure 18: Séquence d'acides aminés de la protéine salivaire 34 kDa de la femelle d' <i>Aedes aegypti</i> (gi 94468336),(Ribeiro et al. 2007).	56
Figure 19: Evolution de la réponse IgG anti-Nterm-34 kDa des individus avant et après l'implémentation de la lutte anti-vectorielle (VCI) contre l' <i>Ae. albopictus</i> sur l'Île de Réunion	59
Figure 20: Activités du groupe IHVEC portant sur la salive totale d' <i>Aedes</i>	61
Figure 21: Activités du groupe IHVEC portant sur le peptide salivaire Nterm-34 kDa d' <i>Aedes aegypti</i>	62
Figure 22: Pourcentage des différents arbovirus détectés dans les 3 quartiers d'Abidjan, Côte d'Ivoire.....	97
Figure 23: Pourcentage des enfants positifs aux arbovirus au sein de chacun des 3 quartiers d'Abidjan, Côte d'Ivoire	97
Figure 24: Départements du Sud de la France colonisés par <i>Aedes albopictus</i> depuis 2004	100
Figure 25: Sites d'étude du projet ARBO-MED/PRIAM.	101
Figure 26: Hétérogénéité de réponse Ac anti-peptide salivaire d' <i>Ae. aegypti</i> selon les régions.	105
Figure 27: Hétérogénéité des réponses Ac anti-peptide salivaire d' <i>Ae. aegypti</i> selon les départements en Occitanie	106

Figure 28: Hétérogénéité de réponse Ac anti-peptide salivaire d'*Ae.aegypti* selon les départements en PACA 107

Figure 29: Hétérogénéité de réponse Ac anti-peptide salivaire d'*Ae. aegypti* selon les années de colonisation des départements..... 108

Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques arborivus majeurs et leurs vecteurs moustiques	14
Tableau 2: Situation actuelles des candidats vaccins contre la dengue à base de virus virants aténués ou inactivés purifiés (Tripathi and Shrivastava 2018).	31
Tableau 3 : Protéines salivaires recombinantes d'arthropodes et leurs diverses applications ..	49
Tableau 4: Caractéristiques de la population d'étude	102
Tableau 5: Facteurs socio-environnementaux du milieu de vie de la population d'étude.....	103
Tableau 6: Influence des facteurs de risque sur les réponses IgG et IgM anti-peptides 34 kDa d' <i>Ae. aegypti</i>	110

Listes des abréviations

ARN	: Acide ribonucléique
CHIKV	: Virus du chikungunya
DENV	: Virus de la dengue
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CSH	: Capture sur Homme
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
EJ	: Encéphalite japonaise
EGS	: Extrait de glande salivaire
FJ	: Fièvre jaune
FJV	: Virus de la fièvre jaune
IL1	: Interleukine 1
IFN	: Interféron
IgG	: Immunoglobuline G
IgM	: Immunoglobuline M
kDa	: Kilodalton
LAV	: Lutte anti-vectorielle
MAX	: Maxadilan
NS	: Non structural
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PACA	: Provence-Alpes-Côte d'Azur
PrM	: Protéine de membrane
USUV	: Virus Usutu (Usutu virus)
RVF	: Fièvre de la Vallée du Rift (Rift Valley fever)
WN	: Fièvre du Nil occidental (West Nile fever)
WNV	: Virus du Nil occidental (West Nile virus)
YFV	: Virus de la fièvre jaune (yellow fever virus)
ZIKV	: Virus Zika (Zika virus)



Introduction

Les maladies infectieuses dues à des arbovirus, c'est-à-dire des virus transmis à l'homme par un arthropode (insecte ou arachnide), sont regroupées sous l'appellation d'« arboviroses ». Ces maladies sont aujourd'hui sur tous les continents, le nombre de personnes infectées et à risque ne cesse de croître.

Les virus responsables des arboviroses sont transmis à un hôte vertébré par des arthropodes hématophages : *Culicoides*, phlébotomes, moustiques et tiques (Mellor, Boorman, and Baylis 2000; Remoli et al. 2016; Leta et al. 2018; Madison-Antenucci et al. 2020; Snyman et al., 2021). Les plus importantes en santé humaine sont la dengue (DEN), le Chikungunya (CHIK), la fièvre jaune (FJ) et la fièvre à Zika (ZIK) dont les agents causaux sont transmis par les moustiques du genre *Aedes* (*Ae.*), majoritairement *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. D'autres maladies ou zoonoses, telles que la fièvre du Nil occidental (WN), l'encéphalite japonaise (EJ), l'encéphalite de Saint-Louis (ESL) et la fièvre de la vallée du Rift (FVR) dont les agents causaux sont transmis aux hôtes humains par les moustiques du genre *Culex* (*Cx*) avec une forte implication de l'espèce *Culex quinquefasciatus*, sont également des problèmes ou des menaces pour la santé publique.

L'OMS estime que 3,9 milliards de personnes (environ 40 % de la population mondiale) sont exposées au risque d'infection par le virus de la dengue (DENV) et 390 millions de personnes sont infectées chaque année par le DENV, dont 96 millions cas de dengue hémorragique (OMS, 2019) (<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dengueand-severe-dengue>). Environ 200 000 personnes sont touchées chaque année par la FJ dans le monde (Gaythorpe *et al.*, 2021). Dans les pays tempérés, surtout en Europe, les épidémies de WN sont signalées dans plusieurs pays (Sambri *et al.*, 2013). En début de saison de transmission, en Octobre 2021 ; 135 personnes ont été identifiées infectées par le virus WN (<https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-dataecdc>).

Cette forte et rapide expansion des arboviroses dans les différentes régions du monde est imputable à plusieurs facteurs. Ces facteurs sont, entre autres, l'absence de traitement efficace contre la plupart de ces affections (à l'exception de la FJ et l'EJ contre lesquelles il existe des vaccins efficaces). A cela s'ajoute la résistance des vecteurs d'arbovirus aux insecticides (Kothera et al. 2019; Moyes et al. 2021). L'urbanisation rapide et mal contrôlée, notamment en Afrique subsaharienne, et l'explosion démographique dans les villes tropicales, créent des environnements propices à l'émergence des vecteurs. De plus, l'augmentation des transports

internationaux aériens ou maritimes multipliant les échanges, permettent une diffusion passive des œufs de moustiques et des vecteurs sur les grandes voies commerciales. Enfin, le changement climatique à la base des hausses de température et des quantités de pluie créent des conditions bioclimatiques favorables à la survie des vecteurs (Gubler *et al.*, 2011; Fournet *et al.* 2016; Bellone and Failloux 2020; Ibáñez-Justicia *et al.* 2020).

Le nombre de personnes susceptibles de contracter ces différentes arboviroses ne cesse de croître à travers le monde. Faute de traitement curatif et de vaccins efficaces contre ces arboviroses, la lutte repose essentiellement sur la réduction ou la suppression du contact entre l'homme et les moustiques vecteurs. Cette lutte anti-vectorielle (LAV) implique une surveillance accrue afin d'estimer les risques de transmission des arbovirus, de planifier les stratégies de lutte et d'évaluer l'impact de ces stratégies de lutte sur le niveau d'exposition de la population humaine. Cette surveillance est actuellement basée sur des méthodes purement entomologiques telles l'identification des gîtes larvaires positifs, l'échantillonnage des moustiques adultes par piégeage, la capture sur homme (CSH). Toutefois, ces méthodes présentent de nombreuses limites d'efficacité et de précision qui rendent difficile leur application à grande échelle sur le terrain (Boyer, Foray, and Dehecq 2014; Cromwell *et al.* 2017a). Au regard de la forte capacité d'expansion de ces arboviroses, il apparaît nécessaire de développer de nouveaux outils qui soient faciles à appliquer sur le terrain et complémentaires de ceux existants, afin de mieux évaluer l'exposition des hommes aux piqûres des vecteurs d'arbovirus humains, et donc au risque de transmission de ces arbovirus, pour contrôler les maladies.

Ainsi, nous nous sommes intéressés au développement d'outils dont le principe est basé sur la relation immunologique qui s'établit entre l'Homme et le vecteur au cours de son repas sanguin.

La transmission des arbovirus à l'homme a lieu au cours du repas sanguin d'un moustique du genre *Aedes* ou *Culex* infecté. Lors de la prise de sang, le moustique, qu'il soit infecté ou non, injecte sous la peau de l'homme de la salive constituée d'un cocktail de molécules bioactives (protéines) dont le rôle majeur est de contrecarrer les réponses hémostatiques et inflammatoires dues à la piqûre chez l'homme. Mais certaines protéines salivaires sont immunogéniques et induisent une synthèse d'anticorps. Une approche intéressante est d'exploiter ces propriétés immunologiques des protéines salivaires des moustiques pour développer des biomarqueurs d'exposition aux piqûres des vecteurs basés sur le dosage de la réponse anticorps anti-salive induite chez l'homme par les protéines salivaires, et évaluer ainsi

le risque de transmission des arbovirus. Toutefois, l'utilisation des anticorps IgG ou IgM antiprotéines de la salive totale des vecteurs comme biomarqueurs d'exposition peut ne pas être suffisamment spécifique dans certains contextes, car certaines protéines salivaires sont partagées entre les moustiques ou les arthropodes de différents genres ou différentes espèces comme *Culex pipiens quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Cimex lectularis*, *Anopheles gambiae* et *Culex tarsalis* (Ribeiro et al. 2004; 2007; 2007; Cornelie et al. 2007; Francischetti et al. 2010a; Calvo et al. 2010; Ribeiro et al. 2018), et il sera difficile d'identifier de façon formelle le genre ou l'espèce de vecteurs incriminés dans l'exposition humaine aux piqûres de ces derniers. Dans le but d'optimiser ces indicateurs prometteurs (IgG et IgM), l'identification de protéines et/ou de peptides salivaires spécifiques et antigéniques de moustiques *Aedes* et *Culex* au moyen des techniques immuno-protéomiques et bio-informatiques, ont été réalisées (Poinsignon et al. 2010; Elanga Ndille et al. 2012a). Ces travaux ont conduit à i) l'identification de la protéine salivaire 30 kDa chez *Culex quinquefasciatus*, protéine qui semble être la protéine la plus immunologique des protéines salivaires chez cette espèce (Zhikang Peng and Simons 2004); ii) l'identification de la protéine salivaire 34 kDa spécifique au genre *Aedes* (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2010 ; Elanga Ndille et al. 2012b; Ndille et al. 2014a; Elanga Ndille et al. 2016b). Fait intéressant, le peptide Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti*, a été identifié et validé comme candidat biomarqueur spécifique de l'exposition humaine aux piqûres des *Aedes* majeurs (*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*) dans plusieurs pays : Bénin, RDP Laos, Ile de La Réunion (Elanga Ndille *et al.*, 2012; 2014 et 2016).

Dans le cas du moustique *Culex quinquefasciatus*, cette thèse sera le lieu de développer et valider i) les EGS de *Cx quinquefasciatus* comme candidat biomarqueur d'exposition aux piqûres des *Culex* et la protéine recombinante 30 kDa comme indicateur spécifique de niveau d'exposition des hommes aux piqûres du genre *Culex* ou de l'espèce *Cx quinquefasciatus*. La protéine salivaire recombinante de 30 kDa, la technique de l'immunoblot a montré qu'elle est la composante salivaire la plus immunogénique dans la solution des protéines salivaires chez *Cx quinquefasciatus* (Zhikang Peng, Li, and Simons 1998; Zhikang Peng and Simons 2004; Djegbe et al. 2011; Z. Peng et al. 2016).

Ce manuscrit comporte trois grandes parties. La première, consacrée aux généralités, présentera les principaux vecteurs d'arboviroses humaines rencontrés dans nos zones d'étude, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et *Cx. quinquefasciatus*, leur bio-écologie, l'épidémiologie des arboviroses transmises par ces vecteurs ainsi que les méthodes utilisées pour lutter contre ces maladies et la rapide expansion des arboviroses à travers le globe. Le rôle des protéines

salivaires des moustiques lors du repas sanguin et la réponse immunitaire induite chez l'hôte vertébré seront décrites, l'historique du développement de biomarqueurs d'exposition de l'homme aux moustiques vecteurs *Aedes* et *Culex* basés sur le dosage des anticorps dirigés contre ces protéines ou une partie de ces protéines salivaires sera retracé.

La deuxième partie présentera les objectifs de notre travail de thèse, les différents sites d'étude et les résultats de nos travaux, divisés en trois volets :

- i) l'évaluation du risque de transmission des arboviroses en milieu urbain africain (présenté sous la forme d'un article soumis).
- ii) l'évaluation du risque de transmission d'exposition de l'Homme à *Ae. albopictus* dans le Sud de la France métropolitaine.
- iii) le développement d'un candidat biomarqueur d'exposition aux *Culex* (présenté sous la forme d'un article publié dans *PLOS Neglected Tropical Diseases*).

Enfin, la troisième partie comportera la discussion générale et la conclusion générale, et nous envisagerons des perspectives nouvelles d'applications des biomarqueurs immunoépidémiologiques d'exposition aux piqûres des moustiques vecteurs de pathogènes aux hôtes vertébrés et source de nuisances.

I. LES MOUSTIQUES *Aedes* ET *Culex* VECTEURS D'ARBOVIRUS HUMAINS

Un certain nombre d'arthropodes hématophages sont vecteurs d'arbovirus humains. Ils appartiennent à plusieurs ordres, parmi lesquels l'ordre des Diptères, auquel appartiennent les moustiques, occupe une place importante (Rodhain 2015). La famille des Culicidés (*Culicidae*), du sous-ordre des Nématocères, regroupe l'ensemble des moustiques. Dans le cadre de notre étude, les travaux ont porté sur deux genres de moustiques : le genre *Aedes* dont les espèces majeures sont *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* et le genre *Culex* dont l'espèce représentative dans cette étude est *Culex quinquefasciatus*.

1.1. Répartition géographique, d'*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* et *Culex quinquefasciatus*

Ces trois espèces de vecteurs sur lesquelles porte notre étude sont originaires de diverses parties du globe et ont gagné pratiquement tous les continents.

Originaire du continent africain, *Aedes aegypti* (Linnaeus,1792) (**Figure 1A**) se rencontre à présent sur toutes les zones tropicales et subtropicales du globe terrestre et son aire de distribution s'est élargie ces dernières décennies (Kraemer *et al.*, 2015). En Afrique, d'abord détecté en milieu selvatique (Mattingly 1957), il s'est adapté en milieu domestique et péri-domestique, surtout en Afrique de l'Ouest (Powell and Tabachnick 2013; Brown, McBride, et al. 2011; Crawford et al. 2017).

Aedes albopictus (Skuse,1894) ou moustique tigre (**Figure 1B**) est quant à lui originaire d'Asie du Sud-Est et présent sur tous les continents. En effet, ces dernières décennies, il a envahi presque toutes les parties du globe. En Europe, la première incursion d'*Ae. albopictus* a été signalée en Albanie en 1979 (Adhami and Reiter 1998), puis en Italie en 1990 (Sabatini et al. 1990).

La capacité des moustiques *Aedes* à exploiter les habitats de petite taille dans les zones urbaines, à produire des œufs en diapause dans les régions tempérées, et à voyager dans des véhicules le long des réseaux routiers, a facilité son déplacement vers plus de 28 pays européens et son établissement dans de grandes parties du bassins méditerranéen (Medlock et al. 2015; Di Luca et al. 2017a; Trájer 2021). Plusieurs espèces du genre *Aedes* se sont donc établies suite à l'importation, et constituent une nuisance notable (Kraemer et al. 2015; Cull et al., 2021). En France métropolitaine depuis 2004, il s'est solidement implanté à partir du Sud (Delaunay et al. 2007; 2012) et 64 départements de l'hexagone sont aujourd'hui colonisés par ce moustique à forte expansion (Roche et al. 2015).

Enfin, *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (**Figure 1C**) bénéficiant des changements de conditions climatiques, jouit lui aussi d'une aire de répartition très importante puisqu'il est présent sur tous les continents.

Cette espèce se rencontre en Afrique subsaharienne, en Afrique du Nord, en Asie, aux Etats-Unis, dans le Sud-est de l'Europe, dans le pacifique et même en Arabie Saoudite (Samy et al. 2016). Elle se rencontre dans des milieux qui souffrent d'un manque d'infrastructures d'assainissement où des collections d'eau stagnante riche en nutriments en décomposition y sont abondantes. En Afrique, le milieu urbain est son domaine de prédilection car il lui procure les gîtes favorables à son développement (Salako *et al.*, 2019). Cette facilité de colonisation de différents endroits du monde par les moustiques *Aedes* et *Culex* est liée à plusieurs facteurs qui contribuent à leur implantation et à leur expansion rapide dans le monde

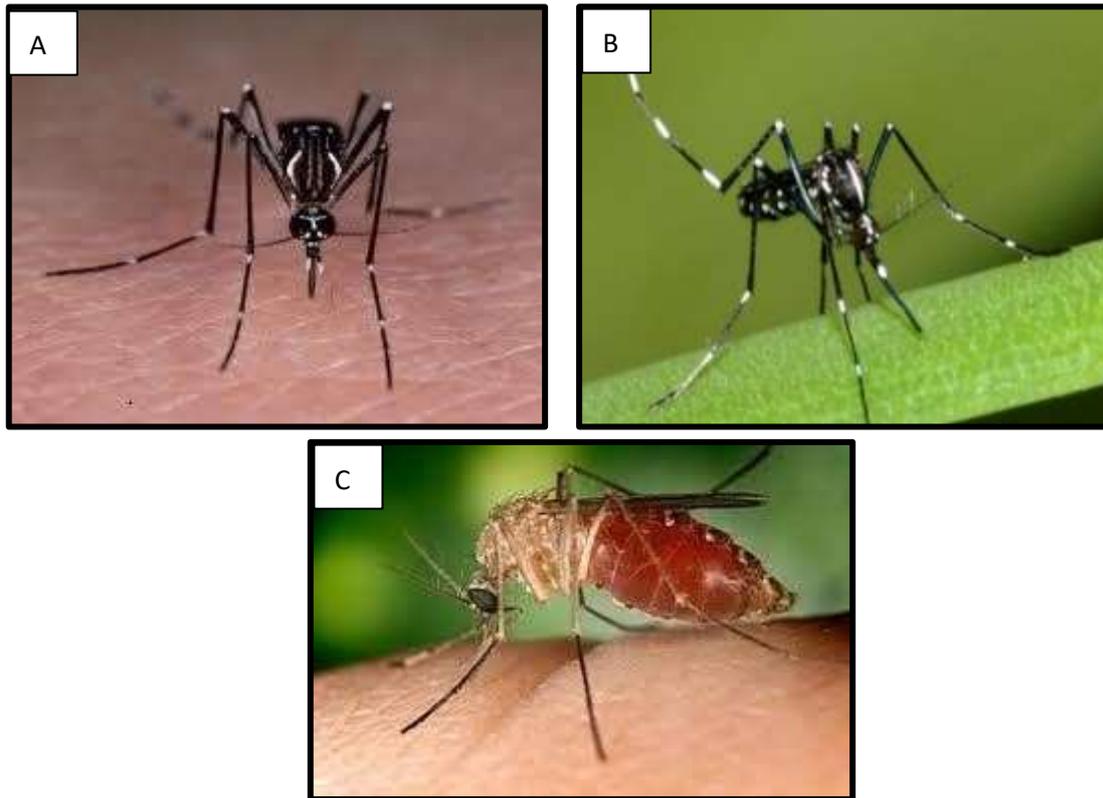


Figure 1: Vecteurs d'arbovirus impliqué dans notre étude (A) *Aedes aegypti*, (B) *Aedes albopictus* et (C) *Culex quinquefasciatus*

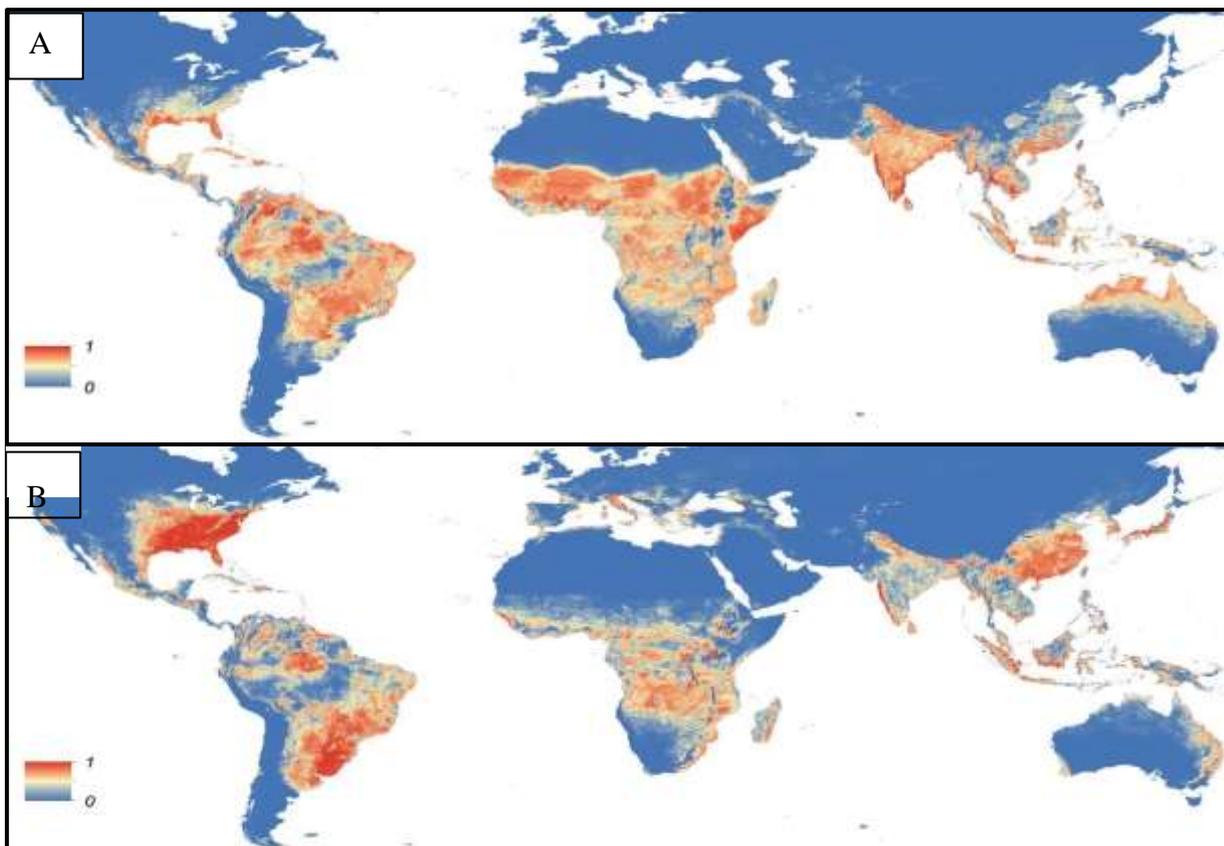
(A) *Aedes aegypti* (lewebpedagogique.com), (B) *Aedes albopictus* (eid-rhonealpes.com) et (C) *Culex quinquefasciatus* (fr.wikipedia.org).

1.2 Facteurs de distribution des moustiques *Aedes* et des *Culex* à travers le monde

Les éléments favorisant la conquête de nouveaux territoires par les *Aedes* et les *Culex* sont de plusieurs ordres. D'abord, les facteurs climatiques caractérisés par une élévation globale des températures et une variation des quantités de pluie sur l'ensemble du globe. Ces conditions influençant considérablement l'abondance et la durée du cycle de développement des moustiques, favorisent la colonisation définitive ou temporaire, des milieux tempérés par ces vecteurs (Gould and Higgs 2009; Kraemer et al. 2019). En plus, l'urbanisation galopante et anarchique dans les pays tropicaux en l'occurrence dans les pays subsahariens du continent africains, représente une part importante dans l'expansion de ces vecteurs. Le développement des villes densément peuplées et présentant des difficultés de gestion de l'environnement (absence de service régulier et efficace de collecte de déchets ménagers, le manque d'entretien des caniveaux, etc.), créent des conditions favorables à la formation de gîtes larvaires (Fofana et al. 2012; Batallán et al. 2015; Fournet et al. 2016b). L'utilisation des réservoirs de stockage

d'eau par des populations dans les zones qui manquent d'adduction d'eau courante participe aussi à la formation des gîtes larvaires des *Aedes*. Le commerce de pneus usagés dans le monde est aussi incriminé dans cette dispersion. L'espèce *Ae aegypti* par exemple a été introduite par ce canal au Pays-Bas (Brown, Scholte, et al. 2011). Aussi, l'utilisation à grande échelle des terres agricoles, modifiant la couverture végétale, influence l'abondance, la distribution et les comportements de recherches de l'hôte par les vecteurs *Aedes* (Zahouli et al. 2017). L'usage non sélectif des engrais et pesticides dans le milieu agricole crée aussi une pression de sélection favorisant l'apparition de résistance à ces pesticides. Le déplacement passif des vecteurs s'opérant via les transports (aériens, maritimes et terrestres) a incontestablement joué sa part dans la colonisation de nouveaux lieux par les *Aedes*.

Les fréquences des précipitations ainsi que leur quantité dans le contexte du changement climatique, les orages dont les dégâts peuvent causer des crues et la résurgence des nappes phréatiques sont de nature à maintenir constante la population des moustiques *Culex*. Ces facteurs dépendent essentiellement de la région et il est difficile pour l'homme de les gérer. Les systèmes d'irrigation par gravité tels que les rizières, les zones d'élevage piscicoles et d'aquaculture, les stations d'épuration, barrages, les lacs artificiels sont autant de modifications liées à l'activité humaine qui participent considérablement à l'expansion des moustiques *Culex* sur tous le globe terrestre (Muturi *et al.*, 2007; 2009). **Les figures 2A, 2B et 2C** indiquent la distribution mondiale de ces trois espèces de vecteurs.



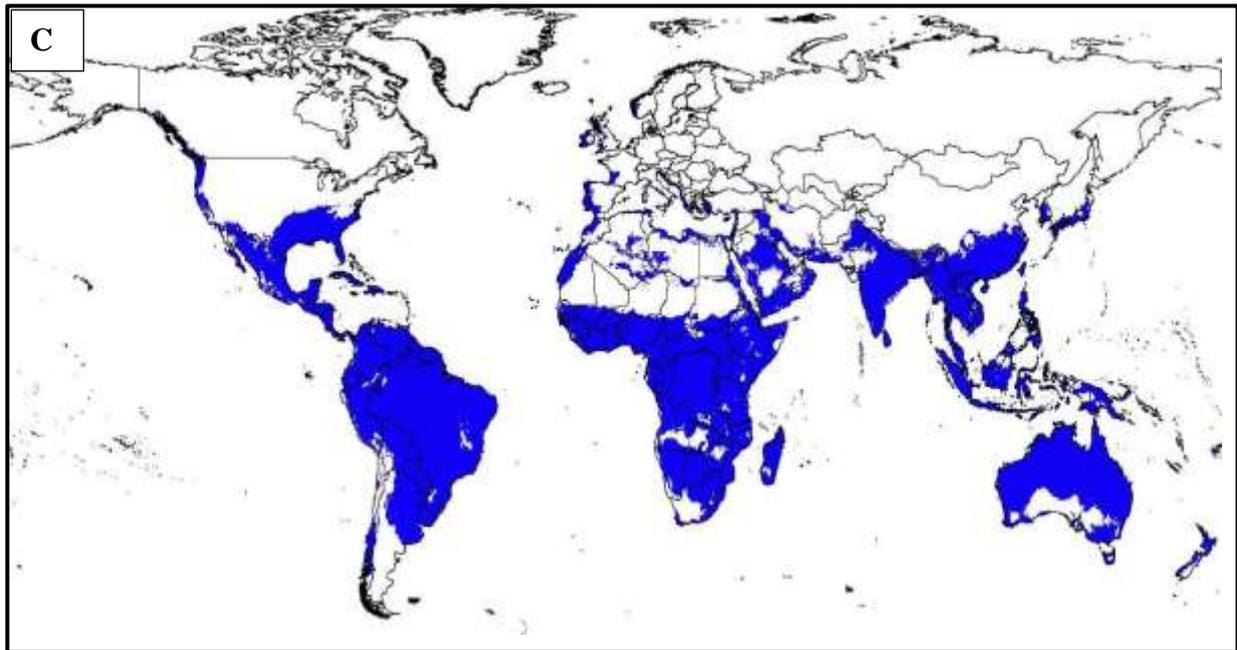


Figure 2: Distribution potentielle mondiale de trois vecteurs majeurs d'arboviroses. (A) *Aedes aegypti* et (B) *Aedes albopictus* dans le monde.

Le chiffre (1) indique la présence d'*Aedes* et (0) indique l'absence d'*Aedes* sur le globe (Kraemer et al., 2015). (C) Distribution de *Culex quinquefasciatus* à l'échelle du globe. Les zones en bleu sont les localisations de *Culex quinquefasciatus* sur le globe (Samy et al., 2016).

1.3 Bio-écologie des *Aedes* et *Culex*

1.3.1. Cycle biologique et bio-écologique

Comme tous les autres moustiques, les *Aedes* et les *Culex* sont des insectes holométaboles (les larves ont un aspect et un mode de vie différents de ceux des formes adultes) et présentent un cycle de vie à deux phases : une phase aquatique et une phase aérienne.

La phase aquatique pour les *Aedes*, passe par les œufs très résistants à la dessiccation et pondus isolément au bord de la surface de l'eau des gîtes par les femelles. Pour *Culex* les œufs sont pondus habituellement à la surface de collection d'eau riches en matière organique et flottent grâce à la présence de flotteurs apicaux. Ils sont protégés par deux enveloppes (l'endochorion interne épais et l'exochorion externe plus mince). Ils sont agglutinés en barquettes stables de plusieurs dizaines d'œufs. La **Figure 3** présente les œufs de *Aedes* et *Culex*.

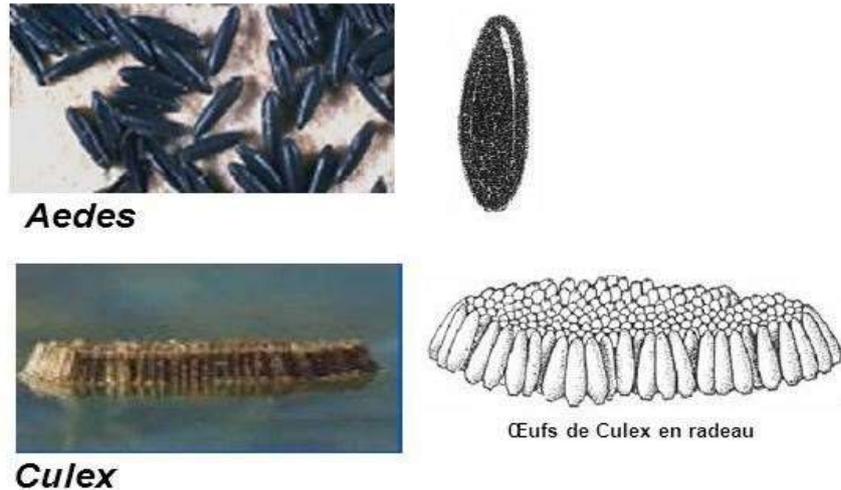


Figure 3: Oeufs des moustiques *Aedes* et *Culex*.

Les œufs des *Aedes* de couleur sombre sont pondus isolément au bord des récipients contenant une petite collection d'eau, et ceux de *Culex* sont pondus en grappe (radeau) à la surface de l'eau. **Source :** *Mémoire de DEA, Dynamique de la faune culidienne sur le campus de Yaoundé I, Cameroun (Kamgang et al., 2006). Consulté et modifié par Zamblé le 28 /01/2022.*

A l'instar des œufs des autres moustiques, les œufs éclosent dans les 34 à 48 heures qui suivent leur mise en eau après une période de quiescence pour donner naissance à des larves. Les larves traversent 4 stades (L1, L2, L3 et L4) avant d'aboutir à la forme nymphale. Pour *Aedes* cette phase aquatique dure 6 à 7 jours selon les conditions climatiques et la disponibilité en nourriture (Couret et al., 2014) et se déroule dans des gîtes domestiques (**Figure 4**) résultant des activités humaines tels que les soucoupes de pots de fleurs, les pneus usés, les boîtes de conserve, les récipients pouvant stocker de l'eau ou de larges amas de déchets ménagers pour les *Aedes* (Dieng et al. 2018). Ces gîtes qualifiés de gîtes artificiels favorisent le fort contact de ce vecteur avec l'homme. A côté de ces gîtes artificiels, il existe des gîtes naturels retrouvés dans des ravins, des trous de rochers, des bambous cassés, des creux d'arbres ou plantes à larges feuilles engainantes, des coquilles d'escargot et les terriers des crabes pour l'*Aedes polynesiensis*. Ces orifices collecteurs d'eau de pluie sont exploités par des *Aedes* qui entretiennent le cycle selvatique (en forêt) de la transmission de certains arbovirus. Les *Culex*, qualifiés de moustiques des villes et des lieux "sales", vivent dans les fosses septiques, les caniveaux et les collections d'eaux polluées de nos villes (Muturi et al. 2007; 2009).

La phase aérienne quant à elle est marquée par l'émergence de moustiques adultes des stades nymphaux. Après l'émergence, l'adulte reste immobile pendant 24 à 48 heures, le temps que sa cuticule sèche, que ses ailes se déploient et que son appareil reproducteur soit fonctionnel. Le mâle devient sexuellement fonctionnel après 24 à 48 heures, alors que la femelle a besoin de 30 à 60 heures. Après leurs premiers repas composés de nectar, l'unique et premier accouplement de la femelle a lieu après leur envol après 24 heures à 36 heures. Les mâles quant à eux peuvent s'accoupler plusieurs fois au cours de leur vie. Une fois fécondée, la femelle qui est seule hémaphage, entame la recherche active d'un hôte vertébré pour un repas sanguin, source préférentielle de protéines utiles à la maturation de ses œufs. Gorgée, la femelle trouve un endroit de repos pour la maturation de ses œufs puis un gîte pour pondre et le cycle reprend. Qualifié de cycle gonotrophique ou cycle trophogonique, il est espacé de 3 à 5 jours et tient compte de la durée de vie des femelles de moustique qui se situe entre 4 à 8 semaines selon les conditions du milieu (**Figure 5**).



Figure 4: Gîtes larvaires artificiels d'*Aedes* et de *Culex* (Di Luca et al. 2017b)

(a ; b ; c ; d ; e ; f ; g ; h ; i) gîtes préférentiels des *Aedes* et j ; k ; l gîtes préférentiels des *Culex*

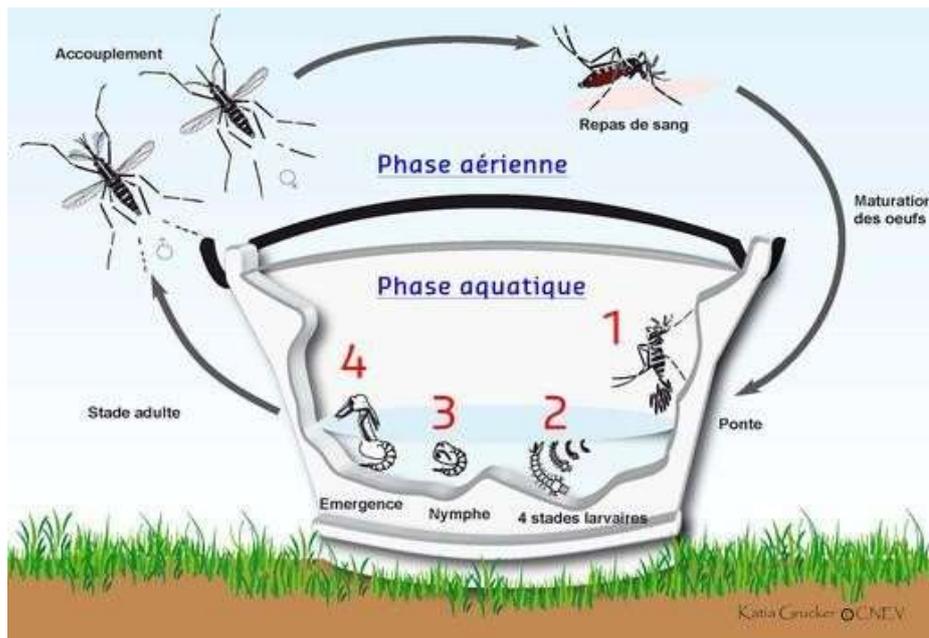


Figure 5: Cycle général de la reproduction et de la vie des moustiques

Consulté le 31/12/2021 sur <https://www.cavem.fr/moustiques-tigres/biologie-et-cycle-devie-de-l-insecte-1248.html>

1.3.2 Comportement de piqûre et cycle nyctéméral d'agressivité des *Aedes* et de *Culex*

Etroitement lié à l'Homme à cause de la nature anthropisée de leurs gîtes (petites collections d'eau non polluée pour les *Aedes* et collections d'eau chargée en matière organique pour les *Culex*), les femelles de ces vecteurs hématophages et solénophages ont besoin de sang de vertébrés pour assurer la maturation de leurs œufs. Le choix de l'hôte se fait grâce aux fonctions sensorielles. Les antennes leur permettent de percevoir des émissions odoriférantes, telles que l'acide lactique, l'acétone ou les composés phénoliques et l'œil pour les espèces nocturnes (*Culex*), grâce à la lumière leur indique les habitations. Lorsque l'hôte est proche, les couleurs foncées (bleu sombre, noir) ou les contrastes de couleur sombres et claires, exercent un pouvoir attractif (Tauxe et al. 2013; Wolff and Riffell 2018). Lorsque la femelle veut se nourrir, elle vient se placer sur l'hôte choisi, et se sert de ses palpes maxillaires pour le repérage thermique d'un capillaire sanguin. Le labium se replie à la surface de la peau et les stylets pénètrent dans le tégument afin de cathétériser le vaisseau. Les femelles *Aedes* et *Culex* se nourrissent à l'intérieur comme à l'extérieur des habitations. Après leur repas de sang, elles peuvent se reposer aussi bien à l'intérieur (endophiles) qu'à l'extérieur (exophiles). Ces deux moustiques très actifs en milieu urbain, présentent des périodes d'activités différentes. Les

Aedes sont principalement actifs pendant la journée, avec deux pics d'activité, un au petit matin et un autre au crépuscule. Quant aux *Culex*, l'heure à laquelle piquent les femelles débute à la tombée du jour et dure jusqu'à l'aube (Araujo, Guo, and Rosbash., 2020).

1.3.3 Compétence vectorielle des *Aedes* et *Culex*

La compétence vectorielle se définit comme la faculté qu'a un vecteur à acquérir, à maintenir, à assurer la réplication et à transmettre un agent pathogène à un hôte vertébré. De par leur comportement hématophage, les moustiques ingurgitent des agents pathogènes de diverses natures lors de leur prise de repas sanguin sur un hôte infecté et ils les transmettent à un autre hôte vertébré lors d'un prochain repas de sang. Cet état de fait implique donc un contact régulier entre le moustique et l'hôte vertébré.

Pour y parvenir, le vecteur doit répondre à certaines conditions (une bonne longévité, une préférence trophique, une bonne densité, etc.) sur lesquelles s'exercent les facteurs environnementaux (température, humidité, abondance de nourriture pour les larves...). C'est donc la combinaison de la compétence vectorielle et de ces facteurs qui offrent au vecteur sa capacité à transmettre le virus aux hôtes, donc sa capacité vectorielle.

Les vecteurs *Aedes* sont ainsi majoritairement compétents pour les virus du chikungunya (CHIKV), de la dengue (DENV), de la fièvre jaune (YFV), du Zika (ZIKV) et les *Culex* le sont pour l'encéphalite japonaise (EJV), l'encéphalite de Saint-Louis (ESLV), le virus du Nil occidental (WNV) (Paupy et al. 2009; Diagne et al. 2014; Souza-Neto, Powell, and Bonizzoni 2019; Auerswald et al. 2021; Eynde et al. 2022). La présence concomitante de ces vecteurs et de ces affections qu'ils induisent chez l'Homme dans les différentes régions du monde intertropicales et tempérées du globe, constituent d'ailleurs une véritable difficulté à surmonter pour la mise en place des stratégies de lutte contre ces vecteurs et donc les vastes problèmes de lutte contre la transmission des arbovirus.

II. LES PRINCIPALES ARBOVIROSES

2.1 Les arboviroses à l'échelle du globe

La distribution géographique (**Figure 6**) des virus transmis par des arthropodes s'est étendue ces dernières années, suivant l'extension de leurs vecteurs. Si ces virus peuvent se multiplier chez l'arthropode sans déclencher d'affections, ils peuvent cependant causer chez l'hôte vertébrés des manifestations pathologiques. On en dénombre à travers le monde plus de

500 appartenant à cinq familles (*Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* et *Togaviridae*), une centaine sont impliqués dans les maladies humaines (Blair et al., 2000). Le **Tableau 1** présente quelques arbovirus et leurs vecteurs.

Dans le cadre des travaux de notre thèse, nous allons nous intéresser à l'épidémiologie des arboviroses induites par les virus transmis aux humains par *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et *Cx quinquefasciatus*. Il s'agit principalement du CHIK, de la DEN, de la FJ, FVR, USUTU, WN et du ZIKA.

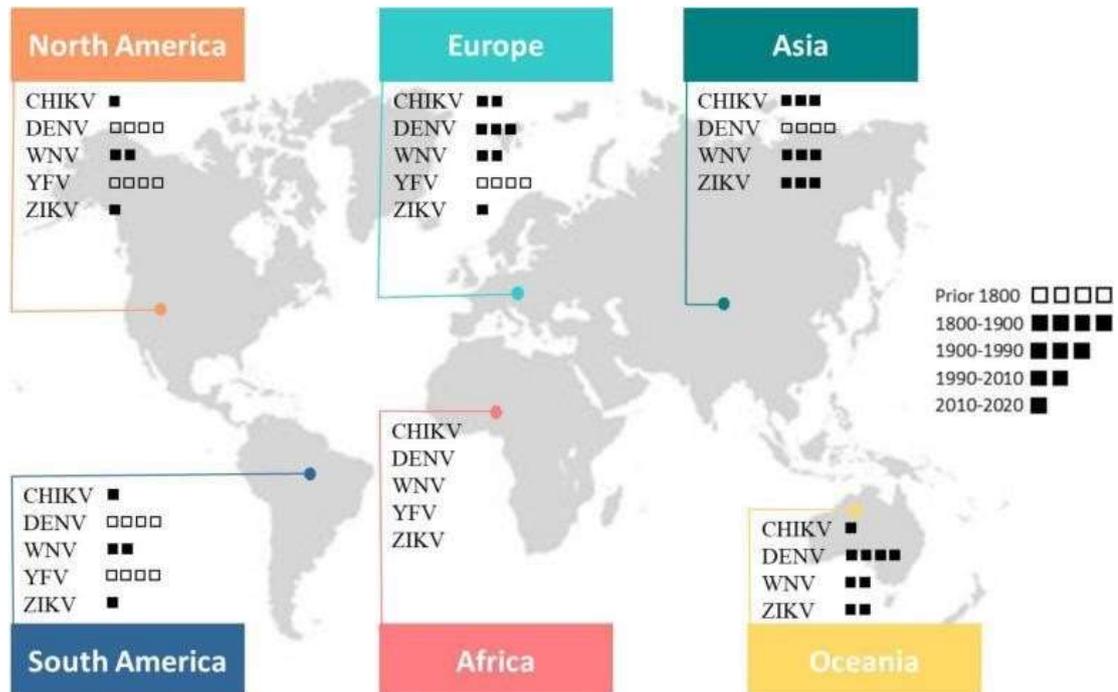


Figure 6: Distribution mondiale de cinq (5) arbovirus (transmission actuelle ou passée).

Les petits carrés font référence à la période de la première détection documentée chez l'homme (introduction du virus). Les études phylogénétiques suggèrent une origine africaine pour les cinq virus (Braack et al., 2018).

Tableau 1: Quelques arborivirus majeurs et leurs vecteurs moustiques

Agents pathogènes	Maladies	Répartition	Vecteurs principaux	Principaux hôtes
Virus chikungunya (Alphavirus)	Chikungunya	Zone tropicale (Foyer limité en zones tempérées)	<i>Aedes</i>	Singes/Hommes
Virus de la dengue (D1, D2, D3, D4)	Dengue	Monde tropical (foyer limité en zones tempérées)	<i>Aedes</i>	Aucun singe virus pour selvatiques/Hommes
(Flavivirus)				
Virus de la fièvre jaune (Flavivirus)	Fièvre jaune	Afrique tropicale et intertropic al	<i>Aedes</i>	Singes /Hommes
Virus de la fièvre de la vallée du Rift (Phlébovirus)	Fièvre de la vallée du Rift	Afrique	<i>Culex</i>	Ruminants /Hommes
Virus de la fièvre Usutu (Flavivirus)	Fièvre Usutu	Afrique et Europe	<i>Culex</i>	Rongeurs,chevaux,oiseaux,Hommes
Virus West Nil (Flavivirus)	Fièvre west Nile	Tous les continents	<i>Culex</i>	Chevaux, Hommes
Virus à Zika (Flavivirus)	Fièvre Zika	Tous les continents	<i>Aedes</i>	Hommes

2.1.1 Chikungunya

2.1.1.1 Répartition géographique

Des cas sporadiques de chikungunya ont maintes fois été enregistrés dans les régions d'où le CHIKV est originaire, l'Afrique centrale et orientale (Russo *et al.*, 2020), mais les grandes épidémies humaines sont peu fréquentes dans ces régions. Les premières épidémies urbaines significatives de fièvre de chikungunya ont été documentées au début des années 1960 à Bangkok, et de 1963 à 1973 en Inde (Halstead, Nimmannitya, and Margiotta 1969; Mavalankar, Shastri, and Raman 2007; Sang et al. 2008). Des épidémies de faibles ampleurs se sont

produites périodiquement au cours des 30 années suivantes, sans qu'aucune épidémie majeure ne se signale jusqu'en 2004, où une large épidémie s'est produite sur la côte du Kenya (Sergon et al. 2008). Cette épidémie a marqué le début d'une période de 4 ans au cours de laquelle le CHIKV s'est répandu dans de nombreuses îles de l'océan indien, en Inde et dans certaines parties de l'Asie du Sud-Est (Khongwichit et al. 2021). En outre, au moins 18 pays d'Asie, d'Europe et d'Amérique du Nord ont signalé des cas importés de chikungunya. Quelques-uns ont fait face à des transmissions autochtones de CHIKV.

En Afrique, des épidémies ont sévi au Gabon en 2007 et en 2010 avec plus de 10 000 cas (Nkoghe et al. 2012), ainsi qu'au Sénégal entre 2009-2010 (Sow *et al.*, 2018). L'isolation récente du CHIKV dans *Ae. vittatus* en Côte d'Ivoire et au Sénégal (Diagne et al. 2014; Sudeep and Shil 2017), montre le risque de propagation de ce virus au sein des populations des pays de l'Afrique de l'Ouest. Dans l'outre-mer français, l'Île de la Réunion a été touchée par une épidémie de grande ampleur en 2005-2006 (environ 40 % de la population).

En Europe, l'Italie en 2007, a enregistré 200 cas de chikungunya (Carrieri et al. 2012) et la France métropolitaine à son tour, a enregistré ces dernières années des cas importés de chikungunya, ainsi que des cas de transmission autochtones. En 2021; 3 cas importés de chikungunya a été signalé par Santé publique France (www.santepubliquefrance.fr consulté le 03 /11/2021).

2.1.1.2 L'agent causal

Le CHIKV est originaire d'Afrique centrale et orientale (Robinson et al.,1955), où l'on a constaté qu'il circulait dans un cycle sylvatique chez les moustiques de l'espèce *Aedes* vivant dans la forêt et les primates.

Appartenant à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*, le CHIKV possède un réservoir animal uniquement en Afrique. Il existe 3 sérotypes décrits à ce jour: Est-centreSud-africain (ECSA), Ouest africain et asiatique (Schwartz *et al.*, 2010). Isolé pour la première fois en Tanzanie en 1952 chez *Ae. aegypti*, le CHIKV comporte comme matériel génétique, un simple brin d'ARN d'environ 11800 nucléotides. Des études ont montré qu'une mutation ponctuelle dans la glycoprotéine d'enveloppe E1 du virus a provoqué une adaptation de ce virus au vecteur secondaire qu'est *Ae. albopictus* dans plusieurs parties du monde (Khongwichit et al. 2021). Cette modification génétique a probablement contribué à l'ampleur et à la distribution des épidémies dans les zones où le vecteur naturel de CHIKV n'existait pas.

2.1.1.3 La symptomatologie

La première série de cas de patients infectés par le CHIKV, publiée en 1955, décrivait 115 patients hospitalisés en Tanzanie avec l'apparition aiguë d'une forte fièvre, de douleurs articulaires sévères et d'une éruption cutanée (Robinson 1955). Ces cas ont été initialement diagnostiqués comme une maladie de type Dengue jusqu'à ce que le test en laboratoire confirme la présence du CHIKV. Présentant généralement une période d'incubation comprise entre 3 à 7 jours, les individus infectés par le CHIKV ne développent pas tous des symptômes. Les enquêtes sérologiques indiquent que 3 à 25 % des personnes ayant des anticorps contre le CHIKV ont des infections asymptomatiques (Montero et al., 2015). La forme symptomatique se traduit par l'apparition brutale de fièvre suivie de polyarthralgies graves principalement au niveau des poignets, des coudes, les doigts, des jambes et des chevilles (Khongwichit et al. 2021). Les arthralgies des membres inférieurs peuvent être gravement invalidantes, entraînant une démarche lente, large et hésitante qui peut persister pendant des mois. La proportion d'individus présentant une éruption cutanée est très variable d'une étude à l'autre, ce qui en fait un signe moins fiable de chikungunya.

2.1.2 Dengue

2.1.2.1 Répartition géographique

La dengue est l'exemple type d'arbovirose en émergence constante. Elle est la plus répandue au niveau mondial avec une prédilection pour les zones urbaines et semi-urbaines et représente un problème de santé publique majeur dans pratiquement toutes les régions tropicales et subtropicales du globe.

Sa prévalence a progressé de façon spectaculaire au cours des dernières décennies. Elle est devenue endémique dans plus d'une centaine de pays d'Afrique, du continent américain (Sud des Etats-Unis d'Amérique, l'Amérique du Sud), de la Méditerranée orientale, de l'Asie du Sud-Est et du pacifique occidental. Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 2,5 milliards d'individus sont exposés au risque d'infection par le DENV (soit environ 40 % de la population mondiale). Chaque année dans le monde, il y aurait près de 50 millions d'infections dont 500 000 formes sévères nécessitant une hospitalisation, et responsables de 20 000 à 30 000 décès, principalement chez les enfants (Bhatt et al. 2013; WHO, 2014).

En Afrique, d'où la dengue pourrait être originaire, l'infection est paradoxalement peu rapportée, probablement car elle est moins diagnostiquée et donc sous-estimée du fait de

manifestation cliniques bénignes voire asymptomatiques, ou de formes sévères non diagnostiqués au cours d'épidémies d'ampleur limitée, ou encore parce qu'elle est confondue à d'autres pathologies endémiques dans la zone (e.g le paludisme) (Were et al.,2012). Des années 1970 à 2000, une transmission selvatique a prédominé dans la région, en particulier au Sénégal et au Burkina Faso avec la notification de cas sporadiques (Gonzalez et al. 1985). Par la suite, à partir des années 2000, l'Afrique de l'Ouest et notamment le Burkina Faso (en 2003, 2004, 2007 et 2016), la Côte d'Ivoire en 2008 et le Sénégal en 2009 ont fait face à des épidémies de dengue (Ridde et al. 2014; 2016; Tarnagda et al. 2018; L'Azou et al. 2015; 'OMS, 2017). En 2019, la ville d'Abidjan faisait face à une épidémie de Dengue qui a affecté 130 personnes parmi lesquelles il y a eu 2 décès (OMS,2019 <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> consulté le 3/01/2022).

En France métropolitaine, la dengue circule depuis 2004 dans les zones d'implantation d'*Ae. albopictus*. Le premier cas de dengue autochtone a été déclaré par le Ministère de la Santé le 13 Septembre 2010 dans le département des Alpes-Maritimes. Toutefois en métropole, les cas diagnostiqués correspondent principalement à des cas d'importation de retour des voyageurs des zones d'endémie. Selon Santé publique France (Bulletin du 01 Mai au 21 Octobre 2021), 155 cas de dengue importées (13 cas venant de voyageurs qui avaient séjourné en Côte d'Ivoire et 103 cas de voyageurs venant de l'Île de la Réunion) ont été diagnostiqués. Parmi eux 133 cas ont été détectés dans des départements où le vecteur *Ae. albopictus* est implanté propice à la transmission autochtone de DENV (2 cas , 1 cas dans le VAR et 1 cas à Montpellier, santé publique France du 1^{er} Décembre au 30 Novembre 2021 , www.santepubliquefrance.fr consulté le 30 Janvier 2022) et donc au risque d'épidémie dans ces départements.

2.1.1.3 L'agent causal

Le virus de la dengue appartient au genre *Flavivirus* (famille des *Flaviviridae*) et présente 4 sérotypes différents DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DEN-4. Ces sérotypes se différencient par la composition de leur génome et de leurs antigènes de surface. Chaque sérotype regroupe de nombreux génotypes présentant une variabilité géographique et temporelle.

Le génome du DENV se présente sous forme d'un ARN simple brin de sens positif, long d'environ 11 kb. Il est composé d'un seul cadre de lecture ouvert et contient une région non traduite à chaque extrémité. L'ARN code une polyprotéine unique, qui est clivé pendant et

après sa traduction en sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) et en trois protéines structurales (C, prM et E). La protéine C est présente dans la capsid, la protéine prM est un précurseur de la protéine M qui est retrouvée dans la membrane et la protéine E est la composante principale de l'enveloppe virale (Murugesan and Manoharan 2020). Comme les autres virus à ARN, le génome de DENV est en constante variation à cause de l'ARN-polymérase ARN-dépendante qui n'a pas de mécanisme de vérification des erreurs lors de la réplication rapide du DENV et la grande quantité de virus retrouvée dans le monde est la résultante d'un phénomène complexe qui combine des facteurs intrinsèques (propre au couple virus-vecteur) et extrinsèques (température, insecticides, pluviométrie...) auxquels on ajoute les échanges intercontinentaux qui favorisent les « déplacements » de virus.

L'infection due à n'importe quel sérotype entraîne une immunité à vie contre ce sérotype. Cependant, cette immunité n'offre qu'une immunité croisée à court terme contre les autres sérotypes (Vicente et al. 2016).

Dans certaines régions tropicales, la présence simultanée de plusieurs sérotypes de DENV peut conduire à des situations dans lesquelles la maladie est hyperendémique (co-circulation de plusieurs sérotypes (Vicente et al. 2016).

En milieu urbain, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* sont les principaux vecteurs du virus de la dengue, mais certaines espèces comme *Ae. taylori*, *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus* participent aussi à sa transmission aux humains dans le cycle sauvage du virus.

2.1.1.4 La symptomatologie de la dengue

La dengue se manifeste sous 3 formes majeures: 1) une forme asymptomatique dans 50 à 80 % des cas ; 2) une forme classique ou «*dengue fever*» se manifestant après 5 à 8 jours (maximum 12 jours) d'incubation, par une forte fièvre (38,5°C) d'apparition brutale et au moins un signe algique; asthénie, arthralgies, myalgie, lombalgie, douleurs rétro-orbitaires, douleurs musculo-articulaires, céphalées, myalgies qui peuvent aboutir à une rémission transitoire et une immunité spécifique contre le sérotype en cause ; 3) une forme hémorragique ou «*dengue hemorrhagic fever*» qui peut conduire à la mort du malade. En effet la dengue peut se compliquer de formes hémorragiques, de choc hypovolémique ou de défaillance viscérale.

Il n'existe pas encore de traitement antiviral de la dengue. Le traitement est avant tout symptomatique, notamment antalgique ou antipyrétique. L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont contre-indiqués du fait du risque hémorragique. Les dengues compliquées relèvent d'un traitement symptomatique hospitalier (Sumarmo et al. 1983).

Pendant la phase de virémie (en moyenne 7 jours à partir du début des signes), des mesures de protection individuelle doivent être appliquées chez le patient et son entourage afin de limiter la transmission du virus par les moustiques vecteurs.

Son incidence s'est accrue de 30 fois ces dernières décennies selon le bilan d'activité de l'OMS (OMS, 2017) et les jeunes enfants sont les plus touchés par cette pathologie.

2.1.3 Fièvre jaune

2.1.3 .1 Répartition géographique

Maladie virale aiguë, la fièvre jaune fait partie des arboviroses en plein émergence et réémergence sur le continent Africain et le continent Sud-américain (**Figure 7**). De 1985 à 2009, ces deux parties du monde enregistraient 31445 cas de fièvre jaune (Monath and Vasconcelos 2015). Suite à des résultats de sérosurveillance menée pendant 15 ans, il a été rapporté à l'OMS environ 200 000 cas de FJ par an, avec environ 30 000 décès dans les zones où cette pathologie est solidement implantée (Vasconcelos and Monath 2016; Couto-Lima et al. 2017). En Chine, ont été diagnostiqués pour la première fois 11 cas importés d'Angola, (OMS 2018; Cracknell Daniels et al. 2021).

En Amérique du sud, la FJ a touché le Brésil en 2016 avec plus de 1000 cas et 79 décès signalés par les laboratoires de virologie (Couto-Lima et al. 2017).

Les grandes villes de l'Afrique sont également touchées ces dernières décennies: Abidjan (Côte d'Ivoire) en 2001, 2008 et récemment en 2019 avec 130 cas (dont un décès), Conakry (Guinée) en 2002, Dakar et Touba (Sénégal) en 2002, Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) en 2004, Kinshasa (République démocratique de Congo) en 2015 avec 16 décès et à Luanda (Angola) en 2015 avec 301 décès sur 2538 cas suspects (OMS,2016 <https://www.who.int/fr/newsroom/fact-sheets/detail/yellow-fever> consulté le 06/01/2016)

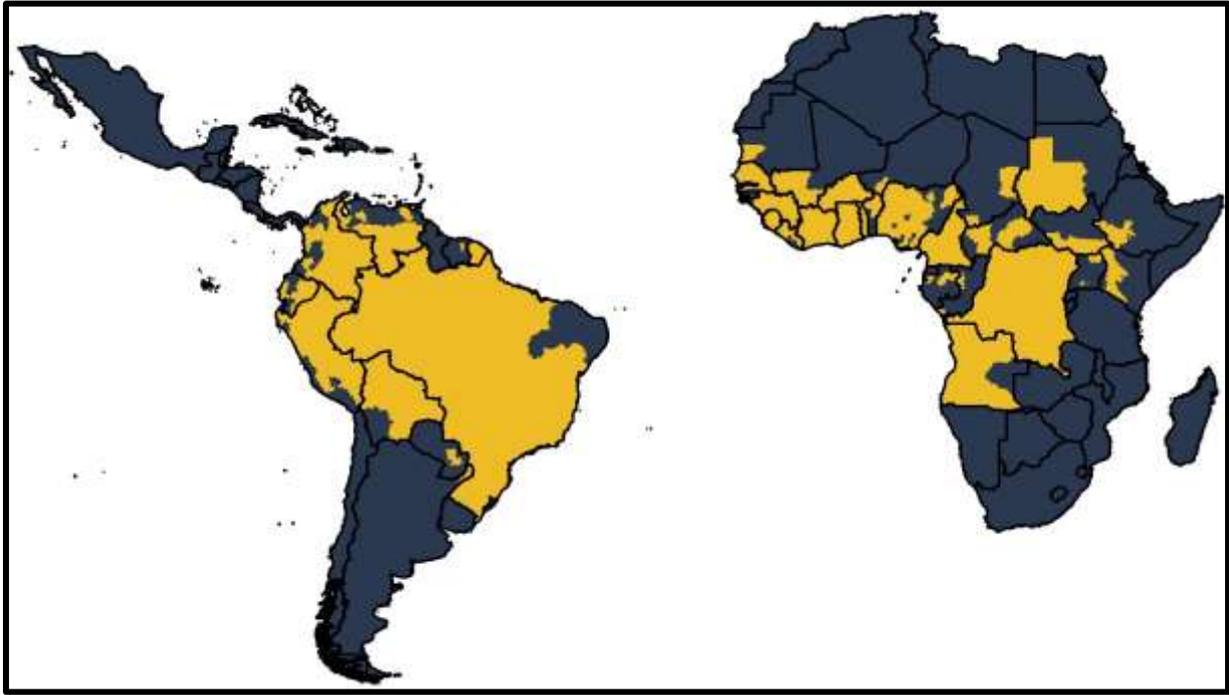


Figure 7: Distribution de l'incidence de la fièvre jaune depuis 1948 en Amérique du Sud et en Afrique.

(Gaythorpe et al., 2021). La partie jaune indique l'incidence de la fièvre jaune

2.1.3 .2 L'agent causal de la fièvre jaune

Décrite pour la première fois en 1968 au Yucatan (Mexique), la fièvre jaune (FJ) est causée par un virus (YFV, pour *Yellow Fever Virus*) du genre *Flavivirus*, qui a été isolé pour la première fois en Afrique de l'Ouest en 1927 et s'est répandu dans le nouveau monde pendant la traite des esclaves à partir du 16^e siècle (Hamlet et al. 2021). Appelé aussi virus amaril et circulant à la fois en milieu selvatique et en milieu urbain, il existe au moins sept (7) génotypes de la souche sauvage : cinq en Afrique et deux en Amérique du Sud (Mutebi *et al*, 2002). Ce virus est un petit virus d'environ 40 nm de diamètre. Il possède un génome à ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 11 à 12 kb (Vasilakis et al. 2019). Grâce à ces protéines, le virus est capable d'infecter et de se répliquer dans une cellule hôte.

Les génotypes africains, transmis majoritairement par *Ae. aegypti* (Attoh-Touré *et al.*, 2010) dans les grandes zones urbaines en Afrique de l'Ouest et par *Ae. simpsoni* en Afrique centrale, sont responsables des poussées épidémiques dans ces régions (Couto-Lima et al. 2017; Braack et al. 2018). Malgré l'existence d'un vaccin efficace contre la FJ, des épidémies de FJ continuent d'apparaître, du fait de la couverture vaccinale incomplète (Garske et al. 2014).

2.1.3 .3 Symptomatologie

La période d'incubation dans l'organisme dure 3 à 6 jours. L'infection reste asymptomatique chez de nombreuses personnes mais lorsque les signes apparaissent, les plus courants sont des myalgies, une fièvre, des maux de tête suivis d'une rémission transitoire après 3 à 4 jours.

Dans une petite proportion des cas, les patients entrent cependant dans une deuxième phase, plus toxique dans les 24 heures suivant la rémission initiale. Une fièvre élevée se réinstalle et plusieurs organes sont touchés, en général le foie et les reins. Dans cette phase, un ictère apparaît souvent (jaunissement de la peau et des yeux, d'où le nom de « fièvre jaune », avec des urines sombres et des douleurs abdominales accompagnées de vomissements. On peut observer des saignements dans la bouche, le nez, les yeux ou au niveau de l'estomac. Au cours de cette phase toxique, 50 % à 80 % des malades meurent dans les 7 jours.

2.1.4 Fièvre de la vallée du Rift

2.1.4.1 Répartition géographique

Décrite pour la première fois en 1931 dans la vallée du Rift au Kenya chez les moutons laineux d'importation (Daubney, Hudson, and Garnham 1931). Cette maladie touche les ruminants domestiques, en particuliers les petits ruminants. Elle s'étend de l'Afrique de l'Est, à la corne de l'Afrique, en Afrique australe et dans la péninsule arabique (Arabie saoudite et Yémen) en 2000 (Javelle et al. 2020). Aucun cas de cette maladie dans la zone européenne n'a encore été signalé. Mais la présence des vecteurs de cet arbovirus en Europe et en Asie associé à la généralisation des déplacements des populations à travers le monde, pourrait conduire une poussée épidémique de RVF dans ces parties du monde (Martinet et al. 2019; Tong et al. 2019). Des cas de suspicion ont été signalés parmi les forces armées françaises déployées au Niger en 2016(Tong et al. 2019).

Les premiers cas humains ont été signalés en 1951, en Afrique du Sud chez des individus ayant touché des animaux morts ou infectés de la maladie (Bron et al. 2021) puis L'Égypte a été particulièrement touchée durant les années 1977 et 1978 par des épizooties massives, accompagnées d'une épidémie humaine de 200000 cas et 600 décès (El-Akkad 1978; Imam, Darwish, and El-Karamany 1979).

Dans les années 2000, le Kenya, Somalie et en Tanzanie ont fait état de plus 100 000 dont 450 décès. Dans la péninsule arabique en 2002 environ 4000 personnes ont été détectées positives au RVF avec 200 morts (Mohamed et al. 2010; Nderitu et al. 2011).

La présence de ce virus en Afrique de l'Ouest constitue une menace pour la santé des populations de cette région. En effet les déplacements d'animaux d'élevage et des hommes sont très intenses et cela pourrait faciliter l'introduction du virus dans des indemnes en l'occurrence la Côte d'Ivoire puisque le vecteur *Culex quinquefasciatus* y est largement répandu.

2.1.4.2 L'agent causal de la fièvre de la vallée du Rift

Le RVFV, du genre *Phlebovirus*, est un virus appartenant à la famille des *Phenuiviridae*. Son génome à ARN monocaténaire est constitué de 3 segments. Le segment L (large) code la protéine L, une polymérase. Le segment M (medium) code des glycoprotéines (Gn et Gc) et une protéine non structurale NSm. Le 3^e segment ou segment S (small) code une nucléoprotéine de polarité négative et une protéine non structurale NS de polarité positive. La nucléocapside est constituée par la nucléoprotéine N associé aux ARNs monocaténaires formant des ribonucléoprotéines (RNP). Le virus RVF a sa propre ARN polymérase dépendante Les RNP apparaissent sous formes circulaire dont les extrémités 3' et 5' ont des séquences complémentaires inversées (Wright et al. 2019).

2.1.4.3 Symptomatologie

Chez l'Homme, après une période d'incubation de 2 à 6 jours, le virus peut provoquer plusieurs syndromes si des symptômes apparaissent. Le plus souvent, les personnes souffrant de la FVR ne présentent soit aucun symptôme, soit une maladie bénigne avec de la fièvre, une faiblesse, des maux de dos et des vertiges, avec rétablissement dans 2 à 7 jours après l'apparition des symptômes.

Cependant un petit pourcentage des personnes infectées développe des symptômes plus sévères: maladie oculaire, encéphalite ou inflammation du cerveau pouvant entraîner un coma ou des convulsions, une fièvre hémorragique (1% de tous les patients du RVF). Ces symptômes apparaissent 2 à 4 jours après le début de la maladie. Les décès chez ceux qui développent des symptômes de fièvre hémorragique atteignent environ 50 % et le décès survient 3 à 6 jours après le début des symptômes (CDC, 2020) (www.cdc.gov/vhf/rvf/french/signssymptoms/signes-symptomes.html consulté le 06/01/2022).

2.1.5. Maladie à virus Usutu

2.1.5.1 Distribution

Détecté pour la première fois en Afrique du Sud le virus Usutu (USUV), s'est vite étendu à d'autres pays africains (République centrafricaine, Sénégal, Côte d'Ivoire, Nigéria, Ouganda, Burkina Faso, Tunisie et le Maroc) auxquels s'ajoute Israël au Moyen Orient (Nikolay et al. 2011; Mannasse et al. 2017).

Suivant les routes migratoires, de la mer Méditerranée, le USUV a atteint l'Europe centrale en 1980 (Engel et al. 2016). Des cas d'infection de moustiques, d'oiseaux, de chevaux dans 12 pays européens (Allemagne, Australie, Belgique, Croatie, Espagne, France, Grèce, Hongrie, Italie, République tchèque, Serbie et Suisse) (Ashraf et al. 2015).

Le 1^{er} cas humain d'infection à USUV a été rapporté en République Centrafricaine en 1980, et le second cas a été diagnostiqué au Burkina Faso en 2004 (Nikolay et al. 2011). En Europe c'est en 2009 que deux italiens ont été infectés par le USUV; ces cas ont coïncidé avec une épidémie WNV. Puis, entre 2008 et 2009, trois autres cas ont été signalés lors d'une étude rétrospective (Pecorari et al. 2009; Cavrini et al. 2011). En France un cas d'infection de USUV a été rapporté par Gaibani et ses collaborateurs (Gaibani et al. 2012).

2.1.5.2 Agent causal

Transmis aux animaux et aux humains par les moustiques de plusieurs genres comme les *Culex*, les *Aedes* et les *Anopheles* (Camp, Kolodziejek, and Nowotny 2019; Clé et al. 2018), le virus Usutu (USUV) était inconnu jusqu'à peu. Il attire l'attention en raison de sa propagation importante en Europe. L'Usutu est un arbovirus de la famille des *Flaviviridae* et du genre flavivirus. De diamètre de 40 à 60 nm, USUV est un virus à ARN positif monocaténaire d'environ 9,5-12,5 kb avec un long cadre (3434 acides aminés) de lecture ouverture dans sa partie non traduite aux extrémités 5' et 3'. Constitué de 3 protéines structurales (C, prM et E) et de 8 protéines structurelles (NS1/NS1, NS2a NS2b, NS3, NS4a, 2K, NS4b et NS5), qui sont codées par la partie C-terminale de la polyprotéine impliquée dans la réplication de l'ARN viral (Behrens et al. 1998; Calisher and Gould 2003).

La comparaison des séquences de l'hélicase du USUV a permis d'identifier des séquences conservées entre des hélicases de divers virus à ARN tels DENV et virus de l'Hépatite C (Wu et al. 2005).

2.1.5.3 Symptomatologie

Les signes accompagnant l'infection humaine à l'USUV se caractérisent par une fièvre et des éruptions cutanées avec une légère atteinte du foie. Des atteintes neurologiques sont aussi associées à l'infection à USUV humaine. L'encéphalite ou méningo-encéphalite, sont aussi des signes à l'infection à l'USUV, associés à d'autres comorbidités dans la moitié de ces cas. Des cas d'infection asymptomatique sont associés à des infections à l'USUV (Pecorari et al. 2009; Cavrini et al. 2011; Clé et al. 2018).

2.1.6 Fièvre du Nil occidental

2.1.6.1 Distribution

Le virus du Nil occidental ou West Nile (WNV) a été isolé pour la première fois en Ouganda en 1937 chez une femme souffrant d'une forte fièvre (Smithburn et al. 1940; Van der Meulen, Pensaert, and Nauwynck 2005). Par la suite, on a constaté qu'il s'était largement répandu dans plusieurs pays dans le monde : Moyen-Orient, Asie du Sud-Ouest, y compris l'Inde, Russie occidentale et Australie (Kramer, Styer, and Ebel 2008; Artsob et al. 2009). Les grandes épidémies sont survenues aux USA et en Europe. En Europe, l'année 1960 marque les premiers cas humains d'infection au WNV. Aujourd'hui, le WNV est endémique dans plusieurs pays d'Europe du Sud et des USA. Aux USA entre 1999 et 2019 ; 51700 cas confirmés et 2381 décès ont été enregistrés et en Europe l'on enregistrait 1503 cas dans 11 pays de l'UE en 2018 dont 92% venaient d'Italie, de la Grèce, de la Roumanie et de la Hongrie (Hansen 2004; Haussig et al. 2018; Zientara, Beck, and Lecollinet 2020).

En France métropolitaine, il est régulièrement détecté sur le pourtour de la Méditerranée des cas d'infection de WN (Zientara, Beck, and Lecollinet 2020). En 2003, la France a enregistré des infections équine en Camargue, et 7 cas humains. En 2018, l'Europe a dû faire face à une forte épidémie avec un nombre de cas supérieur à la somme des 10 années précédentes, et la France a enregistré 27 cas humains dans les Alpes-Maritimes (Kolodziejek et al. 2018).

En Afrique, la plus importante épidémie de WNV date de 1974 et a touché 3000 personnes de la province du Cap (Jupp et al.,2001). D'autres épidémies isolées se sont déclarées dans les pays tels que: Algérie, Egypte, Ethiopie, Madagascar, Maroc, Nigéria, République centrafricaine République démocratique du Congo, Sénégal, Soudan et Tunisie (Jupp 2001; Amraoui et al. 2012; Sule et al. 2018).

En Côte d'Ivoire aucun cas de West Nile n'a encore été notifié. La présence du vecteur compétent *Culex* représente un risque d'apparition de cette pathologie au sein de la population ivoirienne.

2.1.6.2 Agent causal

Logé au sein de la famille des flaviviridae, du genre *Flavivirus* comme le ZIKV, le DENV et le YFV, le virus du Nil occidental (WNV) a été isolé pour la première fois dans le district du Nil occidental en Ouganda en 1937 chez une femme souffrant d'une forte fièvre (Smithburn et al. 1940; van der Meulen, Pensaert, and Nauwynck 2005). Les souches se répartissent en plusieurs lignées suivant la base de la protéine. Ce virus possède un génome à ARN simple brin positif de 11 kb.

Le WNV a un cycle de transmission naturel chez les moustiques *Culex spp.* et les oiseaux sauvages qui sont des hôtes amplificateurs. Le WNV est subdivisé en plusieurs lignées suivant la base de la protéine de l'enveloppe. Nous avons : la lignée 1 composée des souches africaines américaines, australiennes, européennes et indiennes, la lignée 2 composée de des souches d'Afrique continentale, de Madagascar, de l'Europe de l'Est et du Sud. En outre il existe 4 autres lignées : lignées 3, 4, 5 et 6 qui ne sont représentées que par quelques isolats. Enveloppé, ce virus possède un génome à ARN simple brin (ARNs) positif de 11 kilobases qui code pour 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) et 3 structurales (protéine d'enveloppe E, protéines de membrane, prM et Protéines de capsid C). Son génome est composé d'un seul cadre de lecture ouvert avec deux régions non traduites (à l'extrémité 5' et à l'extrémité 3') (Rossi, Ross, and Evans 2010).

Le WNV, appartenant au sérocomplexe du virus de l'EJ, se maintient dans la nature dans un cycle enzootique entre les moustiques du genre *Culex* comme vecteurs, et les oiseaux comme principaux hôtes réservoirs et amplificateurs. Les mammifères infectés lors d'un repas de sang de *Culex* ne sont pas de bons amplificateurs du virus (courte et faible virémie). L'homme, dans ce cycle de transmission au sein de la population des mammifères, est accidentellement infecté par un *Culex* qui se serait alimenté sur un oiseau porteur de WNV. D'autres genres/espèces de vecteurs (*Aedes japonicus*, *Aedes ochlerotatus*) peuvent aussi servir de vecteur de WNV (Hubálek and Halouzka et al., 1999).

2.1.6.3 Symptomatologie

La période d'incubation de l'infection au WNV dure en général de 2 à 6 jours mais peut s'étendre jusqu'à 14 jours. La majorité (80 %) des personnes infectées au WNV restent asymptomatiques ou peu symptomatiques. Un syndrome pseudo-grippal marqué par une fièvre d'apparition brutale, maux de tête, douleurs articulaires et musculaires (parfois associés à une éruption cutanée), peut apparaître dans 20 % des cas. Mais des formes graves de l'infection au WNV peuvent survenir chez moins d'une personne infectée sur 100. En effet, des atteintes neurologiques graves avec formes neuro-invasives peuvent toucher des adultes, notamment des personnes âgées, et entraîner des séquelles ou des décès. (Santé publique France, 2021) <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmissionvectorielle/west-nile-virus>. Consulté le 07/01/2021.

2.1.7 Zika

2.1.7.1 Répartition géographique

La première épidémie de fièvre à Zika a été signalée en 2007 dans l'archipel de Yap en Micronésie avec 185 cas dont 74 % positifs (Lanciotti et al. 2008), suite à une période d'absence de plus de 50 ans après le rapport des surveillances de routine notifiant des cas d'infections humaines à ZIKV déclarées au Nigeria, Gabon, Sierra Leone, République Centrafricaine, Tanzanie, Egypte, Ouganda, Pakistan, Thaïlande, Vietnam du Nord et Philippines (Simpson 1964; Marchette, Garcia, and Rudnick 1969; Fagbami 1979). Des vagues d'épidémies se sont déclarées successivement en Polynésie française en 2013 et dans d'autres îles du Pacifique en 2014 (Musso, Nilles, and Cao-Lormeau 2014; Cao-Lormeau et al. 2014), puis en Amérique du Sud et centrale en 2015, avant d'atteindre les îles du Cap-vert en Afrique (Lednicky et al. 2016; Chang et al. 2016; Paz and Semenza 2016; J. K. Morris et al. 2020).

La présence du virus Zika (ZIKV) au Cap-Vert constitue une réelle menace pour les populations vivant en Afrique de l'Ouest. Le risque d'épidémies de Zika en Côte d'Ivoire a été signalé par les autorités sanitaires ivoiriennes depuis 2015. En effet, *Ae. aegypti* est présent et le ZIKV a déjà été signalé en Côte d'Ivoire (Sudeep et Shil, 2017). L'Etat de Côte d'Ivoire a d'ailleurs déjà établi, depuis Juillet 2016, un plan global de préparation et riposte face à une épidémie de Zika.

En Europe, et particulièrement en France métropolitaine, des centaines de cas importés ont été enregistrés sans aucune transmission autochtone. Mais, en 2019, l'Agence Régionale de Santé (ARS) de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (Région PACA) dans le Sud de la

France a déclaré 3 cas autochtones de ZIKA dans la même région (Lazarus et al. 2016) (Santé Publique France 2019).

2.1.7.2 Agent causal

Isolé en 1947 chez un singe rhésus en Ouganda (Dick, Kitchen, and Haddow 1952), le virus Zika (ZIKV) est un *flavivirus* à ARN monocaténaire de polarité positive, transmis principalement par les femelles des moustiques du genre *Aedes*. *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* en sont les principaux vecteurs dans les régions tropicales d'Asie du Sud-est, d'Afrique, du Pacifique et de l'Europe. D'autres voies de transmission du ZIKV, telle que la voie maternofoetale, ont été formellement rapportées (Klase et al. 2016).

En milieu urbain, la transmission de ZIKV aux humains est assurée par *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, et en milieu selvatique elle est assurée par *Ae. africanus*, *Ae. taylori*, *Ae. furcifer*, *Ae. diazieli*, et *Ae. luteocephalus*, à travers le monde.

Virus enveloppé d'environ 50 nm de diamètre, le ZIKV présente une capsidie icosaédrique recouverte d'une membrane contenant l'ARN viral, et possède un génome non segmenté long de 10 kilobases qui code 3 protéines structurales (protéine C de 105 résidus d'acides aminés, protéine de membrane prM de 187 résidus d'acides aminés, et protéine d'enveloppe E de 505 résidus d'acides aminés associé à la virulence du virus), ainsi que 7 protéines non structurales (NS1 de 352 résidus, NS2A de 127 résidus, NS2B de 139, résidus NS3 de 619 résidus un complexe NS2B-NS3, NS4A de 127 résidus, NS4B de 255 résidus NS5 de 904 résidus et une ARN polymérase ARN-dépendante)(Chang et al. 2016).

2.1.7.3 Symptomatologie

Asymptomatique au début de l'infection, cette maladie présente ensuite des signes semblables à ceux de la dengue et du chikungunya : température, rougeur des yeux (conjonctivite), éruptions cutanées, céphalées, douleurs rétro-orbitaires, douleurs articulaires et musculaires. Ces signes durent environ une semaine.

Les symptômes communs entre le Zika, la dengue et le chikungunya rendent difficile le diagnostic dans les régions où circulent les différents arbovirus.

Dans le cas de transmission de la femme enceinte au fœtus, des complications se caractérisant par une malformation du cerveau du fœtus (microcéphalie) et diverses autres

malformations du cerveau chez le nouveau-né (Shi et al. 2018). Chez les adultes, l'infection au ZIKV peut conduire à un syndrome de Guillain-Barré (Krauer et al. 2017).

Les arbovirus et leur vecteur sont donc présents sur presque tous les continents du globe terrestre et la conquête de nouveaux territoires à leur actif est en plein développement. Les vecteurs souvent co-infectés par ces arbovirus sont aussi un réel facteur d'exacerbation des phénomènes épidémiques dans certaines parties du monde (Jain et al. 2017; Mourya et al. 2018).

La santé humaine sur toutes ces parties du globe est sans cesse sous menace d'émergence des épidémies d'arboviroses. Il est donc important de mettre en place des mesures de lutte contre ces maladies afin de préserver la santé humaine.

III LA LUTTE CONTRE LES ARBOVIROSES HUMAINES

3.1 Lutte contre les virus pathogènes

3.1.1 Le diagnostic

Le diagnostic clinique des arboviroses, se basant sur l'interprétation des signes cliniques présentés par un patient, est peu fiable, particulièrement dans les régions tropicales où sévissent à la fois plusieurs arboviroses et d'autres maladies présentant des signes cliniques similaires. Il peut être difficile de faire un diagnostic différentiel entre la dengue et le chikungunya en se basant uniquement sur les manifestations cliniques. En Afrique, la co-circulation des arboviroses avec le paludisme rend difficile l'établissement d'un diagnostic spécifique et formel en présence de ces maladies (Ridde et al., 2016).

Au stade précoce des infections à arboviroses, le diagnostic clinique est donc très souvent associé aux diagnostics biologiques. Il existe deux types de diagnostics biologiques pour la détection des infections humaines par les arbovirus : i) le diagnostic direct qui se base sur la détection du virus ou de son génome, ou encore des antigènes viraux par la technique RT-PCR et ii) le diagnostic indirect basé sur la détection des anticorps (IgM et IgG) spécifiques aux antigènes de surface du virus, par approche immunologique (ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Dans ce dernier cas, la détection d'IgM dans le sang ou le sérum du patient est indicateur d'une infection récente, puisque ces anticorps apparaissent rapidement (quelques jours après les premiers signes cliniques) et persistent 2 à 3 mois. Ils sont détectables lors d'une primo-infection, leur niveau étant plus faible lors d'une infection secondaire. Les IgG apparaissent plus tardivement lors d'une primo-infection, mais persistent à vie, et leur

niveau est important lors d'une seconde infection. Ainsi pour un même antigène, les taux de ces anticorps évoluent de manière inversée (**Figure 8**). La détection de ces anticorps se résume comme suit : i) IgM+ = infection récente ou en cours ; et IgG+ = infection plus ancienne et indicateur de l'historique d'une infection.

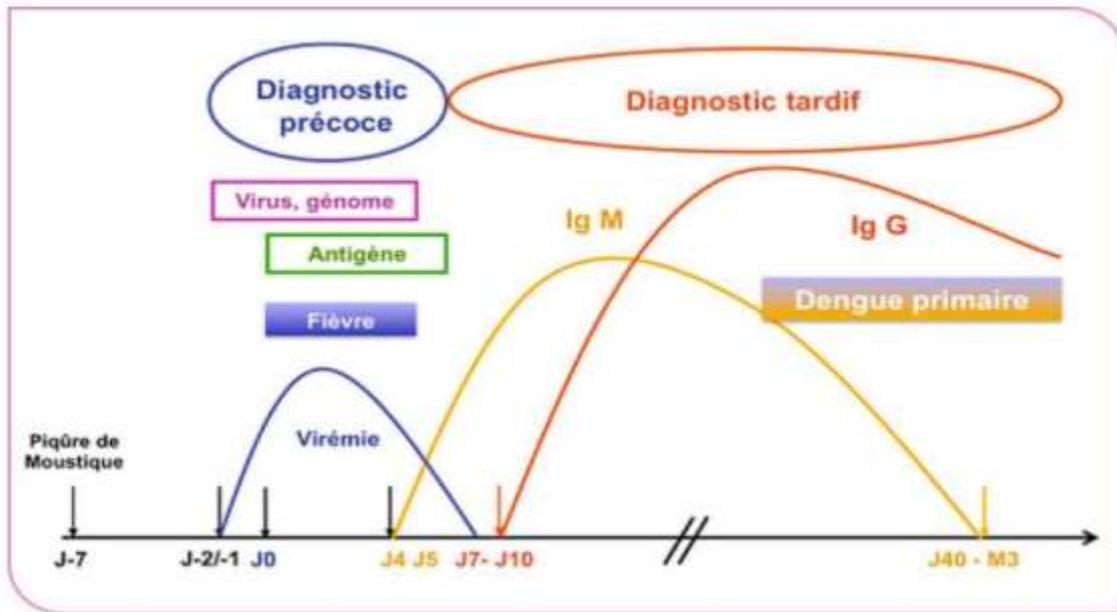


Figure 8: Chronologie d'utilisation des outils de diagnostic d'une arbovirose. Exemple de la dengue ([http://www.insvs.sante.fr/dossiers-thématiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission/vectorielle/Dengue/](http://www.insvs.sante.fr/dossiers-thématiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Dengue/)).

Après une identification précoce et formelle du virus incriminé, le traitement, qui repose exclusivement sur une thérapeutique symptomatique, est prescrit en fonction des signes constatés. Dans le cas de la fièvre à ZIKA, par exemple, la prise d'analgiques, paracétamol et le repos sont préconisés. L'aspirine et les anti-inflammatoires sont déconseillés dans le cas de la dengue à cause de nombreuses thrombopénies rapportées liées à l'infection par DENV (<https://solidarites-sante.gouv.fr/a-dengue-information-et-prevention>).

3.1.2 Les thérapies contre les arboviroses : état des lieux

3.1.2.1 Les vaccins

Des stratégies vaccinales contre les arboviroses portent sur 4 types de vaccins (vaccin vivant atténué, vaccin recombinant, vaccin inactivé et vaccin à ADN) et concentrent aujourd'hui une

grande attention des chercheurs engagés dans la lutte contre les arboviroses. Parmi les 4 arboviroses décrites dans cette thèse, seul un vaccin contre la FJ est efficace et commercialisé dans les zones d'endémicité. C'est un vaccin conçu à partir de la souche 17 D du virus amaril et qui est de type vivant atténué. Il est injectable et confère aux vaccinés une immunité au bout de 10 jours et dure environ 10 ans (Bettie et al., 2020). Malgré cette efficacité, les autorités de certains pays peinent à assurer un maximum de couverture, surtout en Afrique où cette arbovirose sévit. L'OMS ne recommande plus de rappel vaccinal chez les adultes, 10 ans après administration, comme précédemment. Ce changement pourrait constituer un risque de réémergence de la FJ chez les adultes s'il y a une chute d'immunité vaccinale après 10 ans.

Hormis le cas de la FJ, beaucoup d'efforts sont consentis pour le développement de nouveaux vaccins contre les autres arboviroses, qui continuent de faire des victimes dans les populations humaines. Ainsi, des essais cliniques sont par exemple mis en place en vue de concevoir des vaccins qui soient efficaces, tolérés et accessibles aux pays en voie de développement. Les travaux sur le vaccin contre la dengue semblent les plus avancés, et un vaccin a fait l'objet d'homologation et de commercialisation (Tableau 2). Le vaccin « Dengvaxia^R » dirigé contre les 4 sérotypes de DENV a été homologué en 2015 suite aux études cliniques menées en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud (Guy *et al.*, 2017). Cependant, des études posthomologation dans l'optique d'apprécier l'innocuité du vaccin à long terme (étude de pharmaco-vigilance) révèle des inquiétudes. En effet, selon des études ce vaccin entraînerait des complications chez les personnes séronégatives à la DENV et vaccinés par rapport aux individus séropositifs vaccinés et cela ne serait pas lié à l'âge des individus inclus dans le jeu de la vaccination (Vannice et al. 2018). Depuis la commercialisation du vaccin « Dengvaxia^R », 51 décès ont été rapportés par les instigateurs du vaccin (groupe Sanofi-Pasteur). Ces décès ont été enregistrés majoritairement chez les enfants vaccinés dont l'âge était compris entre 9-13 ans aux Philippines et 15 de ces décès étaient dû au DENV (Sanofi Pasteur, 2017, OMS, 2019 et Stephen *et al.*, 2019). La posologie de la « Dengvaxia^R » exclut les enfants de moins 9 ans dans l'administration de ce vaccin comme indiqué par « mes vaccins.net » (<https://www.mesvaccins.net/web/vaccines/539-dengvaxia> consulté le 24/01/2022).

Tableau 2: Situation actuelles des candidats vaccins contre la dengue à base de virus virants atténués ou inactivés purifiés (Tripathi and Shrivastava 2018).

Candidat vaccin et développeur	Approche et type de vaccin	Statuts et références
Dengvaxia (CYD-TDV) ; Sanofi pasteur	YF-17D avec la structure de gene prM et E De virus de la dengue 1-4 (Vaccin atténué vivant)	Licensé (Guy et al. 2017)
TetraVax-DV-TV003/TV005 ; NIAID/NIH	Virus de la dengue 1/2/3/4 de longue taille dont il manque 30 NT dans la 3'UTR (vaccin vivant atténué)	Phase III (Whitehead 2016)
DENVax/TAK003/TDV ; Takeda/Inviragen	Virus de Dengue 2 PDK53 avec la structure chimère de prM et E du virus de la Dengue 1 ; 3 et 4 (Vaccin atténué vivant)	Phase III (SáezLlorens et al. 2017)
TDEN ; WRAIR/GSK/	Virus dengue 1/2/3/4 PDK virus (Vaccin atténué vivant)	Phase II (Bauer et al. 2015)
TDEN PIV ; WRAIR /GSK/Fiocruz	Virus de Dengue 1/2/3/4 formalin inactivé (Vaccin atténué et purifié)	Phase I (Schmidt et al. 2017)

3.1.2.2 Les thérapies curatives

Elles sont toujours à l'état embryonnaire malgré quelques avancées notables ces dernières années. Par exemple pour le CHIK, l'administration d'immunoglobuline anti-CHIK (CHIKVIg) provenant de plasma de patients en phase de convalescence de CHIK, semblerait constituer une stratégie de prévention, un traitement sûr et efficace pour les personnes à risque d'infection sévère, comme les nouveau-nés nés de mères virémiques et les adultes souffrant d'affections sous-jacentes (Couderc et al. 2009). Pour la dengue, des médicaments sont en cours

d'élaboration ou déjà identifiés afin de bloquer la réplication virale au sein de l'hôte vertébré. Il s'agit, pour ces médicaments, d'induire l'inhibition de l'activité des protéases du virus telles que NS3, NS5, E et ARN triphosphatase par administration singulière ou en combinaison. Les composés thérapeutiques tels ZX-2401 et IFN et autres composés provenant des plantes en sont des exemples (Ojwang et al. 2005; Yang et al., 2011; Huang et al. 2018; Massé et al. 2022). Le succès des essais vaccinaux et les thérapies curatives seraient un outil idéal dans la prévention des maladies à arbovirus. Malheureusement ces résultats mitigés ne sauraient garantir dans un délai proche une protection efficace contre les arboviroses. La lutte antivectorielle pourrait être gage d'une prévention du contact entre les vecteurs et les hôtes humains, et le contrôle des populations de vecteurs reste actuellement la seule méthode efficace et utilisée (hormis le vaccin FJ) dans la protection et la lutte contre les arboviroses.

3.2 Lutte contre les vecteurs : *Aedes* et *Culex*

La lutte anti-vectorielle (LAV) dans le cadre du contrôle des arboviroses humaines, vise essentiellement à réduire les densités de populations des vecteurs et/ou leurs contacts avec l'homme, à un niveau en dessous duquel elles ne seront plus en mesure d'entretenir une épidémie d'arboviroses. Les différentes stratégies de lutte actuelles ciblent ainsi le moustique à tous les stades de sa vie.

3.2.1 L'aménagement et l'entretien de l'environnement

De tout temps, l'homme a cherché à se protéger contre la nuisance due aux piqûres des moustiques en agissant sur le milieu de vie de ces vecteurs. Ces moyens, qualifiés de lutte physique, sont essentiellement basés sur l'aménagement ou la modification de l'environnement (Mouchet et Carnevale, 1991) et constituent le premier niveau de la lutte anti-vectorielle (LAV).

Contre le moustique *Culex*, qui se développe préférentiellement dans les collections d'eau stagnante et polluée, la lutte physique se focalise plus sur l'assainissement et l'aménagement du milieu urbain, qui consiste à éliminer les collections d'eaux usées stagnantes. Contre les *Aedes*, du fait de la nature domestique et péri-domestique des gîtes larvaires de ces vecteurs, de vastes campagnes de sensibilisation et d'implication des populations visant la destruction mécanique des gîtes larvaires sont menées (Abramides et al. 2011; Basso et al. 2015). Ces actions permettent d'éliminer les gîtes larvaires potentiels et positifs, et permettent aussi de

prévenir la formation ou la multiplication de nouveaux gîtes larvaires (en les vidant de leur eau ou en les couvrant d'une moustiquaire pour empêcher les femelles de venir y pondre).

Ces mesures très simples, basées sur l'éducation sanitaire et la participation communautaire, constituent un premier niveau de lutte pour prévenir la prolifération de *Culex* et *Aedes* dans les villes africaines et européennes.

3.2.2 Les larvicides

L'utilisation d'insecticides de nature biologique, tels que *Bacillus thuringiensis var israelensis* (*Bti*) et *Bacillus sphaericus* (*Bs*), est aussi indiquée pour la lutte contre les stades larvaires des *Aedes* et de *Culex* (Margaret et al., 2001; Bravo et al., 2007 ; Ahmed et al., 2017), surtout quand les gîtes sont inaccessibles ou s'ils contiennent de l'eau de consommation (cas des *Aedes*). En plus de ces insecticides biologiques, les insecticides chimiques tels que le téméphos (Organophosphoré) et les pyréthrinoïdes ont longtemps été utilisés comme larvicides dans la LAV (Tikhomirov, 1972; Smith *et al.*, 2016). Des régulateurs de croissance d'insectes, qui empêchent les larves de moustiques de terminer leur stade immature et d'atteindre le stade adulte, tels que le pyriproxifène ou le méthoprène ont également montré une efficacité à de faibles concentrations (Francis et al. 2020). Les billes de polystyrène sont également employées pour couvrir la surface des eaux des gîtes dans les endroits clos afin d'empêcher la ponte des femelles des *Culex*. En effet, les billes de polystyrène, ont été utilisées en Makunchi, Zanzibar (Tanzanie) dans le cadre de la réduction des densités de *Culex quinquefasciatus* se développant des fosses septiques (Chavasse 1995 ; Curtis *et al.*, 2005). Cette technique entraîne la mort par asphyxie des larves de *Cx. quinquefasciatus*. D'autres substances jouant un rôle de barrière physique à la surface de l'eau, comme de l'huile minérale, peuvent s'avérer efficaces sur certains gîtes.

3.2.3 Lutte contre les adultes

Afin de renforcer la stratégie anti-larvaire, le stade adulte des *Aedes* et *Culex* est également visé par les pulvérisations spatiales de très faible volume d'insecticides (organophosphorés et pyréthrinoïdes) afin d'interrompre la transmission durant les épidémies.

Bien qu'elles donnent des résultats intéressants, ces stratégies présentent malheureusement des limites qui réduisent leur efficacité. Les mécanismes de résistance des adultes d'*Aedes* au téméphos et aux pyréthrinoïdes démontrés par différentes études en sont les principaux

obstacles (Kamgang et al. 2017; Catherine L. Moyes et al. 2017). A cela s'ajoute le problème de ressources financières et humaines (coût et main d'œuvre), ainsi que les difficultés liées à l'accès aux habitations du fait d'une faible adhésion des populations et de la non-acceptabilité de certaines mesures lors des campagnes de LAV. Un autre problème lié à l'utilisation de composés chimiques est son effet sur l'environnement, particulièrement sur la faune non cible. Le développement de nouvelles stratégies de LAV pourrait constituer de pertinentes alternatives.

3.3 Nouvelles méthodes de lutttes contre les *Aedes* et *Culex*

Plusieurs nouvelles stratégies sont décrites comme pouvant avoir un impact considérable dans la lutte contre les vecteurs des arbovirus. Parmi les plus probants, on peut citer :

- L'utilisation dans les gîtes larvaires du pyriproxifène, un inhibiteur de croissance. Il a la capacité de perturber l'émergence des adultes. Même à de très faibles doses, il reste efficace. Il aurait aussi des effets sub-létaux sur la reproduction des adultes (Darriet., 1988; Suman, Wang, and Gaugler 2015; Oscar et al., 2014)
- La manipulation génétique des vecteurs qui vise principalement à réduire la densité des vecteurs mais aussi leur capacité vectorielle.
- L'utilisation des endosymbiotes bactériens comme la bactérie *Wolbachia* est une stratégie très prometteuse. Elle vise le contrôle des populations d'*Ae. aegypti* grâce aux lâchers de mâles porteurs de *Wolbachia*, dits incompatibles ou stérilisants (technique de l'insecte incompatible) (Beebe et al. 2021). Mais cette approche exploite aussi une autre propriété de la bactérie *Wolbachia* qui est de réduire la capacité des femelles à transmettre les virus. L'approche vise alors un remplacement de populations grâce aux lâchers de femelles porteuses de *Wolbachia* (Aliota et al. 2016; Kamtchum-Tatuene et al. 2017).
- La technique de l'insecte stérile vise également la réduction des populations de vecteurs et repose sur les lâchers massifs de moustiques mâles, préalablement irradiés, dans le milieu naturel. Les œufs issus de l'accouplement entre un mâle stérile et une femelle sauvage ne sont pas viables et ne donneront pas de progéniture, conduisant ainsi à la réduction des populations de vecteurs (Tur et al. 2021).
- L'utilisation des matériaux imprégnés (rideaux, moustiquaire, tissus) largement déployés dans la lutte contre le vecteur de paludisme et contre *Culex* aurait aussi montré une probable efficacité contre les *Aedes* (Ponlawat et al. 2016).

- Les pièges pondoirs à effet létal (**Figure 9**), présentent une efficacité sur les populations d'*Aedes*. Ils sont constitués d'un petit récipient contenant de l'eau et d'une tige en bois ou en papier imprégnée d'insecticide sur laquelle les femelles d'*Aedes* viendront pondre leurs œufs. L'insecticide est destiné à causer la mort des larves et/ou des femelles qui viendront pondre (Parker et al. 2017).



Figure 9 : Pondoir piège pour capturer les femelles d'*Aedes* contenant de l'insecticide (<https://cdn-s-www.dna.fr/images/06622FE8-EC41-4B1F-97>) consulté le 22/11/2021

IV.INDICATEURS ENTOMOLOGIQUES ACTUELS DANS L'EVALUATION DU CONTACT HOMME-VECTEURS D'ARBOVIROSES.

4.1 Estimation de la densité des stades immatures

Pour évaluer le risque de transmission des arboviroses dans une zone donnée, des méthodes entomologiques sont utilisées (Morales-pérez et al.,2020 ; Kosoltanapiwat et al., 2020). Elles permettent d'estimer l'abondance des vecteurs dans une localité à une période donnée en utilisant des indicateurs visant à estimer les densités des stades immatures.

L'évaluation de cette abondance des stades immatures, qui peut représenter par extrapolation un proxy des densités des adultes des *Aedes* et des *Culex*, passe par le décompte des larves et des nymphes. Ce décompte dans le cas des *Aedes*, permet le calcul des indicateurs

stégomyiens que sont l'Indice Maison (House Index, HI) et de l'Indice Réservoir (Container index CI), correspondant au pourcentage de maisons/réservoirs infestés par des larves et/ou par des nymphes, respectivement, et l'Indice de Breteau (Breteau Index, BI) qui correspond au nombre de réservoirs positifs (en larves et/ou nymphes) pour cent maisons enquêtées. Ces indicateurs sont aussi bien utilisés pour évaluer le risque de transmission des arbovirus que l'efficacité d'une lutte anti-vectorielle (LAV). A titre d'exemple, une étude conduite dans la ville de Brazzaville au Congo, a montré un haut risque de transmission des arbovirus dans les sites d'études. Dans cette étude, le HI, BI et CI pour *Ae. aegypti* étaient respectivement de 27%, 38%, 23% et pour *Ae. albopictus* 33%, 50% et 27%. Ces indicateurs étaient bien supérieurs aux seuils de risque de transmission des arbovirus établis par l'OMS qui sont de 5%, 5% et 20% (Wilson-Bahun et al. 2020).

Ces indices n'ont pas toujours traduit la réalité d'exposition aux *Aedes* adultes (Bowman et al., 2014 ; Cromwell et al. 2017; Nascimto et al., 2020). En effet, l'hétérogénéité de la densité vectorielle au sein d'une zone d'étude ne peut pas être déterminée à partir de ces indices. Le CI ne porte que sur la proportion de réservoirs avec des stades immatures et ne donne pas le nombre de réservoirs par maison. Le HI ne peut fournir que le nombre de réservoirs positifs au sein d'une maison mais pas ceux qui se trouvent dans l'espace péri-domestique. Et avec le BI, la productivité des réservoirs ne peut pas être estimée. Il apparaît impossible d'estimer le risque de transmission d'arbovirus avec cette méthode (Mbogo et al. 2003; Regis et al. 2013).

Ainsi, la pertinence de ces techniques entomologiques indirectes est-elle très limitée pour évaluer la réelle exposition de l'homme aux piqûres des *Aedes* et par conséquent, le risque de transmission d'arbovirus. De plus, elles ne rendent pas compte du niveau d'exposition au niveau individuel.

4.2 Estimation de la densité des moustiques adultes

La collecte d'adultes de moustiques reste la méthode actuelle indispensable et la plus performante pour évaluer le risque de transmission des pathogènes ainsi que l'efficacité des moyens de lutte anti-vectorielle mis en place. Elle se fait au moyen de techniques telles que les captures sur hommes (CSH), les aspirateurs à dos, ou encore les pièges visuels, mais présentent elle-aussi de nombreuses limites d'efficacité et d'utilisation à large échelle sur le terrain.

4.2.1 Capture sur Homme

La capture sur homme implique la participation de volontaires humains comme « appâts » pour attirer les femelles. Cette technique est décrite comme la plus sensible pour évaluer les densités des vecteurs des arboviroses qui piquent effectivement l'Homme (Marquetti et al. 2000; Schoeler et al. 2004). Cependant, cette méthode se heurte à des problèmes dans l'application et dans les résultats. D'abord, le taux de piqûre par homme obtenu dans la capture sur appât humain est un paramètre qui varie au sein des aires géographiques, du fait de la forte variabilité d'attractivité des hôtes (Martinez et al. 2021), d'où l'impossibilité d'extrapolation de cette méthode à des zones plus grandes. Ensuite, cette méthode pose des problèmes éthiques évidents qui empêchent son application dans la capture des femelles d'*Aedes* et *Culex*. En effet, il n'existe ni médicaments ni vaccin pour la majorité des arboviroses. Il est donc déconseillé d'exposer « volontairement » (ou tout au moins sans surveillance médicale) des individus aux virus responsables de ces maladies (Ndebele et al., 2012).

4.2.2 Capture à l'aide des aspirateurs électriques

Les techniques d'aspiration permettent de capturer les adultes d'*Aedes* et *Culex* au repos, aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des maisons. Elles renseignent ainsi sur la biologie et sur le comportement des vecteurs. Les aspirateurs ont pour grand avantage de capturer à la fois les mâles et les femelles moustiques. Mais leur utilisation représente une tâche ardue et pénible, surtout pour la capture des femelles d'*Aedes* (Scott and Morrison 2004).

4.2.3 Les pièges visuels et électriques

La capture par pièges permet à la fois la surveillance de la circulation des pathogènes, l'estimation et la réduction de la densité des œufs et des formes adultes des moustiques (Engler et al. 2013; Xavier et al. 2020; Rossi da Silva et al. 2021). Plusieurs types de pièges sont utilisés pour échantillonner les populations adultes et les œufs des moustiques dont entre autres : les pièges collants, pondoirs pièges, les pièges « *Fay-prince* », les pièges « *CDC Wilton* », le « Double BR-OVT » ou encore les pièges « *BG-Sentinel 1 et 2* » et « le mosquito Magnet Pioneer (Figure 10A et 10B).

Le « *BG-Sentinel 1 et 2* » et « le mosquito Magnet Pioneer » sont des pièges qui émettent grâce à une bouteille de gaz un flux continu de CO₂, combiné aux attractant (Octénol, Attrakta ...) qui miment l'odeur corporelle des humains. Cette combinaison de CO₂ et d'Octénol attire les moustiques (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* et *Culex*) ainsi que d'autres insectes piqueurs

(phlébotomes, moucheron...) vers les orifices aspirant de ces pièges. Ce type de piège capture non seulement les femelles à la recherche de nourriture mais aussi des mâles.

Les pièges pondoirs peuvent participer à réduire la population des femelles déjà gorgées de sang et éventuellement infectées par des arbovirus (Degener et al. 2014; Eiras et al. 2021). Un inconvénient de l'utilisation de pièges comme outils de contrôle des *Aedes* dans les zones urbaines est la nécessité de les déployer dans des propriétés privées, nécessitant ainsi le consentement et l'acceptation des résidents. Une autre limite logistique est le déploiement en grand nombre dans la majorité des maisons pour avoir un effet significatif sur la réduction des densités des vecteurs (Degener et al. 2014). A cela s'ajoute le coût des pièges et les biais liés à l'attraction seulement des femelles gravides dans ces pièges.

Toutes ces limites réduisent ainsi la capacité de ces méthodes entomologiques à évaluer efficacement le risque de transmission des arboviroses. Il est donc crucial de développer de nouvelles techniques plus sensibles, moins coûteuses, faciles à utiliser sur le terrain, plus précises et qui mesurent le contact réel Homme-vecteur tant au niveau individuel qu'au niveau communautaire.

Dans cette optique, l'étude des relations immunologiques homme/vecteur au cours de la prise de sang du moustique constitue un axe de recherche intéressant. Ceci ouvre ainsi la voie pour le développement de nouveaux outils d'évaluation de l'exposition des Hommes aux piqûres des vecteurs.



Figure 10: Pièges à moustiques . (A) Mosquito Magnet Pioneer. (B) BG-Sentinel 2

www.excellium-antinuisibles.com/452-mosquito-magnet-pioneer-piege-anti-moustiquesgrandes-surfaces Consulté le 25/01/2022 edialux.fr/moustiques/2312-3022-biogents-bg-sentinel-edialux-piege-moustique. Consulté le 25/01/2022

V. INTERACTIONS PHYSIOLOGIQUES DU CONTACT HÔTE-VECTEUR : ROLE DES PROTEINES SALIVAIRES DU VECTEUR AU COURS DU REPAS SANGUIN

Les arthropodes hématophages se scindent en deux groupes de par la stratégie utilisée pour le repas sanguin : les solénophages et les telmophages. Les solénophages (moustiques, punaises, glossines) insèrent directement leurs pièces buccales effilées et creuses dans un vaisseau sanguin (capillaire ou veinule) puis aspirent directement le sang qui y circule. Quant aux telmophages (Simulies, Phlébotomes, tiques...), ils s'alimentent du « micro lac » de sang né de la lacération de la peau de l'hôte vertébré.

En réponse à cette agression, l'organisme de l'hôte vertébré réagit en mettant en place des mécanismes de défense pour empêcher la perte de sang et pour se défendre contre cette agression extérieure. Ces mécanismes sont notamment les réactions hémostatiques (agrégation plaquettaire, vasoconstriction, coagulation), inflammatoires ou encore immunologiques (**Figure 11**)

L'insecte, pour mener à bien sa prise de repas sanguin, a développé à son tour des stratégies pour contrecarrer ces mécanismes de défense de l'hôte vertébré, en produisant des composés salivaires protéiques ayant des propriétés : i) pharmacologiques qui vont inhiber les réactions

hémostatiques, inflammatoires déclenchées par l'hôte comme mécanismes de défense et ii) modulatrices de la réponse immunitaire de l'hôte vertébré que l'hôte développe contre cette agression de l'insecte.

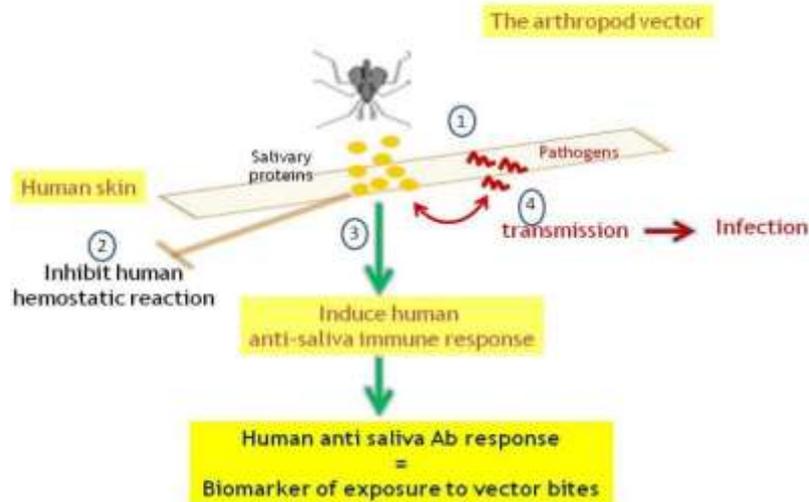


Figure 11: Schéma des étapes de l'interaction entre l'Homme et le vecteur

(1) le vecteur injecte ses protéines salivaires dans la peau humaine pendant le probing, (2) les protéines salivaires à l'intérieur de la peau de l'hôte prennent le contrôle du système hémostatique en inhibant l'activation des plaquettes, le mécanisme de coagulation et d'inflammation, (3) les protéines salivaires modulent la réponse immunitaire humaine et favorisent la production d'Ac anti-saliva et (4) Au cas où le vecteur serait porteur d'agent pathogène, les protéines salivaires contribueront à sa transmission à l'homme.

5.1 Rôle des protéines salivaires des vecteurs dans le bon déroulement du repas sanguin

Les interactions Homme-vecteur lors du repas sanguin du vecteur font intervenir des mécanismes facilitant la prise de sang par l'arthropode et, si l'insecte est infecté, la transmission des pathogènes présents dans sa salive (Kazimírová et Štibrániová, 2013). Le succès de ces phénomènes est le fait des composés salivaires protéiques comme cité ci-dessus, et se situe donc au cœur de cette interface hôte vertébré et insecte vecteur à travers leurs effets pharmacologiques et immunologiques exercés lors de la piqûre (**Figure 12**).

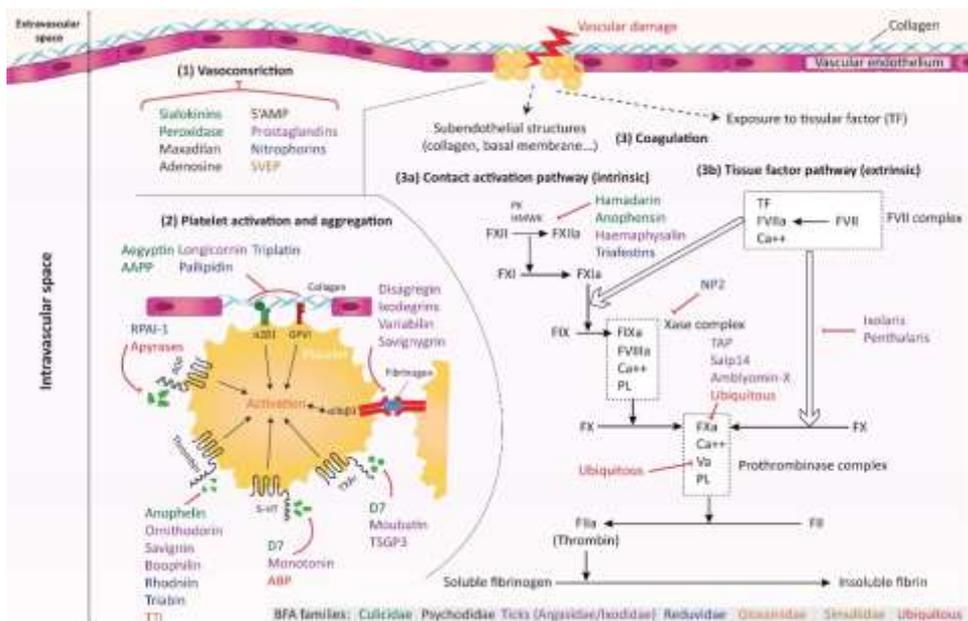


Figure 12: Représentation schématique des mécanismes d'inhibition de la réaction hémostatique des vertébrés due à des protéines salivaires d'arthropodes hématophages

Les protéines appartenant à une même famille d'arthropodes sont indiquées par une même couleur. Les différentes familles d'arthropodes sont indiquées au bas de la figure (Fontaine et al., 2011a).

Certaines de ces molécules, en plus d'être impliquées dans les mécanismes d'inhibition de la réponse hémostatique, peuvent également intervenir dans les mécanismes biologiques visant à empêcher l'initiation de la réponse immunitaire ou à la moduler, généralement développé par l'hôte pour éliminer les corps étrangers de son organisme.

5.1.1 Propriétés pharmacologiques : inhibition de la réponse hémostatique de l'hôte

Pour lutter contre cette perte de sang, correspondant typiquement à une plaie de type « coupure/blessure » au niveau de la peau, l'organisme de l'hôte réagit par une réaction hémostatique incluant trois phénomènes : l'agrégation plaquettaire, la réduction du diamètre du vaisseau endommagé (ou vasoconstriction) et la coagulation du sang. Ces réactions de défense de l'hôte piqué, empêcheront ainsi le bon déroulement de la prise de sang de l'arthropode.

Pour contourner cette réaction hémostatique, les arthropodes ont dû développer, produire et sécréter au cours de leur évolution des substances pharmacologiques qui leur permettent de s'alimenter sans entraves (Francischetti et al. 2009). Ils injectent alors continuellement de la

salive sous le derme de l'hôte pour contrecarrer les défenses de l'hôte et maintenir ainsi l'hémorragie (Yoshida et al., 2008; Figueiredo et al., 2012).

5.1.1.1 Inhibition de l'agrégation plaquettaire chez l'hôte vertébré

L'agrégation plaquettaire est la première ligne de défense de l'hôte vertébré pour éviter la perte de sang lors d'une blessure. Elle se met en place très rapidement. La lésion de l'endothélium par les pièces buccales de l'insecte piqueur entraîne une libération d'adénosine diphosphate (ADP) par les cellules endommagées et de collagène par cellules sous endothéliales. Les plaquettes, présentes dans le sang, réagissent à cette augmentation de l'ADP en adhérant entre elles sous l'endothélium et s'activent. La salive des insectes contient des molécules anti-agrégantes pour fluidifier le sang et permettre ainsi une prise de sang de plus rapide et complète. Plusieurs études ont montré une diversité de nature, de structure et du mode d'action de ces protéines suivant des genres ou des espèces de vecteurs hématophages (Ribeiro 1995; Figueiredo et al. 2012).

L'une des plus ubiquistes de ces protéines salivaires d'arthropodes hématophages est l'apyrase. Elle se trouve dans la salive des arthropodes hématophages tels que les simulies (Cross et al., 1993), *Lutzomyia longipalpalis* (Charlab et al. 2000), *Rhodnius* (Sarkis et al., 1986), *Glossina morsitans* (Alves-Silva et al. 2010) et les moustiques (Champagne et al., 1995 ; Nascimento et al., 2000). La différence entre les apyrases des espèces se concrétise au niveau de leur Ph optimum d'action et de la nature des cations divalents requis pour leur activation (Ca^{2+} ou Mg^{2+}). L'apyrase a une très grande importance dans le comportement alimentaire des moustiques (Ribeiro et al., 1985 et 1987). Agissant au point de lésion dû à la piqûre, l'apyrase hydrolyse l'ADP et l'ATP en AMP (Adénosine Monophosphate) et en phosphate inorganique, réduisant ainsi le taux d'agoniste ADP au niveau du site de piqûre et donc de minimiser l'activation des plaquettes. Elle intervient également dans l'inhibition des réactions inflammatoires de l'hôte vertébré (Ribeiro et al., 1991).

Chez *Ae. aegypti* par exemple, l'aegyptine, a un effet sur l'agrégation plaquettaire pendant la prise de repas (Chagas et al. 2014). L'apyrase longuement étudiée chez les punaises de lit et commune à plusieurs autres arthropodes joue également le même rôle (Francischetti et al. 2010; Svensjö et al. 2012).

5.1.1.2 Inhibition de la coagulation sanguine

Suite à la perforation de la peau de l'homme par le vecteur, le processus de coagulation de sang se met en place pour limiter la perte de sang. Pour contourner cela et prendre leur repas rapidement, les insectes ont des stratégies leur permettant de contourner ce processus de coagulation. Certains produisent des facteurs anticoagulants, d'autres des molécules qui interagissent à différents niveaux dans la formation du caillot. Elles ciblent spécifiquement les protéines de type sérine-protéases ou les complexes de la cascade de coagulation dans le but de bloquer ce processus le temps que le vecteur prenne son repas sanguin. L'anopheline et l'aegyptine isolée des glandes salivaires des anophèles de l'*Aedes aegypti* respectivement agissent ainsi sur les différents facteurs de la coagulation du sang de l'hôte (Calvo et al., 2007; Figueiredo et al., 2012).

5.1.1.3 Rôle vasodilatateur des protéines salivaires des arthropodes hématophages

Lorsque le vecteur pique ou lacère la peau de l'hôte, les substances vasoconstrictrices endogènes telles que TXA2 et la sérotonine sont sécrétées pour réduire le diamètre des vaisseaux afin de limiter la perte de sang. Le vecteur injecte des protéines vasodilatatrices au site de piqûre qui interagissent avec les récepteurs endogènes des hôtes vertébrés.

Les sialokines I et II d'*Ae. aegypti* identifiées comme vasodilatatrices (Champagne et Ribeiro, 1994), ont un effet semblable à celui du maxadilan (MAX), découvert premièrement chez *Lutzomyia longipalpis*.

5.1.1.4 Inhibition de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est un moyen de défense immunitaire non spécifique de l'homme lorsque celui-ci se blesse à un endroit de son corps. Suite à la perforation de la peau de l'hôte par les pièces buccales de l'insecte, il se met alors en place chez l'homme la réaction inflammatoire qui se caractérise par la triple réponse de Lewis : douleur, chaleur et rougeur.

Les deux derniers signes cités résultent d'une vasodilatation locale. Le complexe prékallikréineHK et le collagène libéré par les cellules détruites, vont activer la voie endogène ou système contact qui libère de la bradykinine, un médiateur de l'inflammation, responsable d'une vasodilatation, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la sensibilité à la douleur (Colman et al., 1997). L'ATP libéré par les cellules lésées active les polynucléaires neutrophiles qui s'accumulent et dégranulent au niveau du site de piqûre (O'Flaherty et al.,

1994). Ils libèrent des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF α) responsables de l'augmentation de la douleur et du développement de la réponse immune inflammatoire non spécifique (Cook et al., 2002). La sérotonine et l'histamine libérées par les plaquettes et les mastocytes sont également impliquées dans l'exacerbation de la douleur et dans l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux. De nombreuses molécules interagissent pour générer la douleur qui accompagne l'inflammation (Milan et al., 1999).

Les insectes possèdent au sein de leur salive des molécules capables d'inhiber chez l'hôte la sensation de douleur que provoquerait la réaction inflammatoire. Ces protéines salivaires appartiennent à la famille des protéines D7. Selon des études, ces protéines seraient capables de transporter des petites molécules hydrophobes intervenant dans la facilitation de la prise de sang par les insectes, de l'hémostasie et de l'inflammation (Valenzuela et al., 2002, Arca et al., 2002 ; Calvo et al., 2002). Elles seraient aussi capables de capter des médiateurs de la réponse hémostatique de l'homme tels que la sérotonine, l'histamine, la norépinephrine (Arca et al., 2002, Calvo et al., 2006).

5.1.1.5 Propriétés immunologiques des protéines salivaires de vecteurs

Parmi les composantes protéiques salivaires des arthropodes hématophages, en plus des propriétés pharmacologiques, certaines protéines salivaires présentent aussi des propriétés immunologiques. Elles ont la caractéristique de pouvoir moduler les réponses immunitaires de l'hôte vertébré et/ou sont immunogéniques et ainsi peuvent induire, chez l'Hôte vertébré, des réponses immunitaires, notamment Anticorps (Ac) spécifiques (IgM, IgE et IgG) anti-protéines salivaires (Imperato et al., 1969 ; Brossard et al., 1979,). Ribeiro et al. 2007).

5.1.1.6 Modulation de la réponse immune de l'hôte par la salive des arthropodes

Les protéines salivaires peuvent ainsi être responsables d'une immunomodulation locale qui, par un effet adjuvant ou immunosuppresseur, va impacter le développement de la réponse immune innée et adaptative (donc spécifique à des antigènes) de l'hôte.

A titre d'exemple, la réponse immunitaire de type Th2 (production de cytokines IL-4, IL5, IL-10 majoritairement) est boosté au détriment de la réponse de Th1 (production de cytokines IFN- γ , TNF α , IL-12 majoritairement) après une co-inoculation d'extraits de glandes salivaires de *Ae. aegypti* à des souris en conditions expérimentales (Schneider et al., 2004) . De plus, la sialokinine, protéine vasodilatatrice, présente dans la salive des moustiques du genre *Culex* et

Aedes est aussi capable de modifier l'équilibre de la production de cytokines Th1 /Th2 en favorisant une réponse de type Th2 avec la production des interleukines IL-4 et IL-10 (Zeiner *et al.*, 1999). Chez *Ae. aegypti*, il a été démontré qu'une protéine salivaire de 20 kDa favoriserait la production de la réponse de type Th2 par la production d'IL-4 chez les cellules CD4+ tout en réduisant l'expression de la réponse de type Th1 par la baisse de la production IFN- γ . Les conclusions de ces travaux indiquaient ainsi que le facteur SAAG-A était capable de stimuler la différenciation des cellules CD4+ (Boppana *et al.*, 2009). Les tiques, qui ont un mode d'alimentation différent de celui des moustiques, possèdent aussi dans leur sialome des protéines capables de favoriser une réponse de type Th2 (Mejri *et al.*, 2001 ; Schoeler & Wikel, 2001 ; Mejri & Brossard, 2007). La salive des simulies présente également des propriétés immunosuppressives sur l'activité des cellules T. Leurs piqûres inhiberaient la capacité de présenter les antigènes par les cellules immunes en diminuant l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II (29).

La salive, à travers ces composantes protéiques, affecte donc le fonctionnement des acteurs de l'immunité innée et adaptative (**Figure 13**). Ces actions immunosuppressives des protéines salivaires des vecteurs exercés sur les réponses immunes de l'hôte pourraient fournir un environnement favorable à la transmission des agents pathogènes (Ribeiro *et al.*, 1987).

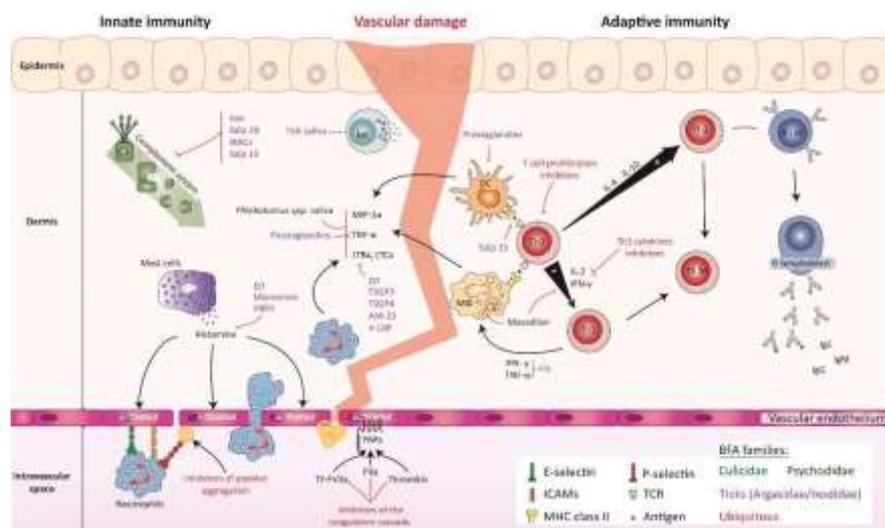


Figure 13: Représentation schématique des mécanismes de modulation de la réponse immunes des vertébrés due à des protéines salivaires d'arthropodes hématophages au moment du repas sanguin de ces derniers

Les protéines appartenant à une même famille d'arthropodes sont indiquées par une même couleur. Les différentes familles d'arthropodes sont indiquées au bas de la figure (Fontaine *et al.*, 2011a).

5.1.1.7 Transmission des pathogènes et développement de l'infection chez l'hôte vertébré : rôle des protéines salivaires des arthropodes

Le développement des effets immuno-modulateurs peut aussi avoir des conséquences sur la transmission des pathogènes et le développement ou la réduction des pathologies associées (Titus and Ribeiro 1988; R. V. Morris et al. 2001). L'injection d'extraits salivaires ou l'exposition aux piqûres des phlébotomes non infectés à des souris semble induire une augmentation de la production d'IFN- γ et semble protéger les souris contre l'infection aux *Leishmania* (Kamhawi et al. 2000; Rohousová and Volf 2006; Drahota et al. 2009). Ces observations suggèrent la possibilité intéressante que la vaccination de l'hôte contre des composants salivaires des vecteurs pourrait inhiber la transmission des pathogènes en particulier *Leishmania*. De manière intéressante, une pré-exposition aux antigènes salivaires pourrait s'avérer « protectrice » sur l'infection/pathologie. Elle n'a pas les mêmes effets sur la réponse immune de l'hôte que la co-injection simultanée de pathogènes et de salive qui, dans ce cas, exacerbe la pathologie en inhibant la réponse immunitaire de Type Th1 par une activation de la prolifération des lymphocytes T et une baisse de production des cytokines associées, l'IL-12 et l'IFN- γ (Mbow et al. 1998; Lestinova et al. 2017). De même, la préexposition des bovins aux piqûres de la tique *Rhipicephalus microplus* favoriserait une résistance et une protection à la transmission des agents pathogènes car les bovins résistants ont un taux d'Ac anti-salive totale de tique supérieur aux bovins sensibles (Garcia et al. 2017).

Les protéines salivaires extraites des glandes salivaires d'*Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus* non infectés sont, en revanche, favorables à la réplication du West Nile Virus (WNV) et à l'inhibition les réaction inflammatoire initiées par les kératinocytes infectés par WNV, en modèle expérimentale (Schneider and Higgs 2008; Schneider et al. 2010). Cette immunomodulation locale induite par l'exposition aux piqûres d'*Aedes* augmenterait l'inflammation et permettrait ainsi aux virus de se répliquer au sein de la kératinocyte, cellule effectrice de l'immunité innée par inactivation des substances antivirales de cette cellule (Garcia et al., 2018). Chez *Ae. aegypti* aussi, une protéine le «salivary factor LTRN», faciliterait la transmission du virus Zika par son effet immunomodulateur (Pingen et al., 2017;Jin et al., 2018). Cet effet facilitateur est donc opposé à l'effet protecteur induit par la réaction inflammatoire développée au site de piqûre suite à des pré-expositions répétées aux phlébotomes et aux tiques (Belkaid et al. 1998; Garcia et al. 2017).

La pré-exposition aux antigènes salivaires induirait ainsi un microenvironnement particulier qui serait favorable ou non à la transmission des pathogènes par un effet immunomodulateur au site de piqûre. Cela pourrait être une voie exploitable dans l'établissement des vaccins constitués des composants salivaires des vecteurs et donc offrirait les moyens prophylactiques aux infections des humains par les arbovirus.

En exploitant cette voie dans le cadre des études réalisées sur la leishmaniose, il a été démontré qu'il est fort possible de prévenir les maladies à transmission vectorielle en exploitant le potentiel immunosuppresseur de la salive des arthropodes pour développer des vaccins. Des souris pré-exposées à la salive de *Lutzomyia papatasi* avant d'être infectées par *Leishmania major*, présentaient une résistance au développement de la leishmaniose et guérissaient plus vite de l'infection que leurs homologues non pré-exposées (Morris *et al.*, 2001).

5.1.2 Approche vaccinale contre la transmission des agents pathogènes aux hôtes vertébrés

Dans la quête des solutions de préservation de la santé des vertébrés en générale et en particulier celles des humains contre les maladies à transmission vectorielle, les composants salivaires des vecteurs offrirait une voie de recherche intéressante pour produire des vaccins. Plusieurs vaccins candidats ont été élaborés en exploitant le pouvoir immunosuppresseur des certaines protéines salivaires chez plusieurs arthropodes (Manning *et al.* 2018). Un exemple probant est la protéine Salp15 du sialome de la tique *Ixodes scapularis*, impliqué dans la transmission du spirochète *Borrelia burgdorferi*, responsable de la maladie de Lyme. Des souris inoculées avec la forme recombinante de cette protéine en laboratoire, ont montré une résistance à la transmission du *Borrelia burgdorferi* (Dai *et al.*, 2009 ; Neelakanta and Sultana 2015)). De même, des souris inoculées avec le MAX sous forme recombinante, cette protéine vasodilatatrice, a permis à ces souris de produire des Ac anti-MAX conduisant ainsi à une inhibition les fonctions vasodilatatrices de ces protéines. Cela aiderait l'hôte vertébré à limiter la perte de sang et empêcherait le vecteur de s'alimenter et donc empêcherait de transmettre les agents pathogènes qu'il contiendrait dans sa salive. Ces effets semblent marcher avec *L. longipalpis* car ces Ac anti-MAX n'ont pas d'influence sur la prise de repas de sang de *P. papatasi* (Mathews *et al.*, 1996). Aussi, une forte réponse cellulaire anti-protéines salivaires pourrait inhiber le bon déroulement de la piqûre en contrecarrant l'effet anti-inflammatoire de certaines protéines salivaires et/ou en orientant la production des cytokines localement au site de la piqûre (Mbow *et al.*, 1998).

Enfin, l'invasion des glandes salivaires du vecteur par les agents pathogènes ingurgités lors de la prise de repas sur un hôte infecté, pourrait être bloquée par les anti-protéines salivaires produites par un hôte préalablement vacciné avec une protéine salivaire de vecteur (Barreau *et al.*, 1995 ; Brennan *et al.*, 2000).

Nonobstant ces résultats encourageants, l'immunisation préalable des hôtes avec des candidats vaccins à base de protéines salivaires n'offre pas tous les effets inhibiteurs recherchés. C'est le cas de la recombinante rD7, de la protéine D7 de 36 kDa immunogénique et abondante dans la salive de *Culex tarsalis*, un vecteur du virus de WNV. Une exacerbation de la maladie du WN a été observée chez des souris qui ont pourtant été préalablement vaccinées avec le rD7 (Reagan *et al.*, 2012). Ceci a permis aux auteurs de conclure que l'abondance et l'antigénicité des protéines salivaires ne garantissent pas obligatoirement le pouvoir vaccinal de ces protéines (Reagan *et al.*, 2012). D'autres composants salivaires d'*Ae. aegypti* comme la sérine protéase CLIPA3 et la protéine 34 kDa sont fortement impliqués dans l'exacerbation de l'infection des hôtes vertébrés au virus de la Dengue (Conway *et al.* 2014; Surasombatpattana *et al.* 2014).

5.1.3 Réaction allergiques chez l'hôte et diagnostic de niveau d'exposition

Il a été noté de nombreuses fois des réactions d'hypersensibilité (retardée ou immédiate) chez les hôtes après des piqûres d'arthropodes. Ces réactions ont généralement été accompagnées de la production importante des immunoglobulines d'isotype E et G (IgE et IgG1 et IgG4) spécifiques aux protéines de la salive des arthropodes (Reunala *et al.*, 1994 ; Peng *et al.*, 1995).

Dans l'optique de développer des outils de diagnostics et de traitements de l'homme contre les réactions d'hypersensibilité ou réaction allergiques, les protéines salivaires allergisantes contre lesquelles sont produites ces IgE et IgG ont été caractérisées au cours de plusieurs travaux de recherches. Les moustiques et les tiques ont été les arthropodes hématophages les plus identifiés comme ayant le plus grand nombre de protéines allergisantes chez l'Homme (Brummer-Korvenkontto *et al.*, 1997 ; Jeon *et al.*, 2001 ; Peng and Simons, 1997 ; Gauci *et al.*, 1998 ; Parmar *et al.*, 1996). Chez l'espèce *Ae. aegypti* par exemple, l'apyrase de 68 kDa (rAed a1), une protéine de 37 kDa appartenant à la famille de D7 (rAed a2) et la protéine 30 kDa sont au nombre de ces protéines (Peng *et al.*, 2002 ; Peng *et al.*, 2006). Les formes recombinantes de ces protéines testées sur les humains ont induit, non seulement une réaction cutanée au niveau du site de la piqûre, mais aussi une production conséquente d'Ac IgE (Fe and Z 2001; Peng

and Simons 2004, Peng *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que les taux d'anticorps d'IgG4 et IgE anti-protéines salivaires de *Ae. aegypti*, de *Culex* et d'*Anopheles* pourraient indiquer des niveaux d'exposition intense aux piqûres de ces vecteurs (Reunala *et al.*, 1994 ; Palusio *et al.*, 1997).

Ainsi, le diagnostic et le traitement des allergies pourraient bénéficier du pouvoir immunogène de ces protéines identifiées chez d'autres arthropodes hématophages (Bircher *et al.*, 2005). Elles peuvent aussi être utilisées pour identifier les personnes les plus exposées aux piqûres des vecteurs. **Le tableau 3** regroupe d'autres protéines salivaires recombinantes et leurs diverses applications.

Tableau 3 :Protéines salivaires recombinantes d'arthropodes et leurs diverses applications

(Peng and Simons 2004; Poinsignon et al. 2010).

Proteines	Organimes	Informations additionelles	MM (kDa)	Application
rAed a1	<i>Aedes aegypti</i>	Apyrase salivaire	68	Allergy
rAed a2	<i>Aedes aegypti</i>	Appartient à la famille D7	37	Allergy
rAed a3	<i>Aedes aegypti</i>	Allergene salivaire 30 kDa	30	Allergy
TAg5	<i>Glossina m. morsitans</i>	Tse Tse Antigen 5	28,9	Allergy
Maxadilan	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	9,5	Vaccine candidate
SP15	<i>Phlebotomus papatasi</i>	-	15	Vaccine candidate
RIjm19	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	11	Vaccine candidate
Salp15	<i>Ixodes scapularis</i>	-	14,7	Vaccine candidate
Gsg6	<i>Anopheles gambiae</i>	-	10	Immunogial biomarker
RIjm11	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Protéine liée au jaune	43	Immunogial biomarker
RIjm17	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Protéine liée au jaune	45	Immunogial biomarker

5.2 Autres fonctions de la salive des insectes

Outre ces fonctions inhibitrices, la salive des moustiques remplit bien d'autres fonctions qui participent aussi à sa survie. En effet, la salive des moustiques mâles et femelles permet la solubilisation, l'ingestion et la digestion des oligosaccharides ingérés au cours des repas sucrés. Chez ces insectes, une α -glucosidase est responsable de la digestion des molécules de sucre prises lors des repas sucrés (Souza-Neto et al. 2007). Des substances bactéricides contenues dans la salive des *Aedes*, protègent leurs pièces buccales et leur salive des invasions bactériennes. Dans la salive de ces derniers, des estérases ont aussi été identifiées.

VI. INDUCTION DE REPONSES ANTICORPS ANTI-PROTEINES SALIVAIRES DES ARTHROPODES : APPLICATIONS POTENTIELLES DANS LE CONTRÔLE DES INFECTIONS TRANSMISES PAR LES ARTHROPODES

Parmi les protéines salivaires d'arthropodes hématophages, certaines sont immunogéniques. Elles induisent la synthèse d'anticorps (Ac) spécifiques IgM, IgE et IgG (Billingsley *et al.*, 2006; Fontaine *et al.*, 2011). Il a été démontré une corrélation entre la quantité de ces immunoglobulines (Ig) et le niveau d'exposition de l'hôte aux piqûres d'arthropodes (Peng *et al.* 2002; Poinsignon *et al.* 2008; Doucoure *et al.*, 2012a). La composition isotypique et l'intensité de cette réponse anticorps spécifique peuvent-être également modifiées dans le temps suivant l'antécédent d'exposition, l'intensité d'exposition et la physiologie de l'hôte (Belkaid *et al.*, 2000 ; Volf *et al.*, 2000; Choumet *et al.*, 2007; Prates *et al.*, 2008).

L'étude de ces réponses Ac anti-salive, pourrait donc constituer un outil d'évaluation du niveau d'exposition des hommes aux piqûres des vecteurs, d'indicateur de risque de transmission des arbovirus, d'orientation des stratégies de LAV et d'évaluation des LAV en complément des méthodes entomologiques classiques.

6.1 Réponse Ac anti-protéines salivaires des arthropodes : un marqueur immunologique d'exposition aux piqûres de vecteurs hématophages

De par leurs propriétés immunogéniques, certaines protéines salivaires d'arthropodes, comme décrites plus haut, peuvent être antigéniques et ainsi induisent une production d'Ac spécifiques lorsque l'hôte est exposé aux piqûres de ces arthropodes. Les personnes exposées, par exemple, aux piqûres des glossines, des tiques, des *Anophèles*, des *Aedes*, et autres arthropodes, ont développé un niveau d'Ac anti protéines-salivaires plus important que des personnes non exposées (Elfving *et al.*, 2008; Poinsignon *et al.*, 2008; Doucoure *et al.*, 2012a, 2012b). La découverte dans le sérum de soldats français des Ac IgG anti-salive d'*Anopheles gambiae* et d'*Ae. aegypti*, après un séjour de 5 mois en zone tropicale et dans le sérum de voyageurs ayant séjourné en zones tropicales (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007 ; Londono-Renteria *et al.*, 2013), constitue un argument en faveur de la relation entre le niveau d'exposition aux vecteurs et la synthèse des Ac anti-salive d'arthropodes. Le niveau de ces réponses Ac

spécifiques notamment les IgG, à la salive totale, chez ces individus exposés était fonction de l'intensité d'exposition de ces derniers aux piqûres (**Figure 14**)

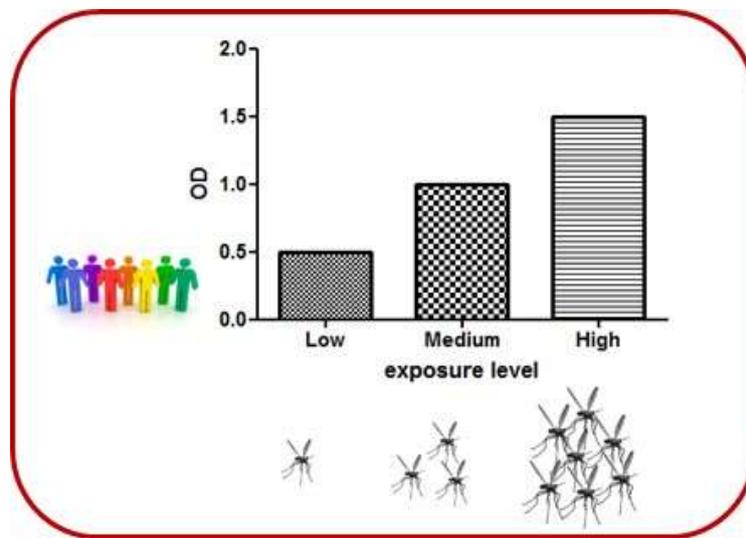


Figure 14: Intensité de réponses Anticorps (DO) en fonction de l'intensité d'exposition des Hommes à des vecteurs (Poinsignon et al., 2008)

Les réponses anticorps anti-EGS sont positivement corrélées avec les densités de vecteurs.

En comparant la densité des vecteurs évaluée par les méthodes entomologiques classiques et les taux d'Ac anti-salive chez les individus d'une zone rurale du Sénégal, les auteurs ont montré une association positive, au niveau populationnelle (comparaison de foyers) entre niveau d'exposition aux vecteurs *Anopheles gambiae* et réponse Ac anti-salive totale d'*Anopheles* chez l'hôte (Remoué *et al.*, 2006). Les mêmes observations ont été faites lors d'une étude conduite en Bolivie. Dans cette étude le taux d'Ac IgG anti-salive totale d'*Ae aegypti* était positivement lié au niveau d'exposition des populations d'étude à l'*Ae. aegypti* en milieu urbain. Dans cette étude, suivant les paramètres entomologiques d'exposition (stade larvaire et nymphale), 68,5 % et 72,6 % d'individus immédiatement exposés aux piqûres de l'*Ae. aegypti*, c'est-à-dire vivant dans les maisons où les nymphes d'*Ae aegypti* ont été collectées, avaient une réponse Ac anti- EGS d'*Ae aegypti* important que celles des individus vivant dans les maisons où les larves ont été principalement collectées. Les niveaux de réponse Ac IgG anti-salive étaient liés à l'intensité du contact de l'homme avec les vecteurs (Doucoure et al., 2012a). Au Sud de la France Métropolitaine, les réponses IgG anti-EGS d'*Ae. albopictus* ont été évaluées dans le sérum des individus âgés de 44 à 99 ans, ceci en fonction des facteurs de risque (facteurs socio-environnementaux). Il est ressorti de cette étude que les individus vivant dans les appartements avaient un taux d'Ac IgG anti-EGS d'*Ae. albopictus* plus

important que ceux qui vivaient en maison individuelle, suggérant que les appartements constitueraient un lieu privilégié de concentration des densité d'*Ae. albopictus* (Poinsignon et al. 2019);

L'évaluation du niveau de la réponse Ac spécifique à la salive d'un certain nombre d'insectes vecteurs peut être ainsi utilisée pour montrer non seulement l'exposition mais aussi le degré d'exposition de l'homme aux piqûres de ces arthropodes. La réponse IgG anti-salive des vecteurs constituerait un biomarqueur immuno-épidémiologique pertinent pour évaluer l'exposition de l'homme aux piqûres d'arthropodes et au risque de transmission d'agents pathogènes (Remoué *et al.*, 2006). Au niveau individuel, le nombre de piqûres reçues serait proportionnel à la quantité d'Ac anti-salive chez cet individu (Remoué *et al.*, 2007)

Par ailleurs, de fortes concentrations d'IgG anti-salive d'*An. dirus* et d'*An. darlingi* mises en exergue chez les patients parasités par *Plasmodium falciparum* ou *plasmodium vivax* contrairement à ceux vivant hors de la zone endémique, montrent ainsi qu'il est possible d'utiliser la réponse IgG anti-salive des vecteurs comme un indicateur de risque d'infection/transmission de paludisme dans une zone donnée (Londono-Reteria *et al.*, 2020). Une étude s'intéressant à l'évaluation du risque de transmission du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans au Sénégal a pu démontrer que les enfants parasités présentaient un niveau d'anticorps plus élevé que ceux qui étaient exempts de toute affection (Papa M. Drame et al. 2015).

Enfin, les réponses Ac anti-salive totale ont été exploitées à l'Île de la Réunion afin d'évaluer la LAV. Cette étude a conclu à l'efficacité de cette LAV menée. En effet, la comparaison du niveau d'IgG anti-salive totale d'*Ae. albopictus* avant et après l'implémentation de la LAV a montré une réduction progressive du niveau des IgG anti-salive deux semaines après la LAV, et jusqu'à la 6ème semaine (**Figure 15**)

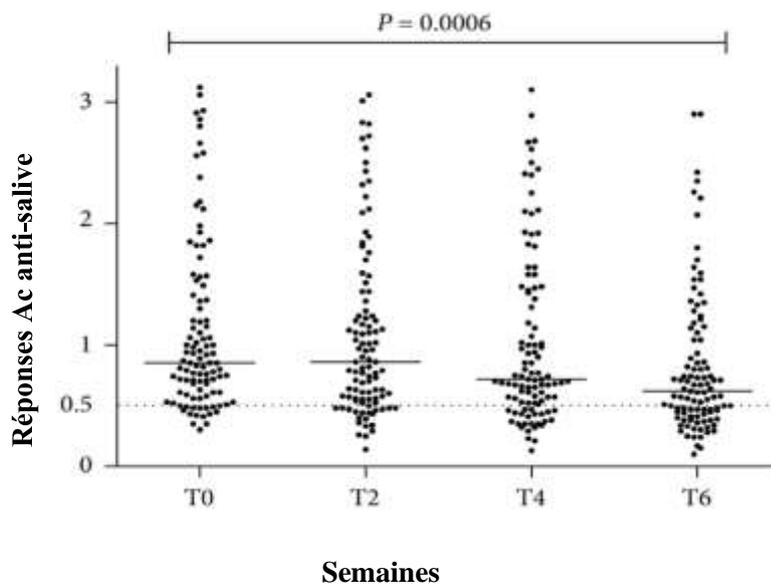


Figure 15 : Evolution de la réponse IgG anti-salive des individus avant et après l'implémentation de la lutte anti-vectorielle (VCI) contre l'*Ae. albopictus* sur l'île de la Réunion. To= Réponse IgG anti-salive avant l'implémentation de la lutte antivectorielle

To+15= Réponse IgG anti-salive 15 jours après l'implémentation de la lutte antivectorielle

To+ 30= Réponse IgG anti-salive 30 jours après l'implémentation de la lutte antivectorielle

To+ 45= Réponse IgG anti-salive 45 jours après l'implémentation de la lutte antivectorielle

Au regard de tout ce qui précède, la réponse Ac à la salive totale d'insectes semble être un outil idéal dans la lutte contre les maladies à transmission vectorielle.

Cependant l'utilisation de la salive totale comme biomarqueur d'exposition présente un certain nombre de limites. La collecte de la salive est un travail long et fastidieux, les quantités de protéines salivaires peuvent varier d'un lot à l'autre et l'ubiquité des protéines salivaires chez les arthropodes (Induction de réactions immunologiques croisées avec la salive d'autres arthropodes présents dans la zone) (Arcà *et al.*, 2005 et 2007 ; Ribeiro *et al.*, 2007 ; Andersen *et al.*, 2009 ; Francischetti *et al.*, 2010) et le problème de conservation sur le terrain des extraits de glande salivaire (EGS) (Fontaine *et al.*, 2011).

Un biomarqueur immuno-épidémiologique précis et spécifique doit donc répondre à un certain nombre de critères pour être considéré comme un outil pertinent.

6.1.1 Identification et caractéristiques d'un biomarqueur pertinent d'exposition aux piqûres de moustiques

Un biomarqueur d'exposition optimal doit présenter les caractéristiques intrinsèques suivantes : une possibilité d'utilisation à grande échelle, une spécificité à une espèce ou à un genre d'insecte, une antigénicité (intensité de la réponse Ac) associée positivement avec le niveau d'exposition aux piqûres d'insectes et permettre une reproductibilité des tests (**Figure 16**).

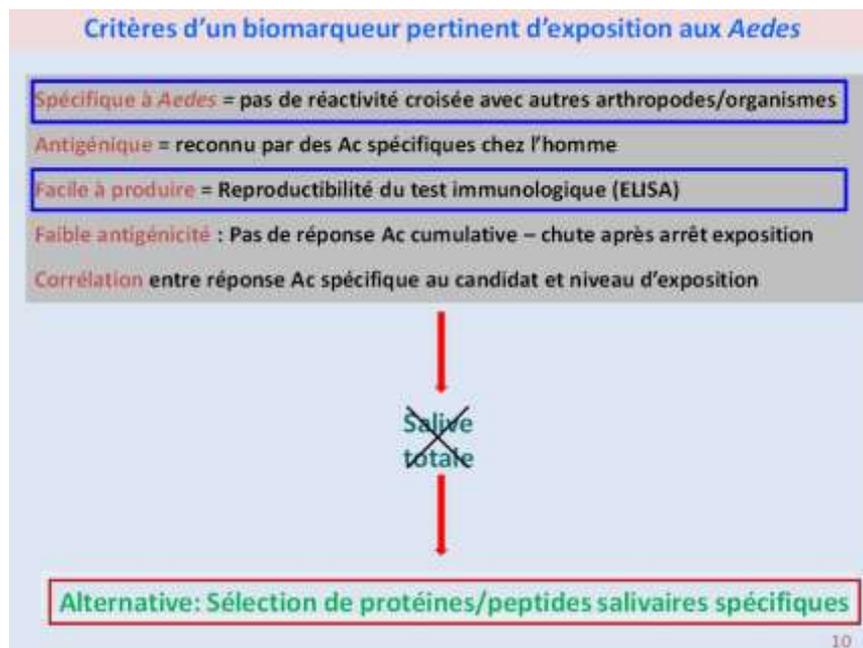


Figure 16 : Critères d'un candidat biomarqueur pertinent d'exposition des vertébrés aux piqûres des vecteurs

La salive totale ne répondant pas à l'ensemble de ces critères, il a été donc nécessaire d'identifier des protéines et/ou peptides salivaires antigéniques et spécifiques au genre ou aux espèces de vecteurs, comme candidats biomarqueurs (**Figure 17**).

Au travers de techniques immuno-protéomiques couplées à l'utilisation des outils bioinformatiques, 15 protéines potentiellement immunogéniques ont été identifiées dans les EGS de la femelle *Ae. aegypti* (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2010). Par des recherches bioinformatiques impliquant des comparaisons de séquences (programme d'alignement de séquences 'Blast' dans la base de données VectorBase, puis dans la base de données GenBank) (**Figure 17**), la protéine salivaire de la famille de 34 kDa fut identifiée comme étant celle qui était plus spécifique aux moustique du genre *Aedes*. En sus, en utilisant une approche similaire

à celle qui a permis l'identification du peptide gSG6-P1 (Cornelie et al., 2007 ; Poinsignon *et al.*, 2008), l'extrémité N-terminale de la protéine putative 34 kDa (le peptide Nterm-34 kDa) constituée de 19 acide-aminés fut identifiée comme plus antigénique et spécifique aux genre *Aedes*.

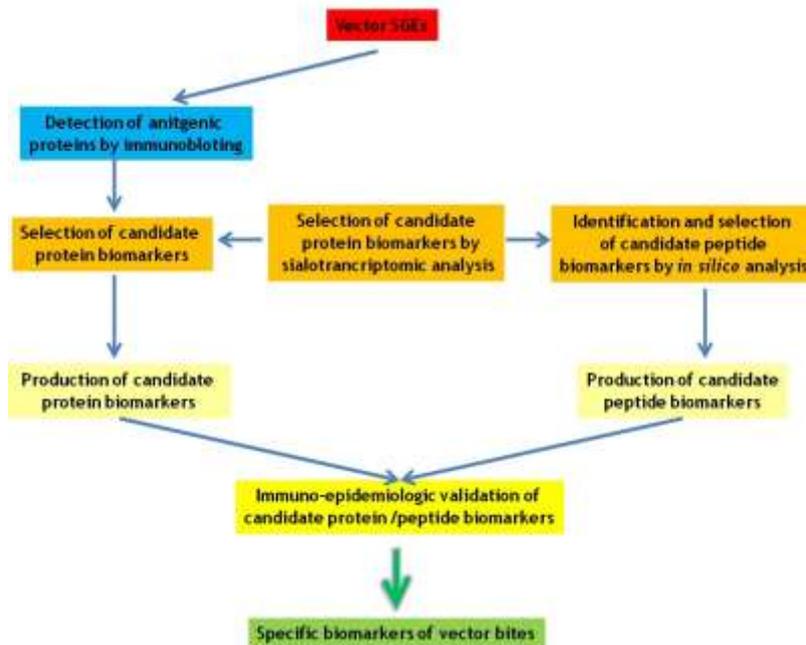


Figure 17: Schéma synoptique de recherche de candidat biomarqueur spécifique aux piqûres des vecteurs

Ces peptides salivaires ont donc depuis une décennie, fait l'objet de validation et d'application sur le terrain dans différents contextes (Poinsignon *et al.*, 2008, Doucoure et al., 2012a ; Doucoure et al., 2012b ; Elanga Ndille *et al.*, 2012 ; Elanga Ndille *et al.*, 2014 ; Elanga Ndille *et al.*, 2016 ; Dipomin et al., 2018 ; Sagna et al., 2019).

Dans cette thèse seront exposées les différentes applications du biomarqueur (Ac anti-Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti*) d'exposition à aux piqûres des *Aedes (aegypti et albopictus)* dans différents contextes dont les séquences peptidiques sont présentées par la **figure 18**.

MSPSNKILVLLLFPILLVSSHPIPAEDPAKQC�LSEDDLTCLK
AAISGASSAKAANEDILPNTTLAACPMKKNFTTEMLKTVATD
MEVLKTQGVSNMEVQLLRESFEEKLNDLAKNKDIFERQAN
QDTSKAE6EMVEKINKLQLEMAKLQEEIEEQTKQMYVDMI
EYIFERLKMNDTEAIDSYAQIVMKTMMHELMKKTDRLLV
WEMVKYVEGKKNKWVGRKVLNTILDQVNKLKLYKPEEVEIG
KNSLVVWCWKFNSETVYGTDEDQKSFLAKLFFPKEKGC
KECANVKSRTMCNNDYPKVMVKAFG

Figure 18: Séquence d'acides aminés de la protéine salivaire 34 kDa de la femelle d'*Aedes aegypti* (gi|94468336),(Ribeiro et al. 2007).

Concernant l'exposition à *Culex quinquefasciatus*, nous évoquerons les quelques travaux qui ont fait usage de salive totale de *Culex* dans l'optique d'estimer le potentiel indicateur de niveau d'exposition des hommes aux piqûres des *Culex*. Dans la partie résultats, seront présentées plus en détails les différentes activités menées dans l'optique de valider la protéine recombinante spécifique à *Culex quinquefasciatus* (la protéine 30 kDa).

6.2 Applications du biomarqueur d'exposition d'*Aedes aegypti* dans le contrôle des arboviroses

Dans les zones endémiques de maladies transmises par les moustiques telles que les infections à arbovirus, la lutte s'organise autour de la LAV qui vise à réduire ou interrompre le contact hôte-vecteur. L'estimation du niveau de contact homme-*Aedes* constitue donc un indicateur important pour mesurer le risque de transmission de ces maladies. Ainsi, la découverte qui a montré que les protéines salivaires des moustiques induisent chez l'hôte humain une synthèse d'Ac « proportionnelle » à son niveau d'exposition aux piqûres de ces moustiques a stimulé des recherches visant à identifier des biomarqueurs spécifiques pour mesurer l'exposition de l'homme aux piqûres des moustiques (Poinsignon *et al.*, 2009; Doucoure *et al.*, 2012a, 2012b). Récemment, la réponse IgG dirigée contre le peptide salivaire Nterm-34kDa d'*Ae. aegypti* a été validée comme biomarqueur d'exposition à *Ae. aegypti* et à *Ae albopictus*, les principaux vecteurs d'arbovirus (Elanga Ndille *et al.*, 2012, 2016). Cela pourrait aider à identifier les individus exposés aux piqûres des *Aedes* vecteurs (Remoue et al. 2007; Doucoure et al., 2012; Doucoure et al., 2012a), par conséquent à un risque de transmission d'arbovirus, et à évaluer l'efficacité de la LAV (Doucoure et al., 2014; Elanga

Ndille et *al.*, 2016b) mise en œuvre par les autorités sanitaires.

6.1.2 Identification des zones à risque d'arboviroses

Le peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* a été utilisé pour évaluer le risque d'infection par la dengue dans les zones urbaines de la ville de Vientiane, Laos (Ndille et al. 2014a). Les auteurs n'ont rapporté aucune différence significative au niveau individuel, dans les niveaux de réponses IgG anti-Nterm-34kDa entre les individus DENV+ (positifs à la dengue, évalué par PCR sur sérum) et ceux négatifs (DENV-). Cependant, le niveau des réponses IgG anti-Nterm-34 kDa différait de manière significative selon le degré d'urbanisation des quartiers. Les réponses IgG spécifiques étaient plus élevées chez les individus vivant dans la zone périphérique faiblement urbanisée que celles des personnes vivant dans la zone centrale fortement urbanisée. Fait intéressant, la prévalence d'infection au DENV était plus élevée chez les individus vivant dans la périphérie (4,5 %) que chez ceux vivant dans la zone centrale (2,2 %). Cette étude soulignait ainsi la pertinence de l'utilisation de la réponse IgG anti-Nterm-34 kDa pour prédire, au niveau populationnel donc au niveau des zones/sites/foyers, les zones à haut risque de transmission des arbovirus en zones urbaines des pays en développement. Cependant, d'autres études dans différents contextes épidémiologiques sont nécessaires pour valider ce biomarqueur comme indicateur du risque de transmission des arboviroses.

6.1.3 Indicateur d'hétérogénéité d'exposition aux piqûres des *Aedes*

En milieu naturel, les populations humaines ne sont pas exposées aux piqûres des moustiques vecteurs de manière uniforme. Il s'avère donc nécessaire que soit développés de nouveaux indicateurs et méthodes évaluant l'hétérogénéité de l'exposition humaine aux piqûres de moustiques du genre *Aedes* afin de cibler et prioriser les interventions suivant les zones, les saisons ou groupes d'individus à haut risque de transmission d'arbovirus. La pertinence de l'utilisation des réponses IgG humaines dirigées contre le peptide salivaire Nterm-34Da comme biomarqueur de l'exposition aux piqûres d'*Ae. aegypti* a été directement testée dans une zone rurale du Bénin (Elanga Ndille et al. 2012a). Les Ac IgG spécifiques au peptide salivaire Nterm34Da ont été évalués pendant les saisons sèches et pluvieuses qui constituent généralement des périodes d'exposition faible et élevée aux piqûres d'*Aedes*, respectivement. Les réponses anticorps ont ensuite été comparées aux précipitations mensuelles cumulées enregistrées au cours des mêmes périodes. Les réponses IgG spécifiques ont montré des

variations saisonnières significatives dans la zone d'étude et étaient plus élevées pendant la saison des pluies, saison majoritaire du nombre des *Aedes* adultes, par rapport à la saison sèche. De plus, ce résultat était parfaitement corrélé avec la pluviométrie enregistrée durant les mêmes périodes. Ceci mettait en évidence la sensibilité et la spécificité du peptide Nterm-34 kDa en milieu rural. Aussi dans 4 quartiers de Saint Louis de la ville de Dakar au Sénégal, où les enfants sont majoritairement exposés aux piqûres d'*Aedes* et de l'*Anopheles*, les réponses IgG anti-Nterm 34 kDa et anti-gSG6-P1 (peptide salivaire d'*Anopheles gambiae*) ont été évaluées dans le cadre d'une étude transversale en saison de pluie. Les niveaux médians d'Ac anti-Nterm-34 kDa et anti-gSG6-P1 variaient significativement entre les 4 quartiers. Les niveaux médians d'Ac anti-Nterm-34 kDa, c'est-à-dire l'exposition des enfants aux piqûres d'*Aedes* variait aussi suivant l'accès des ménages aux services sanitaires de la ville dans cette étude (Sagna et al. 2019). Une autre étude menée sur l'île de La Réunion a révélé une forte réactivité croisée entre le peptide Nterm-34kDa d'*Ae. aegypti* et celui d'*Ae. albopictus* (Elanga Ndille et al. 2016a), le deuxième vecteur principal d'arbovirus dans le monde. En effet, la réponse IgG contre le peptide Nterm-34 kDa avait été mesurée chez des individus exposés exclusivement aux piqûres d'*Ae albopictus*, comme genre *Aedes* (pas de présence *Ae. aegypti* dans cette zone d'étude). Les résultats indiquaient que les individus exposés à *Ae. albopictus* développaient une réponse IgG spécifique au peptide Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti*, suggérant que ce peptide pourrait être utilisé pour évaluer l'exposition humaine à ces deux vecteurs d'arbovirus.

6.1.4 Biomarqueur d'exposition et programme de lutte contre les *Aedes*

La LAV étant la pierre angulaire dans le contrôle des arboviroses, sa mise en œuvre est aussi importante que l'évaluation de son efficacité. L'évaluation correcte de l'efficacité des stratégies de contrôle sur la réduction du contact homme-*Aedes* est nécessaire aussi bien au niveau individuel qu'au niveau communautaire. Les méthodes entomologiques classiques sont largement utilisées quand il s'agit d'évaluer une stratégie de LAV, mais dans un contexte de faible transmission/exposition, ces mesures de référence montrent des limites. Un biomarqueur immuno-épidémiologique pourrait servir à évaluer une LAV à court et long terme (indicateur de recolonisation après traitement d'une zone, par exemple). Une étude récente a rapporté que la réponse IgG anti-Nterm-34kDa pourrait être utilisée pour évaluer l'efficacité de la LAV contre *Aedes* (Elanga Ndille et al. 2016a). Au cours de cette étude, la réponse IgG anti-Nterm34kDa a été évaluée chez 102 individus vivant en zone urbaine sur l'île de La Réunion avant et après la mise en œuvre d'une stratégie de LAV contre *Ae. albopictus* selon la stratégie

(élimination de tous les sites de ponte et pulvérisation spatiale d'insecticide à base de deltaméthrine). Une diminution rapide et significative de la réponse IgG spécifique a été rapportée en seulement 15 jours après la mise en œuvre de la LAV. Cette réponse IgG spécifique continuait à diminuer jusqu'à 30 jours après la LAV, puis restait stable jusqu'à 45 jours après celle-ci. Cette diminution de la réponse IgG spécifique avait été associée à une réduction des densités de moustiques *Aedes*, estimée par les méthodes entomologiques et étroitement corrélée à la mise en œuvre de la LAV.

Tous ces résultats montrent que ce biomarqueur candidat peut détecter les variations à court terme de l'exposition humaine aux piqûres de moustiques *Aedes* après la mise en œuvre d'une stratégie de LAV. Cet outil immuno-épidémiologique semble donc être pertinent pour évaluer l'efficacité réelle de la LAV vis-à-vis des vecteurs d'arbovirus.

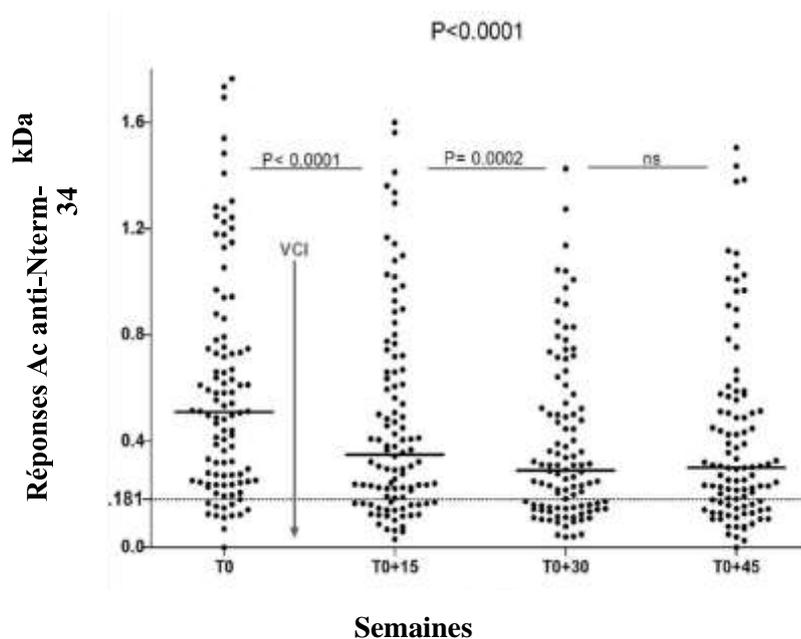


Figure 19: Evolution de la réponse IgG anti-Nterm-34 kDa des individus avant et après l'implémentation de la lutte anti-vectorielle (VCI) contre l'*Ae. albopictus* sur l'Île de Réunion

Chaque point est la réponse Ac IgG anti-Nterm-34 kDa et les barres horizontales sont les niveaux médians d'Ac au fil des semaines.

T₀ = Réponse IgG anti-Nterm-34 kDa avant l'implémentation de la lutte antivectorielle

T₀+15 = Réponse IgG anti-Nterm-34 kDa 15 jours après l'implémentation de la lutte antivectorielle

T₀+ 30 = Réponse IgG anti-Nterm-34 kDa 30 jours après l'implémentation de la lutte antivectorielle

T₀+ 45 = Réponse IgG anti-Nterm-34 kDa 45 jours après l'implémentation de la lutte antivectorielle

6.1.5 Biomarqueur d'exposition aux piqûres de *Culex quinquefasciatus*

Peu d'études ont fait cas de l'utilisation de la salive totale de *Culex* pour estimer le niveau d'exposition des hommes aux piqûres de *Cx quinquefasciatus* ou *Cx pipiens*. Dans l'une d'elle, les hommes vivant dans une zone endémique de filariose lymphatique présentaient un taux d'Ac (IgE et IgG) anti- EGS important que ceux qui vivaient dans la zone avec moins de *Culex quinquefasciatus*. En plus ce taux était positivement corrélé avec l'âge des enquêtés. (Das et al., 1991). La seconde étude (Carnague, Fos-sur-Mer et Marseille avec différentes caractéristiques socio-environnementales) indiquait que les niveaux d'IgG contre EGS de *Cx pipiens* était similaire spatialement et temporellement, sauf les taux d'IgG anti-EGS de *Cx pipiens* détecté chez les individus de la ville de Marseille. Dans cette ville, il a été observé une augmentation significative de niveaux d'IgG anti- EGS de *Cx pipiens* dans le sérum des individus après une période de pic d'exposition aux piqûres de *Cx pipiens*. Enfin, cette étude a pu montrer que les réponses IgG anti- EGS de *Cx pipiens* ne semblaient pas être corrélées à la diminution des densités de *Cx. pipiens* de la Camargue à Marseille (Fontaine et al., 2011).

❖ Parcours du biomarqueur au sein de l'équipe « IHVEC » 'Immunology of Human Vecteur Contact '

Nous adressons un résumé du chemin parcouru par des étapes successives d'identification, de validation et d'utilisation du biomarqueur immunoépidémiologique d'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs *Aedes*. Nous concernant, nous proposons de lister les objectifs et les principales conclusions des travaux qui ont porté spécifiquement sur les biomarqueurs l'exposition aux piqûres des *Aedes* (**Figure 20 et 21**).

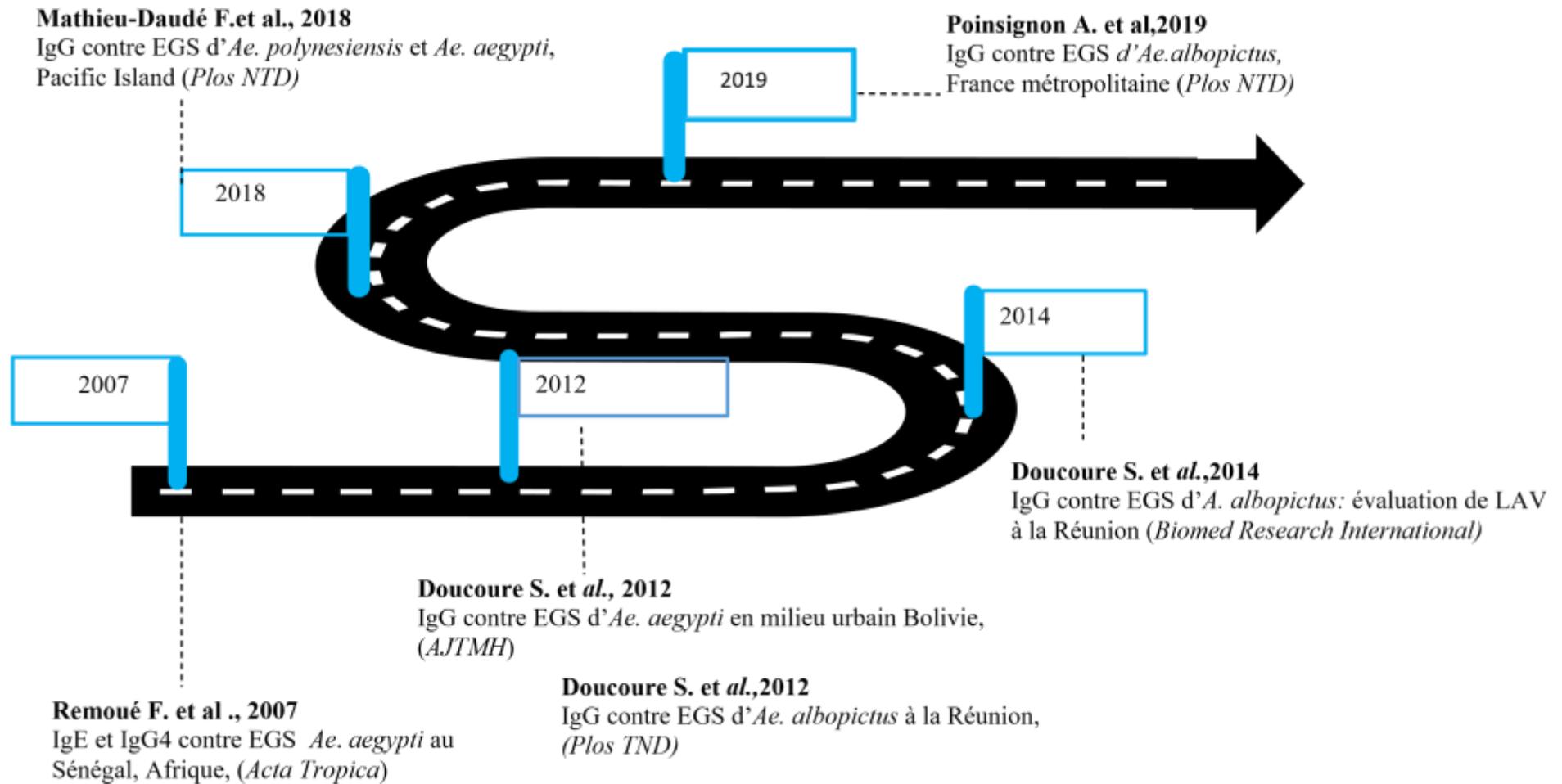


Figure 20: Activités du groupe IHVEC portant sur la salive totale d'*Aedes*.

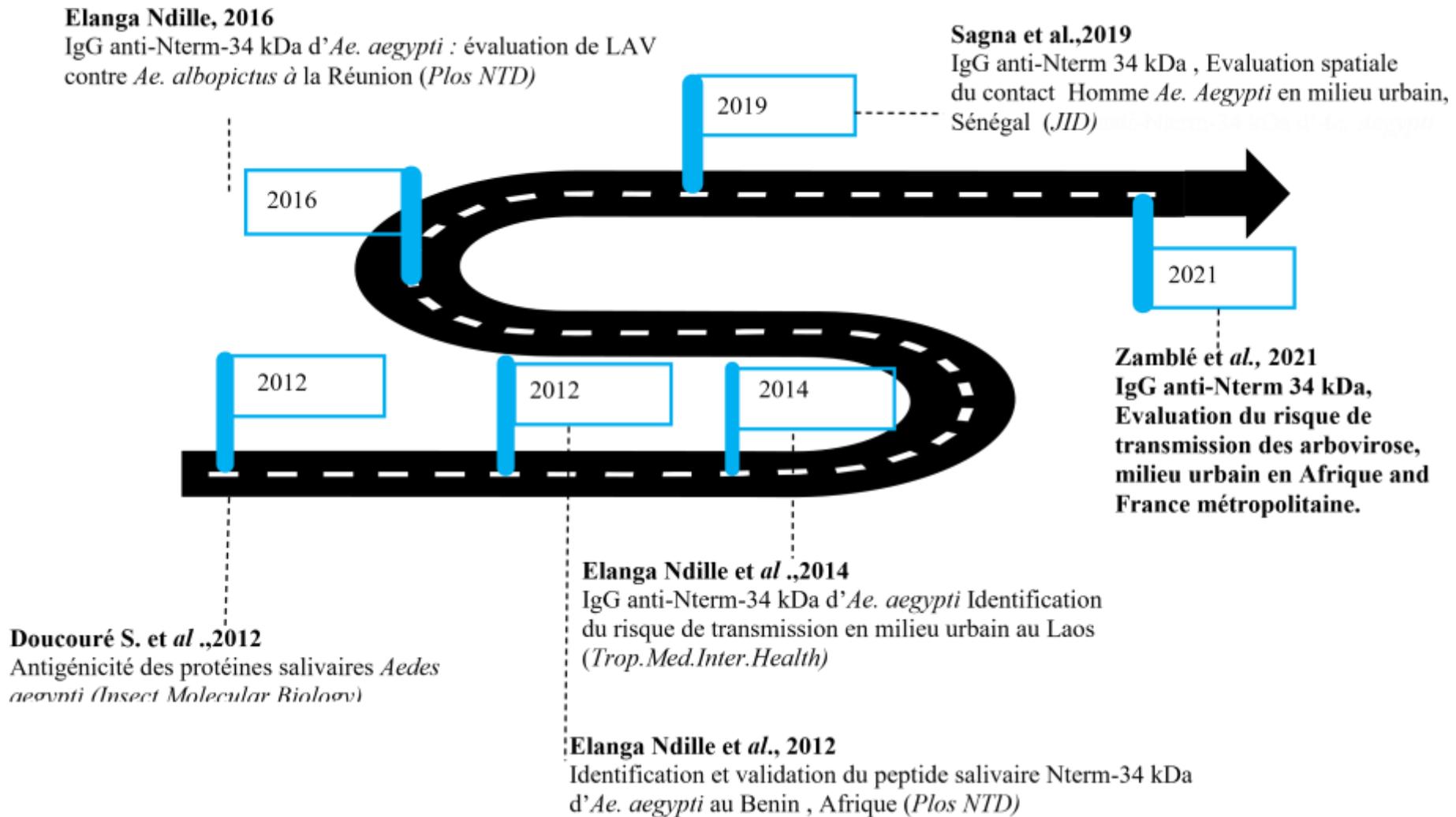


Figure 21: Activités du groupe IHVEC portant sur le peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Aedes aegypti*

1.Objectifs

1.1Objectif général

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer l'exposition des populations humaines aux piqûres des moustiques vecteurs *Aedes* et *Culex*, et ainsi le risque de transmission des arboviroses dans deux contextes différents mais complémentaires : i) au Sud : le contexte urbain africain en Afrique de l'Ouest et ii) au Nord : en France métropolitaine.

1.2Objectifs spécifiques

Nos objectifs spécifiques nous permettent d'apprécier le niveau d'exposition humaine aux vecteurs d'arboviroses en utilisant les biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition basés sur la quantification des Ac anti-protéines ou peptides salivaires des *Aedes* et *Culex*.

Les activités menées sur les différentes cohortes dans chaque contexte d'étude visaient deux objectifs spécifiques :

1. Évaluer le niveau d'exposition des populations d'étude aux piqûres des *Aedes* et leur hétérogénéité en milieu urbain africain (Abidjan, Côte d'Ivoire), et en contexte de risque engendré par la colonisation différentielle d'*Ae. albopictus* dans le Sud de la France.
2. Identifier un potentiel biomarqueur d'exposition aux *Culex* par l'analyse des réponses Ac dirigés contre les extraits de glandes salivaires et la protéine recombinante de 30 kDa de *Culex quinquefasciatus*.

2.Cadre de la thèse

Les principaux travaux de cette thèse s'inscrivent dans l'étude générale des relations immunologiques Homme-vecteur établies lors de la prise du repas sanguin du moustique sur l'Homme.

L'équipe IHVEC « Immunology of Human Vector Contact » dirigée par Dr Franck Remoué de l'UMR MIVEGEC (Université de Montpellier, IRD, CNRS,) est l'équipe au sein de laquelle j'ai mené à plein temps mes travaux de thèse.

Les objectifs de cette équipe sont i) l'identification des biomarqueurs immunoépidémiologiques d'exposition de l'Homme aux piqûres des insectes vecteurs de pathogènes, ii) l'évaluation du niveau d'exposition des Hommes aux piqûres des insectes

vecteurs, iii) l'étude des effets immuno-modulateurs induite par les piqûres des moustiques sur les réponses immunes anti-*Plasmodium* et leur effet sur la transmission du paludisme.

Les travaux de cette thèse se sont déroulées dans différents institutions et laboratoire en Afrique et en Europe : i) Institut Pierre Richet de Bouaké / Institut National de Santé Publique (IPR /INSP) à Bouaké en Côte d'Ivoire et à la délégation Régionale Occitanie IRD de Montpellier en France.

Les axes d'études exploités dans cette thèse s'inscrivent dans 3 projets financés dont l'objectif principal était l'évaluation de l'exposition aux moustiques et le risque de transmission des arboviroses.

❖ Projet 1 « ARBORISK » Activité 1 : Evaluation du risque de transmission des arboviroses sur l'axe Abidjan-Ouagadougou (Coordinateur : M.A. Adja (IPR/INSP), correspondant IRD : F. Remoué).

Ce projet est une étude transversale (Novembre 2015-Aout 2016) et multidisciplinaire visant à évaluer le risque de transmission des arboviroses en zones urbaines en Afrique de l'Ouest, en exploitant les aspects socio-anthropologiques, géographiques, entomologiques, épidémiologiques, virologiques et immunologiques. Les activités se sont déroulées dans 5 villes : Aboisso, Abidjan et Bouaké (Côte d'Ivoire), Bobo-Dioulasso et Ouagadougou (Burkina Faso). Il a été financé par l'Etat ivoirien dans le cadre des Contrats de Désendettement et de Développement (C2D, projet PRESED-CI) des pays du Sud dont la gestion a été confiée à l'IRD.

Les activités des équipes enquêtrices se sont déroulées suivant 4 subdivisions saisonnières (petite saison des pluies, petite saison sèche, grande saison des pluies et grande saison sèche). Dans le cadre de notre thèse, nous avons exploité uniquement les échantillons venant de 3 quartiers d'Abidjan et collectés durant la petite saison des pluies du 02 Novembre au 12 Novembre 2015. Cette partie du projet ARBORISK concernait au total 813 enfants (6 mois à 14 ans) mais pour le besoin de notre étude 736 échantillons de sérums des enfants âgé de 1 à 14 ans ont été sélectionnés dans 3 quartiers de la ville d'Abidjan (Anoumabo, Bromakoté et Petit-Bassam).

❖ **Projet 2 « ARBO-MED/PRIAM » Activité 2: Perception de Risque de transmission des Arboviroses sur le pourtour de la Méditerranée.**

Ce projet a impliqué les institutions universitaires et les laboratoires français suivants : AixMarseille université (AMU), Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen (EID), Institut Pasteur (IP), Service de Santé des Armées, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et Université de Corse (UC).

Ce projet multidisciplinaire dont les activités se sont déroulé à partir de Septembre 2012, avait pour objectifs principaux l'évaluation dans les populations des donneurs de sang des régions de Corse, de PACA, d'Occitanie et de l'Auvergne des indicateurs suivants : i) les paramètres associés à une exposition accrue de la population aux piqûres des vecteurs potentiels (*Aedes*, *Culex* et Phlébotomes) d'arbovirus et ii) les paramètres associés à un risque accru d'infection de la population par les arbovirus dans l'optique de la création et de l'analyse approfondie d'un jeu de données rassemblant des informations microbiologiques, entomologiques, épidémiologiques, sociologiques et spatiales relatives à l'infection humaine par les arbovirus.

Dans le cadre des activités de notre thèse, nous avons travaillé dans l'optique de détecter et de quantifier les anticorps IgG et IgM anti-peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Aedes aegypti* afin d'évaluer de façon spécifique l'exposition des populations aux piqûres d'*Ae. albopictus* de ces 4 régions françaises, en utilisant la sérothèque du projet Arbo-MED/PRIAM. Notre analyse concernait 2400 donneurs de sang âgés de 44 à 90 ans.

Nos activités se déclinaient en 3 objectifs spécifiques :

- i) Une caractérisation sérologique de la population étudiée par le dosage des IgG et IgM dirigés contre le peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti*.
- ii) L'analyse des facteurs de risque - année de colonisation des régions par *Ae. albopictus*, caractéristiques des logements, niveau socio-économique des donneurs de sang - potentiellement associés aux taux d'IgG spécifiques.
- iii) L'analyse des taux d'IgG spécifiques selon les lieux d'habitation des donneurs de sang (région, département, type d'habitat).

❖ **Projet 3 « JEAI EVAPAL-CI » Activité 3 : Développement et validation d'un biomarqueur immuno-épidémiologique d'exposition aux piqûres de *Culex* : Etude pilote (Coordinateur : M.A. Adja (IPR/INSP), correspondant IRD : F. Remoué).**

Ce projet est une étude transversale (2013-2016) et multidisciplinaire visant à évaluer le risque de transmission du paludisme après la crise socio-politique dans la ville de Bouaké (Côte d'Ivoire) et 2 villages environnants, en exploitant les aspects socio-anthropologiques, géographiques, entomologiques, épidémiologiques, parasitologique et immunologiques. Les activités se sont déroulées dans 3 quartiers: Kennedy (quartier résidentiel), N'Gattakro et Dares-salam (quartiers urbains non résidentiels) et 2 villages à proximité (Allokokro et Petessou)).

Il a bénéficié du financement de l'IRD dans le cadre des « projets Jeune Equipe Associée à l'IRD ».

Au cours des activités de ce projet, le passage des équipes enquêtrices ont été réalisées suivant 2 subdivisions saisonnières : saison des pluies (Août 2014) et la saison sèche (MarsAvril 2015).

Lors des passages des équipes enquêtrices, les données entomologiques, socioanthropologiques, parasitologique et sérologiques (prélèvement veineux : environ 1ml de sérum pour le dosage des Ac anti-Extrait de Glandes Salivaires ou anti-protéine recombinante) ont été collectées. Au total 801 enfants âgés de 6 mois à 14 mois ont été prélevés.

Dans le cadre de notre thèse, nous avons exploité les échantillons venant de 4 sites d'étude et les collectes ont été réalisées durant la saison sèche (Mars-Avril 2015). Pour les besoins de notre étude, nous avons sélectionné 223 échantillons de sérums des enfants âgés de 1 à 14 ans venant des quartiers Dar-es-salam, Kennedy, N'Gattakro et Petessou.

3. Financement

Tout au long de nos travaux de thèse qui ont duré du 1^{er} Novembre 2018 à Janvier 2022, nous avons bénéficié d'une allocation doctorale de la fondation Méditerranée Infection (bourse Infectiopôle Sud).

I. ETUDE DU RISQUE DE TRANSMISSION D'ARBOVIRUS DANS UN CONTEXTE URBAIN AFRICAIN PAR L'UTILISATION DU BIOMARQUEUR IMMUNOEPIDEMIOLOGIQUE D'EXPOSITION HUMAINE AUX PIQURES DE *Aedes Aegypti* A ABIDJAN, COTE D'IVOIRE

Résumé des activités menées pendant cette étude

Cette étude s'inscrit dans le volet immunologique du projet multidisciplinaire « ARBORISK » dont l'objectif majeur était l'évaluation des risques de transmission des arboviroses en zones urbaines suivant l'axe Abidjan-Ouagadougou.

Nos travaux de thèse se sont portés sur la partie du projet déployée dans la ville d'Abidjan et ont concerné 736 enfants âgés de 1 à 14 ans afin d'être sûr de doser exclusivement que les anticorps IgG produit par les enfants et non ceux transmis par la mère aux plus jeunes enfants (moins de 1 an).

Par la technique i) ELISA, réalisée sur les sérums de ces enfants, nous avons quantifié le taux d'IgG spécifique au peptide Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* dans le sérum des enfants afin d'évaluer leur niveaux d'exposition aux piqûres du vecteur majeur d'arbovirus (*Ae. aegypti*) dans la zone d'étude. Nous avons, dans un premier temps, analysé le niveau d'IgG spécifique en fonction des 3 quartiers d'étude qui présentaient des profils différents selon leurs caractéristiques socio-environnementales (Analyse spatiale). Par la suite, nous avons analysé les réponses IgG spécifiques suivant les classes d'âge des enfants afin d'identifier la classe d'âge la plus exposée aux piqûres d'*Ae. aegypti*.

Par la technique ii) LUMINEX nous avons dressé un état rétrospectif (**figure 22 et Figure 23**) des infections aux arbovirus des enfants inclus dans ce volet immunologique du projet ARBORISK selon leur lieu d'habitation.

a) Etude de niveaux d'exposition des enfants aux piqûres de l'*Aedes aegypti* dans les quartiers d'étude

Les différents résultats obtenus avec la technique ELISA ont fait l'objet d'un article qui a été soumis au journal *Epidemiology and Infection*. Ceux de la technique Luminex ne font pas partie de cet article et seront indiqués à la suite de cet article.

Risk assessment of arbovirus transmission in African urban context by using immunological biomarker of human exposure to *Aedes aegypti* bites in Abidjan, Côte d'Ivoire

BI Zamblé Hubert ZAMBLE^{1,2}, Akré Maurice ADJA³, André Barembaye SAGNA², François Dipomin TRAORE², Stéphane Didier Mintokapieu KPAN^{2,3}, , Négnorogo GUINDO-COULIBALY^{2,3}, Mireille Affoué KOUADIO^{2,3}, Mardoché Rodolphe Konan AZONGNIBO^{2,4}, Danielle Dounin ZOH^{2,3}, Florence FOURNET¹, Françoise MATHIEU-DAUDE¹, Franck REMOUE¹

1 Title: **Heterogeneous human exposure to arbovirus vectors in African urban context by**
2 **using immuno-epidemiological biomarker of *Aedes aegypti* bites.**

3

4 Bi Zambélé Hubert ZAMBLE^{1,2*}, Akré Maurice ADJA³, André Barembaye SAGNA^{1,2},
5 François Dipomin TRAORE², Mintokapiou Didier Stéphane KPAN^{2,3}, Négnorogo GUINDO-
6 COULIBALY³, Affoué Mireille Nadia KOUADIO^{2,3}, Konan Rodolphe Mardoché
7 AZONGNIBO^{2,4}, Danielle Dounin ZOH^{2,3}, Anne POINSIGNON¹, Florence FOURNET¹,
8 Françoise MATHIEU-DAUDE^{1,5}, Franck REMOUE^{1*}

9

10 ¹ MIVEGEC, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

11 ² Institut Pierre Richet-Institut National de Santé Publique (IPR-INSP), Bouaké, Côte
12 d'Ivoire

13 ³ Unité de Formation et de Recherches Biosciences, University Félix Houphouët-Boigny,
14 Abidjan, Côte d'Ivoire

15 ⁴ Institut de Géographie Tropicale (IGT), Université Félix Houphouët-Boigny (UFHB),
16 Abidjan, Côte d'Ivoire

17 ⁵ Institut Louis Malardé, Tahiti, Polynésie française

18

19

20 ***Corresponding authors**

21 hubertbizamble.zamble@ird.fr

22 franck.remoue@ird.fr

23

24 Word count:

25 - Summary: 180

26 - All text: 3 885

27

28

1

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK

29 Summary

30 Uncontrolled urbanization led to a proper environment for *Aedes* mosquitoes spread in many
31 African cities. Here, we assessed human exposure to *Aedes* mosquito bites in the urban area of
32 Abidjan, Côte d'Ivoire by using antibody-based biomarkers. A cross-sectional study was
33 undertaken during the short rainy season in November 2015 in 3 different neighborhoods
34 (Bromakote, Anoumabo, and Petit-Bassam) presenting various socio-environmental and
35 entomological characteristics. The specific IgG responses to *Aedes* Nterm-34kDa salivary
36 peptide were assessed in children and analyzed according to neighborhoods and age classes.
37 The specific IgG level was significantly higher in Bromakote compared to Anoumabo and Petit-
38 Bassam. No significant difference in specific IgG level was observed according to age. We also
39 noticed an association between *Ae. aegypti* densities and some socio-environmental factors with
40 the level of specific IgG responses. This study indicated that exposure to *Aedes* vector
41 appeared dependent on neighborhoods in the same city which could be related to some socio-
42 environmental factors. Antibody-based biomarkers of human exposure to *Aedes* bites could be
43 a helpful tool for evaluating the heterogeneity of exposure to arbovirus vectors by national
44 control programs.

45 **Keys words:** Urbanization; biomarkers of exposure; *Aedes*, Africa

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55 Introduction

56 Emerging and re-emerging diseases such as arboviral infections, including dengue, yellow
57 fever, chikungunya, and Zika remain major health problems worldwide [1]. It is estimated that
58 2.5 billion people are at risk of dengue infection in the world. Around 200 000 people are
59 affected each year by yellow fever infection around the world [2]. *Aedes aegypti* and *Aedes*
60 *albopictus* mosquitoes are the major vectors of arboviruses and are worldwide spread,
61 especially in urban settings [3].

62 In Africa, 43 % of the population live in urban settings leading to the rapid and uncontrolled
63 urbanization of many African cities [4]. However, uncontrolled urbanization is often
64 accompanied by many issues [5]. This urbanization, wich growth with the extension of African
65 cities, creates breeding sites for the emergence of human-biting insects [6] including
66 mosquitoes. Among them, *Aedes aegypti* is largely collected during most of the entomological
67 surveys in urban areas in African cities [6, 7].

68 During the last decades, many epidemics of arboviral diseases occurred in the main cities of
69 some African countries, as obvserved in West Africa for example: in Senegal in 2009 and in
70 Ouagadougou, Burkina Faso in 2016 [8,9]. Abidjan isthe largest and the most populated city in
71 Cote d'Ivoire and represents one relevant exemple of expansion African megalopolis with
72 uncontrolled urbanization and associated arboviral emergence. Indeed, 192 cases during dengue
73 epidemic have been recorded in 2017, and casesof yellow fever transmission were also recorded
74 in the northern part of the country in 2011 [10,11].

75 No vaccine or medicines are available to control arboviral diseases, except for two efficient
76 vaccines against yellow fever and Japanese encephalitis. The most efficient way to control
77 mosquito-borne diseases remains prevention and vector population control. That involves
78 conventional methods such as personal protection, community mobilization and insecticide
79 treatments [12], innovative approaches such as sterile insect techniques [13] or biological
80 control of *Aedes* populations [14].

81 The evaluation of arbovirus transmission risk and vector control effectiveness is crucial.
82 Regarding *Aedes* vectors, *Stegomyia* indices such as House Index (HI), Container Index (CI),
83 and Breteau Index (BI) are calculated and used as indicators for the risk of arbovirus
84 transmission [15]. These parameters present several limitations because they represent only an
85 indirect extrapolation of the *Aedes* adults density in a study site and do not directly measure the
86 human-vector contact [16]. In addition, these entomological methods assess human exposure

87 to vector bites at the population level and do not take into account the heterogeneity of inter-
88 individual exposure.

89 Therefore, WHO underlines the need for the development of alternative indicators to accurately
90 evaluate the real and direct human exposure to *Ae. aegypti* mosquito bites and to estimate the
91 potential risk of *Aedes aegypti* borne pathogen transmission in an exposed population [1, 2].

92 During blood-feeding, concomitantly to blood intake, female mosquitoes inject saliva
93 containing a cocktail of biologically active proteins that counteract host homeostasis and
94 modulate the vertebrate immune response [17]. The injection of vector saliva can elicit a host
95 antibody (Ab) response against these salivary proteins [18, 19]. An interesting approach
96 exploits the immunological properties of mosquito saliva to identify immuno-epidemiological
97 biomarkers of human exposure to mosquito bites [20,21]. To avoid immune cross-reactivity
98 between arthropod and the limitations of whole saliva use, the identification of antigenic
99 salivary protein or peptide which are specific to vector species/genus have been several times
100 performed. Specific immunoglobulin G (IgG) antibody responses have been validated as a
101 serological biomarker of exposure to the main mosquito vectors such as *An. gambiae* (IgG
102 response to gSG6 or CE5 salivary proteins, or to the gSG6-P1 salivary peptide), the vector of
103 human malaria *Plasmodium* [22,23]. In the case of arboviral diseases, several studies have
104 indeed validated the IgG Ab response to only one *Aedes* salivary peptide (the *Ae. aegypti*
105 Nterm-34 kDa peptide) as a biomarker of human exposure to *Aedes* genus bites, and thus the
106 risk of arboviruses transmission and as the relevant tool to assess vector control strategies
107 [24,25, 26]. In a study in Vientiane city, Laos, the human IgG response against this salivary
108 peptide showed an inter-individual heterogeneity of exposure to *Ae. aegypti* bites in semi-urban
109 and urban settings-[27]. These results suggested also that the IgG responses can indicate areas
110 at risk of arboviral transmission [27]. In addition, another study indicated also that the human
111 IgG to this salivary peptide has been validated as a relative quantitative indicator to evaluate
112 the efficacy of vector control strategies [28].

113 This present study aimed to use the IgG responses to *Ae. aegypti* Nterm-34 kDa salivary peptide
114 to evaluate the heterogeneity of human exposure to the major arbovirus vectors, *Ae. aegypti* in
115 Abidjan city (Côte d'Ivoire).

116

117 **Methods**

118 ***Study sites***

119 The study was conducted in three urban settings of Abidjan city (Fig.1), the largest (57,735
120 hectares) and the most populated city (5 close to 5 inhabitants) in Côte d'Ivoire. Located in the
121 southern region and crossed by Ebrie lagoon, Abidjan city is characterized by a sub-equatorial
122 climate, hot and humid, which includes a large rainy season (May to July), a short rainy season
123 (September to November), and, intercalated, two dry seasons.. Rainfall in Abidjan is
124 abundantly with more than 1,500 mm of water per year. The temperature is around 27°C all
125 year round and the average annual humidity is over 80 %. During the short rainy season, in
126 which this study was conducted, the average temperature is 26°C and the average rainfall 123
127 mm [29].

128 Three municipalities (Adjame, Marcory, and Port-Bouët) were selected for sampling in this
129 study. In each municipality, one neighborhood was included in the study. In Adjame, the
130 Bromakote neighborhood was selected because of its considerable commercial activities, the
131 numerous individual exchange (transportation) between the different neighborhoods across
132 Abidjan and between African countries due to the location of the main bus station of the city.
133 This neighborhood also houses the railway station that connects Côte d'Ivoire to Burkina Faso
134 for people and goods. The choice of Anoumabo in Marcory municipality was based on its
135 precarious nature and, thus, its environment potentially favorable to the development of
136 mosquitoes. The choice of Petit-Bassam, in Port-Bouet municipality, has been done because
137 the autonomous port is located in this neighborhood, which results in significant traffic of goods
138 and potentially the introduction of vector species and pathogens. Besides, the presence of *Ae.*
139 *albopictus*, a major vector of arbovirus, and cases of dengue infections have already been
140 reported in this neighborhood [30].

141 In the objective to describe the socio-environmental characteristics of the neighborhoods in
142 relation to the risk of proliferation of arbovirus vectors, one hundred households were randomly
143 selected in each neighborhood. The Geographic Information System software version QGIS
144 2.14.4 was used to randomly select households. Information on house type, building materials
145 and social practices (water storage, domestic waste and wastewater management, type of toilets)
146 were collected in the three neighborhoods.

147

148 ***Study population***

5

149 This entire study was carried out on a population of 880 children aged from 6 months to 14
150 years old and enrolled in a cross-sectional study during the short rainy season (SRS) from
151 September to November 2015. The present immunological study was conducted on a sub-
152 sample of the initial cohort and consisted of 436 children (Table 1). For immunological assays,
153 blood samples were collected in November 2015 during the SRS, at the fingertips in microtainer
154 tubes (Sarsted, Marnay, France) and serum was obtained after centrifugation at 3,000 rpm for
155 10 min. Sera were fractionated into aliquots and then frozen at -20°C until used.

156 The Kruskal-Wallis test on children's age indicated a significant difference in the mean of
157 children's age between the studied neighborhoods ($p=0.0002$). Comparison two-by-two
158 (Dunn's test and adjusted with Bonferroni method) indicated firstly a significant difference in
159 the age mean between children from Bromakote and those living in Petit Bassam, and then
160 between those living in Anoumabo and Bromakote (p -adjusted=0.001 and p -adjusted=
161 0.0007 respectively).

162

163 ***Entomological data***

164 In the present study, three entomological methods were used according to the mosquito stage
165 as previously described [29]. The deeping method was conducted during larval prospection
166 while ovitraps (eggs were reared until the adult stage at insectarium) and sticky traps were used
167 for adult mosquitoes (*Aedes aegypti*) evaluation.

168 Using the random sampling tool of the Geographic Information System software version QGIS
169 2.14.4, 20 geographical points were generated within each of the three study sites, and one
170 ovitrap and one sticky trap were placed at each geographical point during the study period.
171 Twenty ovitraps and 20 sticky traps were used to collect *Aedes* eggs and *Ae. aegypti* adults
172 during the short rainy season (September to November 2015) and in each study sites. A total of
173 60 laying traps and 60 sticky traps were thus used to collect entomological data. Data in this
174 present study were collected during the SRS (November 2015).

175 *Ae. aegypti* larvae population was estimated through visiting 300 households (100 per
176 neighborhood as indicated above) and by identifying potential breeding containers in each
177 household. The collected larvae were reared in an insectarium and morphologically identified
178 after emergence. The *Stegomyia* indices have been estimated for the risk of arboviruses
179 transmission by *Ae. aegypti* according to WHO criteria: i) the House Index (HI) represents the
180 percentage of houses infested by *Ae. aegypti* larvae; ii) the Container Index (CI) is the

181 percentage of containers infested by *Ae.aegypti* larvae, and iii) the Bretau Index (BI) is the
182 number of positive breeding sites in 100 visited houses.

183 According to these *Stegomyia indices*, the WHO criteria indicate that: i) an area is considered
184 to be at high risk of transmission of dengue and chikungunya viruses by *Aedes aegypti* if HI or
185 BI or CI exceed 5, 20, and 3%, respectively, and ii) an area is considered to be at high risk of
186 favoring the transmission of Zika and yellow fever viruses by *Aedes aegypti* if HI or BI or CI
187 exceed 5, 4 and 3%, respectively [30].

188

189 *Aedes aegypti* Nterm-34 kDa salivary peptide

190 The Nterm-34 kDa salivary peptide from *Ae. aegypti* was synthesized and purified (> 95 %) by
191 Genpep SA (Saint Jean de Vedas, France). The peptide was shipped in lyophilized form and
192 then suspended in milliQ water and frozen at -20°C until use.

193

194 *Evaluation of human IgG level to Nterm-34 kDa salivary peptide*

195 IgG level to Nterm-34 kDa peptide was measured by Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
196 (ELISA) as previously described [24]. Briefly, MaxiSorp flat-bottom 96-well (Nunc, Roskilde,
197 Denmark) were coated with Nterm-34 kDa peptide at a final concentration of 20 µg/ml in
198 coating buffer (PBS) and incubated 150 min at 37°C. Plates were blocked with 200 µL of
199 protein-free Blocking Buffer (Thermo Scientific, Rockford, USA) and incubated for 60 min at
200 37°C. Individual sera were diluted in buffer (PBS-Tween 1%) and incubated at a final dilution
201 of 1/80. Monoclonal mouse biotinylated anti-human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA)
202 was added in at a 1/500 dilution (PBS-Tween 1%) and incubated for 90 min at 37°C.
203 Peroxidase-conjugated Streptavidin (GE Healthcare, Orsay, France) was then added (1/1000 in
204 PBS-Tween 1%) and incubated for 60 min at 37°C. Colorimetric development was carried out
205 with 2,2'-azino-bis ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium salt (sigma, Saint-Louis,
206 MO, USA) in 50 mM citrate buffer (pH = 4 containing 0.003% H₂O₂) and absorbance (optical
207 density [OD]) was measured at 405 nm (Multiskan GO Thermo Scientific). Each sample was
208 tested in duplicate wells containing Nterm-34 kDa and in a well without antigen (Nterm-30
209 kDa) to measure non-specific reactions. Individual results were expressed as the ΔOD value:
210 $\Delta OD = OD_x - OD_n$, where OD_x represents the mean of the individual OD value in both wells
211 with salivary antigen and OD_n the individual OD value in a blank well containing no antigen.

7

212

213 ***Data analysis***

214 Statistical analysis were done using Graph Pad Prism 5® software (San Diego, CA) and R
215 (Version 3.5.3, R Core Team, Vienna, Austria). After checking that the data did not follow a
216 Gaussian distribution (normal distribution), the non-parametric Mann-Whitney test was used to
217 compare the Ab levels between two independent groups and the non-parametric Kruskal-Wallis
218 test was used to compare the Ab levels between more than two groups. The Dunn's post-hoc
219 test was also performed for two by two comparisons in more than three groups, then the
220 difference was adjusted with the Bonferroni method. The prop.test was used to compare
221 proportions between two or more two groups. The chi-square test was used to compare the HI
222 and CI between study sites.

223 All differences were considered significant for $p < 0.005$.

224

225

226 **Results**

227 *Specific IgG level against Nterm-34 kDa salivary peptide according to neighborhoods*

228 IgG levels to Nterm-34 kDa salivary peptide were compared between the three studied
229 neighborhoods in the 436 sub-sample of children population (Table 1, Fig. 2). First, an high
230 inter-individual heterogeneity of specific IgG responses (Δ OD ranging from 0 to 1.2) was
231 observed within each neighborhood. Secondly, the median level of specific IgG responses
232 varied significantly between neighborhoods ($p \leq 0.001$). These Ab levels were significantly
233 higher in children from Bromakote than those from Anoumabo and Petit-Bassam ($p < 0.001$).
234 No significant difference in specific IgG levels was observed between Anoumabo and Petit-
235 Bassam ($p = 0.102$).

236

237 *IgG level against Nterm-34 kDa salivary peptide according to age groups*

238 The median level of IgG responses was compared between the three pre-defined age groups
239 ([1-5], [6-10], and [11-14] years old) within each neighborhood (Fig 3A, Fig 3B and Fig 3C).
240 There is no significant difference in specific IgG responses according to the age group whatever
241 the neighborhood ($p > 0.05$). However, highly significant variation in the specific IgG level was
242 observed between the three study sites in children aged [1-5] and [6-10] years-old ($p < 0.001$,
243 Table 1). Indeed, as observed for the whole studied population, the specific IgG responses were
244 higher in Bromakote compared to the two other neighborhoods in these youngest age groups.
245 In contrast, no significant differences of specific IgG level were observed between the three
246 neighborhoods in the [11-14] age group.

247

248 *Socio-environmental characteristics of study neighborhoods*

249 Environmental factors and sociological behaviors/practices , (housing type, construction
250 materials, water storage, domestic waste and waste water management) that could potentially
251 be associated with human exposure to *Aedes* vector were analyzed according to the three
252 neighborhoods. A total of 55, 87, and 98 houses in Anoumabo, Bromakote, and Petit-Bassam,
253 respectively, were randomly selected and visited allowing to identify common and divergent
254 factors between the three neighborhoods (Table 2).

255 There was no clear difference in the housing type between the three neighborhoods, except for
256 the presence of apartments. Indeed, the proportion of apartments was significantly higher in
257 Bromakote compared to other sites (12.36 %; $p=0.01$). Most of the houses were built with
258 cement but not significant difference in the construction materials was observed between the
259 three sites.

260 Regarding the water storage factor, the large majority of containers was uncovered in each
261 neighborhoods (>75 %). Nevertheless, significant difference was observed in the proportion of
262 uncovered water storage containers between neighborhoods ($p=0.001$) and also in the
263 proportion of covered water storage ($p=0.02$).

264 Concerning domestic waste management, a higher proportion of inhabitants at Bromakote
265 declared that it waste was collected by private companies (55.17 %; $p=0.005$). In contrast,
266 domestic waste was mostly dropped off near the house in Petit-Bassam (61.22 %; $p<0.001$).

267 Fifty-five (55) inhabitants in Anoumabo, 80 in Bromakote, and 98 in Petit-Bassam gave
268 responses about wastewater management. Among them, a higher proportion of inhabitants at
269 Bromakote (61.8 %) discharged wastewater into a septic pit compared to other neighborhoods
270 ($p<0.001$). Channels were also used for discharging wastewater by 19.54 %, ($p=0.006$). Some
271 inhabitants used both septic pit or abandoned wells with a higher proportion in Anoumabo
272 (16.36 %; $p<0.001$).

273 Most of the people from the three neighborhoods used the water storage for cooking or drinking
274 and the comparison to use containers for water store was not statistically significant between
275 neighborhoods ($p=0.262$, data not shown). In addition, most people used latrine as a type of
276 toilet, and a very low number of modern toilets was recorded in the three neighborhoods.

277 Altogether, the results indicated that some sociological practices such as wastewater and waste
278 management, water storage and housing type appeared differently represented between the
279 three neighborhoods.

280

281 ***Entomological risk according to neighborhoods***

282 Only three species of mosquitoes were collected during the short rainy season in the three
283 neighborhoods and only *Ae. aegypti* species was collected within *Aedes* genus (Table 3). In the
284 present study, three entomological methods were used according to the mosquito stage. The

deeping method was conducted during larval prospection while ovitraps (after reared) and sticky traps were used for the assessment of adult mosquito level.

The comparison of results using the ovitraps showed a significant difference in the *Ae. aegypti* proportion between the three neighborhoods ($p < 0.001$), with the highest proportion observed in Petit-Bassam. In contrast, with sticky traps, a significantly higher proportion of adult mosquitoes was observed in Bromakote (68.38 % compared to the two other sites, $p < 0.001$). In visited houses, 1083 potential breeding sites were counted (435 in Anoumabo, 361 in Bromakote, and 287 in Petit-Bassam). The proportions of breeding sites was significantly higher in Petit-Bassam compared to the two other neighborhoods ($p < 0.001$). The type of positive breeding sites was different according to the neighborhoods with a higher proportion of water storage containers in Anoumabo, and of abandoned containers in Bromakote, and of tires in Petit-Bassam.

Finally, the major *Stegomyia* indices were calculated. The HI and BI parameters appeared higher in Anoumabo but the difference was not significant between the three sites. The WHO risk scale was thus calculated and 5-7, 5-6, and 4-6 scores were obtained in Anoumabo, Bromakote and Petit-Bassam, respectively. It suggested a similar risk between neighborhoods even if a slight higher risk was noticed in Anoumabo as observed for BI.

304 Discussion

305 In the present study, the quantitative and specific IgG responses against the *Aedes aegypti*
306 Nterm-34 kDa salivary peptide were used to evaluate exposure to *Aedes aegypti* bites in
307 children from three neighborhoods of Abidjan city, and therefore to assess the potential
308 different risk of arboviral disease spread between these sites.

309 First, the immunological data showed heterogeneity of IgG response to the *Aedes aegypti*
310 Nterm-34 kDa salivary peptide between individuals within each studied neighborhood and each
311 age group. This suggests that children are differently exposed to *Ae. aegypti* bites whatever the
312 studied neighborhood and their age. This heterogeneous exposure could be particularly
313 observed for *Aedes* mosquitoes in an urban context where the breeding sites are numerous but
314 various according to the sites [24,25]. In addition, several individual factors or household
315 characteristics could explain such results. The use of personal protection or personal
316 attractiveness could influence the contact between children and *Aedes* mosquitoes.

317 Secondly, the major result of the present study is the significant differences of IgG levels to
318 *Aedes aegypti* Nterm-34 kDa salivary peptide observed between neighborhoods within the same
319 city. The impacts of some social practices or environmental factors such as the type of water
320 storage containers, may explain these differences in *Aedes* exposure [26]. In addition, some
321 entomological parameters used in the present study could be associated with the level of IgG
322 levels according to neighborhoods: i) adult *Aedes* caught by the sticky traps, ii) breeding site
323 type, and especially iii) the abandoned water storage containers. As only observed for these 3
324 entomological parameters, the specific IgG level was significantly higher in Bromakote
325 compared to other neighborhoods. The immunological results suggest that children in
326 Bromakote were significantly more exposed to *Ae. aegypti* bites than those living in Anoumabo
327 and Petit-Bassam. Interestingly, some entomological indicators seemed to be linked to the
328 human exposure evaluated by specific IgG levels whereas others were not associated. This
329 discrepancy could be explained also by some entomological indicators/methods and one
330 hypothesis is that some entomological parameters could not be pertinent and thus applied to the
331 African urban context [32].

332 Third, we compared some environmental (waste management, water storage) and social
333 practices (household type and construction materials) factors between studied neighborhoods
334 in the objective to define which factors could explain the site-dependent level of *Aedes* exposure
335 measured by the biomarker of exposure. Indeed, *Ae. aegypti* mosquitoes are known to exploit
336 any kind of abandoned containers susceptible to contain water and favoring eggs laying [33,34].

337 In the present study, abandoned containers and tires appeared to be the major positive breeding
338 sites. In addition, Bromakote's inhabitants mostly testified to pour wastewater in septic pits and
339 channels. The active and permanent circulation of the dengue virus in west Africa is sustained
340 by its major vector which finds constantly adequate breeding conditions for its development as
341 reported in Ouagadougou, Burkina Faso [35].

342 The proportion of children living in an apartment was higher in Bromakote compared to other
343 studied neighborhoods. Even if the number of apartments was low in the present study, one
344 hypothesis is that this type of housing may increase the *Aedes* exposure, as previously suggested
345 [37]. Indeed, presence of potential breeding sites in the apartments and/or associated with the
346 higher concentration of human population could be major in this kind of housing compared to
347 individual households [33-37]. Nevertheless, further studies are needed to support this
348 hypothesis.

349 Altogether, the present study highlights that the IgG level against *Ae. aegypti* Nterm-34 kDa
350 salivary peptide could represent a relevant tool in the African urban context. It can be used to
351 identify the neighborhoods at risk of exposure to *Ae.aegypti* bites, and therefore the risk of
352 arbovirus transmission, as previously reported [25,26,27]. Nevertheless, the present study
353 presents some limitations. Indeed, socio-environmental data were not collected in the household
354 of the sampled children. It could help to mix these variables into a statistical model for better
355 appreciating the impacts of these variables on the IgG level against *Aedes aegypti* Nterm-34
356 kDa salivary peptide expressed in each child.

357 The IgG level against *Aedes aegypti* Nterm-34 kDa salivary peptide was also analyzed
358 according to 3 age groups ([1-5], [6-10], and [11-14] years old) and results showed
359 heterogeneity of IgG levels responses within each age group. Children appeared therefore
360 differently exposed to *Ae. aegypti* bites within each group and the youngest were differently
361 exposed to *Aedes* between the studied neighborhoods. Indeed, some of them because of their
362 young age (1 to 5 years old) stay at home, and could be exposed to the *Aedes* mosquito which
363 breeds in the abandoned containers in the compound and have daily betting activities [25].
364 Those attending school and aged between 6 to 14 years could be also bitten by *Ae.aegypti* in
365 the schoolyard or the classroom. Similar information was reported in a study undertaken in a
366 Brazilian school [38] Nevertheless, specific IgG responses were higher in Bromakote compared
367 to other studies sites, only in children of [1-5] and [6-10] year's age groups. It suggests that the
368 younger children (<10 years old) could represent an adequate target population to identify the
369 heterogeneity of human exposure to *Aedes* bites in an urban situation.. These results indicated

370 clearly that children, whatever their age, were at risk of arboviral virus transmission even if it
371 is not possible to determine which age group is most at risk as has been shown previously
372 [25,26,27].

373 In conclusion, this study highlighted that the IgG level against *Ae. aegypti* Nterm-34 kDa
374 salivary peptide represents an adequate tool to evaluate the heterogeneity of exposure to *Ae.*
375 *aegypti* bites at individual and population levels in the African urban context. It could also
376 represent an alternative way to obtain new criteria for measuring the efficacy of the specific
377 vector control strategies used in urban settings and to allow a relevant monitoring of the
378 strategies developed by public health authorities in African contexts.

379

380

For Review Only

381 ***Ethics statement***

382 The present study followed the ethical principles recommended by the Edinburgh revision of
383 the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Ethics Committee of Côte
384 d'Ivoire, Ministry of Health (June 2014; N° 41/MSLS/CNER-dkn). Written informed consent
385 of all the parents or legal guardians of children who participated in this study was obtained
386 before inclusion.

387

388

389 ***Acknowledgments***

390 We gratefully acknowledge the populations of Anoumabo, Bromakote, and Petit-Bassam,
391 especially householders and guardians of children, for their kind support and collaboration.

392

393

394 ***Financial support***

395 This research was integrated into the ARBORISK multidisciplinary study funded through the
396 C2D programm(Contrat de Désendettement et de Développement; 2013). BZH Zamble was
397 supported by a PhD fellowship provided by the Méditerranée Infection Foundation. DD Zoh
398 was supported by a fellowship from the IRD.

399

400 ***Conflict of interest:*** None

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413 **References**

414

- 415 1. **Gubler DJ.** (2010) The Global Threat of Emergent/Re-emergent Vector-Borne Diseases.
416 *Vector Biol Ecol Control* 39–62.
- 417 2. **World Health Organizations.** (2014) A global brief on vector-borne diseases. Available
418 from: www.who.int/world-health-day
- 419 3. **Vega-Rúa A et al.** (2014) High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes*
420 *albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of
421 Chikungunya Virus. *Journal of Virology*. **88**, 6294–306.
- 422 4. **United Nations** (2018) Department of Economic and Social Affairs, Population Division.
423 The speed of urbanization around the world. **2018/1:1–2**.
- 424 5. **Uttara S et al.** (2012) Impacts of urbanization on environment. *Applied Science* **2**,10.
- 425 6. **Li Y et al.** (2014) Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and
426 Accelerates Mosquito Development and Survivorship. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**,
427 PMC4230920
- 428 7. **Fofana D et al.** (2019) Risk of Dengue Transmission in Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire).
429 *Journal of Parasitological Research*. PMC6348904.
- 430 8. **Faye O et al** (2014) Urban Epidemic of Dengue Virus Serotype 3 Infection, Senegal,
431 2009. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 456–9.
- 432 9. **WHO** (2016) Dengue Fever – Burkina Faso. World Health Organization. Available from:
433 <http://www.who.int/csr/don/18-november--dengue-burkina-faso/en/>
- 434 10. **WHO** (2017) Dengue fever – Côte d'Ivoire. World Health Organization. Available from:
435 <http://www.who.int/csr/don/04-august-2017-dengue-cote-d-ivoire/en/>
- 436 11. **WHO** (2011) Yellow fever in Côte d'Ivoire. WHO. World Health Organization Available
437 from: https://www.who.int/csr/don/2011_01_25/en/
- 438 12. **Andersson N et al** (2015) Evidence-based community mobilization for dengue prevention
439 in Nicaragua and Mexico (Camino Verde, the Green Way): cluster randomized controlled
440 trial. *British Medical Journal* **351**, 3267.
- 441 13. **Tur Cet al.** (2021) Sterile Insect Technique in an Integrated Vector Management Program
442 against Tiger Mosquito *Aedes albopictus* in the Valencia Region (Spain): Operating
443 Procedures and Quality Control Parameters. *Insects* **12**.
- 444 14. **Huang Y-JS et al.** (2017). Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of
445 Arboviruses. *Insects* **8**.

- 446 15. **Bowman LR et al.** (2014) Assessing the Relationship between Vector Indices and Dengue
447 Transmission: A Systematic Review of the Evidence. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**.
- 448 16. **Boyer S et al.** (2014) Spatial and Temporal Heterogeneities of *Aedes albopictus* Density
449 in La Reunion Island: Rise and Weakness of Entomological Indices. *PLoS ONE* **9**.
- 450 17. **Ribeiro JMC et al.** (2003) Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-
451 Sialome Perspectives. *Annu Rev Entomol.* **48**, 73–88.
- 452 18. **Doucoure S et al.** (2015) Biomarkers of Vector Bites: Arthropod Immunogenic Salivary
453 Proteins in Vector-Borne Diseases Control. In: Preedy VR, Patel VB, editors. *General*
454 *Methods in Biomarker Research and their Applications.* p. 1177–205.
- 455 19. **Drame PM et al.** (2010) Human Antibody Response to *Anopheles gambiae* Saliva: An
456 Immuno-Epidemiological Biomarker to Evaluate the Efficacy of Insecticide-Treated Nets
457 in Malaria Vector Control. *Am J Trop Med Hyg.* **83**, 115–21.
- 458 20. **Fontaine A et al.** (2011) Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in
459 host-vector interactions. *Parasite and Vectors* **4**:187.
- 460 21. **Doucoure S et al.** (2012) Evaluation of the Human IgG Antibody Response to *Aedes*
461 *albopictus* Saliva as a New Specific Biomarker of Exposure to Vector Bites. *PLoS Negl*
462 *Trop Dis.* **6(2)**.
- 463 22. **Poinsignon A et al.** (2008) Novel Peptide Marker Corresponding to Salivary Protein
464 gSG6 Potentially Identifies Exposure to *Anopheles* Bites. *PLoS ONE* **3(6)**.
- 465 23. **Rizzo C et al.** (2014) Differential antibody response to the *Anopheles gambiae* gSG6 and
466 cE5 salivary proteins in individuals naturally exposed to bites of malaria vectors. *Parasite*
467 *and Vectors.* **7**.
- 468 24. **Elanga Ndille E et al.** (2012) First Attempt To Validate Human IgG Antibody Response
469 to Nterm-34kDa Salivary Peptide as Biomarker for Evaluating Exposure to *Aedes aegypti*
470 Bites. *PLoS Negl Trop Dis.* **6(11)**.
- 471 25. **Sagna AB et al.** (2019) Spatial Assessment of Contact Between Humans and Anopheles
472 and Aedes Mosquitoes in a Medium-Sized African Urban Setting, Using Salivary
473 Antibody-Based Biomarkers. *The Journal of Infectious Diseases* **220**:1199–208
- 474 26. **Sagna AB et al.** (2018) New Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to
475 *Aedes* Vector Bites: From Concept to Applications. *Trop Med Infect Dis.* **3(3)**.
- 476 27. **Ndille EE et al.** (2014) Human IgG antibody response to *Aedes aegypti* Nterm-34 kDa
477 salivary peptide as an indicator to identify areas at high risk for dengue transmission: a
478 retrospective study in urban settings of Vientiane city, Lao PDR. *Trop Med Int Health.* **19**,
479 576–80.

- 480 28. **Elanga Ndille E et al.** (2016) Human IgG Antibody Response to *Aedes* Nterm-34kDa
481 Salivary Peptide, an Epidemiological Tool to Assess Vector Control in Chikungunya and
482 Dengue Transmission Area. *PLoS Negl Trop Dis.* **10(12)**.
- 483 29. **Kpan MDS et al.** (2021) Spatial Heterogeneity and Seasonal Distribution of *Aedes*
484 (*Stegomyia*) *aegypti* (L) in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **21**,
485 769-776.
- 486 30. **Konan YL et al.** (2013) Species composition and population dynamics of *Aedes*
487 mosquitoes, potential vectors of arboviruses, at the container terminal of the autonomous
488 port of Abidjan, Côte d'Ivoire. *Parasite* doi: 10.1051/parasite/2013013
- 489 31. **WHO** (2016) Entomological surveillance for *Aedes* spp. in the context of Zika virus:
490 interim guidance for entomologists.:(Who/Zikv/Vc/16.2): **10 p**.
- 491 32. **Nascimento KLC et al.** (2020) Comparison Between Larval Survey Index and Positive
492 Ovitrap Index in the Evaluation of Populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus,
493 1762) North of Paraná, Brazil. *Environ Health Insights* **14**.
- 494 33. **Chareonviriyaphap T et al** (2003) Larval habitats and distribution patterns of *Aedes*
495 *aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse), in Thailand. *Southeast Asian J Trop*
496 *Med Public Health* **34**, 529–35.
- 497 34. **Hiscox A, et al.** (2013) Risk Factors for the Presence of *Aedes aegypti* and *Aedes*
498 *albopictus* in Domestic Water-Holding Containers in Areas Impacted by the Nam Theun
499 2 Hydroelectric Project, Laos. *Am J Trop Med Hyg.* **88**, 1070–8.
- 500 35. **Fournet F et al.** (2016) The Influence of Urbanization Modes on the Spatial Circulation
501 of Flaviviruses within Ouagadougou (Burkina Faso). *Int J Environ Res Public Health.* **13**.
- 502 36. **Tauxe GM et al.** (2013) Targeting a dual detector of skin and CO2 to modify mosquito
503 host-seeking. *Cell.* **155**,1365–79.
- 504 37. **Poinsignon A et al.** (2019) Risk factors of exposure to *Aedes albopictus* bites in mainland
505 France using an immunological biomarker. *Epidemiol Infect.***147**.
- 506 38. **García-Rejón JE et al.** (2011) Mosquito Infestation and Dengue Virus Infection in *Aedes*
507 *aegypti* Females in Schools in Mérida, México. *Am J Trop Med Hyg.* **84**, 489–96.
- 508
- 509

510 **Figure legends**

511

512 **Fig 1. Map of the study areas in the city of Abidjan, Côte d'Ivoire.**

513 The different study sites (Bromakote, Anoumabo, Petit-Bassam) are indicated by the red stars.

514

515 **Fig 2. IgG responses to *Aedes aegypti* Nterm- 34 kDa salivary protein in the study sites.**

516 Each dot represents an individual IgG responses (ΔOD) against the *Ae. aegypti* Nterm-34 kDa

517 salivary peptide and the horizontal bar indicates the median value of specific IgG levels for the

518 site under study. The number of processed sera is indicated below (n).

519

520 **Fig 3. IgG responses to *Aedes aegypti* the Nterm- 34 kDa salivary protein according to age**
521 **classes.**

522 Each dot represents the individual IgG responses (ΔOD) against the *Ae. aegypti* Nterm-34 kDa

523 salivary peptide and the horizontal bar indicates the median value of specific IgG levels for

524 each age group; A: [1-5], B: [6-10] and C: [11-14] years old. The number of processed sera is

525 indicated below (n).

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

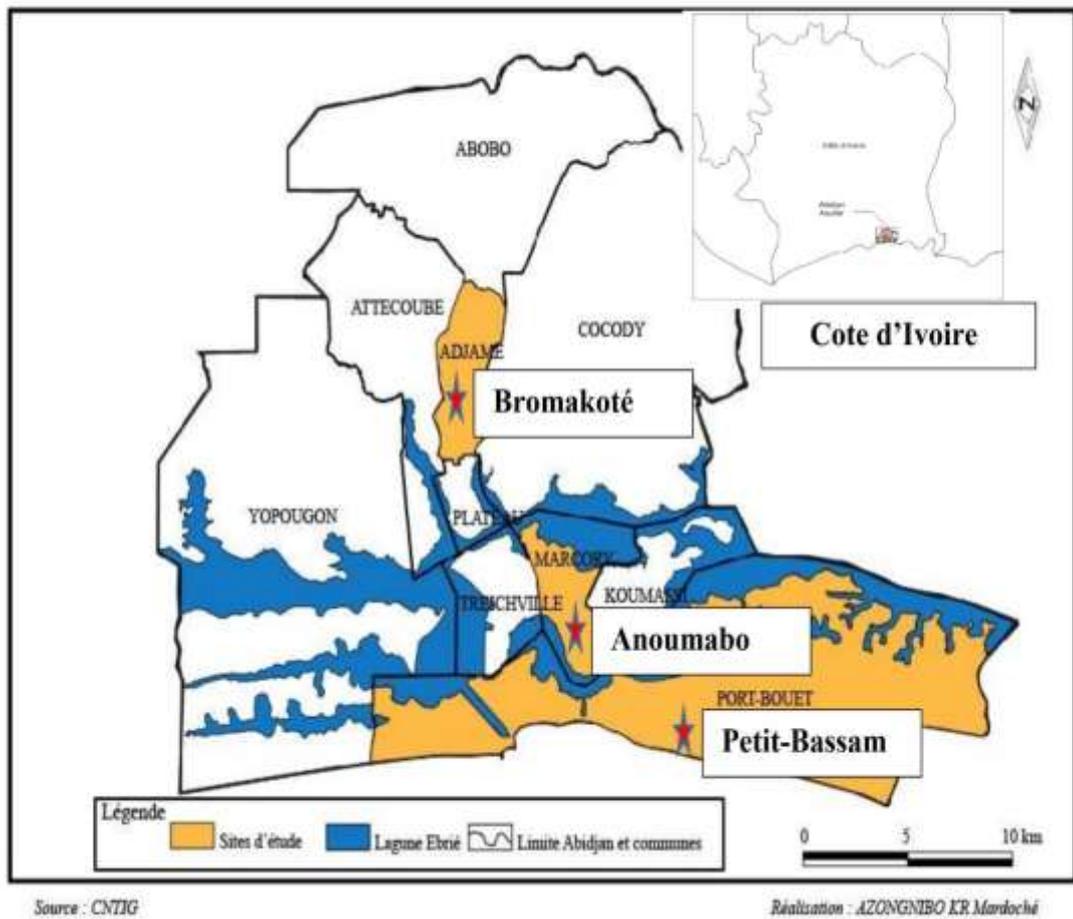


Figure 1 : Map of the study areas in the city of Abidjan, Côte d'Ivoire. *The different study sites (Anoumabo, Bromakote et Petit-Bassam) are indicated by red stars*

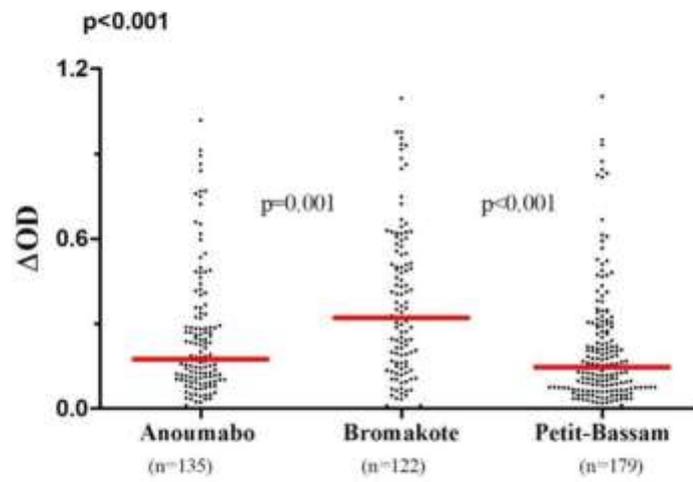


Figure 2: IgG responses to *Aedes aegypti* Nterm- 34 kDa salivary protein in the study sites.

125x82mm (300 x 300 DPI)

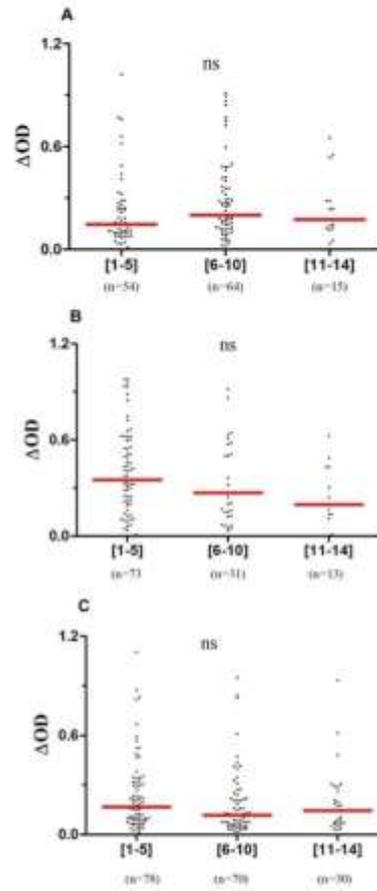


Figure 3: IgG responses to *Aedes aegypti* the Nterm- 34 kDa salivary protein according to age classes.

190x254mm (96 x 96 DPI)

Table 1: Population characteristics and anti-Nterm-34 kDa IgG median level in the study sites

	Neighborhoods			Total	p-value
	Anoumabo	Bromakote	Petit Bassam		
Demographic data					
n (%)	135 (30.96)	122 (27.98)	179 (41.06)	436	
Age mean (CI _{95%})	6.90 (5.95-7.06)	4.98 (4.33-5.64)	5.90 (6.43-6.96)	6.05 (5.72-6.40)	<0.001
Age groups [years] (%)					
[1-5]	54 (40.00)	73 (62.40)	78 (43.82)		
[6-10]	66 (48.89)	31 (26.50)	70 (39.33)		NS
[11-14]	15 (11.11)	13 (11.10)	30 (16.85)		
Gender ratio (Male/Female)	0.82 (61/74)	0.92 (56/61)	0.69 (73/105)	0.80 (190/240)	0.016
Anti-Nterm-34 kDa IgG median level (CI95%)	0.174 [0.118-0.271]	0.321 [0.261-0.378]	0.138 [0.106-0.173]		0.001
Anti-Nterm-34 kDa IgG median level by age group (CI95%)					
[1-5]	0.15 [0.16-0.34]	0.35 [0.35-0.46]	0.17 [0.19-0.28]	0.21 [0.27-0.33]	<0.001
[6-10]	0.20 [0.22-0.34]	0.26 [0.25-0.54]	0.12 [0.14-0.26]	0.16 [0.22-0.31]	<0.001
[11-14]	0.17 [0.14-0.35]	0.20 [0.14-0.37]	0.15 [0.12-0.26]	0.16 [0.17-0.27]	NS

NS: Not Significant between the 3 neighborhoods

Table 2 : Characteristics of the study sites

	Neighborhoods			p-value
	Anomaba	Bromakoto	Petit Bassam	
Neighborhood characteristics n (%)				
House type	n.a= 55	n.a= 87	n.a= 98	
Common house	47 (85.45)	74 (83.15)	89 (90.82)	NS
Apartment	03 (05.45)	11 (12.36)	02 (02.04)	0.01
Single apartment	01 (01.82)	0	01 (01.02)	NS
Individual house	04 (07.27)	02 (02.25)	06 (06.12)	NS
Construction materials	n.a= 43	n.a=89	n.a= 80	
Cement	38 (89.09)	83 (93.26)	72 (73.47)	NS
Wood	04 (09.27)	05(05.62)	08 (08.16)	NS
Improved loam	02 (03.64)	01 (01.12)	0	NS
Banco (simple and improved)	01 (01.82)	0	0	NS
Water storage containers	n.a = 48	n.a=74	n.a= 75	
Uncovered containers	40 (83.33)	58 (78.38)	57 (76.00)	0.001
Covered containers	01 (02.08)	01(01.35)	10 (13.33)	0.02
Both covered and uncovered containers	07 (14.59)	15 (20.27)	08 (10.67)	NS
Waste management	n.a = 50	n.a= 87	n.a=97	
Collected by companies	17 (34.00)	48 (55.17)	24 (24.74)	0.005
Dropped off near the house	09 (18.00)	04 (04.60)	60 (61.86)	<0.001
Burned near the house	01 (2.00)	0	01 (01.03)	NS
Collected or dropped off near the house	23 (73.00)	55 (40.23)	12 (12.37)	<0.001

	Neighborhoods			p-value
	Anomabo	Bromakoto	Petè Basam	
Wastewater management	n.a = 55	n.a = 87	n.a = 98	
Septic pits	21 (38.18)	55 (63.22)	16 (16.33)	<0.001
Sewage channels	05 (09.09)	17 (19.54)	04 (04.08)	0.0001
Septic pits or abandoned wells	09 (16.36)	07 (8.05)	02 (02.04)	0.006
Pour in the street	19 (34.55)	05 (05.75)	71 (72.45)	<0.001
Septic pits or pots in the street	01 (01.82)	02 (02.30)	05 (05.10)	NS
Sewage channels or abandoned wells	0	01(01.15)	0	NS
			0	
Toilet type	n.a = 55	n.a = 89	n.a = 94	
Modern toilet	11 (20.00)	13 (16.85)	28 (28.57)	0.097
Latrine	43 (78.18)	72 (80.9)	66 (67.35)	NS
Modern toilet and latrine	01 (01.82)	02 (02.25)	0	NS

n.a: number of answers

NS : Not Significant between the 3 neighborhoods

	Neighborhoods			<i>p</i> -value
	Anzomabo	Bromakote	Petit Bassam	
Wastewater management	n.a = 55	n.a = 87	n.a = 98	
Septic pits	21 (38.18)	55 (63.22)	16 (16.33)	<0.001
Sewage channels	05 (09.09)	17 (19.54)	04 (04.08)	0.9001
Septic pits or abandoned wells	09 (16.36)	07 (08.05)	02 (02.04)	0.006
Pour in the street	19 (34.55)	05 (05.75)	71 (72.45)	<0.001
Septic pits or pour in the street	01 (01.82)	02 (02.30)	05 (05.10)	NS
Sewage channels or abandoned wells	0	01(01.15)	0	NS
			0	
Toilet type	n.a = 55	n.a = 89	n.a = 94	
Modern toilet	11 (20.00)	15 (16.85)	28 (28.57)	0.097
Latrine	43 (78.18)	72 (80.9)	66 (67.35)	NS
Modern toilet and latrine	01 (01.82)	02 (02.25)	0	NS

n.a: number of answers

NS : Not Significant between the 3 neighborhoods

Table 3 : Entomological data in the study sites

Entomological methods	Species	Neighborhoods			p-value
		Anomabo	Bromakote	Petit-Bassam	
		n	n	n	
Larval survey	<i>Ae. aegypti</i>	436	48	192	
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	26	0	1	
	<i>Cx. nigripes</i>	0	0	1	
Adults survey n (%)					
Ovitrap	<i>Ae. aegypti</i>	68 (25.28)	61 (22.68)	140 (52.04)	<0.001
Sticky traps	<i>Ae. aegypti</i>	21 (07.72)	186 (68.38)	65 (23.90)	<0.001
Breeding site types n (%)					
Visited houses		100	100	100	
Potential breeding site		435 (40.17)	361 (33.33)	287 (26.50)	<0.001
Positive breeding sites		78 (17.93)	57 (15.80)	62 (21.60)	NS
Positive breeding site types :					
Water containers ^a		27 (34.61)	14 (24.56)	10 (16.13)	NS
Abandoned containers ^b		12 (15.38)	14 (24.56)	8 (12.90)	0.044
Tires		23 (29.50)	20 (35.09)	30 (48.39)	NS
Other containers ^c		16 (20.51)	9 (15.79)	14 (22.58)	0.066
<i>Ae. aegypti</i> Stegomyia Indices					
House Index		45%	39%	28%	NS
Container Index		17.93%	15.80%	21.60%	0.042
Breteau Index		78	57	62	
WHO risk scale		[5-7]	[5-6]	[4-6]	

^a (barrel, basin, pan, cooler, jar, bucket);^b(all abandoned water storage containers, others abandoned containers for domestic use, wastes of civilization);^c (flower pots, wells, water troughs, gutters, tarpaulins, septic tank).

NS : Not Significant between the 3 neighborhoods

b) Etude rétrospective de la circulation des arbovirus dans les trois quartiers d'étude

Cette étude rétrospective a été réalisée grâce à la technique la technique immunologique LUMINEX. Fondée sur le principe de la cytométrie en flux, la Technologie Luminex™ allie l'utilisation de microsphères fluorescentes et une détection laser. Ces microsphères (ou billes) de couleurs différentes peuvent être couplées individuellement à leur surface avec des sondes oligonucléotidiques, des peptides ou des anticorps, permettant ainsi la détection d'allèles, d'anticorps ou de peptides. Cette technique peut donc permettre la détection simultanée d'anticorps (Ac) spécifiques dirigés contre différents arbovirus dans un liquide biologique, en l'occurrence le sérum dans notre étude.

Nous avons ainsi recherché dans les sérums des cohortes d'enfants d'Anoumabo, Bromakoté et Petit-Bassam, la présence d'Ac IgG dirigés contre des antigènes (protéines structurales et non structurales) de 9 arbovirus : CHIKV (E2), O'nyong-nyong (E2), ZIKV (NS1), DENV sérotypes 1 à 4 (DENV1 NS1 à DENV4 NS1), USUV (NS1) et WNV (2 antigènes testés pour ce virus, NS1 et E DIII).

Des IgG spécifiques à 6 arbovirus ont ainsi été détectés dans nos sérums : O'nyong-nyong, ZIKV et DENV 1 à 4. Les pourcentages d'enfants positifs pour chacun de ces arbovirus sont présentés (**Figure 22**). Le DENV 3 présente le plus fort pourcentage (10,6 %) suivi du virus du Zika avec 6,3 % de la totalité des enfants testés.

En comparant le pourcentage des enfants infectés par les arbovirus en fonction des quartiers (**Figure 23**), une différence significative est observée ($p=0,015$). Ces proportions d'enfants infectés apparaissent statistiquement similaires entre les quartiers de Bromakoté et de PetitBassam ($p=0,54$), mais ces proportions sont significativement supérieures à celles du quartier d'Anoumabo.

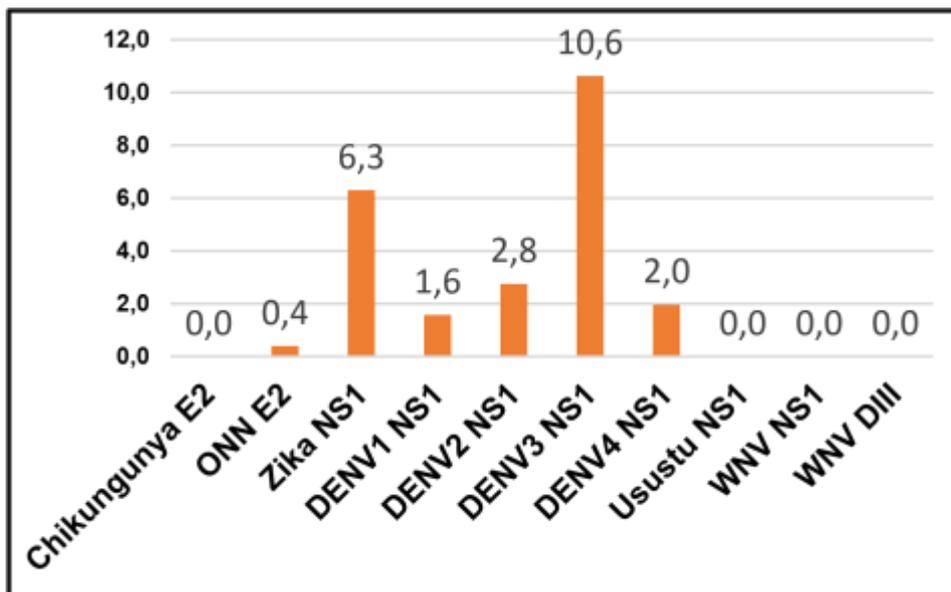


Figure 22: Pourcentage des différents arbovirus détectés dans les 3 quartiers d'Abidjan, Côte d'Ivoire

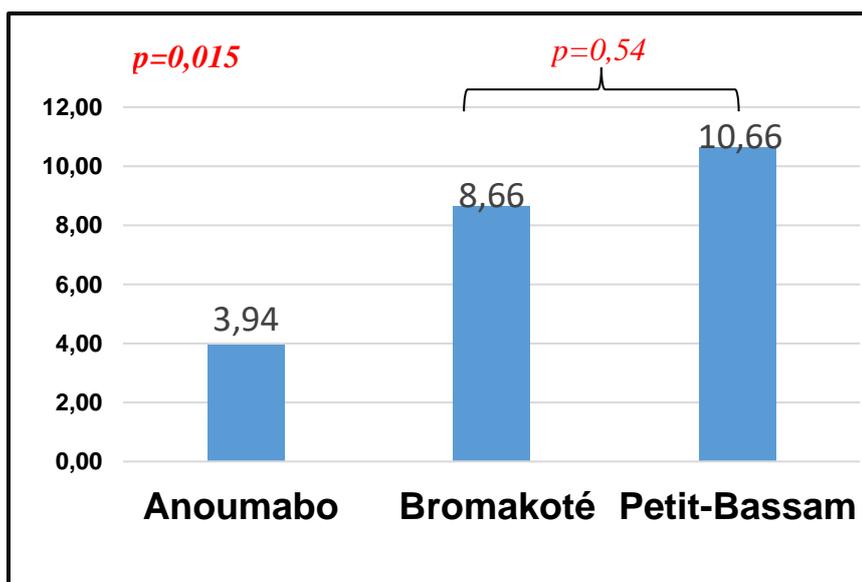


Figure 23: Pourcentage des enfants positifs aux arbovirus au sein de chacun des 3 quartiers d'Abidjan, Côte d'Ivoire

Principaux résultats

Hypothèse : 1) La réponse IgG dirigée contre l'antigène salivaire Nterm-34 kDa d'*Aedes aegypti* représente un indicateur d'exposition des enfants aux piqûres de *Aedes aegypti* en milieu urbain africain.

2) Les arbovirus circulent dans les quartiers de la ville d'Abidjan

Résultats : 1) Les réponses IgG anti-Nterm-34 kDa étaient significativement différentes entre les quartiers d'étude ($p=0,001$), avec un fort niveau d'IgG spécifique dans le quartier de Bromakoté par rapport aux quartiers d'Anoumabo et de Petit-Bassam ($p=0,001$ et $p<0,001$ respectivement)

2) Aucune différence significative de réponses IgG anti-peptide salivaire n'a été notée entre les classes d'âges des enfants ([1-5], [6-10] et [11-14] ans).

3) Les différentes techniques et indices entomologiques, utilisés pour évaluer l'hétérogénéité d'exposition aux *Aedes* entre quartiers, ont donné des résultats mitigés. Pendant que les indices maison (45%), les indices larvaires (64,49%) et de Breteau (78) indiquaient que les enfants du quartier d'Anoumabo seraient les plus exposés à *Ae. aegypti*, l'indice de récipient (21,60%) et les pièges pondoirs (52,04%) désignaient Petit-Bassam comme le quartier le plus exposé. Les pièges collants (68,38%) désignaient Bromakoté comme plus exposé aux piqûres de *Ae. aegypti*. La tentative d'association en fonction des quartiers, les réponses IgG anti-Nterm-34 kDa avec les données entomologiques s'est ainsi uniquement traduite en reprenant en compte les résultats entomologiques obtenus avec les pièges collants.

4) L'état rétrospectif (ou historique) de l'infection des enfants aux arbovirus, identifié par la technologie immunologique (détection des IgG spécifiques) LUMINEX, a montré que les enfants étaient infectés par les arbovirus tels que DENV1 à DENV4, ZIKV et le virus de O'nyong nyong avec à une détection majoritaire de DENV3. Au niveau des sites, les enfants du quartier de Bromakoté et de Petit-Bassam ont été statistiquement ($p<0,015$) les plus infectés aux arbovirus avec respectivement 8,33 et 10,66 % que les enfants d'Anoumabo (03,94%).

Conclusion : Les réponses IgG anti-peptide salivaire spécifique ont montré une hétérogénéité d'exposition des enfants aux piqûres d'*Ae. aegypti*, dans chaque quartier et dans chaque classe d'âge des enfants. Les réponses IgG anti-peptide également ont montré une différence d'exposition des enfants entre les quartiers. Suggérant ainsi un risque de transmission des arbovirus différents selon les quartiers. Ce risque est apparu plus important à Bromakoté qu'Anoumabo et à Petit-Bassam. Les enfants vivant à Abidjan sont en effet infectés aux arbovirus avec plus

d'enfants infectés à Bromakoté et Petit-Bassam qu'Anoumabo. Les réponses IgG anti-Ntem 34 kDa d'*Ae. aegypti* n'ont pas suivi ce niveau d'infection des enfants de Petit-Bassam mais était associé à celui de Bromakté.

Cette étude montre que l'utilisation des biomarqueurs d'exposition aux piqûres des *Aedes* pourraient un outil pertinent pour l'évaluation de l'hétérogénéité d'exposition aux vecteurs d'arbovirus dans le contexte urbain africain ainsi que le risque de transmission des arbovirus. La technique de détection simultanée des arbovirus (LUMINEX) a montré un historique de circulation des arbovirus dans les quartiers urbains en Afrique.

Au moment des prélèvements, les enfants étaient porteurs d'IgG spécifiques contre ces virus, ils ont donc été en contact avec le virus mais ne sont pas forcément infectés

II. ETUDE DU NIVEAU D'EXPOSITION DES POPULATIONS HUMAINES AUX PIQURES DE *AE. ALBOPICTUS* AU SUD DE LA FRANCE METROPOLITAINE PAR L'UTILISATION DU BIOMARQUEUR IMMUNO-EPIDEMIOLOGIQUE D'EXPOSITION

Cette deuxième étude de notre thèse porte sur le volet immunologique du projet ARBOMED/PRIAM, projet multidisciplinaire décrite plus haut dans le projet 2 du point 2 du cadre de la thèse.

2.1 Contexte de nos travaux

La France métropolitaine est en proie depuis les années 2004, à une colonisation progressive par le moustique invasif *Aedes albopictus* nommé « moustique tigre », de différents départements au Sud de la France (EID,2022), et plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen. Plus de 60 départements (**Figure 24**) sont actuellement colonisés, des cas d'arboviroses importées et des cas autochtones de transmission sont de plus en plus rapportés dans ces départements colonisés par *Ae. albopictus*. (Santé publique France, 2021).

Il est donc nécessaire, non seulement d'évaluer l'exposition des habitants aux piqûres d'*Ae. albopictus* et leur hétérogénéité géographique mais aussi d'explorer les éléments de risque associés au niveau d'exposition individuel des habitants de ces zones pour une meilleure orientation des mesures de luttés contre *Ae. albopictus* et donc la réduction de la transmission des arboviroses à la population.

Une étude en 2012 a été conduite sur la population de donneurs de sang du Sud de la France. L'objectif de cette étude était d'explorer une potentielle association entre les données biomarqueurs d'exposition aux piqûres de *Ae albopictus* (les réponses anticorps IgG et IgM anti-EGS d'*Aedes*

albopictus) et les facteurs de risque d'exposition des populations. Au nombre de ces facteurs de risque figuraient la localisation des donneurs de sang et les caractéristiques de leurs logements (présence de jardins, balcon, appartement individuel). Les principaux résultats de cette étude indiquaient que i) les individus vivant dans les zones colonisées avant

2009 ou récemment colonisées (entre 2010 et 2012) présentaient des niveaux d'IgG antialvinaire plus élevés que ceux vivant dans les zones non encore colonisées par *Ae. albopictus*.

Le type de logement ne semblait pas avoir d'impact sur le niveau d'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus*. Les personnes vivant en appartement avaient un niveau d'IgG EGS plus élevé que celles des personnes vivant dans des maisons individuelles, mais cette différence n'était pas significative. La présence de l'air conditionné ou de moustiquaires aux fenêtres était associée à une réduction notable de l'intensité des piqûres des *Aedes* (Poinsignon *et al.*, 2019). Dans le cadre de nos activités de thèse, nous avons travaillé des individus venant de la même zone, dans l'optique de détecter et de quantifier les anticorps IgG et IgM anti-peptide salivaire (34 kDa d'*Aedes aegypti*) afin d'indiquer de façon spécifique le niveau d'exposition de 681/2400 donneurs de sang âgés de 40 à 99 ans aux piqûres d'*Ae. albopictus* et ceci entre Septembre et Octobre 2012 (mois du pic d'exposition).

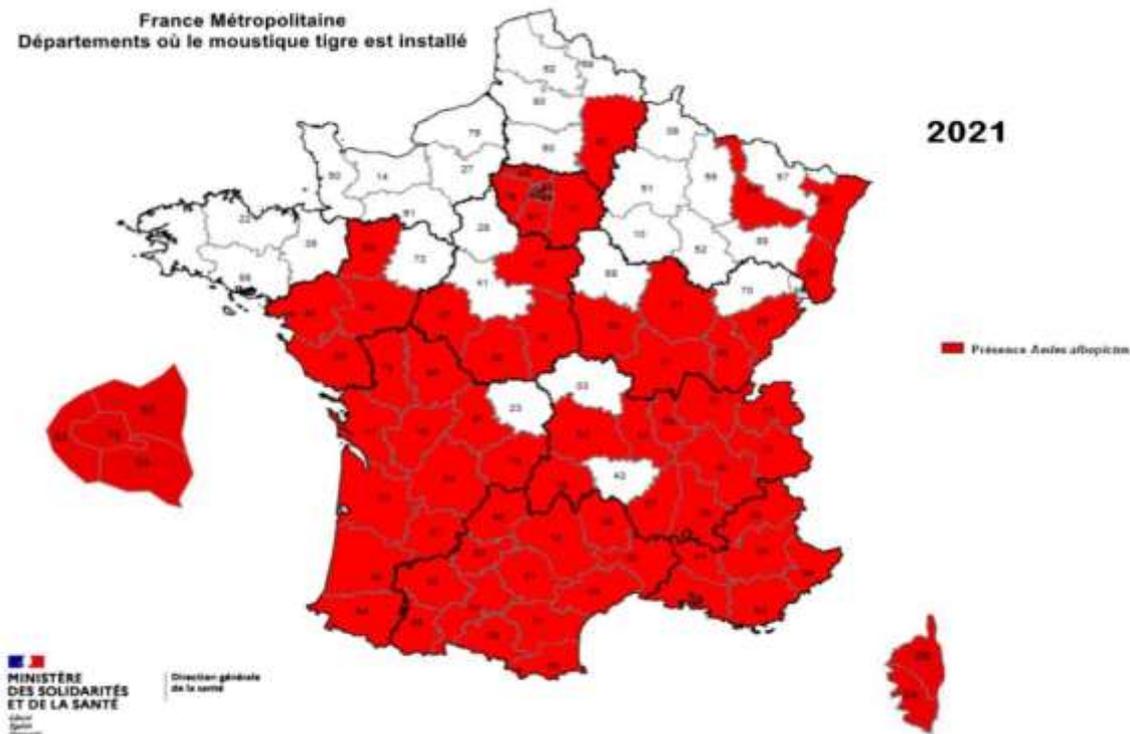


Figure 24: Départements du Sud de la France colonisés par *Aedes albopictus* depuis 2004 (Santé publique France, 2021)

Nous avons ensuite analysé les taux d'Ac IgG et IgM en fonction des : i) régions (Corse, Paca, Occitanie et l'Auvergne), les départements d'habitation des populations d'étude, et ii) de certains facteurs socio-environnementaux (type d'habitats, existence de jardins, de système de climatisation, présence de moustiquaires sur les fenêtres, âge des individus) de leur milieu au Sud de la France métropolitaine.

Cette zone étant colonisée par plusieurs types d'arthropodes vecteurs (Raison d'implémentation du projet ARBO-MED/PRIAM), les analyses des résultats de nos travaux de thèse se focalisera sur les facteurs de risque associés aux niveaux d'exposition des populations exclusivement aux *Ae. albopictus* au Sud de la France métropolitaine.

Dans cette zone du Sud de la France métropolitaine (**Figure 25**), 4 régions ont été sélectionnées pour ce projet : 3 régions colonisées par *Ae. albopictus* au moment des études (Corse, Occitanie et PACA) et une non colonisée en 2012 (Auvergne), qui pouvait permettre d'étudier une « région contrôle ».

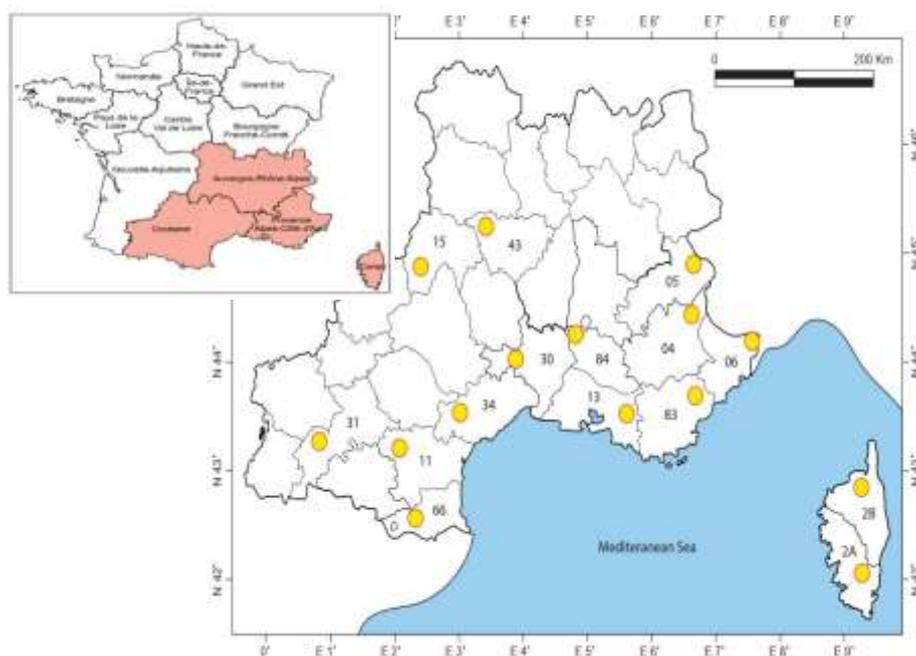


Figure 25:Sites d'étude du projet ARBO-MED/PRIAM.

En jaune et encadrés en rouge les différents départements d'étude

La population d'étude était essentiellement composée d'adultes âgés entre 40 et 99 ans présentant différents états de santé (Très bonne santé, Assez bonne santé et très mauvaise santé).

Le **tableau 4 et 5** résument les différentes caractéristiques de cette population d'étude et présentent certains facteurs socio-environnementaux de leur milieu de vie.

2. 2 Caractéristiques de la population d'étude

Tableau 4: Caractéristiques de la population d'étude

Caractéristique de la population	Auvergne	Corse	Occitanie	PACA	Total	<i>p</i>
<i>N</i> (%)	50(07,30)	122(17,90)	158(23,20)	351(51,50)	681 (100)	-
Age, moyenne^a	64,62	65,45	65,76	67,68	66,61	0 ,094
(IC 95%)	(59,50-69)	(62,50- 67,50)	(63,49-67,50)	(66 -69)	(65,50-67,50)	
Groupe d'âge^a (%)						
[40-60]	23 (46,00)	47 (38,52)	57 (36,07)	113 (32,19)	240 (35,24)	
[61-80]	19 (38,00)	54 (44,26)	76 (48,10)	117 (50,43)	326 (47,87)	0,570
[81-100]	08 (16,00)	19 (15,57)	25 (15,82)	57 (16,24)	109 (16,01)	
<i>NA</i> ^b	0	02 (01,64)	0	04 (01,13)	06 (0,88)	
Ratio du genre (Masculin/Féminin)	0,85 (23/27)	1,10 (64 /58)	1,33 (89/69)	0,93(169/182)	01,11(358/323)	0,180
Etat de santé (%)						
Très bonne santé	30 (62,50)	70 (59,80)	91 (60,30)	195 (56,90)	386(58,60)	
Assez bonne santé	18 (37,50)	47 (40,20)	60 (39,70)	147 (42,90)	272 (41,30)	0,914
Très mauvaise santé	0	0	0	01 (0,20)	01(0,20)	

Tableau 5: Facteurs socio-environnementaux du milieu de vie de la population d'étude

Commodités de vie	Auvergne	Corse	Occitanie	PACA	Total	<i>p</i>
Air conditionné (%)						
Oui	10 (20,80)	19 (15,60)	30 (19,20)	77 (22,20)	136 (20,20)	0,462
Non	38 (79,20)	103 (84,40)	126 (80,80)	270 (77,80)	537 (79,80)	
Jardins (%)						
Oui	30 (63,82)	102 (87,20)	127(83,00)	262 (74,65)	521 (77,99)	
Non	17 (36,20)	15 (12,80)	26 (17,00)	71 (20,23)	129 (19,31)	<0,0001
NA	0	0	0	18 (05,12)	18 (02,70)	
Moustiquaires sur les fenêtres (%)						
Oui	11 (22,90)	35 (29,70)	37(23,90)	78 (23,10)	161 (24,50)	0,550
Non	37 (77,10)	83 (70,30)	118 (76,10)	259 (76,90)	497 (75,50)	
Type de logements (%)						
Appartements	15 (30,00)	19 (16,8)	38 (25, 30)	81(23,83)	153 (23,40)	
Maisons individuelles	33 (66,00)	92 (81,40)	109 (72,70)	253 (74,20)	487 (74,50)	0,485
Autres	02(04,00)	02 (01,80)	03 (02,00)	07 (02,10)	14 (02,10)	
Vidange des réservoir d'eau (%)						
Souvent	04 (08,70)	21 (18,40)	29 (20,00)	55(16,70)	109 (17,20)	
Rarement	15 (32,60)	34 (29,40)	44 (30,33)	113(34,30)	206 (32,50)	0,627
Jamais	27 (58,70)	59 (51,80)	72 (49,70)	116 (48,90)	319 (50,30)	

3. Résultats

Les données pour le volet immunologique du projet ARBO-MED/PRIAM, ont été recueillies dans le mois de Septembre 2012. Cette période était une période de forte présence de *Ae. albopictus* et considéré comme le mois du pic d'exposition. Ainsi, pour identifier les facteurs qui pourraient favoriser et expliquer le comportement de piqûre de *Ae. albopictus* dans cette partie de la France métropolitaine, les niveaux de réponses spécifiques IgG et IgM antiNterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* ont été comparés selon les régions, les départements, les années de colonisation des départements et les facteurs socio-environnementaux.

3.1 Réponses IgG et IgM anti-34 kDa en fonctions des régions

En fonction des régions Corse, Occitanie, Paca (régions colonisée par *Ae. albopictus*) et l'Auvergne (région non colonisée en 2012), une hétérogénéité de réponses d'Ac IgG et IgM anti-peptide salivaire a été observée (**Figure 26A et 26B**). Les niveaux médians d'IgG et d'IgM spécifiques étaient significativement différents entre les régions ($p < 0.0001$).

La comparaison deux à deux avec le Dunn's test des différents médians des réponses IgG spécifique, les réponses IgG spécifique étaient plus élevées dans les régions colonisées (Corse, Occitanie, Paca) que dans celui de l'Auvergne (région non colonisée). De plus, un niveau médian d'IgG spécifique était plus élevé en Occitanie et en PACA qu'en Corse ($p = 0,018$ et $p < 0,0001$ respectivement).

La comparaison deux à deux avec le Dunn's test des niveaux médians d'IgM, indiquait une différence significative entre le niveau médian d'IgM spécifique entre la région d'Occitanie et de PACA ($p = 0,0006$) et entre la région de PACA et celle de la Corse ($p = 0,058$). Seule la région d'Occitanie indiquait une différence significative de niveau médian des IgG par rapport à celui de la « région contrôle » Auvergne ($p = 0,007$).

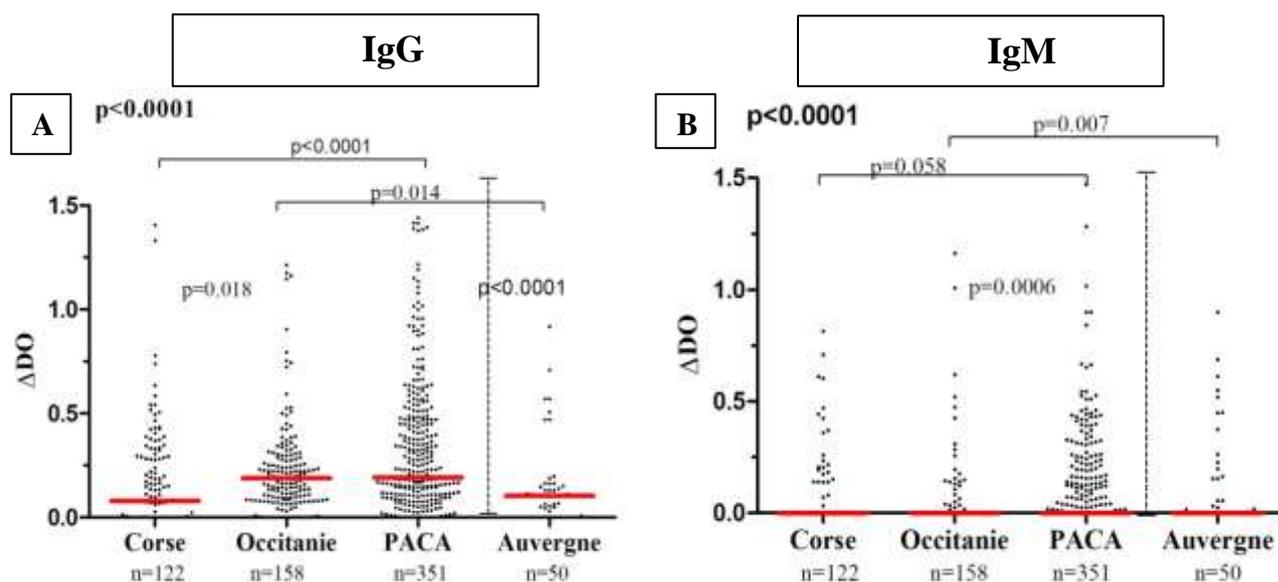


Figure 26: Hétérogénéité de réponse Ac anti-peptide salivaire d'*Ae. aegypti* selon les régions. (A) Réponses IgG anti-Nterm 34 kDa d'*Ae.aegypti*. (B) Réponses IgM anti-Nterm 34 kDa d'*aegypti*. Chaque point représente la réponse IgG et IgM (ΔOD) de chaque individu prélevé. Les barres rouges désignent le niveau médian des Ac IgG et IgM d'une région. Le nombre d'individus dont les sérums ont été testés dans chaque région est indiqué par (n).

3.2. Réponses IgG et IgM anti-Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* en fonction des départements des régions Occitanie et PACA

Afin de mettre en exergue les différences d'exposition entre les départements des régions colonisés par *Ae. albopictus*, des comparaisons de niveau de réponse Ac anti-Nterm-34 kDa ont été réalisées entre les différents départements d'Occitanie et de PACA. Seuls les départements de ces 2 régions ont fait l'objet d'étude en raison du nombre supérieur des ces départements par rapport aux départements d'Auvergne (2 départements) et de Corse.

En Occitanie, en plus de l'hétérogénéité des réponses IgG spécifiques intra-départements, le niveau médian d'IgG spécifique était différent de façon significative ($p < 0,0001$, test de kruskall wallis) entre les départements. Le Dunn's test utilisé pour la comparaison deux à deux des niveaux médian d'IgG a indiqué que les réponses IgG spécifiques des individus vivant dans les départements 30 et 34, étaient plus élevés que celles des départements 31 et 66 (**Figure 27**). Dans la région PACA, une hétérogénéité du niveau des IgG anti- Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* a aussi été observée au sein de chaque département (**Figure 28**). La comparaison entre les départements du niveau médian d'IgG a montré une différence significative entre les départements ($p < 0,0001$). Le département 34 puis 83 qui présente un taux d'IgG le plus élevé

alors que niveau IgG semble similaire pour les autres départements. La comparaison deux à deux avec le Dunn's test indique une différence significative du taux d'Ac IgG entre le département 04 et 13 et entre les départements 05 et 13 (04 vs 13, $p < 0.05$; 05 vs 13 ; $p < 0.05$). Bien qu'une hétérogénéité de réponses Ac IgM anti-Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* ait été observée au sein de chaque département (**Figure 28**). Mais aucune différence significative des niveaux médians d'IgM n'a été noté entre les départements d'Occitanie ($p = 0.0273$; test non paramétrique de Kruskal-Wallis) et de Paca ($p > 0.05$; test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

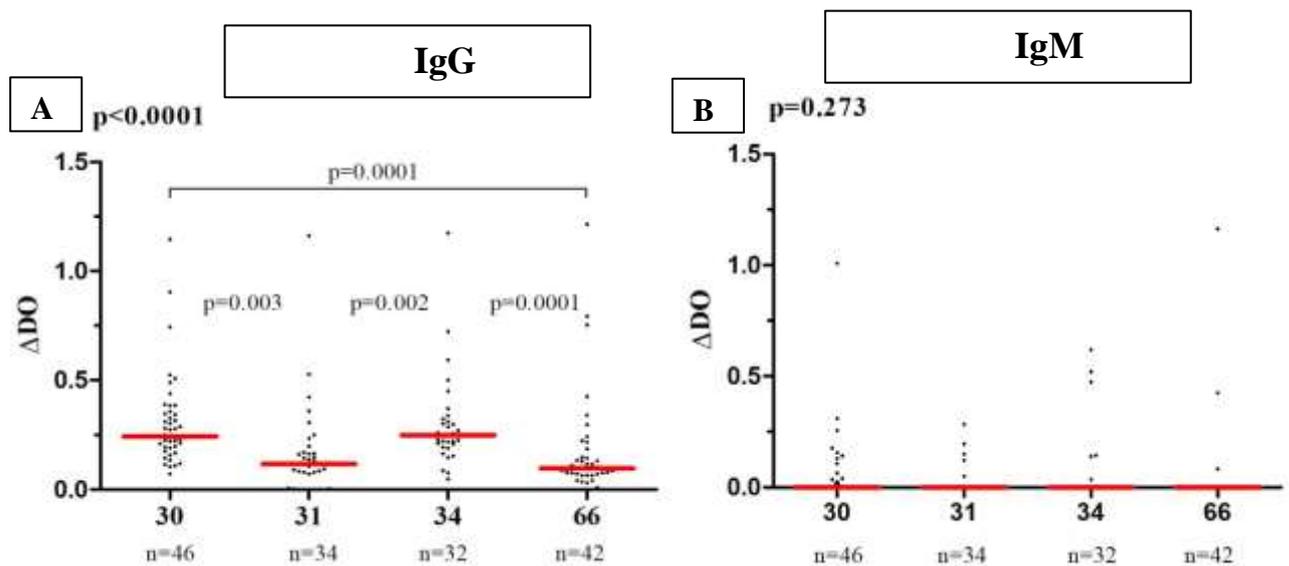


Figure 27: Hétérogénéité des réponses Ac anti-peptide salivaire d'*Ae. aegypti* selon les départements en Occitanie

(A) Réponses IgG anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti*. (B) Réponses IgM anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti*. Chaque point représente la réponse IgG et IgM (ΔOD) de chaque individu prélevé. Les barres rouges désignent le niveau médian des Ac IgG et IgM d'une région. Le nombre d'individus dont les sérums ont été testé dans chaque département est indiqué (n

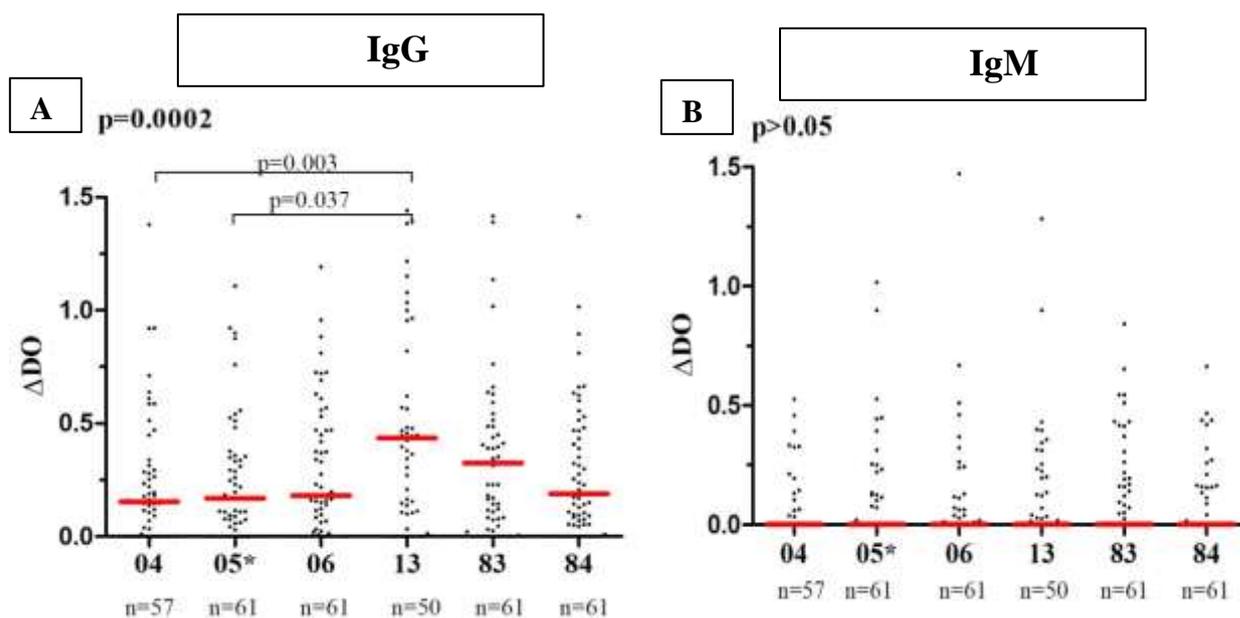


Figure 28: Hétérogénéité de réponse Ac anti-peptide salivaire d'*Ae.aegypti* selon les départements en PACA

(A) Réponses IgG anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti*. (B) Réponses IgM anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti*. Chaque point représente la réponse IgG et IgM (ΔOD) de chaque individu prélevé. Les barres rouges désignent le niveau médian des Ac IgG et IgM d'une région. Le nombre d'individus dont les sérums ont été testé dans chaque département est indiqué (n).

3.3 Réponses IgG et IgM anti-Nterm-34 kDa en fonctions des années de colonisation des départements

Nous avons évalué le niveau d'Ac IgG et IgM spécifique en fonction des années de colonisation des départements par *Ae. albopictus* en suivant 3 classes d'années sélectionnés arbitrairement (2004 à 2009 ; 2010 à 2012 et 2012 ou les départements n'était pas encore colonisés).

Le niveau médian d'IgG spécifique était significativement différent entre les départements selon les années de colonisation ($p=0,0022$; test non paramétrique kruskall-wallis).

Les départements colonisés entre 2010 et 2012 présentaient un niveau médian d'Ac IgG spécifique statiquement plus élevé que celui des départements non colonisés (non colonisé en 2012) au moment de l'étude ($p<0,001$; comparaison deux à deux avec les Dunn's test ; **Figure 29**). Le niveau médian d'IgG des départements colonisés entre 2004 et 2009 était plus élevé à celui des départements non encore colonisé en 2012 de façon surprenante cette différence n'était pas significative ($p>0,05$).

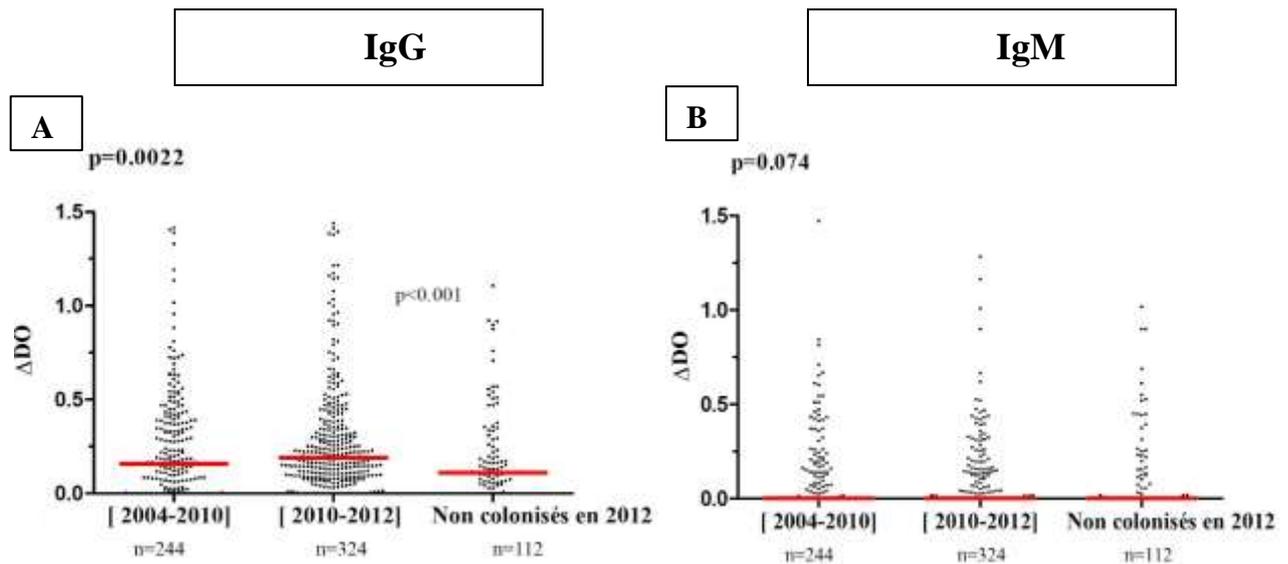


Figure 29: Hétérogénéité de réponse Ac anti-peptide salivaire d'*Ae. aegypti* selon les années de colonisation des départements.

(A) Réponses IgG anti-Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti*. (B) Réponses IgM anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti*. Chaque point représente la réponse IgG et IgM (ΔOD) de chaque individu prélevé. Les barres rouges désignent le niveau médian des Ac IgG et IgM dans chaque tranche d'année. Le nombre d'individus dont les sérums ont été testé dans chaque département est indiqué (n).

Au niveau des réponses IgM spécifique, bien qu'il ait eu une hétérogénéité de réponses IgM, les médianes du niveau des IgM spécifique sont toutes nulles. Donc statistiquement similaires suivant les découpages des années de colonisation des départements par *Ae. albopictus* ($p=0.074$, test non paramétrique kruskall-Wallis).

3.4 Effets des facteurs socio-environnementaux sur les réponses IgG et IgM anti-peptide salivaire

Les différences de niveau des réponses Ac anti-peptide Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* observées entre différentes régions et plus en détails entre les différents départements d'études, nous a conduit à prospecter du côté des facteurs qui pourraient impacter ces réponses Ac spécifiques. Cette analyse incluait des facteurs socio-environnementaux du milieu de vie des populations du Sud de la France.

Les facteurs tels que le Jardin, type de logement, de système de climatisation, la moustiquaire sur les fenêtres, la fréquence de vidange des réservoir d'eau, la pratique de l'élevage d'animaux et la présence des animaux domestiques ont été retenus du fait de leur potentiel influence sur la densité vecteur *Aedes* dans une zone donnée (Sabatini et al. 1990; Joshi et al. 2006; Whiteman et al. 2019).

La comparaison des médianes IgG spécifiques entre les individus utilisant les commodités de vie ou pratiquant certaines activités (Elevage d'animaux et la vidange des réservoirs d'eau) et ceux n'en disposant pas ou n'élevant pas les animaux, nous a indiqué les différents niveaux médiane d'Ac IgG mais cette différence n'était pas significative. Par exemple, les niveaux médian d'IgG entre les personnes utilisant de l'air conditionné et ceux n'en utilisant pas était respectivement de 0,15 et 0,16 malgré le pourcentage de personne 79,80 n'utilisant pas de l'air conditionné. Cette différence de médianes n'étaient donc pas significatives comme c'est le cas d'autres facteurs présentés (**Tableau 6**).

Les réponses IgM anti-Nterm 34 kDa quant à elles ont données toutes des médians nulles selon les facteurs de risque en présence.

Tableau 6: Influence des facteurs de risque sur les réponses IgG et IgM anti-peptides 34 kDa d'*Ae. aegypti*

	OUI		NON		
Equipements	% d'individu	Médiane IgG	% d'individu	Médiane IgG	<i>p</i>
Air conditionné	20,20	0,150	79,80	0,16	0,461
Jardins	79,99	0,140	19,31	0,17	0,244
Moustiquaires sur fenêtres	24,50	0,145	75,50	0,167	0,256
Appartement	23,40	0,180	76,60	0,159	0,463
Maisons individuelles	74,50	0,159	25,60	0,18	0,267
Vidange des réservoir d'eau	49,70	0,173	50,30	0,151	0,374
Elevage d'animaux	38,32	0,137	41,85	0,164	0,246
Animaux domestiques	03,38	0,163	89,86	0,164	0,741

4. Discussion

Cette étude portant sur des populations adultes (donneurs de sang) vivant dans 4 régions du Sud de la France métropolitaine, visait à évaluer leur niveau d'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus* pendant une période de forte pullulation d'*Ae. albopictus* (Septembre 2012).

A cet effet, les réponses Ac IgG et IgM anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti* ont été dosées dans leurs sérums et analysés suivant i) les régions colonisées (Corse, Occitanie, Paca) et région non colonisée (Auvergne), ii) les départements de ces régions, iii) les années de colonisation des régions par *Ae. albopictus* et iv) les facteurs socio-environnementaux du milieu de vie de la population d'étude.

Une hétérogénéité de réponses IgG et IgM spécifique a été notée au sein des régions et des départements qu'ils soient exposés ou non aux piqûres d'*Ae. albopictus*. Au sein de chaque région et département (Occitanie et PACA), les réponses IgG et IgM de chaque habitant (ΔOD) y sont différents et y varient de 0 à 1,5. Il y aurait au sein de chaque région et de chaque département une différence de niveau d'exposition des habitants aux piqûres d'*Ae. albopictus*. En plus de cette hétérogénéité des réponses IgG et IgM au sein des régions et les départements, une différence significative des réponses IgG et IgM spécifique a été mis en exergue entre les régions et entre les départements. La région de PACA et Occitanie semblent plus exposées que Corse et Auvergne. Aussi nous avons détecté IgG et IgM en Auvergne chez un bon nombre d'individus. La comparaison du niveau d'exposition entre les départements, montre une différence significative de niveau d'exposition au vecteur entre les différents départements d'Occitanie et de PACA.

En Occitanie, les habitants des département 30 et 34 semblaient plus exposés aux piqûres d'*Ae. albopictus* que ceux des départements 31 et 66 . Dans la région de PACA, ce sont plutôt les habitants des départements 13 et 83 qui étaient plus exposés que ceux vivant dans les départements 04, 05, 06 et 84. Cela viendrait confirmer la variabilité de niveau d'exposition des hommes aux vecteurs en milieu naturel comme déjà indiquée par des études antérieures utilisant la réponse Ac IgG dirigés contre Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* comme biomarqueur d'exposition des hommes aux piqûres des *Aedes* (Elanga Ndille et al. 2012b; 2016b; Sagna et al. 2018a).

Entre les régions aussi, il y aurait une différence de niveau d'exposition de la populations d'étude aux piqûres d'*Ae. albopictus*. Cette exposition semble plus importante dans les régions où les populations étaient exposées aux piqûres d'*Ae. albopictus* que la région d'Auvergne (régions non exposée au moment des études). Les populations semblent plus exposées aux piqûres d'*Ae. albopictus* dans les régions d'Occitanie et de PACA que les populations vivant en Corse, d'où la réponse IgG plus élevée dans ces régions (PACA et Occitanie).

Les facteurs socio-environnementaux pourraient être associés à une telle situation. Mais dans le cadre de cette étude une association entre le niveau d'exposition et les réponses biomarqueur d'exposition aux piqûres des *Aedes* n'a pu être mis en exergue. En effet l'analyse des facteurs de risque d'exposition des habitants aux piqûres d'*Ae albopictus*, a montré des variations individuelles de niveau d'exposition des habitants, traduit par le taux de réponses IgG, mais ces variations n'étaient pas statistiquement significatives.

In fine, ces résultats permettraient ainsi d'identifier les zones à risque ou les populations à risque d'infection par les arbovirus avec le concours du biomarqueur d'exposition aux piqûres de l'*Ae. albopictus*. De telles conclusions furent observées à la suite des études menées par Elanga et collaborateurs en 2014 dans la ville capitale de Vientiane au Laos en Asie du Sud-Est et par Sagna et collaborateurs dans 4 quartiers urbains à St-Louis au Nord du Sénégal (Ndille et al. 2014b; Sagna et al. 2019).

De même, les réponses IgM spécifiques utilisées afin d'apprécier de potentiels récentes expositions des individus et donc des zones nouvellement colonisés /exposés aux piqûres d'*Ae. albopictus* au sein de la population, semblaient indiquer une différence significative de niveau d'IgM des individus entre les régions dites exposées et la région non exposée (Auvergne). La région de PACA semblerait regorgée plus de nouveaux exposés aux piqûres de d'*Aedes* que les autres régions même si le niveau médian d'Ac IgM semble très faibles dans chaque région. Cela pourrait s'expliquer par l'arrivée dans cette région des nouvelles personnes ou des personnes de retour des vacances.

La région d'Auvergne bien que désignée comme étant non colonisée en 2012 donc potentiellement non exposée aux vecteur *Ae. albopictus* au moment du déploiement du projet PRIAM, semblait abriter des individus anciennement ou nouvellement exposés aux piqûres d'*Ae.albopictus*. Cela pourrait être due une faible présence du vecteur dans les deux départements d'Auvergne (département 15 et 43) au moment des études que les pièges entomologiques n'auraient pas permis de quantifier. Le biomarqueur a déjà montré son efficacité dans de telles situation en dans une zone rurale du Benin en Afrique de l'Ouest et à Saint-Denis à la Réunion. En effet, dans le cas de faible intensité vectorielle pendant la saison sèche, les réponses Ac IgG anti-Nterm 34 kDa ont été détectées chez des enfants Béninois. De faibles niveaux d'IgG anti-Nterm 34 kDa chez les adultes de la Réunion à la suite d'une LAV où de faible intensité vectorielle a été enregistrée (Elanga Ndille et al. 2012a; 2016b).

Aussi faut-il prendre en compte le déplacement (Aller-retour) de certains habitants de cette région de l'Auvergne vers d'autres régions plus exposées à *Ae. albopictus* pour les besoins de travail ou de vacances.

Le biomarqueur d'exposition (réponse Ac IgG et IgM spécifique à ce peptide salivaire) aiderait à identifier une zone de forte exposition aux vecteur *Aedes*. Comme cela fut le cas dans plusieurs études utilisant les réponses Ac anti-Nterm 34 kDa d'*Ae.aegypti* (Ndille et al. 2014b; Sagna et al. 2018b; 2019).

Enfin, en comparant les niveaux d'IgG et d'IgM suivant les années de colonisation des régions (2004 à 2009 ; 2010 à 2012) et des régions non encore colonisées en 2012, les populations étaient différemment exposées aux piqûres de *Ae. albopictus*. Cette exposition semblait être plus importante entre 2009 et 2012. Les facteurs climatiques et environnementaux pourraient être un argument en faveur de la forte pullulation des vecteurs *Aedes albopictus* d'où l'exposition forte des habitants aux piqûres d'*Ae. albopictus* pendant cette période. Une étude portant sur l'implantation annuelle de *Ae. albopictus* depuis le Sud de la France métropolitaine de 2006 à 2012, a identifié à travers un modèle mathématique l'utilisation des terres agricoles, le paysages semi-urbains et urbains comme facteurs ayant contribué à la colonisation de nouvelles zones par *Ae. albopictus* (Roche et al. 2015).

Le biomarqueur immuno-épidémiologie dans ce contexte, semble être un indicateur du niveau d'exposition non seulement individuel mais aussi collective. Il nous a permis d'indiquer de façon spécifique l'hétérogénéité du niveau d'exposition de la population du Sud de France, nous permettant de rendre compte de la variabilité du niveau d'exposition de ces populations dans leur milieu de vie. Enfin, le biomarqueur immuno-épidémiologique nous a permis l'identification des régions et les départements dont les populations sont sujettes aux piqûres répétées d'*Ae albopictus* et donc au risque élevé de transmission des arbovirus aux populations humaines au Sud de la France métropolitaine. Une association entre les facteurs de risque et les réponses Ac IgG et IgM anti-peptide salivaire n'ont pu être mis en exergue de façon formelle.

D'autres facteurs comme la pluviométrie, la température, la densité de vecteur nous auraient peut-être montré une association avec le niveau des données biomarqueurs comme indiqué par d'autres étude auparavant (Elanga Ndille et al. 2012b; Doucoure et al. 2014; Yobo et al. 2018; Sagna et al. 2018a). Mais ils n'ont été fournis dans le cadre de cette étude.

Principaux résultats

Hypothèse : Les réponses IgG et IgM dirigées contre l'antigène salivaire Nterm-34 kDa de *Aedes aegypti* représentent des indicateurs du niveau d'exposition (ancienne et récente, pour IgG et IgM, respectivement) humaine aux piqûres d'*Aedes albopictus*.

Résultats : 1) Le niveau médian des IgG spécifiques était plus élevé dans les régions colonisées (Corse, Occitanie et PACA) que dans la région non colonisée (Auvergne) par *Ae. albopictus*. La réponse IgG spécifique IgG était plus élevée en Occitanie et en PACA par rapport à la Corse ($p=0,018$ et $p<0,0001$ respectivement).

2) Le niveau médian des IgM anti-peptide salivaire, indiquait une différence significative entre les régions exposées. Seule la région d'Occitanie indiquait, pour l'IgM, une différence significative de niveau médian par rapport à celui de l'Auvergne ($p=0,007$).

3) En Occitanie, les niveaux médians des réponses IgG anti-peptide des départements 30 et 34, étaient plus élevés que celles des départements 31 et 66 ($p<0,0001$). Pas de différence significative de réponses IgM anti-Nterm-34 kDa était observée entre les différents départements d'Occitanie ($p=0,0273$).

4) En PACA, une différence significative du niveau des IgG spécifique était détectée entre le département 04 et 13 et entre les départements 05 et 13 (04 vs 13, $p<0,05$; 05 vs 13 ; $p<0,05$). Le niveau médian des IgG des départements 13 et 83 plus élevé que ceux des autres départements (04 ; 05 ; 06 ; 84). Aucune différence significative du niveau médian d'IgM anti-Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* n'a été observé entre les départements de PACA ($p>0,05$).

5) Les départements colonisés entre 2010 et 2012 (Département N°66 dans la région d'Occitanie et N°13, N° 34, N° 84 et N°04 dans la région de PACA), présentaient un niveau médian de réponses IgG anti-peptide statiquement plus élevés que celui des départements non colonisés (non colonisé en 2012) au moment de l'étude ($p<0,001$). Le niveau médian d'IgG des individus des départements colonisés entre 2004 et 2009 était plus élevé à celui des départements non encore colonisé en 2012 mais cette différence n'était pas significative ($p>0,05$). Aucune différence significative de niveau médian d'IgM anti-Nterm34 kDa a été observée entre les départements selon les années de colonisations ($p>0,074$).

6) Aucune variation significative du niveau médian des IgG anti-Nterm-34 kDa entre les individus utilisant les commodités de vie ou pratiquant certaines activités (Elevage d'animaux et la vidange des

réservoirs d'eau) et ceux n'en disposant pas et n'élevant pas les animaux a été observée. Les niveau médian d'IgM entre les individus des 4 régions) était pratiquement nul.

Conclusion : La réponses IgG anti-Nterm-34 kDa d'*Aedes aegypti* pourrait constituer des biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition humaine aux piqûres d'*Ae. albopictus* en contexte de France métropolitaine. Mais il est difficile dans l'étude actuelle d'associer ces niveaux d'exposition à des facteurs de risque. Chose qui nous aurait permis de dresser un ensemble d'éléments environnementaux et climatiques à prendre en compte lors d'une éventuelle intervention des équipes impliquées dans la lutte anti-vectorielle contre le moustique tigre (*Ae. albopictus*). La sélection de la population d'étude basée sur les « donneurs de sang EFS », bien que très pratique au niveau opérationnelle, pourrait être un biais dans sa représentativité de la population générale vivant dans ses départements étudiés.

Les IgM anti-Nterm-34 kDa d'*Aedes aegypti* exploitées dans l'optique d'identifier les zones et les individus nouvellement colonisées et exposés respectivement, n'a répondu que très partiellement à nos préoccupations. La région d'Auvergne désignée comme région non exposée aux piqûres d'*Ae. albopictus* au moment des études a présenté cependant des individus positif en Ac anti-peptide salivaire suggérant qu'ils étaient « récemment » exposés tout comme les régions anciennement exposées. Les régions d'Occitanie et de PACA se sont trouvées avec un nombre important de nouveaux exposés par rapport à l'Auvergne. L'utilisation de ce biomarqueur a permis d'identifier ou tout au moins de déterminer un proxy des régions les plus exposés au Sud de la France, ce qui est une première. De manière intéressante, ce biomarqueur a permis de mettre en évidence une hétérogénéité d'exposition entre départements au sein d'une même région.

III. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN BIOMARQUEUR IMMUNEPIDEMIOLOGIQUE D'EXPOSITION AUX PIQURES DE *CULEX* : ETUDE PILOTE

Résumé des activités menées pendant cette étude

Cette étude a bénéficié du projet JEA1 EVAPAL-CI dont l'objectif était, initialement d'évaluer le risque de transmission du paludisme après la crise socio-politique dans la ville de Bouaké.

Dans le cadre de notre thèse, nous avons exploité les échantillons venant de 3 quartiers de la ville de Bouaké et d'1 village à proximité qui ont été collectés durant la saison sèche (Mars-Avril 2015). Les données socio-anthropologiques, géographiques, entomologiques, épidémiologiques, parasitologique et immunologiques par la même occasion ont été collectés pendant la saison des pluies (Août 2014) et la saison sèche (Mars-Avril 2015). Les EGS (Extraits totaux de Glandes Salivaires) ont été collectées sur des femelles de *Culex quinquefasciatus* élevées au laboratoire de l'Institut Pierre Richet à Bouaké. En plus, une production sous forme recombinante de la protéine salivaire 30 kDa a été utilisée. Cette protéine avait été identifié comme candidat biomarqueur (L. Almeras, IRBA, Marseille) par techniques immuno-protéomiques et bio-informatiques spécifique et immunogène dans la salive de *Culex quinquefasciatus*.

Pour les besoins de notre étude, 223 échantillons de sérums des enfants âgé de 1 à 14 ans (pour être sûr de doser que les anticorps IgG produit par les enfants et non ceux transmis par la mère aux plus jeunes enfants) venant des sites Dar-es-salam, Kennedy, N'Gattakro et Petessou ont été exploités.

Les réponses Ac IgG anti-EGS ont été dosé par la technique ELISA afin d'estimer leur potentiel indicateur de niveaux d'exposition des enfants aux piqûres de *Culex quinquefasciatus*. Pour une identification spécifique de *Culex quinquefasciatus*, les réponses Ac IgG spécifique à la protéine recombinante 30 kDa ont été analysés.

Les résultats de nos analyses ont fait l'objet d'un article publié dans le journal Plos NTD.

First evaluation of antibody responses to *Culex quinquefasciatus* salivary antigens as a serological biomarker of human exposure to *Culex* bites: a pilot study in Côte d'Ivoire

Short title: Serological biomarker of *Culex* bite exposure

Bi Zamble H. Zamble^{1,2*}, Serge S. Yao³, Akre M. Adja^{1,4}, Mahfoud Bakli^{5,6}, Dounin D. Zoh^{1,4}, Françoise Mathieu-Daudé^{2,7}, Serge B. Assi^{1,8}, Franck Remoue², Lionel Almeras^{5,9,10}, Anne Poinignon^{1,2}

RESEARCH ARTICLE

First evaluation of antibody responses to *Culex quinquefasciatus* salivary antigens as a serological biomarker of human exposure to *Culex* bites: A pilot study in Côte d'Ivoire

Bi Zambie H. Zambie^{1,2*}, Serge S. Yao³, Akre M. Adja^{1,4}, Mahfoud Bakli^{5**}, Dounin D. Zoh^{1,4}, Françoise Mathieu-Daudé^{2**b}, Serge B. Assi^{1,6}, Franck Remoue², Lionel Almeras^{5,7,8}, Anne Poinsignon^{1,2}

1 Institut Pierre Richet / Institut National de Santé Publique, Bouaké, Côte d'Ivoire, **2** MIVEGEC, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France, **3** Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire, **4** UFR Biosciences, University Felix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, **5** IHU Méditerranée Infection, Marseille, France, **6** Programme National de Lutte contre le Paludisme, Abidjan, Côte d'Ivoire, **7** Unité Parasitologie et Entomologie, Département Microbiologie et Maladies Infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France, **8** Aix Marseille Univ, IRD, SSA, AP-HM, VITROME, Marseille, France

**a Current address: Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences et Technologie, Université Belhadj Bouchaib d'Ain Temouchent, Ain Temouchent, Algeria

**b Current address: Institut Louis Malardé, Papeete, Tahiti, Polynésie française
* hubertbizambie.zambie@ird.fr



OPEN ACCESS

Citation: Zambie BZH, Yao SS, Adja AM, Bakli M, Zoh DD, Mathieu-Daudé F, et al. (2021) First evaluation of antibody responses to *Culex quinquefasciatus* salivary antigens as a serological biomarker of human exposure to *Culex* bites: A pilot study in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis* 15(12): e0010004. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004>

Editor: Fabiano Oliveira, National Institutes of Health, UNITED STATES

Received: July 23, 2021

Accepted: November 17, 2021

Published: December 13, 2021

Copyright: © 2021 Zambie et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [supporting information](#) files. Cohort data were anonymized to ensure participant confidentiality.

Funding: This research was integrated into the EVAPAL-CI multidisciplinary study granted to AMA and funded by the French National Institute for Research for Sustainable Development (IRD, <https://www.ird.fr/>). *Jeune Equipe Associée à

Abstract

Background

Culex mosquitoes are vectors for a variety of pathogens of public health concern. New indicators of exposure to *Culex* bites are needed to evaluate the risk of transmission of associated pathogens and to assess the efficacy of vector control strategies. An alternative to entomological indices is the serological measure of antibodies specific to mosquito salivary antigens. This study investigated whether the human IgG response to both the salivary gland extract and the 30 kDa salivary protein of *Culex quinquefasciatus* may represent a proxy of human exposure to *Culex* bites.

Methodology/Principal findings

A multidisciplinary survey was conducted with children aged 1 to 14 years living in neighborhoods with varying exposure to *Culex quinquefasciatus* in the city of Bouaké, Côte d'Ivoire. Children living in sites with high exposure to *Cx quinquefasciatus* had a significantly higher IgG response to both salivary antigens compared with children living in the control site where only very few *Culex* were recorded. Moreover, children from any *Culex*-high exposed sites had significantly higher IgG responses only to the salivary gland extract compared with children from the control village, whereas no difference was noted in the anti-30 kDa IgG response. No significant differences were noted in the specific IgG responses between age

l'IRD", Département des Programmes de Recherche et de la Formation au Sud; convention of February 18, 2013). BZHZ was supported by a PhD fellowship provided by the Méditerranée Infection Foundation (<https://www.mediterranee-infection.com/institut/la-fondation/>). DDZ was supported by fellowship from the IRD. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

and gender. Sites and the use of a bed net were associated with the level of IgG response to the salivary gland extract and to the 30 kDa antigen, respectively.

Conclusions/Significance

These findings suggest that the IgG response to *Culex* salivary gland extracts is suitable as proxy of exposure; however, the specificity to the *Culex* genus needs further investigation. The lower antigenicity of the 30 kDa recombinant protein represents a limitation to its use. The high specificity of this protein to the *Culex* genus makes it an attractive candidate and other specific antibody responses might be more relevant as a biomarker of exposure. These epidemiological observations may form a starting point for additional work on developing serological biomarkers of *Culex* exposure.

Author summary

The evaluation of exposure to mosquitoes is a key parameter in assessing the risk of transmission of associated pathogens, including zoonoses. Entomological methods represent the gold standard but have several limitations, and efforts are being made to develop new indicators to accurately assess human–*Culex* contact. This study showed the IgG response to *Culex quinquefasciatus* salivary gland extract is suitable proxy of exposure to *Culex* bites. The lower antigenicity of the 30 kDa recombinant protein represents a limitation to its use. The high specificity of this protein to the *Culex* genus makes it an attractive candidate and other isotypic antibody responses specific to this salivary antigen might be more relevant as a biomarker of exposure.

Introduction

Culex spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) are widespread globally, except in Antarctica. They can be found in tropical and temperate areas, with more than 770 species described and grouped into 26 subgenera. They can feed both on humans and animals [1,2] increasing their potential for transmission of zoonotic diseases and thereby making them a real threat to public health. *Culex quinquefasciatus* is the most common mosquito species in urban tropical settings [3] and is responsible for the transmission of a wide variety of pathogens, such as filaria parasites including *Wuchereria bancrofti* that cause lymphatic filariasis [4], and avian malaria parasites (*Plasmodium relictum*). It can also transmit numerous human viruses, including West Nile, Japanese encephalitis, Saint Louis, and Rift Valley fever viruses [5]. Moreover, even in the absence of disease transmission, these mosquitoes are a serious nuisance as biting pests worldwide [6].

Culex quinquefasciatus mosquitoes are widespread in Côte d'Ivoire [7] and a high seroprevalence of West Nile virus (WNV) has been reported in horses [8]. Human lymphatic filariasis is endemic in many districts [7] where mass drug administration has been introduced since 2014 to stop the spread of the infection, as recommended by the World Health Organization [9]. Thus, in the absence of human vaccines against most of the *Culex*-borne diseases and the difficulties to cover all endemic areas with drug treatment, disease transmission could be prevented through the reduction of *Culex* populations. The control of vector population consists of personal (e.g., long-lasting insecticide-treated mosquito nets) and collective strategies (e.g.,

improvement of the living environment, indoor residual spraying of insecticides) or innovative approaches such as the radiation-based sterile insect technique [10].

The most common approaches for evaluating the risk of disease transmission and the effectiveness of vector control strategies are based on entomological methods [11,12]. However, they have some limitations because they are labor-intensive, face budgetary and logistical constraints, and have ethical limitations when human-landing catches (HLCs) are deployed [13]. Although HLCs are the current relevant indicators of the intensity of contact between humans and vectors, these measures are generally applied to a limited area/population and do not take into account the heterogeneity of inter-individual exposure. Therefore, there is a demand for the development of alternative strategies to accurately evaluate human exposure to *Culex* mosquito bites at individual level, and to estimate the potential risk of *Culex*-borne pathogen transmission in exposed populations.

During blood-feeding, concomitantly to blood intake, female mosquitoes inject saliva containing a cocktail of biologically active proteins that counteract host homeostasis and modulate the vertebrate immune response [14,15]. The injection of vector saliva can also elicit a host antibody response against some salivary proteins and an interesting approach exploits the immunological properties of mosquito saliva in order to develop serological biomarkers of exposure to mosquito bites [16–19]. However, the use of whole saliva as an antigen source presents numerous limitations. Saliva collection or salivary gland dissection is tedious and time-consuming work, and the composition of salivary proteins (nature and amount) varies depending on the mosquito age and the time since blood-feeding [20,21]. Additionally, some salivary proteins are ubiquitous in various vector genera [22–25], which can lead to human antibody cross-reaction. Thus, it is necessary to identify antigenic salivary proteins specific to a genus or with low homology to other blood-sucking arthropods. Previous work combining immunoproteomic studies and bioinformatic predictions led to the identification of salivary proteins or peptides specific to main mosquito vectors. Specific immunoglobulin G (IgG) antibody responses to these salivary components have been validated as a serological biomarker of exposure to *Anopheles* (IgG response to gSG6 or CE5 salivary proteins, or to the gSG6-P1 salivary peptide), the vector of human malaria *Plasmodium* [26,27], and for *Aedes*, the vector of arboviruses (IgG to Nterm34-kDa, a salivary peptide) [28].

The immunogenicity of *Culex* spp. saliva has been a topic of interest, but most studies focused on identifying the main immunogenic salivary proteins responsible for allergy so as to develop high-sensitivity diagnostic tests and immunotherapy [29,30]. Studies identified *Cx. quinquefasciatus* salivary proteins that elicit an IgE and IgG responses in humans, with the major antigens being the D7-related proteins [30–33].

Only few studies have assessed human antibody responses to *Culex* salivary gland extract (SGE) in relation to exposure to *Cx. quinquefasciatus* or *Cx. pipiens*. Individuals living in region endemic for filariasis where *Cx. quinquefasciatus* was predominant had higher IgG and IgE titers than people living in a region where *Culex* was less prevalent, and the specific IgG level increased with age [34]. Another study had reported a seasonal dynamics in anti-SGE IgG response in an urban setting where *Culex* are predominantly anthropophilic, with the highest level during the warm season [35]. More studies are therefore needed to confirm whether specific IgG responses to salivary gland extracts (SGE) may represent a proxy of exposure to *Culex* bites. It is also necessary to identify a specific salivary candidate to develop a serological tool for assessing specifically the exposure to *Culex* bites and thus the risk of transmission of associated pathogens. Few data on the *Culex* sialotranscriptome, including *Cx. pipiens*, *Cx. tarsalis*, and *Cx. quinquefasciatus*, have been published [22,36,37] that enable the identification of species-specific or genus-specific proteins.

In this study, we selected and tested the 30 kDa salivary gland allergen (gi|170033701) as a pertinent candidate marker of exposure to *Cx. quinquefasciatus* bites. This protein belongs to the 30 kDa antigen/GE-rich/Aegyptin family of proteins that is abundant in the salivary glands of adult anopheline and culicine female mosquitoes [37] including *Cx. quinquefasciatus* [22], *Aedes (Ae.) aegypti* [38], and *Anopheles (An.) gambiae* [39]. Members of this protein family have anti-homeostatic properties in binding collagen and preventing platelet aggregation [18,40]. They were reported to be highly antigenic in inducing an IgE response in humans exposed to *Aedes* species [30] and an IgG response in vertebrates exposed to *Culex* bites [32,33]. Previous bioinformatics work showed a low sequence identity between homologous members of the 30 kDa antigen family, suggesting weak cross-reactivity of human IgG between the related salivary proteins [40].

This study aimed to evaluate by immuno-epidemiological approach, whether the IgE antibody levels against *Cx. quinquefasciatus* SGE and the 30 kDa salivary gland recombinant allergen are suitable serological biomarkers of exposure to *Culex* bites. A multidisciplinary survey was conducted with children living in areas with various exposure to *Cx. quinquefasciatus* estimated by classical entomological indices in the city of Bouaké, Côte d'Ivoire. The sequence homology of the 30 kDa salivary gland allergen protein of *Cx. quinquefasciatus* was also assessed with its different orthologs in the Arthropoda phylum to define the specificity of this candidate.

Methods

Ethics statement

The present study followed the ethical principles recommended by the Edinburgh revision of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Côte d'Ivoire Ministry of Health (June 2014; No. 41/MSLS/CNER-dkn). Site leaders provided prior permission to survey on each site and written informed consent of all parents or guardians of children who participated in the study was obtained before inclusion.

Study sites

The study was carried out in the city of Bouaké (7°41N, 5°01W), located approximately 350 km North from Abidjan, Côte d'Ivoire (Fig 1). The study area and study design have been previously described in detail [41,42]. Briefly, the climate is tropical humid with two seasons: the dry season runs from November to March, and the rainy season occurs from April to October. The rainy season is marked by two maximum rainfalls, one in June and one in September, with an average annual rainfall of between 1,000 and 1,600 mm.

Study population

The initial cohort consisted of 508 children aged from 6 months to 14 years from 5 sites and enrolled in a cross-sectional study which was carried out during the end of the dry season (March–April 2015). Households and children were randomly selected and socio-demographic (gender, age, sleeping or not under Insecticide-Treated Nets [ITNs]), geographical, entomological, and clinical data were collected. The present study was carried out on a sub-sample of the initial cohort and consisted of 223 children aged from 12 months to 14 years from 4 sites, Dar-es-Salam, N'Gattakro, Kennedy (three neighborhoods of Bouaké city), and Petessou (a village near Bouaké).

For immunological assays, blood samples were collected at the fingertips in microtainer tubes (microvette 500 serum-Gel Starstedt, Marnay, France) and sera were obtained after centrifugation at 3,000 rpm for 10 min. Sera were fractionated into aliquots and then frozen at -20°C until used.

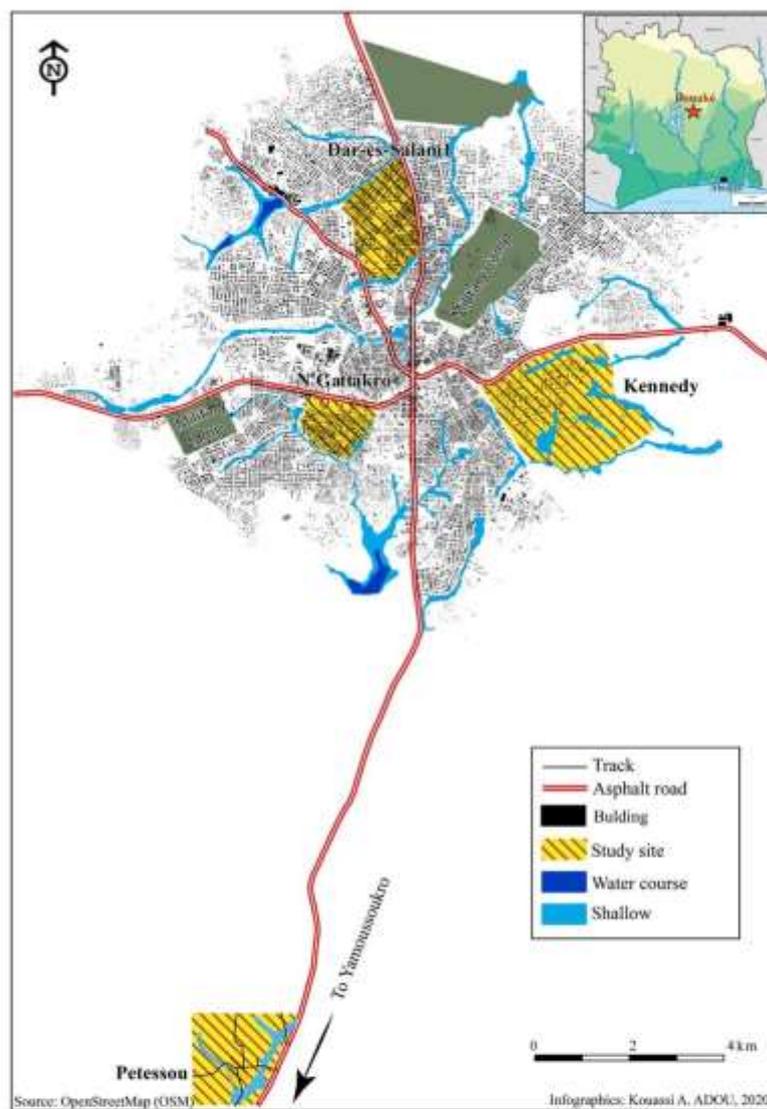


Fig 1. Map of study areas in the city of Bouaké, Côte d'Ivoire. Different study sites are hatched. Map source: <https://www.openstreetmap.org/export?map=1277.68211/-5.0039>.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.g001>

Mosquito collection

Adult mosquitoes were collected in March 2015, as previously described [41,43]. In each of the four sites, six catching points, three indoor and three outdoor were used to collect mosquitoes by landing catches on adult volunteers for two consecutive nights (from 6.00 pm to 06.00 am).

Twelve adult mosquito catchers gave prior informed consent and received yellow fever vaccination and anti-malarial chemoprophylaxis as recommended by the National Malaria Control Program of Côte d'Ivoire. Adult mosquitoes were collected, counted and their species were morphologically classified at the laboratory. The human biting rate (HBR) of each mosquito species was calculated as the average number of mosquitoes collected per person per night (bites/human/night, BHN).

Collection of *Culex quinquefasciatus* salivary gland extracts

Salivary gland extracts (SGE) were obtained from 8-day-old uninfected female *Cx. quinquefasciatus* ($n = 673$) reared in an insectary (Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire). Eggs were obtained from the Vectopole facility from Montpellier. Two days after a blood meal, the mosquitoes were sedated with cold and then their salivary glands were dissected out and transferred into a tube containing 30 μ l of phosphate-buffered saline (PBS, Gibco tablet) and 5 μ l of cocktail protease inhibitor (Sigma, St.-Louis, MO, USA). The dissected salivary glands were then pooled in 50 pairs per batch and frozen at -80°C before protein extraction. To disrupt the salivary gland membranes, three successive freeze-thaw cycles were done and the soluble salivary gland extract (SGE) fraction was then separated by centrifugation for 20 min at 30 000 g at $+4^{\circ}\text{C}$. The protein concentration was evaluated in the supernatant by the Bradford method (OZ Biosciences, Marseille, France) after pooling the different gland batches to generate a homogenous SGE for immunological assessment. The final SGE pool containing 208 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of proteins was stored at -80°C before use.

Expression and purification of the 30 kDa recombinant protein

The coding sequence of 30 kDa salivary gland allergen Aed a3 isoform X1 (gi|170033701) from *Culex quinquefasciatus* was retrieved from National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. The cDNA of this selected protein was synthesized by Genecust (Genecust, Dudelange, Luxembourg) with a C-terminal His-tag and cloned into *E. coli* expression vector pET28b (Novagen). The fidelity of the cloned sequences was verified by DNA sequencing, using an ABI Prism 3100 analyzer (Applied Biosystems). The expression plasmids pET28b containing sequenced genes were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells (Invitrogen). Bacterial precultures were performed overnight and grown in LB Broth Miller medium (Fisher Scientific) at 37°C with shaking (220 rpm). Fifty (50) mL of the saturated culture were then transferred into 5 L of LB Broth Miller medium and grown up to 0.8 OD_{600} before starting induction by IPTG (0.1 mM). After 4 hours of incubation at 30°C and shaking (220 rpm), cells were harvested ($1,000\times g$ for 30min at 4°C) and resuspended in 200 mL of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 10 mM Imidazole and sonicated on ice for 5 min. Cell debris was pelleted by centrifugation at $13,000\times g$ for 1 hour at 4°C . The supernatants were filtered through 0.45 μm Durapore filters (Millipore, Bedford, MA, USA).

The recombinant 30 kDa protein presents in the supernatant, was purified under native conditions according to the manufacturer's instruction using HisTrap HP columns (AKTA purifier 10 GEH, GE Healthcare, France). The 30 kDa protein was loaded with an Aekta fast protein liquid chromatography (LC; GE Healthcare, Glatbrugg, Switzerland) onto a His-Trap HP 5-mL column (GE Healthcare, Cat. No. 17-5248-02), which was equilibrated with Buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 10 mM Imidazole). After protein binding, the column was washed with 10 column volumes of Buffer A and then re-equilibrated with Buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 500 mM Imidazole). Bound proteins were eluted with Buffer B. The fractions containing the His-tagged recombinant proteins were selected based on the profile obtained by SDS-PAGE and were then pooled. To eliminate

contaminant proteins, pooled fractions of each recombinant protein were further purified by gel filtration on HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) gel filtration column in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl.

After protein purification, fractions containing the 30 kDa protein were collected and concentrated using a Centricon of 5 kDa cut-off (Amicon, USA) and then stored at 4°C. The 30 kDa protein concentration was measured using a Lowry DC Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

SDS-PAGE, In-gel digestion, and mass spectrometry analysis

The purities of purified extract were assessed by SDS-PAGE, and 30 kDa recombinant protein position was verified by immunoblot using an anti-His-Tag antibody (1/5000) (Invitrogen), as previously described [44]. The identity of the respective detected band was confirmed by mass spectrometry (MS) as previously described [45]. Briefly, 5 µg of the purified recombinant protein was reduced in a Tris buffer containing dithiothreitol (1% w/v, Sigma), boiled for 5 min, and loaded onto a 12% polyacrylamide gel before being separated using a Mini PROTEAN II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After electrophoresis, gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Imperial Protein Stain, Thermo scientific) and scanned with a high-resolution densitometer scanner (Image Scanner 3, GE Healthcare) and densitometry profiles were analyzed using the ImageQuant TL software (GE Healthcare). Protein bands from gels were excised for further identification by mass spectrometry. Molecular weights were estimated by comparison with standard molecular weight markers (Bio-Rad).

Excised bands were digested overnight at 37°C with sequencing-grade trypsin (12.5 µg/mL; Promega Madison, WI, USA) in 50 mM NH₄HCO₃ (Sigma). The resulting peptides were extracted with 25 mM NH₄HCO₃ for 15 min, dehydrated with acetonitrile (Sigma), incubated with 5% acid formic (Sigma) for 15 min under agitation, then dehydrated with acetonitrile, and finally completely dried using a SpeedVac. The samples were then analyzed on a MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) for identification. The quantity of recombinant protein produced was estimated using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). We also verified that the 30kDa salivary protein is the main immunogenic component of the recombinant solution. Western blots were carried out on sera from individuals naturally exposed to *Culex* bites who were previously tested by ELISA [35].

Evaluation of human IgG level for *Cx. quinquefasciatus* SGE and the 30 kDa recombinant protein

IgG level to SGE and 30 kDa recombinant protein was measured by indirect ELISA. Ninety-six (96) well Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with SGE or the 30 kDa recombinant protein at a final concentration of 1 µg/ml in coating buffer (PBS) and incubated for 150 min at 37°C. Plates were blocked with 200 µL of protein-free Blocking Buffer (Thermo Scientific, Rockford, USA) and incubated for 60 min at 37°C. Individual sera were diluted in buffer (PBS-Tween 1%) and incubated at 4°C overnight at a final dilution of 1/200. Monoclonal mouse biotinylated anti-human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA) was added in at a 1/2000 dilution (PBS-Tween 1%) for 90 min at 37°C. Peroxidase-conjugated streptavidin (GE Healthcare, Orsay, France) was then added (1/1000 in PBS-Tween 1%) for 60 min at 37°C. Colorimetric development was carried out with 2,2'-azino-bis ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) diammonium salt (sigma, Saint-Louis, MO, USA) in 50 mM citrate buffer (pH = 4 containing 0.003% H₂O₂) and absorbance (optical density [OD]) was measured at 405 nm (Multi-skan GO Thermo Scientific). Each sample was tested in duplicate wells containing SGE or the 30 kDa protein and in a well without antigen to measure non-specific reactions. Individual

results were expressed as the ΔOD value: $\Delta OD = OD_x - OD_n$, where OD_x represents the mean of the individual OD value in both wells with salivary antigen and OD_n the individual OD value in a blank well containing no antigen.

Protein sequence analysis

Arthropod protein sequences related to the 30 kDa protein sequence (gi|170033701; XP_001844715.1) of *Cx. quinquefasciatus* were retrieved from the NCBI using the BLASTp program. For each species, when several hits were found, sequences presenting more than 90% identity were excluded and the protein homolog producing the best score was chosen for further protein sequence comparisons between orthologs, *i.e.* percent identity and sequence alignment. The sequences of *Cx. tarsalis* orthologs identified previously [25] were retrieved manually from the NCBI nucleotide database. PSI-Blast iterations were run to retrieve all sequences with E-value below the threshold of 0.001. Multiple sequence alignment was performed using the Clustal Omega program (EMBL-EBI search and sequence analysis tools: www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) and the multiple alignment viewer MView 1.63 (EMBL-EBI).

Statistical data analysis

Statistical analyzes were done using Graph Pad Prism 5 software (San Diego, CA) and R (Version 3.5.3, R Core Team, Vienna, Austria). After checking that our data did not follow a Gaussian distribution (normal distribution), the non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the Ab levels between two independent groups and the non-parametric Kruskal-Wallis test used to compare the levels of Abs between more than two groups and the Dunn's post-hoc test was also performed for two-by-two comparisons in more than three groups. The Spearman's rank correlation test was used to analyze the correlation between the OD of tested sera with recombinant 30 kDa and total SGE in each high exposed study site to *Cx quinquefasciatus*. The human biting rate (HBR) was compared between sites by using the prop. test testing the null hypothesis that the proportions in several groups are the same.

Univariate analysis was conducted with each covariate, and multivariate linear regression analyses were performed with all covariates with a *p-value* set at < 0.20 in univariate analysis. Final models were adjusted by backward selection and removing non-significant variables at *p-value* > 0.05 . Maximum likelihood methods were used to identify the best-fitting models according to AIC value (Akaike Information Criterion). All differences were considered significant at a *p-value* < 0.05 .

Results

Specificity of the 30 kDa salivary protein sequence in phylum Arthropoda

A BLASTp search for the 30 kDa protein (gi|170033701) in the NCBI database retrieved the orthologous sequences in different species of the phylum Arthropoda. All sequences displaying a significant E-value (< 0.001) were proteins of mosquito species belonging to the *Culicidae* family. Among them, *Cx. pipiens pallens* and *Cx. tarsalis* orthologs showed high sequence identity (91% and 68%, respectively) and high protein coverage (96% and 92%, respectively) with the *Cx. quinquefasciatus* protein sequences. All the other proteins encoded in the phylum Arthropoda displayed a lower sequence identity ($\leq 39\%$). Outside the *Culex* genus, proteins presenting the highest identities were from *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* (with 36% and 39% identity, and 76% and 49% for coverage, respectively), whereas the orthologs found in *Anopheles* species displayed a lower identity ($< 34\%$). Alignment of the orthologous sequences of the

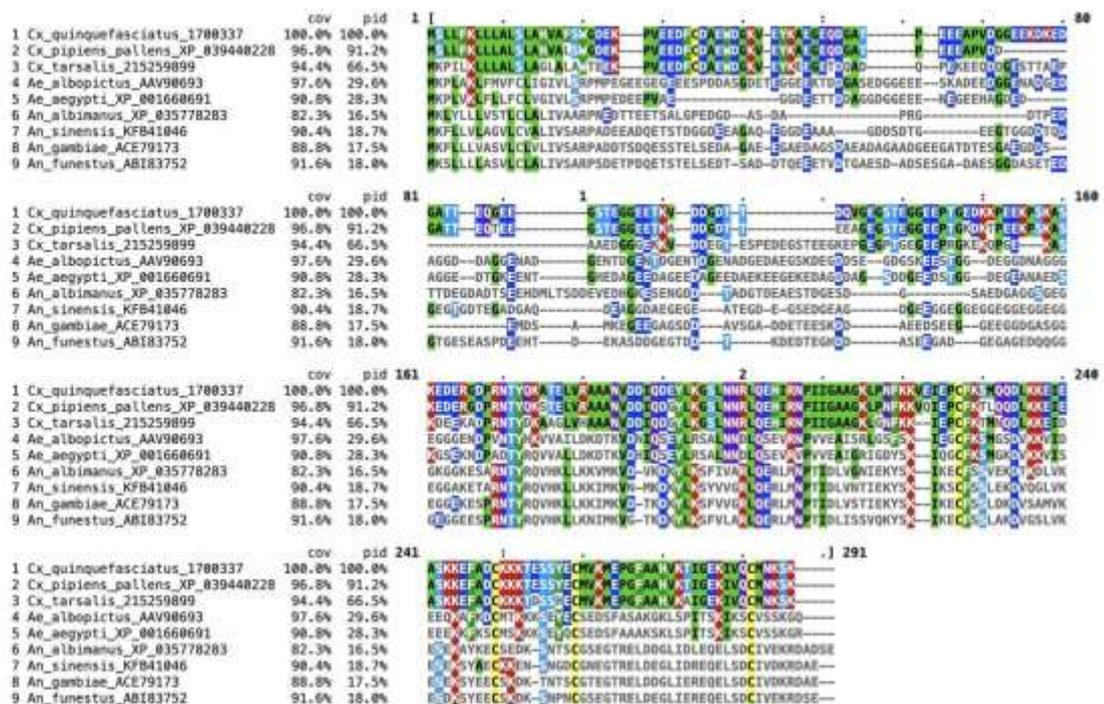


Fig 2. Alignment of arthropod protein orthologs of the 30 kDa protein from *Cx. quinquefasciatus*. Species, accession numbers, percentage of protein coverage (cov), percentage of identical amino acid residues (pid) and amino acid positions are indicated. Residues identical to the reference sequence of *Culex quinquefasciatus* are highlighted in different colors according to the amino acid properties. For each species the protein homolog producing the best score was selected for the alignment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.g002>

Cx. quinquefasciatus 30 kDa protein in each species presenting the best score value is presented in Fig 2. Using Clustal Omega, the whole sequence of the proteins was considered for the calculation of the alignment cover and the identity percentages. These identity values dropped to about 30% and 28% for *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*, respectively, and to 19 to 16% in the different *Anopheles* species.

Apart from the different *Culex* species, the percentage of the orthologous sequence matching the *Cx. quinquefasciatus* sequence is below 30%. No more than 4 to 5 consecutive identical residues are observed between the *Cx. quinquefasciatus* sequence and its orthologs in *Aedes* species, or *Anopheles* species, respectively. Altogether, this suggests that the 30 kDa protein presents a high specificity to the *Culex* species for which genomic data are available.

Production of the 30 kDa recombinant protein

Fractions containing purified 30 kDa protein were separated and analyzed by SDS-PAGE. A representative purified fraction is presented in S1 Fig. The recombinant 30 kDa protein has a predicted molecular mass of 27.71 kDa (249 amino acids), and in-gel SDS-PAGE a protein band at approximately 30 kDa was detected. This protein band of interest was excised from the gel and submitted to MS analysis, confirming that the detected band corresponded to the expected 30 kDa salivary recombinant protein (S1 Table). The relative abundance of the

Table 1. Study population characteristics and entomological data according to the study sites.

	Dar-es-Salam	Kennedy	N'Gattakro	Petesson	Total	<i>p</i>
Demographic data						
<i>n</i> (%)	47 (21.07)	57 (25.56)	59 (26.46)	60 (26.91)	223	
Age, mean ^a (95% CI)	6.23 (5.44–7.02)	7.38 (6.4–8.35)	8.26 (7.34–9.18)	6.88 (5.94–7.84)	7.23 (6.77–7.70)	0.022
Age group ^a (%)						
[1–4]	14 (29.79)	14 (24.56)	11 (18.60)	20 (33.30)	-	
[5–9]	29 (61.70)	26 (41.61)	20 (33.90)	23 (38.30)	-	0.021
[10–14]	04 (08.51)	17 (29.82)	28 (47.50)	17 (28.30)	-	
Gender ratio (male/female)	0.95 (23/24)	0.9 (27/30)	1.27(33/26)	1.14(32 /28)	1.06 (115/108)	0.640
ITNs usage rate (%) ^b	55.3	49.1	64.4	63.3	58.3	0.787
Human biting rate (BHN)						
<i>Culex quinquefasciatus</i>	11.7	9.8	9	0.2	-	<0.001
<i>Culex annulatus</i>	0.1	0.1	0	0.1	-	0.98
<i>Culex decens</i>	0.6	0.4	0.6	0.1	-	0.675
<i>Anopheles gambiae</i>	0.4	12	2.2	35.2	-	<0.001

a: years

b: insecticide-treated net

c: bites/human/night

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.t001>

30-kDa protein was analyzed using ImageQuant TL software and results indicated that the purity of the protein was greater than 80%, which was considered sufficiently pure for ELISA experiments (S1 Table). Immunoblots showed the 30kDa recombinant protein as the main immunogenic component within the recombinant solution (S2 Fig).

Study population characteristics and entomological data according to the study sites

Population demographic data (gender ratio and age structure) and entomological data are presented for each study site in Table 1. The study population comprised 223 children aged from 1 to 14 years (mean age = 7.23; 95% confidence interval [CI] [6.77–7.70]). A statistically significant difference in the mean age of the children was observed between study sites ($p = 0.022$, Kruskal–Wallis test), and two-by-two comparison using Dunn's test indicated that the mean age was only significantly different between children from Dar-es-Salam and N'Gattakro (adjusted $p = 0.018$, Bonferroni method). The population age structure was significantly different between the four sites ($p = 0.021$). Overall, most children were in the 5 to 9 year age group, except in N'Gattakro where a higher number of children were between 10 and 14 years old. Very few children aged 10–14 years were recruited in Dar-es-Salam ($n = 4$), representing only 8% of the total number of children. The gender ratio was not significantly different between the study sites ($p = 0.640$, Pearson's chi-squared test).

The rate of insecticide-treated net (ITN) use was moderate, ranging from 49.1% to 64.4% in Kennedy and N'Gattakro, respectively. There were no statistically significant differences between sites ($p = 0.787$). Entomological catches showed the main anthropophilic mosquito species that were active during nighttime in each site (Table 1). *Culex quinquefasciatus* was the main mosquito species caught in N'Gattakro, and Dar-es-Salam, with a human biting rate (HBR) of 9 and 11.7 bites/human/night (BHN), respectively. Other *Culex* species were also collected but in a much lower proportion (*Cx. annulatus*, *Cx. decens*, and *Cx. cinereus*). Only four *Culex* mosquitoes (two *Cx. quinquefasciatus*, one *Cx. decens*, and one *Cx. cinereus*) were

captured in Petessou village. *Anopheles (An.) gambiae* was also recorded in the study sites and had the highest HBR in Petessou (35.2 BHN), while almost no *An. gambiae* was collected in Dar-es-Salam (HBR = 0.4 BHN). In Kennedy, *An. gambiae* was the main species caught (12 BHN) but *Culex quinquefasciatus* HBR was high and similar to those from N'Gattakro (9.8 BHN). According to entomological data, Petessou can thus be considered as a control village with very low exposure to *Culex*, and N'Gattakro, Kennedy, and Dar-es-Salam as the highly exposed sites.

IgG responses to *Culex quinquefasciatus* SGE and the 30 kDa recombinant protein in children according to study sites

First, we tested the specific recognition of the SGE and of the recombinant protein in sera from individuals exposed to *Culex* bites. We also compared the IgG responses specific to both salivary antigens in individuals according to the site. Children from sites with high exposure to *Culex* (Dar-es-Salam, Kennedy, and N'Gattakro) and from site with low exposure (Petessou) presented a wide range of IgG responses to SGE (ΔOD -SGE; Fig 3A) and to the 30 kDa recombinant protein (ΔOD -30 kDa; Fig 3B). The median level of SGE-specific IgG was significantly different between sites ($p = 0.0005$). Running two-by-two comparisons test with Dunn's test, the median level of SGE-specific IgG was statistically higher in Dar-es-Salam and Kennedy than in Petessou village ($p = 0.005$ and $p = 0.001$, respectively). No statistical difference was observed between N'Gattakro and Petessou ($p = 0.290$). The level of IgG response to the 30 kDa recombinant protein differed significantly also between the four study sites ($p = 0.0364$), but no significant difference was noted between sites after a two-by-two comparison with Dunn's test (adjusted $p > 0.05$ for all comparisons). The number of participants in each village was quite small, so we estimated the precision of the two-by-two comparison tests with post hoc power analysis. The statistical power of the analysis on the IgG response to the SGE ranged from 38,9% (Petessou- Ngattakro) to 93,4% (Petessou-Kennedy) while it ranged from 5,4% (Petessou-Ngattakro) to 25,4% (Petessou-Kennedy) for the recombinant protein.

No significant differences in specific IgG responses were noted between children from the three sites with a high exposure to *Culex* (Dar-es-Salam, Kennedy, and N'Gattakro) using SGE ($p = 0.134$) or the 30 kDa recombinant protein ($p = 0.098$) as antigen source.

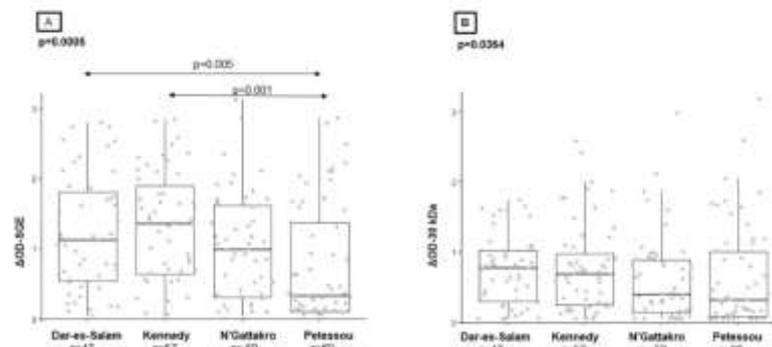


Fig 3. IgG responses to *Cx. quinquefasciatus* SGE and the 30 kDa recombinant protein in the four study sites. Each dot represents an individual and box plots indicate the median value, 25th and 75th percentile IgG response (ΔOD) against SGE (A) and the 30 kDa (B). The number of processed sera is indicated below (n). Significant p -values are indicated above the plots.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.g003>

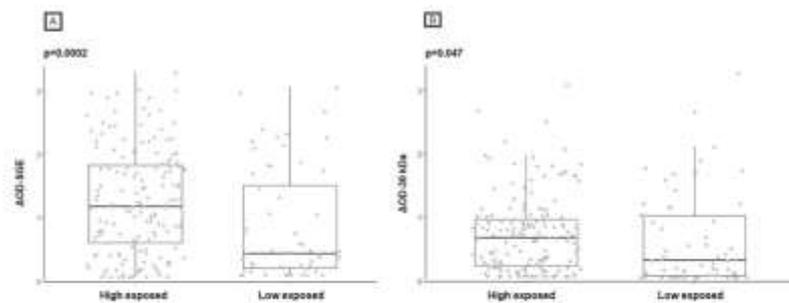


Fig 4. IgG responses to *Cx. quinquefasciatus* SGE and the 30 kDa recombinant protein according to level of exposure of sites. Each dot represents the an individual and the box plots indicate the median value, 25th and 75th percentile IgG response (ΔOD) against SGE (A) and the 30 kDa (B). The number of processed sera is indicated below (n). Significant *p*-values are indicated above the plots.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.g004>

IgG responses to *Culex quinquefasciatus* SGE and the 30 kDa recombinant protein in children according to the level of exposure to study sites

To assess the capacity of the IgG responses to discriminate high exposure and low exposure to *Culex* bites, we compared the level of specific IgG responses between individuals living in sites with high exposure to *Culex* (Dar-es-Salam, Kennedy, and N'Gattakro) and from the control village (Petessou with low exposure to *Culex*). The levels of IgG response to SGE (Fig 4A) and the 30 kDa protein (Fig 4B) were significantly higher in children with high exposure to *Cx. quinquefasciatus* bites than in children from the site with low exposure ($p = 0.0002$ and $p = 0.047$, respectively).

IgG responses to SGE and to 30 kDa recombinant protein according to socio-demographic factors

The specific IgG responses were analyzed according to major socio-demographic characteristics (age, gender, ITNs use) and sites to identify those that could be associated with the anti-saliva IgG responses. After univariate analysis, all covariates with a *p*-value lower than 0.20 were retained in the final multivariate analysis. The results of the univariate analysis showed that age (considered as continuous or categorical variable) and gender were not associated with IgG response to SGE and to the recombinant protein (Table 2). There was an association between specific IgG responses and study sites, and the anti-30 kDa IgG response was significantly negatively associated with the use of ITNs.

Multivariate linear regression analysis and final modeling showed that only the anti-SGE IgG response was statistically significantly associated with the study site, with higher IgG levels detected in sites with high exposure to *Culex* (Dar-es-Salam, Kennedy, and N'Gattakro) (Table 3). No association was found between sites and anti-30 kDa IgG response. The use of ITNs was negatively associated with the IgG antibody levels against the two antigens but the effect was only significant for the anti-30-kDa IgG response (estimate = -0.192 and $p = 0.022$).

Correlation between IgG level against SGE and the 30 kDa protein

The IgG antibody levels against the two salivary antigens were compared for each child individually in the four sites using a Spearman's rank correlation test, and the corresponding *p*-

Table 2. Univariate analysis of IgG Ab level (median) against SGE and the 30 kDa protein.

	n	Median of IgG to SGE	p	Median of IgG to 30 kDa	p
Age group (years)			0.76		0.21
[1–4]	59	0.936	Reference	0.417	Reference
[5–9]	98	0.841	1	0.445	1
[10–14]	66	1.026	1	0.645	0.27
Gender			0.756		0.315
Male	115	0.989		0.594	
Female	108	0.854		0.411	
ITNs use			0.06		0.047
No	93	1.063		0.581	
Yes	130	0.830		0.430	
Sites			0.0005		0.036
Petessou	60	0.332	Reference	0.268	Reference
Dar-es-Salam	47	1.120	0.002	0.736	0.079
Kennedy	57	1.348	0.0005	0.649	0.062
N'Gattakro	59	0.989	0.1451	0.344	1

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.t002>

values were determined (Fig 5). A moderately significant positive correlation between the two IgG responses was found when all sites were considered together ($r = +0.63$, $p < 0.0001$).

Discussion

We investigated the Ab responses to salivary components of *Culex quinquefasciatus* in children differently exposed to *Culex* bites in order to assess whether the specific IgG responses represent a serological biomarker of human exposure to *Culex* bites. We analyzed IgG responses both to whole SGE and to the 30 kDa salivary recombinant protein. This protein belongs to the 30 kDa family and orthologs have been described in *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes [23]. BLAST multiple alignments indicated that this protein has a low identity (<40%) and a low number of contiguous identical residues ($n < 5$) with orthologs retrieved from *Aedes* or *Anopheles* mosquitoes, suggesting low cross-reactivity. The high sequence identity observed between the *Cx. quinquefasciatus* 30 kDa salivary protein and orthologs in two others *Culex* species suggest that the IgG response specific to the recombinant protein could be a biomarker to assess the exposure to various *Culex* species. Nevertheless, the lack of published genomic data from others *Culex* species limits the comparison.

Table 3. Multivariate analysis of specific IgG levels to SGE and to the 30 kDa in children.

	SGE		30 kDa protein	
Final model	$R^2 = 0.06$	$p = 0.002$	Adj. $R^2 = 0.019$	$p = 0.022$
Covariates	Estimate	p	Estimate	p
Sites		0.002		
Petessou	Reference		-	-
Dar-es-Salam	0.467	0.003	-	-
Kennedy	0.494	0.001	-	-
N'Gattakro	0.244	0.1	-	-
ITNs use				
No	Reference		Reference	
Yes	-0.144	0.192	-0.193	0.022

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.t003>

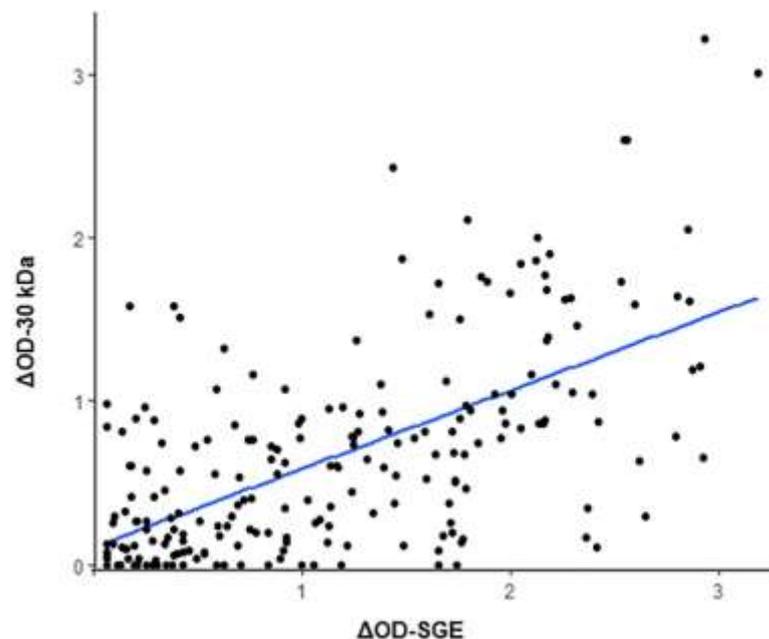


Fig 5. Correlation between IgG specific response to *Cx. quinquefasciatus* SGE and the 30 kDa recombinant protein. Scatter plot analysis of IgG responses to both salivary antigens is presented, and the Δ OD values among the 223 children are reported.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010004.g005>

We detected a mild-to-high reactivity to whole SGE and to the 30 kDa recombinant protein among the children, thus indicating antigenic properties in naturally exposed population to *Culex* bites. We then compared the IgG levels between children living in sites with high exposure or low exposure to *Culex* mosquitoes. Significantly higher IgG response to SGE and to the 30 kDa recombinant protein was detected in children living in sites with a high exposure to *Culex* (all "high exposed" sites taken together). The heterogeneity of SGE-specific IgG levels within the same site might reflect heterogeneous exposure to *Culex* bites. The intensity of exposure in a given population living in the same area can obviously vary between individuals. Indeed, *Culex* abundance is dependent on the presence of breeding sites and on the distance of these sites to the household. Biting intensity may be also related to human individual characteristics such as the attraction of mosquitoes, personal protection to avoid bites, and activities (indoor, outdoor).

Unexpectedly, children from Petessou, the control village where very few *Culex* were caught during entomological studies, presented significant and varying levels of IgG to SGE and to the 30 kDa protein. *Anopheles* mosquitoes were the main *Culicidae* species reported in this site, and we cannot exclude cross-reactivity with ubiquitous proteins present in the saliva of other mosquito genera, including *Anopheles*. This can be a reason for much higher antibody response to SGE than to 30 kDa protein in Kennedy, where both *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* were captured in high number. Entomological catches were carried out at night-time, which is not suitable for detecting the presence of *Aedes* mosquitoes that were probably also present in the sites but most active during the day-time. In addition, the HLC

technique may lack sensitivity in a low exposure context that may result in an under estimation of *Culex* HBR in Petessou.

Nevertheless, children from any of the higher exposed sites to *Culex* bites had significantly higher IgG levels against SGE compared with children from Petessou (with low exposure), suggesting that an anti-SGE IgG response may help determine exposure to *Culex* bites. On the contrary, the anti-30 kDa IgG response was lower in the control village compared with any of the sites with high exposure to *Culex* but the differences were not significant. The low number of participants limited the power of statistical analysis when study sites are considered individually, particularly for the IgG response to the recombinant protein. We also showed that the IgG response to SGE or to the 30 kDa recombinant protein was similar between the three sites where entomological data reported comparable HBR for *Culex*. Global correlation analysis showed a moderate correlation between the two IgG responses.

We assessed different factors related to the IgG response with univariate and multivariate analysis. According to age and gender, no significant difference was noted between the median levels of anti-SGE and anti-30 kDa protein IgG, suggesting that neither age nor gender affect the level of specific IgG responses in the present study. This is surprising because the immune response to specific antigens is known to be acquired progressively with age. The absence of an association with age in our study suggest Ab responses to these salivary antigens may not be cumulative over time but wane rapidly. Previous studies showed the short half-life of anti-saliva Ab response in individuals naturally exposed to *Anopheles* [17] or *Aedes* [46] bites. This represents the main quality when monitoring exposure over time. In our study population, the age ranged from 1 to 14 years, limiting the comparison of immune responses in older groups.

Culex mosquitoes are most active during the night-time and the use of ITNs could have a major impact on human-*Culex* contact and thus on anti-saliva Ab responses. The use of bed nets was negatively associated with the IgG response to SGE and to the 30 kDa protein, with children who reported sleeping under a bed net having significantly lower IgG levels (univariate analysis). The rate of ITN use was similar between sites and thus may not explain the variation in specific IgG levels between sites.

Final models from the multivariate analysis indicated that IgG response to SGE depended on the study site, with a higher IgG response in sites with a high exposure to *Culex*. The use of ITNs was also found in the final model, but it did not seem to have a significant effect, whereas it was the only factor associated with the anti-30 kDa IgG response. Nevertheless, we did not consider the physical integrity of the bed nets, which may also alter their efficacy. Additional factors could also influence the Ab response, such as the history of exposure, co-infection, genetic background, or nutritional status [47–50]. Such data were not available in the present study and future epidemiological studies are needed to investigate additional factors (biological, environmental, or behavioral) that may influence the immune response to salivary antigens.

Altogether, these results suggest that the IgG response to SGE may represent a proxy of human exposure to *Culex* bites. A limitation to its use is related to the low specificity of these antigens with probable ubiquitous proteins shared between arthropods. The IgG response to the 30 kDa recombinant protein significantly varied between children with high exposure to *Culex* (taken together) and from the control village, but not when higher exposed sites are taken individually. However, the negative association between ITNs use and the IgG response to the 30 kDa can suggest that the 30 kDa protein might represent a potential biomarker candidate which can evaluate children's exposure to *Culex* bites in a certain context. Additional studies should evaluate the 30 kDa candidate in a larger cohort of volunteer including older individuals (adults) and/or in other epidemiological contexts (higher *Culex* density). It would

be also of interest to test IgG isotypes to assess if others antibody responses would be more relevant as biomarker of exposure.

Culex mosquitoes are vectors of numerous pathogens, parasites, and viruses of human and livestock. The availability of a serological tool evaluating individual exposure to *Culex* bites would be valuable for assessing the risk of exposure and transmission of related pathogens. Similar serological biomarkers have been developed for *Anopheles* and *Aedes* bites and have shown potential application for the evaluation of vector control efficacy. More studies are needed to assess the sensitivity of such serological biomarkers in order to detect small-scale spatial or temporal variation in *Culex* exposure.

Supporting information

S1 Fig. Assessment of purification recombinant form of the 30 kDa protein from *Cx. quinquefasciatus* expressed in *E. coli*. A total of 5 μ g of the collected fraction was loaded per well. Band identity is listed in [S1 Table](#). Standard molecular weights are indicated on the left side (MW; molecular weight, kDa).
(TIF)

S2 Fig. Assessment of Human IgG response against the 30kD recombinant protein. (A) Scatter plots of Human IgG antibody responses against the purified recombinant 30kD protein from *Cx. quinquefasciatus*. Sera from six individuals per site (Marseille, Fos/Mer and Camargue) exposed to *Cx. pipiens* bites were tested by ELISA. Individuals with high and low level of IgG responses were found in each site. **(B)** Western blot of Human IgG antibody responses against the purified recombinant 30kDa protein from *Cx. quinquefasciatus*. A total of 23 μ g of 30kDa recombinant protein was loaded onto a 10% SDS-PAGE gel (1-well of 7 cm). The immunoblots were performed by transferring the SDS-PAGE gel onto a nitrocellulose membrane. Sera from the same individuals were tested, diluted 1:100. The secondary antibody was diluted at 1:5000. Control anti-His-tag antibody was diluted 1:5000. The arrow and asterisks (*) indicate the position of the 30kD recombinant protein, detected by sera and anti-His-tag antibody, respectively. The number of each sample are indicated at the top of the WB. The individuals with high IgG responses against 30kDa in ELISA, were indicated in bold.
(TIF)

S1 Table. Quantity of purified recombinant salivary protein identified by mass spectrometry.
(TIF)

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the populations of Bouaké's health district neighborhoods (Dar-es-Salaam, Kennedy, N'Gattakro, and Petessou), especially householders and guardians of children, for their kind support and collaboration. We would also like to especially thank Isabella Athanassiou (Bonn, Germany) for language editing and Arsene K. Adou for generating the map.

Author Contributions

Conceptualization: Franck Remoue, Lionel Almeras, Anne Poinsignon.

Formal analysis: Bi Zamble H. Zamble, Françoise Mathieu-Daudé.

Funding acquisition: Akré M. Adja, Franck Remoue.

Investigation: Bi Zamble H. Zamble, Serge S. Yao, Akré M. Adja, Mahfoud Bakli, Dounin D. Zoh, Serge B. Assi.

Methodology: Franck Remoue, Lionel Almeras, Anne Poinsignon.

Resources: Akré M. Adja, Franck Remoue, Lionel Almeras.

Supervision: Anne Poinsignon.

Validation: Anne Poinsignon.

Visualization: Bi Zamble H. Zamble.

Writing – original draft: Bi Zamble H. Zamble.

Writing – review & editing: Bi Zamble H. Zamble, Françoise Mathieu-Daudé, Franck Remoue, Lionel Almeras, Anne Poinsignon.

References

- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Anderson JF, Vosbrinck CR. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerg Infect Dis*. 2006 Mar; 12(3):468–74. <https://doi.org/10.3201/eid1203.051004> PMID: 16704786
- Shahhosseini N, Friedrich J, Moosa-Kazemi SH, Sedaghat MM, Kayedi MH, Tannich E, et al. Host-feeding patterns of *Culex* mosquitoes in Iran. *Parasit Vectors*. 2018 Dec 27; 11(1):669. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3237-2> PMID: 30587194
- Diaz-Badillo A, Bolling BG, Perez-Ramirez G, Moore CG, Martinez-Munoz JP, Padilla-Viveros AA, et al. The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasit Vectors*. 2011 May 9; 4:70. <https://doi.org/10.1186/1758-3305-4-70> PMID: 21554725
- Nchoutpouen E, Talipouo A, Djiappi-Tchamen B, Djamouko-Djonkam L, Kopya E, Ngadjou CS, et al. *Culex* species diversity, susceptibility to insecticides and role as potential vector of Lymphatic filariasis in the city of Yaoundé, Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Apr; 13(4):e0007229. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007229> PMID: 30943198
- Nyaruba R, Mwaliko C, Mwaui M, Mousa S, Wei H. Arboviruses in the East African Community partner states: a review of medically important mosquito-borne Arboviruses. *Pathog Glob Health*. 2019 Jul; 113(5):209–28. <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1678939> PMID: 31664886
- Brugman VA, England ME, Stoner J, Tugwell L, Harrup LE, Wilson AJ, et al. How often do mosquitoes bite humans in southern England? A standardised summer trial at four sites reveals spatial, temporal and site-related variation in biting rates. *Parasit Vectors*. 2017 Sep 15; 10(1):420. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2380-9> PMID: 28915829
- Yoko FN, Zahouli JBZ, Méité A, Opoku M, Kouassi BL, de Souza DK, et al. Low transmission of *Wuchereria bancrofti* in cross-border districts of Côte d'Ivoire: A great step towards lymphatic filariasis elimination in West Africa. *PLoS One*. 2020; 15(4):e0231541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231541> PMID: 32282840
- Cabre O, Durand JP, Prangé A, Gomez J, Maurizi L, Tokou H, et al. [West Nile virus infection: serological investigation among horses in France and in Africa]. *Med Trop Rev Corps Sante Colon*. 2005 Nov; 65(5):439–43. PMID: 16465812
- World Health Organization – Organisation mondiale de la Santé. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2017 – Programme mondial pour l'élimination de la filariose lymphatique: rapport de situation, 2017. *Wkly Epidemiol Rec Relevé Épidémiologique Hebd*. 2018 Nov 2; 93(44):589–602.
- Wilson AL, Courtenay O, Kelly-Hope LA, Scott TW, Takken W, Torr SJ, et al. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Jan; 14(1):e0007831. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007831> PMID: 31945061
- Shaukat AM, Breman JG, McKenzie FE. Using the entomological inoculation rate to assess the impact of vector control on malaria parasite transmission and elimination. *Malar J*. 2010 May 12; 9:122. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-122> PMID: 20459850
- Bolling BG, Barker CM, Moore CG, Pape WJ, Eisen L. Seasonal patterns for entomological measures of risk for exposure to *Culex* vectors and West Nile virus in relation to human disease cases in

- northeastern Colorado. *J Med Entomol*. 2009 Nov; 46(6):1519–31. <https://doi.org/10.1603/033.046.0641> PMID: 19960707
13. Ndebele P, Musesengwa R. View point: Ethical dilemmas in malaria vector research in Africa: making the difficult choice between mosquito, science and humans. *Malawi Med J J Med Assoc Malawi*. 2012 Sep; 24(3):65–8. PMID: 23638277
 14. Ribeiro JMC, Francischetti IMB. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol*. 2003; 48:73–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.060402.102612> PMID: 12194906
 15. Doucoure S, Cornelle S, Drame PM, Marie A, Elanga Ndille E, Mathieu-Daudé F, et al. Biomarker of Vector Bites: Arthropod Immunogenic Salivary Proteins in Vector-Borne Diseases Control. In: Springer, editor. *General Methods in Biomarker Research and their Applications*. Dordrecht: Springer, Dordrecht; 2015. p. pp 1177–1205. (Preedy V, Patel V, editors. *Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*).
 16. Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C, Herve J-P, Boulanger D, et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006 Apr; 100(4):363–70. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.032> PMID: 16310235
 17. Drame PM, Poinsignon A, Besnard P, Le Mire J, Dos-Santos MA, Sow CS, et al. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Jul; 83(1):115–21. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0684> PMID: 20595489
 18. Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Missé D, Pagès F, Fusai T, et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit Vectors*. 2011 Sep 28; 4:187. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-187> PMID: 21951834
 19. Doucoure S, Mouchet F, Cornelle S, DeHecq JS, Rutee AH, Roca Y, et al. Evaluation of the human IgG antibody response to *Aedes albopictus* saliva as a new specific biomarker of exposure to vector bites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(2):e1487. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001487> PMID: 22363823
 20. Das S, Radtke A, Choi Y-J, Mendes AM, Valenzuela JG, Dimopoulos G. Transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. *BMC Genomics*. 2010 Oct 14; 11:566. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-566> PMID: 20946652
 21. Lombardo F, Ronca R, Rizzo C, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Curra C, et al. The *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: an anopheline-specific protein with a blood-feeding role. *Insect Biochem Mol Biol*. 2009 Jul; 39(7):457–66. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.04.006> PMID: 19442731
 22. Ribeiro JMC, Charlab R, Pham VM, Garfield M, Valenzuela JG. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004 Jun 1; 34(6):543–63. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.02.008> PMID: 15147756
 23. Arca B, Lombardo F, Valenzuela JG, Francischetti IM, Marinotti O, Coluzzi M, et al. An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol*. 2005; 208:3971–86. <https://doi.org/10.1242/jeb.01849> PMID: 16215223
 24. Arca B, Lombardo F, Francischetti IM, Pham VM, Mestres-Simon M, Andersen JF, et al. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007 Feb; 37(2):107–27. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.10.007> PMID: 17244540
 25. Calvo E, Sanchez-Vargas I, Favreau AJ, Barbian KD, Pham VM, Olson KE, et al. An insight into the sialotranscriptome of the West Nile mosquito vector, *Culex tarsalis*. *BMC Genomics*. 2010 Jan 20; 11:51. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-51> PMID: 20089177
 26. A P, S C, M M-S, A L, M R, D B, et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One*. 3. 2008. 2472 p. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002472> PMID: 18575604
 27. Rizzo C, Lombardo F, Ronca R, Mangano V, Sirima SB, Nèbié I, et al. Differential antibody response to the *Anopheles gambiae* gSG6 and cE5 salivary proteins in individuals naturally exposed to bites of malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2014 Nov 28; 7:549. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0549-8> PMID: 25428638
 28. Elanga Ndille E, Doucoure S, Damien G, Mouchet F, Drame PM, Cornelle S, et al. First attempt to validate human IgG antibody response to Nterm-34kDa salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to *Aedes aegypti* bites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(11):e1905. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001905> PMID: 23166852
 29. Kulthanan K, Wongkamchai S, Triwongwanat D. Mosquito allergy: clinical features and natural course. *J Dermatol*. 2010 Dec; 37(12):1025–31. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2010.00958.x> PMID: 21083704
 30. Opasawatchai A, Yolwong W, Thuncharoen W, Inrueangsri N, Itsaradisakul S, Sasisakulporn C, et al. Novel salivary gland allergens from tropical mosquito species and IgE reactivity in allergic patients.

- World Allergy Organ J. 2020 Feb; 13(2):100099. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100099> PMID: 32099589
31. Wongkamchai S, Techasintana P, Wisuthsarewong W, Kulthanan K, Sutthipinittharm P, Eakpo P. Analysis of IgE-binding allergens in *Culex quinquefasciatus* saliva protein in mosquito bite allergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. 2007 Feb; 98(2):200–1. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)80698-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)80698-9) PMID: 17304892
 32. Peng Z, Li H, Simons ER. Immunoblot Analysis of IgE and IgG Binding Antigens in Extracts of Mosquitoes *Aedes vexans*, *Culex tarsalis* and *Culiseta inornata*. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996; 110(1):46–51. <https://doi.org/10.1159/000237309> PMID: 8645977
 33. Peng Z, Simons FE. Cross-reactivity of skin and serum specific IgE responses and allergen analysis for three mosquito species with worldwide distribution. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Aug; 100(2):192–8. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70224-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70224-0) PMID: 9275140
 34. Das MK, Mishra A, Beuria MK, Dash AP. Human natural antibodies to *Culex quinquefasciatus*: age-dependent occurrence. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991; 7(2):319–21. PMID: 1895094
 35. Fontaine A, Pascual A, Oriandi-Pradines E, Diouf I, Remoué F, Pagès F, et al. Relationship between exposure to vector bites and antibody responses to mosquito salivary gland extracts. *PLoS One*. 2011; 6(12):e29107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029107> PMID: 22195000
 36. Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science*. 2010 Oct 1; 330(6000):86–8. <https://doi.org/10.1126/science.1191864> PMID: 20929810
 37. Ribeiro JMC, Martin-Martín I, Moreira FR, Bernard KA, Calvo E. A deep insight into the male and female sialotranscriptome of adult *Culex tarsalis* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2018 Apr; 95:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.001> PMID: 29526772
 38. Ribeiro JM, Martin-Martín I, Arcà B, Calvo E. A Deep Insight into the Sialome of Male and Female *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0151400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151400> PMID: 26996592
 39. Cornelle S, Remoué F, Doucoure S, Ndiaye T, Sauvage FX, Boulanger D, et al. An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. *Malar J*. 2007; 6:75. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-75> PMID: 17550586
 40. Calvo E, Pham VM, Marinotti O, Andersen JF, Ribeiro JMC. The salivary gland transcriptome of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* reveals accelerated evolution of genes relevant to hematophagy. *BMC Genomics*. 2009 Jan 29; 10:57. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-57> PMID: 19178717
 41. Traoré DF, Sagna AB, Adja AM, Zoh DD, Lingué KN, Coulibaly I, et al. Evaluation of malaria urban risk using an immuno-epidemiological biomarker of human exposure to *Anopheles* bites. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 98(5):1353–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0231> PMID: 29512479
 42. Aka KG, Traoré DF, Sagna AB, Zoh DD, Assi SB, Tchiekoi BN, et al. Pattern of antibody responses to *Plasmodium falciparum* antigens in individuals differentially exposed to *Anopheles* bites. *Malar J*. 2020 Feb 21; 19(1):83. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03160-5> PMID: 32085710
 43. Zoh DD, Ahoua Alou LP, Toure M, Penneier C, Camara S, Traore DF, et al. The current insecticide resistance status of *Anopheles gambiae* (s.l.) (Culicidae) in rural and urban areas of Bouaké, Côte d'Ivoire. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1).
 44. Vu Hai V, Pages F, Boulanger N, Audebert S, Parola P, Almeras L. Immunoproteomic identification of antigenic salivary biomarkers detected by *Ixodes ricinus*-exposed rabbit sera. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2013 Sep; 4(5):459–68. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.06.001> PMID: 23880749
 45. Ali ZMI, Bakli M, Fontaine A, Bakkali N, Vu Hai V, Audebert S, et al. Assessment of *Anopheles* salivary antigens as individual exposure biomarkers to species-specific malaria vector bites. *Malar J*. 2012 Dec 31; 11:439. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-439> PMID: 23276246
 46. Doucoure S, Mouchet F, Cornelle S, Drame PM, D'Ortenzio E, DeHeccq JS, et al. Human antibody response to *Aedes albopictus* salivary proteins: a potential biomarker to evaluate the efficacy of vector control in an area of Chikungunya and Dengue Virus transmission. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:746509. <https://doi.org/10.1155/2014/746509> PMID: 24822216
 47. Fillol F, Sarr JB, Boulanger D, Cisse B, Sokhna C, Riveau G, et al. Impact of child malnutrition on the specific anti-*Plasmodium falciparum* antibody response. *Malar J*. 2009 Jun 2; 8:116. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-116> PMID: 19490641
 48. Goncalves RM, Lima NF, Ferreira MU. Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. *Pathog Glob Health*. 2014 Jun; 108(4):173–8. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000139> PMID: 24854175

49. Dechavanne C, Sadissou I, Bouraima A, Ahouangninou C, Amoussa R, Milet J, et al. Acquisition of natural humoral immunity to *P. falciparum* in early life in Benin: impact of clinical, environmental and host factors. *Sci Rep.* 2016 Sep 27; 6:33961. <https://doi.org/10.1038/srep33961> PMID: 27670685
50. Elanga Ndille E, Doucoure S, Poinsignon A, Mouchet F, Cornelle S, D'Ortenzio E, et al. Human IgG Antibody Response to *Aedes* Nterm-34kDa Salivary Peptide, an Epidemiological Tool to Assess Vector Control in Chikungunya and Dengue Transmission Area. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Dec; 10(12): e0005109. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005109> PMID: 27906987

Principaux résultats de l'article

Hypothèse : Les antigènes salivaires (EGS et 30 kDa) de *Culex quinquefasciatus* peuvent représenter des candidats biomarqueurs d'exposition des populations humaines aux piqûres des *Culex*

Résultats : 1) Les réponses IgG anti-EGS et anti-30 kDa étaient de façon significative plus élevés chez les enfants vivant dans les sites avec une forte densité de *Culex* (Dar-es-Salam, Kennedy et N'Gattakro, classés par l'utilisation de données entomologiques) et par rapport à ceux vivant dans le site de faible densité de *Cx quinquefasciatus* (Petessou).

2) Les réponses IgG anti-30 kDa étaient de façon de signification plus élevées chez les enfants ne dormant pas sous les moustiquaires imprégnées d'insecticide par rapport à ceux dormant dessous (Estimate = -0,192 et $p=0,022$). Cela n'a pas été le cas avec les réponses IgG anti-EGS de *Cx quinquefasciatus*.

3) Il a été démontré une corrélation positive entre les réponses IgG anti-EGS et celles dirigées contre la protéine recombinante le 30 kDa de *Cx quinquefasciatus* au sein de la population totale. (Coefficient de corrélation $r=+0,63$, $p<0,0001$).

Conclusion : Les réponses IgG anti-EGS et anti-30 kDa pourraient constituer des biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition humaine aux piqûres de *Culex*.

D'autres études sont néanmoins nécessaires pour confirmer ces candidats sur une large cohorte, avec des classes d'âges plus larges, incluant les zones à forte densité vectorielle et intégrant des données entomologiques plus précises. Et cela pour confirmer le potentiel d'indicateur de niveau d'exposition de ces candidats biomarqueurs

IV. DISCUSSION GENERALE

Les travaux conduits dans cette thèse œuvrent à étoffer les outils de surveillance et de lutte implémentés dans le cadre du contrôle des arboviroses dont les agents pathogènes sont principalement transmis par les *Aedes* majeurs (*Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*) et *Culex quinquefasciatus*. La plupart de ces arboviroses sont encore sans thérapie et sans vaccin. Les techniques entomologiques actuelles sont largement sollicitées pour leur contrôle. Mais ces techniques entomologiques ne donnent pas toujours les résultats escomptés car elles présentent de nombreuses limites d'efficacité et opérationnelles. Elles sont difficiles à employer à une large échelle, la mesure des niveaux d'exposition aux piqûres et donc le risque de transmission des pathogènes aux humains se font à une échelle populationnelle et non individuelle. Certains outils présentent une inefficacité dans les contextes de faible densité vectorielles. Elles traduisent des mesures indirectes de niveaux de contact entre l'homme et le vecteur et donc quantifie, uniquement par extrapolation, le niveau de contact ou le risque de transmission des agents pathogènes aux hôtes vertébrés (utilisation des indices des stades immatures des *Aedes*). L'exploitation des réponses anticorps anti-salive totale ou anti-peptides salivaires des vecteurs sur cités dans notre thèse seraient ainsi complémentaires et une voie de réponses à ces limites présentées par des techniques entomologiques dans le contrôle des arboviroses. Des travaux antérieurs dans différents contextes ont présenté la pertinence d'utiliser ces réponses Ac spécifiques dans l'identification des zones et des personnes exposées aux piqûres des vecteurs (Remoue et al. 2006b; 2007; Doucoure, Mouchet, Cornelie, et al. 2012b; Doucoure, Mouchet, Cournil, et al. 2012; Elanga Ndille et al. 2012b; Ndille et al. 2014b; Elanga Ndille et al. 2016a; Sagna et al. 2018a; 2019). Dans le cadre de nos travaux de thèse, les objectifs se situaient à 2 niveaux : i) de quantifier le niveau d'Ac IgG et IgM dirigés contre le peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* dans les sérums de nos populations d'étude, afin d'évaluer leur niveau d'exposition aux piqûres des *Aedes* (*Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*) et donc le risque de transmission des arboviroses dans deux contextes (Afrique de l'Ouest, en Côte d'Ivoire et en Europe, au Sud de la France métropolitaine) et ii) de développer et valider comme biomarqueur d'exposition, la réponse IgG dirigées contre les protéines salivaires totales (EGS) et la protéine recombinante de 30 kDa de *Culex quinquefasciatus*.

4.1 Evaluation du niveau d'exposition des hommes aux piqûres de *Aedes* en milieu urbain en Afrique

Notre travail s'est focalisé sur les populations d'enfants vivant à Abidjan, donc en milieu urbain en Afrique où ils sont exclusivement exposés aux piqûres d'*Ae. aegypti*. La réponse Ac IgG anti-peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* nous a permis tout d'abord d'apprécier l'hétérogénéité du niveau d'exposition au sein des quartiers et des groupes d'âge. C'est plutôt entre les quartiers que la différence de niveau d'exposition aux piqûres de *Ae. aegypti* a été noté. Les enfants vivant dans le quartier de Bromakoté sont apparus plus exposés aux piqûres de *Ae. aegypti* que ceux vivant à Anoumabo et à Petit-Bassam. Ces trois quartiers d'Abidjan sont des zones où il manque certains équipements d'assainissement. Les services de gestions des ordures y sont également déficitaires à l'instar de plusieurs quartiers des villes Africaines (Cyrille et al., 2009; Lodé et al., 2012). Ces zones en déficit des systèmes d'assainissement sont les plus propices au développement des gîtes larvaires et donc à une émergence des vecteurs *Ae. aegypti*. Et cela semblerait être plus marqué dans le quartier de Bromakoté que les autres quartiers d'étude. D'où l'exposition des enfants aux piqûres d'*Ae. aegypti* plus important à Bromakoté. Cette observation est associée à la forte densité vectorielle d'*Ae. aegypti* dans le quartier de Bromakoté dénombré par l'utilisation des pièges collants. Elanga et collaborateurs ont aboutit à une conclusion similaire dans son étude conduite dans la capital du Laos. Dans cette étude, les habitants des quartiers à la périphérie, mal urbanisés étaient plus exposés aux piqûres d'*Ae. aegypti* que ceux vivant dans les quartiers huppés où toutes les commodités d'assainissement s'y trouvent (Ndille et al. 2014b). L'impact des zones mal urbanisées et la mauvaise gestion des ordures, sur la prolifération des *Aedes* a été indiqué dans plusieurs études et dans différents contextes. Dans ces études, les zones ne bénéficiant pas des infrastructures d'assainissement, engendraient un concentré de facteurs favorables à la prolifération des *Aedes* (Fournet et al. 2016b; Walker et al. 2018; Whiteman et al. 2019; Kpan et al. 2021).

Dans notre étude, seuls les résultats entomologiques obtenus par l'utilisation des pièges collants ont montré une association positive entre les données biomarqueurs et la densité d'*Ae. aegypti*. En effet, plusieurs techniques entomologiques (pièges collants, pièges pondoirs, prospections larvaire et les indices stogomiyens) ont été exploitées dans notre étude mais toutes ne donnent pas les mêmes informations. Pendant que les indices maison, les indices larvaires et de Breteau indiquaient les enfants du quartier d'Anoumabo comme les plus potentiellement exposés à *Ae. aegypti*, l'indice de récipient désignait Petit-Bassam comme plus exposé et les pièges collants désigne les enfants de Bromakoté comme les plus exposés aux piqûres de l'*Ae.*

aegypti. Cette différence entre méthodes entomologiques a déjà été démontré dans des études exploitant les indices entomologiques dans le cadre d'évaluation d'exposition des hommes aux piqûres des *Aedes* (Cromwell et al. 2017a; Nascimento et al. 2020; Morales-Pérez et al. 2020). L'une des limites de notre étude menée à Abidjan a été le manque de collecte simultanée des données socio-environnementaux des domiciles des enfants. Le fait que cela soit fait hors périodes de prélèvement du sang pour les analyses biomarqueurs, ne nous a pas permis de dresser le portrait socio-environnemental de chaque quartier et donc de faire les analyses au niveau populationnelle entre les données biomarqueurs et les facteurs socio-environnementaux. Dans notre étude, l'état des lieux rétrospectifs d'infection des enfants aux arboviroses (fièvre jaune, Dengue, chikungunya, Zika, Usutu, West Nil, et O'nyong nyong), par l'utilisation de la technique sérologique LUMINEX (Ac IgG spécifiques à des Acs d'arbovirus) a indiqué que les enfants de nos quartiers d'étude sont infectés par les 4 sérotypes de DENV, par le ZIKV et du virus de O'nyong nyong avec une forte prévalence pour le sérotype de DENV3. Le quartier de Petit-Bassam serait le quartier où les enfants seraient les plus infectés par les arboviroses avec une forte prévalence à arbovirose avec 10,66 % des infections suivi des enfants de Bromakoté avec 08,66 % et les enfants d'Anoumabo avec 03,94 %.

Les réponses Ac IgG anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti* indiquaient que les enfants de Bromakoté étaient les plus exposés et donc à même de développer les infections à arbovirus. Mais les infections ont plutôt été plus abondantes à Petit-Bassam avec la technique LUMINEX. Cette technique qui retrace l'historique d'infection des individus aux pathogènes met ainsi en exergue la circulation ancienne et importante des arbovirus du quartier de Petit-Bassam par rapport aux quartiers de Bromakoté et d'Anoumambo. Les infrastructures portuaires existant dans la zone maritime de Port-Bouët (depuis 1951), les risques d'infections chez les populations ont bien commencé bien avant les autres quartiers d'étude qui sont éloignés de cette zones d'entrée des bateaux transportant des marchandises et autres fournitures. Ce moyen de transport pourrait assurer le transport passif des vecteurs des arbovirus et cela a été le cas depuis le 20 siècle (GUBLER 1997; Gubler 2010). Les vecteurs y trouveraient également les conditions propices pour la ponte de leurs œufs et le développement de leurs larves (Guagliardo et al. 2015; Guagliardo et al. 2019).

Cela nous indique ainsi que les données biomarqueurs ne sont pas associées à l'historique de prévalence des infections aux arboviroses dans notre étude. Elanga et ses collaborateurs sont parvenus à la même conclusion à Vientiane au Laos. Les enfants des zones de forte infection à la Dengue (DEV+) à Vientiane présentaient un taux d'Ac IgG anti-Nterm 34 kDa de *Ae. aegypti*

plus élevé que les zones exempt de dengue (DENV-) (Ndille et al. 2014b). Mais des études exploitant la réponse IgG anti-EGS d'*Ae. aegypti* est parvenu à une autre conclusion. Dans cette étude les auteurs ont pu démontrer que les individus positifs à l'infection du virus de la Dengue présentaient les réponses Ac IgG anti-EGS supérieures à celles des individus négatifs à l'infection de la Dengue (Londono-Renteria et al. 2013). D'autres protéines salivaires de vecteur accompagneraient les infections au DENV. Chez les moustiques infectés la modification des composés protéiques salivaires a été plusieurs fois soulignées dans les études portant sur la sialotranscriptôme des vecteurs (Jariyapan et al. 2006; Colpitts et al. 2011; J. M. C. Ribeiro et al. 2016; Conway et al. 2016; Sri-In et al. 2019). Cela boosterait les réponses Ac anti-salive EGS chez les gens exposés. D'où les réponses immunologiques accompagnant cette infection à la Dengue dans cette étude de Londono-Renteria.

Nous avons enfin comparé le niveau des IgG spécifiques des enfants en les regroupant en classes d'âges. Nous n'avons noté aucune différence significative entre le niveau d'exposition des enfants des différentes classes d'âges bien que les enfants aient répondu différemment aux piqûres des *Ae. aegypti* au sein de chaque classe d'âge. L'absence d'influence de l'âge sur les réponses Ac anti-peptide salivaires Nterm 34 kDa avait été souligné par Elanga *et al.* sur les populations d'enfants Béninois âgés de 0 à 5 ans et les adultes de la Réunion âgés de 18 à 35 ans. Celle de Vientiane portant sur les enfants de 6 mois à 6 ans et d'adultes âgés de plus de 35 ans, a montré que les enfants seraient plus exposés de façon significative aux piqûres d'*Ae. aegypti* que les adultes. Il était ainsi observé que les réponses Ac anti-Nterm 34 kDa d'*Ae. aegypti* détectées chez les enfants plus importantes que celles produites par les adultes (Elanga Ndille et al. 2012c; Ndille et al. 2014b; Elanga Ndille et al. 2016b).

Remoué et collaborateurs travaillant sur la réponse Ac anti- salive totale d'*Ae. aegypti* chez les enfants sénégalais âgés de 1 à 6 ans n'ont pu mettre en lumière une différence significative d'exposition des enfants suivant leur âge (Remoue et al. 2007). Par contre, Doucouré et ses collaborateurs ont pu indiquer dans leur étude en Bolivie une des réponses Ac IgG anti-salive totale d'*Aedes* significativement plus élevées chez les enfants de moins 14 que les individus de plus de 15 ans (Doucoure, et al. 2012a).

Ces informations obtenues à la suite de nos travaux sur l'impact de l'âge sur les réponses IgG anti- 34 kDa d'*Ae. aegypti* la population des enfants de 3 quartiers de la ville d'Abidjan et les informations recueillies dans d'autres études sur l'âge nous indique ici qu'il semble pour l'instant difficile de traduire de façon sereine l'influence de l'âge sur les réponses Ac anti-salive totale ou anti-peptide salivaire d'*Aedes*. Pour les enfants 0-14 ans dans notre étude, il n'y a pas

l'effet de l'âge sur les réponses IgG anti-peptide Nterm d'*Ae. aegypti*. Cela semble ainsi pertinent et intéressant pour utiliser biomarqueur quel que soit l'âge des enfants dans une étude.

4.2 Evaluation du niveau d'exposition des hommes aux piqûres de *Aedes* au Sud de la France

L'exploration dans un premier temps des Ac IgG et IgM anti-peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti*, au Sud de la France métropolitaine nous indiquait une différence de niveau de réponses d'IgG anti-peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* au sein de chaque région et département de la France. Ceci suggérait qu'il serait possible d'identifier au sein d'une même zone, les individus fortement exposés aux piqûres des *Aedes* par rapport à aux autres moins en proie aux piqûres des vecteurs en analysant les réponses Ac IgG et IgM anti peptides salivaires d'*Ae. aegypti*. Bien entendu, ces résultats n'ont pas tenu compte des facteurs intrinsèques des hôtes vertébrés qui pourraient avoir une influence sur la densité de leurs réponses immunologiques (fonds génétique, influence de la nutrition, co-infection, etc..). Mais ces résultats, observées pour la première fois en France métropolitaine, corroborent ceux obtenus dans le cadre des études exploitant d'une part les réponses anti-peptide salivaire des *Aedes* et d'autres part celles exploitant les réponses anticorps anti-salive totale des *Aedes* (Elanga et al., 2012 ; Elanga et al., 2016 ; Sagna et al., 2018 ; Sagna et al., 2019 ; Remoué et al., 2006 ; Rémoué et al., 2007, Doucoure et al., 2012). Les réponses Ac dirigées contre ces différents antigènes salivaires d'*Aedes* pourraient permettre l'indentification individuelle de niveau d'exposition des Hommes aux piqûres des *Aedes*, donc aux risque de transmission des arboviroses.

Au sud de la France, notre étude a analysé les réponses IgG et IgM anti-Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti*, en fonction de 4 régions et de 9 départements de ces régions en France. Il est apparu une différence significative du niveau d'Ac (IgG et IgM) anti-peptide salivaire Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* entre les régions avec un niveau médian d'IgG plus important dans deux des régions exposées à *Aedes albopictus* (Occitanie et PACA) que la région de corse (exposée) et d'Auvergne (non exposée). Au niveau départementale, ce sont les habitants des départements 30, 34 (Occitanie) et 13, 83 (PACA) qui se feraient le plus piqués. Les réponses IgG anti-Nterm34 kDa d'*Ae. aegypti* y sont de façon significative plus importantes que dans les autres départements. Ces régions et départements étant déjà colonisées par *Ae. albopictus* au moment des études, les habitants de ces deux régions se feraient plus piqués par *Ae. albopictus* que les ceux des régions de Corse et de l'Auvergne.

De manière générale, il a été démontré une association positive entre le niveau de réponses d'Ac IgG et les densités de vecteurs comme démontré par de nombreux travaux (Peng *et al.* 2002 ; Elanga *et al.*, 2012 ; Elanga *et al.*, 2016 ; Sagna *et al.* 2018 ; Sagna *et al.*, 2019).

Les différentes configurations des facteurs socio-environnementaux pourraient contribuer à accroître le contact entre le vecteur et les habitants de ces régions et départements (Walker *et al.*, 2018; Paul *et al.* 2018). Une étude réalisée dans la même zone avec le dosage des IgG antiEGS totaux avait pu identifier que les individus habitants dans les appartements seraient plus exposés aux piqûres d'*Ae. albopictus* que ceux vivant dans les autres types d'habitation mais cet effet n'était pas significative (Poinson *et al.* 2019).

Bien que l'Auvergne eût été identifiée comme « région non colonisée » en 2012, donc potentiellement non exposée aux piqûres d'*Ae. albopictus*, certains de ses habitants présentaient néanmoins une réponse IgG spécifique anti-peptide salivaire et donc un niveau d'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus* similaire, en médiane, à celui des habitants de la Corse (Régions colonisée depuis 2006-2007). Cette information vient contredire les données de colonisation par *Ae. albopictus* des différentes régions et donc de départements du Sud de la France. Ces réponses IgG anti-peptide 34 kDa d'*Ae. aegypti*, pourraient être la résultante de 2 hypothèses. La première est le déplacement des personnes de zones déjà colonisées par *Ae. albopictus* vers les départements d'Auvergne. La détection d'Ac anti- salive *Anopheles gambiae* et *Ae. aegypti*, chez les soldats français de retour de mission et chez les voyageurs venant des zones tropicales plaiderait en faveur de cette hypothèse (Orlandi-Pradines *et al.* 2007b). La deuxième pourrait être un déficit de collecte de moustiques par les outils entomologiques actuels de surveillance. Et cela surtout dans les conditions de faibles densités vectorielles (Sagna *et al.* 2018a). En effet, les organismes en charge de la surveillance de la progression du moustique sur le territoire Français avaient désigné la région d'Auvergne non encore colonisée par le moustique au moment de l'étude (2012). Cela est aussi vrai pour le département 05 de PACA mais les données biomarqueurs ont indiqué le contraire. Ces organismes de surveillance utilisent la plupart du temps, des pondoirs pièges, pièges collants, les pièges aspirateurs avec le Dioxyde de Carbone comme attractif au cours de leurs missions, pour collecter les *Ae. albopictus*. Ces pièges en petits dans la plupart des cas installés en petit nombre à l'échelle d'une région, ne peuvent pas représenter le réel statut « colonisée » de cette région. La contradiction mise en exergue ici semble être en parfait accord avec les nombreux biais enregistrés par les pièges à moustiques adultes lors des campagnes entomologiques. Des études réalisées dans l'optique d'évaluer l'efficacité de certains pièges employés dans la surveillance et/ou la lutte contre les moustiques

du genre *Aedes* ont souvent présenté des insuffisances dans la capture de ces vecteurs (Regis et al. 2013; Degener et al. 2014; Staunton et al. 2020).

Selon Roche et ses collaborateurs, l'entière des régions du Sud de la France serait colonisée par *Ae. albopictus* vu la dynamique de colonisation des régions de la France depuis les années 2006. A cette dynamique, ils avaient associé des facteurs socio-environnementaux et climatiques dans plusieurs autres études sur l'invasion de France par le moustique Tigre (Roche et al. 2015, Kiner et al 2016, Krupa et al., 2020).

Nous avons aussi évalué la réponse IgM anti-Nterm-34 kDa d'*Ae. aegypti* dans l'optique de détecter les zones nouvellement exposées aux piqûres des *Ae. albopictus*. Il est ressorti de cette analyse que parmi les habitants des régions du Sud de la France, des personnes seraient nouvellement exposées aux piqûres d'*Ae. albopictus* et cela de façon significative. Cela pourraient être imputé à l'arrivée de nouvelles personnes dans ces régions. Ces régions dont la colonisation a débuté depuis 2004, les habitants y ont été suffisamment exposés aux piqûres du moustique tigre, les seules réponses Ac anti-salive de moustique ou anti-peptide salivaire qu'on devraient détecter chez les habitants, seraient les IgG dont l'apparition dans le sang des exposés seraient postérieure à l'apparition de l'IgM qui est un indicateur de primo ou une nouvelle exposition aux piqûres du moustique tigre. L'IgM est un isotype très tôt détectée chez les vertébrés juste après une exposition aux piqûres ou une infection aux agents pathogènes. Chez certains vertébrés, il apparaît après 1 jour d'infection et disparaît 18 jours après. Comme cela a été détecté chez les poulets exposés aux piqûres du *Triatoma infestans* après la mise en place d'une LAV à bas d'insecticide en Bolivie. La comparaison de l'IgG et de l'IgM a été utilisé dans l'optique de de détecter une ré-infestation ou une récente exposition aux piqûres des *Triatomés* (Schwarz et al. 2010).

4.3 Développement et validation du biomarqueur immuno-épidémiologie d'exposition aux piqûres de *Culex quinquefasciatus* : étude pilote en milieu urbain et semi urbain à Bouaké

Dans le contexte actuel d'émergence des arboviroses dont les agents pathogènes (*Wulcherioa bancrofti*, le virus du West Nil et le virus Usutu) sont transmis par *Culex*, et en particulier par *Culex quinquefasciatus*, vecteur majeur, il nous apparaissait nécessaire de développer notre outil immuno-épidémiologique d'évaluation du niveau d'exposition des Hommes aux piqûres des vecteurs, à celles de *Culex* comme déjà réalisé avec succès dans le cas des vecteurs du genre *Anophèles* et *Aedes*. Ainsi, cet outil permettra l'évaluation du risque

de transmission des arboviroses dont *Culex quinquefasciatus* est vecteur de leurs agents pathogènes et l'évaluation des méthodes et stratégies de LAV contre *Culex quinquefasciatus*. Il permettrait donc d'évaluer avec précision le contact réel contact Homme-*Culex* en complément des outils entomologiques classiques dans les zones et dans des conditions où il est difficile de déployer ces méthodes entomologiques actuelles, ce qui est particulièrement compliqué pour *Culex*.

A cet effet, les réponses Ac IgG anti-EGS et anti-protéine 30 kDa de *Culex quinquefasciatus* ont été dosé, pour la première fois chez l'Homme, afin d'apprécier leur potentialité comme biomarqueur d'exposition des Hommes aux piqûres des moustiques du genre *Culex* et de façon spécifique à l'espèce *Culex quinquefasciatus*.

Les femelles de *Culex quinquefasciatus* ont été élevées en laboratoire puis la dissection de leurs glandes salivaires s'est faite suivant les étapes instruites par Schmid et ses collaborateurs (Schmid et al. 2017). Par la suite les techniques immuno-protéomiques puis bioinformatiques, ont permis l'identification de la protéine 30 kDa, comme étant immunogénique et spécifique à l'espèce *Culex quinquefasciatus* (Calvo et al. 2010; Fontaine et al. 2011). Sa production sous forme recombinante nous a permis d'en avoir une bonne concentration pour les tests immunoenzymatiques ELISA.

Les réponses IgG dirigées contre les antigènes EGS et la protéine de 30 kDa (produite sous forme recombinante par l'IRBA, Marseille) ont été évaluées dans le sérum des enfants dont l'âge était compris entre 1 et 14 ans, dans le cadre d'une étude longitudinale dans 3 quartiers de la ville de Bouaké et d'un village à proximité, en Côte d'Ivoire. Ces résultats ont été comparés aux données entomologiques sur *Culex* disponibles. Nous avons noté une variabilité du niveau de réponses IgG contre ces antigènes chez ces enfants en fonction de leur lieu de résidence (sites d'études) de leur statut potentiel d'exposition (Fortement exposés et faiblement exposés, déterminé par les méthodes entomologiques) et en fonction de l'usage de la Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'action (MILDA). Ceci suggérait ainsi le potentiel d'indicateur de niveau individuel d'exposition des enfants aux piqûres de *Culex quinquefasciatus* par ces biomarqueurs d'exposition.

Les études impliquées dans le développement et la validation des biomarqueurs immunoépidémiologiques dans différents contextes ont abouti à de telles conclusions. Elles ont plusieurs fois mise en lumière l'hétérogénéité du niveau d'exposition des populations d'étude traduit par les valeurs différentes de niveau de réponses Ac spécifique de chaque individu inclus dans l'étude (Remoue et al. 2006b; Drame et al. 2010; Doucoure, Mouchet, Cornélie, et al.

2012a Londono-Renteria et al. 2015; Mathieu-Daudé et al. 2018 Traoré et al. 2019). Les enfants, par exemple, seraient exposés différemment aux piqûres de *Cx quinquefasciatus* au sein de chaque quartier où la densité de vecteurs est variable selon les données entomologiques. Afin de nous assurer aussi du potentiel d'identification des individus exposés et faiblement ou pas exposés aux piqûres de *Cx quinquefasciatus* par ces candidats biomarqueurs, des réponses IgG dirigées contre ces antigènes (EGS et 30 kDa) ont été dosées. De façon intéressante, nous avons noté une différence significative de niveau d'exposition entre les enfants fortement exposés et ceux faiblement exposés à *Culex quinquefasciatus*. Plus en détails, en analyse multivariée, les enfants vivant dans les quartiers de Dar-es-Salam et de Kennedy avec une forte densité de *Cx quinquefasciatus* ont montré un taux d'Ac IgG anti-EGS significativement plus élevé que ceux vivant dans le village de Petessou, présentant une faible densité de *Cx quinquefasciatus*. Corroborant ainsi la relation entre le niveau d'Ac IgG anti-EGS et la densité des vecteurs trouvée dans des études antérieures (Remoue et al. 2006b; Papa M. Drame et al. 2010; Fontaine et al. 2011; Doucoure, Mouchet, Cornélie, et al. 2012b). Les densités des vecteurs *Anopheles* et *Aedes* étaient positivement associées aux niveaux d'Ac anti-EGS chez les individus inclus dans ces études concluant ainsi le potentiel de ces réponses IgG anti-salive totale comme indicateurs de niveau d'exposition des hommes à ces vecteurs.

Les réponses IgG anti-EGS de *Cx quinquefasciatus* permettraient la discrimination entre les individus les plus exposés et les individus les moins exposés et les zones plus exposées, des zones moins exposées aux piqûres de *Culex*. Mais il existe de grandes limites à utiliser les EGS comme biomarqueur pertinent, surtout à cause de possibles cross-réactions immunologiques entre genre de moustiques. Il semble donc pertinent d'identifier et valider une protéine ou un peptide salivaire comme biomarqueur spécifique.

Ainsi les réponses Ac IgG spécifique à la protéine de 30 kDa de *Cx quinquefasciatus* ont été évaluées et détectées dans notre étude mais elles n'ont pas pu identifier de façon significative lequel des quartiers d'étude (les quartiers fortement exposés et le quartier faiblement pris ensemble) était plus exposé aux piqûres de *Cx quinquefasciatus* bien que nous ayons noté de façon globale une différence significative de niveaux de réponses IgG anti-30 kDa à travers le test ANOVA (comparaison d'IgG anti-30 kDa entre plus de 2 quartiers). Cela dénote d'un faible potentiel antigénique de la recombinante 30 kDa contrairement aux EGS dans notre étude. Les EGS induisent des réponses IgG probablement plus fortes que la recombinante 30 kDa et on ne peut pas aussi exclure également des réponses croisées IgG à des protéines partagées entre les

vecteurs dans la zones d'étude. Selon les données entomologiques, il a été capturé dans les zones d'étude en plus de *Cx quinquefasciatus*, des *Anophèles gambiae*.

Cela pourrait donc être une des explications de l'observation que des réponses Ac IgG antiEGS soient plus élevées que celles induisent par la protéine 30 kDa chez les enfants fortement et faiblement exposés à *Cx quinquefasciatus*, respectivement. De plus, les réponses Ac IgG antiEGS et anti-30 kDa chez les enfants vivant dans le village de Petessou où un faible nombre de *Cx quinquefasciatus* a été capturé (HBR=0.2), pourrait traduire la sensibilité de ces candidats biomarqueurs dans les conditions de faible exposition, et en particulier le candidat protéine 30 kDa. La sensibilité d'un biomarqueur fait partir des critères de performance de celui-ci. En effet, un biomarqueur doit être capable d'identifier les zones ou les individus exposés à une faible densité vectorielle. En particulier, cela s'avère pertinent après l'implémentation d'une LAV ou en période de sècheresse où dans la majorité des cas nous avons une très faible densité vectorielle. Mais la capture du nombre important d'*Anopheles gambiae* (HBR=35.2) vient contredire cette information en faveur d'une cross-réactivité des réponses IgG aux différentes protéines salivaires partagées entre ces deux espèces. L'étude du sialome de ces vecteurs a en effet identifié des protéines salivaires partagées entre ces deux espèces de vecteurs (J. M. C. Ribeiro et al. 2004; Cornelie et al. 2007; Fontaine et al. 2012; Arcà et al. 2017).

La tentative d'évaluation des effets de la MILDA sur le contact Homme-vecteur par ces candidats biomarqueurs, a montré que les enfants n'utilisant pas la MILDA avaient une réponse IgG anti-EGS et anti-30 kDa plus élevé que ceux n'en utilisant pas. Cette différence était statistiquement significative uniquement pour les réponses IgG contre la protéine 30 kDa. Ceci suggérait ainsi que la réponse IgG anti-30 kDa pourrait servir à une évaluation de la LAV impliquant le MILDA contre le *Cx quinquefasciatus* qui sévit préférentiellement la nuit tout comme *Anopheles*. Mais avant cette démonstration, ce résultat suggère que la réponse IgG anti-30 kDa peut être modulé par l'utilisation d'une méthode de LAV, laissant présager que ce candidat protéique reste pertinent à valider dans le futur. Les réponses Ac IgG anti-peptide salivaire gSG6-P1 d'*Anopheles gambiae* ont été exploités dans l'évaluation de l'efficacité de MILDA. Les individus déclarant dormir continuellement sous les MILDA avaient une plus faible réponse d'IgG anti-gSG6-P1 d'*Anopheles gambiae* que ceux qui n'en utilisaient pas (Traoré et al. 2020). En effet, les réponses IgG contre ce peptide salivaire *Anopheles* a été validé comme biomarqueur d'efficacité directe des MILDA sur le contact homme-vecteur (Papa Makhtar Drame et al. 2010).

L'étude de la corrélation des réponses IgG anti-EGS et anti-30 kDa, a montré une association positive entre ces deux réponses Ac. Ceci suggère que ces biomarqueurs évalueraient les niveaux d'exposition des enfants dans le même sens. Il est ainsi imaginable d'utiliser les IgG anti-EGS pour évaluer l'exposition des enfants exposés au genre *Culex*, tout comme les IgG anti-30 kDa pour identifier l'exposition des enfants spécifiquement à *Cx quinquefasciatus*. Mais avec les limites déjà évoqués plus haut (cross-réaction pour EGS et faible antigénicité pour la protéine 30 kDa), nos résultats nécessitent d'autres études immunoépidémiologiques pour validation. Tout comme cela a été rapporté dans des études sur la recherche des biomarqueurs immuno-épidémiologique d'exposition des hommes aux piqûres des *Anopheles* et *Aedes* (Poinignon et al. 2010; Elanga Ndille et al. 2012d).

Les réponses Ac IgG anti-EGS et IgG anti-30 kDa de *Cx quinquefasciatus* pourraient ainsi être des indicateurs proxy du niveau d'exposition des hommes aux piqûres des *Culex*. Il a été possible de caractériser avec ces réponses IgG spécifiques, les enfants fortement exposés aux piqûres de *Cx quinquefasciatus* de ceux qui étaient faiblement exposés lorsque les sites d'étude sont pris ensembles. Mais lorsqu'on prend les quartiers individuellement avec les fortes expositions à *Cx quinquefasciatus*, les réponses IgG anti-30 kDa n'ont pas pu identifier les sites d'étude les plus exposés. Enfin, seules les réponses IgG anti-30 kDa ont permis de classer avec significativité les enfants utilisant les MILDAs de ceux qui n'en utilisant pas. La protéine salivaire de 30 kDa de *Cx quinquefasciatus* serait dans ce cas un potentiel candidat biomarqueur d'exposition des enfants aux piqûres de *Culex* nonobstant les faibles niveaux de réponses IgG dirigées contre celui-ci.

Néanmoins, des études supplémentaires sur le 30 kDa dans une plus large population et dans différents sites d'étude pourraient permettre une meilleure appréciation du réel potentiel biomarqueur d'exposition des enfants aux piqûres de *Culex*. Cette étude pourrait comporter par exemple i) les individus d'une large gamme d'âge, ii) une forte densité de *Culex*.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons observé, pour la première fois, que les réponses Ac IgG spécifiques au peptide salivaire Nterm-34 kDa du moustique *Ae. aegypti*, aux EGS de *Culex quinquefasciatus* et à la protéine recombinante 30 kDa de *Culex quinquefasciatus*, pouvaient identifier les personnes exposées aux piqûres des moustiques *Aedes* et *Culex quinquefasciatus*, qui sont les vecteurs des agents pathogènes des arboviroses. Même si cette identification des personnes exposées aux piqûres de *Culex* avec les réponses Ac anti-30 kDa semble moins pertinente dans les conditions de notre thèse, une appréciation qualitative et quantitative de ces réponses Ac permettraient d'identifier les personnes ou les zones à risque de transmission des arbovirus. Elles seraient donc un outils d'évaluation de niveau d'exposition des hommes aux piqûres des vecteurs. Elles pourraient par exemple assurer l'évaluation des réponses Ac entre les personnes exposées et non exposées aux piqûres des vecteurs, évaluer une stratégie de LAV en comparant les taux d'Ac avant et après l'implémentation d'une LAV. Toutefois, la validation complète de la réponse Ac IgG anti-EGS et anti-peptide recombinante de 30 kDa comme biomarqueur d'exposition aux *Culex*, nécessite que d'autres études complémentaires soient menées

PERSPECTIVES

A la suite de ces travaux de thèses nous projetons réaliser un certains nombres d'activités sur le biomarqueurs d'exposition qui contribueront à renforcer la surveillance des arboviroses dans d'autres contextes :

- i) des études supplémentaires sur la protéine 30 kDa dans une large population pourraient permettre une meilleure appréciation du potentiel biomarqueur d'exposition des Hommes aux piqûres de *Culex*. Cette étude pourrait comporter par exemple les individus d'une large gamme d'âge, d'un bon et/ou dans un contexte de lutte LAV contre les *Culex*.
- ii) Exploiter dans le cadre des études prochaines les réponses Ac anti- Nterm-34 kDa d'*Aedes aegypti* chez certains animaux domestiques. Ces animaux proches des hommes pourraient constituer d'indicateur du niveau des expositions des hommes aux piqûres des *Aedes*.
- iii) Évaluer une stratégie de lutte anti-vectorielle portant sur la technique de l'insecte stérile qui est en cours.
- iv) Développer un Test Diagnostic Rapide directement utilisable sur le terrain afin d'identifier les personnes potentiellement exposées aux piqûres des *Aedes*. Cela permettra un gain de temps considérable dans l'identification de ces personnes exposées et donc une orientation rapide ou évaluation rapide des stratégies de LAV.

REFERENCES

- Abramides, Gisela Chebabi, David Roiz, Raimon Guitart, Salvador Quintana, Irene Guerrero, and Nuria Giménez. 2011. 'Effectiveness of a Multiple Intervention Strategy for the Control of the Tiger Mosquito (*Aedes Albopictus*) in Spain'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105 (5): 281–88. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.01.003>.
- Adhami, J., and P. Reiter. 1998. 'Introduction and Establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *Albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania'. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14 (3): 340–43.
- Aliota, Matthew T., Emma C. Walker, Alexander Uribe Yepes, Ivan Dario Velez, Bruce M. Christensen, and Jorge E. Osorio. 2016. 'The WMe1 Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes Aegypti*'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (4): e0004677. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004677>.
- Alves-Silva, Juliana, José MC Ribeiro, Jan Van Den Abbeele, Geoffrey Attardo, Zhengrong Hao, Lee R Haines, Marcelo B Soares, Matthew Berriman, Serap Aksoy, and Michael J Lehane. 2010. 'An Insight into the Sialome of *Glossina Morsitans Morsitans*'. *BMC Genomics* 11 (March): 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-213>.
- Amraoui, Fadila, Ghazi Krida, Ali Bouattour, Adel Rhim, Jabeur Daaboub, Zoubir Harrat, SaidChawki Boubidi, Mhamed Tijane, Mhammed Sarih, and Anna-Bella Failloux. 2012. '*Culex Pipiens*, an Experimental Efficient Vector of West Nile and Rift Valley Fever Viruses in the Maghreb Region'. *PLoS ONE* 7 (5): e36757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036757>.
- Araujo, Maisa da Silva, Fang Guo, and Michael Rosbash. 2020. 'Video Recording Can Conveniently Assay Mosquito Locomotor Activity'. *Scientific Reports* 10 (March): 4994. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61733-5>.
- Arcà, Bruno, Fabrizio Lombardo, Claudio J. Struchiner, and José M. C. Ribeiro. 2017. 'Anopheline Salivary Protein Genes and Gene Families: An Evolutionary Overview after the Whole Genome Sequence of Sixteen *Anopheles* Species'. *BMC Genomics* 18 (February). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3579-8>.
- Artsob, H., D. J. Gubler, D. A. Enria, M. A. Morales, M. Pupo, M. L. Bunning, and J. P. Dudley. 2009. 'West Nile Virus in the New World: Trends in the Spread and Proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere'. *Zoonoses and Public Health* 56 (6–7): 357–69. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01207.x>.
- Ashraf, Usama, Jing Ye, Xindi Ruan, Shengfeng Wan, Bibo Zhu, and Shengbo Cao. 2015. 'Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe'. *Viruses* 7 (1): 219–38. <https://doi.org/10.3390/v7010219>.
- Attoh-Touré, H., N.S. Dagnan, and J. Tagliante-Saracino. 2010. 'Résurgence des épidémies de fièvre jaune en Côte-d'Ivoire'. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 103 (5): 323–26. <https://doi.org/10.1007/s13149-010-0047-y>.
- Auerswald, Heidi, Pierre-Olivier Maquart, Véronique Chevalier, and Sebastien Boyer. 2021. 'Mosquito Vector Competence for Japanese Encephalitis Virus'. *Viruses* 13 (6): 1154. <https://doi.org/10.3390/v13061154>.
- Basso, C., E. Garcia da Rosa, S. Romero, C. Gonzalez, R. Lairihoy, I. Roche, R. M. Caffera, et al. 2015. 'Improved Dengue Fever Prevention through Innovative Intervention Methods in the City of Salto, Uruguay'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 109 (2): 134–42. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru183>.

- Batallán, Gonzalo P., Elizabet L. Estallo, Fernando S. Flores, Paolo Sartor, Marta S. Contigiani, and Walter R. Almirón. 2015. 'St. Louis Encephalitis Virus Mosquito Vectors Dynamics in Three Different Environments in Relation to Remotely Sensed Environmental Conditions'. *Acta Tropica* 146 (June): 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.009>.
- Bauer, Kristen, Ines O. Esquilin, Alberto Santiago Cornier, Stephen J. Thomas, Ana I. Quintero del Rio, Jorge Bertran-Pasarell, Javier O. Morales Ramirez, et al. 2015. 'A Phase II, Randomized, Safety and Immunogenicity Trial of a Re-Derived, Live-Attenuated Dengue Virus Vaccine in Healthy Children and Adults Living in Puerto Rico'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93 (3): 441–53. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0625>.
- Beebe, Nigel W., Dan Pagendam, Brendan J. Trewin, Andrew Boomer, Matt Bradford, Andrew Ford, Catherine Liddington, et al. 2021. 'Releasing Incompatible Males Drives Strong Suppression across Populations of Wild and Wolbachia-Carrying *Aedes Aegypti* in Australia'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (41): e2106828118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106828118>.
- Behrens, S. E., C. W. Grassmann, H. J. Thiel, G. Meyers, and N. Tautz. 1998. 'Characterization of an Autonomous Subgenomic Pestivirus RNA Replicon'. *Journal of Virology* 72 (3): 2364–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.2364-2372.1998>.
- Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, and D. L. Sacks. 1998. 'Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania Major* Infection in the Mouse Ear Dermis'. *The Journal of Experimental Medicine* 188 (10): 1941–53. <https://doi.org/10.1084/jem.188.10.1941>.
- Bellone, Rachel, and Anna-Bella Failloux. 2020. 'The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission'. *Frontiers in Microbiology* 11 (September): 584846. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584846>.
- Bhatt, Samir, Peter W. Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, Catherine L. Moyes, John M. Drake, et al. 2013. 'The Global Distribution and Burden of Dengue'. *Nature* 496 (7446): 504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.
- Billingsley, P. F., J. Baird, J. A. Mitchell, and C. Drakeley. 2006. 'Immune Interactions between Mosquitoes and Their Hosts'. *Parasite Immunology* 28 (4): 143–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00805.x>.
- Blair, Carol D., Zachary N. Adelman, and Ken E. Olson. 2000. 'Molecular Strategies for Interrupting Arthropod-Borne Virus Transmission by Mosquitoes'. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (4): 651–61.
- Boyer, Sebastien, Coralie Foray, and Jean-Sebastien Dehecq. 2014. 'Spatial and Temporal Heterogeneities of *Aedes Albopictus* Density in La Reunion Island: Rise and Weakness of Entomological Indices'. *PLoS ONE* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091170>.
- Braack, Leo, A. Paulo Gouveia de Almeida, Anthony J. Cornel, Robert Swanepoel, and Christiaan de Jager. 2018. 'Mosquito-Borne Arboviruses of African Origin: Review of Key Viruses and Vectors'. *Parasites & Vectors* 11 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2559-9>.
- Bron, Gebbiena M., Kathryn Strimbu, Hélène Cecilia, Anita Lerch, Sean M. Moore, Quan Tran, T. Alex Perkins, and Quirine A. ten Bosch. 2021. 'Over 100 Years of Rift Valley Fever: A Patchwork of Data on Pathogen Spread and Spillover'. *Pathogens* 10 (6): 708. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060708>.

- Brown, Julia E., Ernst-Jan Scholte, Marian Dik, Wietse Den Hartog, Jacob Beeuwkes, and Jeffrey R. Powell. 2011. 'Aedes Aegypti Mosquitoes Imported into the Netherlands, 2010'. *Emerging Infectious Diseases* 17 (12): 2335–37. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110992>.
- Brown, Julia E., Carolyn S. McBride, Petrina Johnson, Scott Ritchie, Christophe Paupy, Hervé Bossin, Joel Lutomiah, et al. 2011. 'Worldwide Patterns of Genetic Differentiation Imply Multiple “domestications” of Aedes Aegypti, a Major Vector of Human Diseases'. *Proceedings. Biological Sciences* 278 (1717): 2446–54. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2469>.
- Calisher, Charles H., and Ernest A. Gould. 2003. 'Taxonomy of the Virus Family Flaviviridae'. *Advances in Virus Research* 59: 1–19. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59001-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59001-7).
- Calvo, Eric, Irma Sanchez-Vargas, Amanda J. Favreau, Kent D. Barbian, Van M. Pham, Kenneth E. Olson, and José Mc Ribeiro. 2010. 'An Insight into the Sialotranscriptome of the West Nile Mosquito Vector, Culex Tarsalis'. *BMC Genomics* 11 (January): 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-51>.
- Calvo, Eric, Fuyuki Tokumasu, Osvaldo Marinotti, Jean-Luc Villeval, José M. C. Ribeiro, and Ivo M. B. Francischetti. 2007. 'Aegyptin, a Novel Mosquito Salivary Gland Protein Specifically Binds to Collagen and Prevents Its Interaction with Glycoprotein VI, Integrin A2β1 and von Willebrand Factor'. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 26928–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705669200>.
- Camp, Jeremy V., Jolanta Kolodziejek, and Norbert Nowotny. 2019. 'Targeted Surveillance Reveals Native and Invasive Mosquito Species Infected with Usutu Virus'. *Parasites & Vectors* 12 (1): 46. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3316-z>.
- Cao-Lormeau, Van-Mai, Claudine Roche, Anita Teissier, Emilie Robin, Anne-Laure Berry, Henri-Pierre Mallet, Amadou Alpha Sall, and Didier Musso. 2014. 'Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013'. *Emerging Infectious Diseases* 20 (6): 1085–86. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138>.
- Carrieri, M., P. Angelini, C. Venturelli, B. Maccagnani, and R. Bellini. 2012. 'Aedes Albopictus (Diptera: Culicidae) Population Size Survey in the 2007 Chikungunya Outbreak Area in Italy. II: Estimating Epidemic Thresholds'. *Journal of Medical Entomology* 49 (2): 388–99.
- Cavrini, Francesca, Maria Elena Della Pepa, Paolo Gaibani, Anna Maria Pierro, Giada Rossini, Maria Paola Landini, and Vittorio Sambri. 2011. 'A Rapid and Specific Real-Time RTPCR Assay to Identify Usutu Virus in Human Plasma, Serum, and Cerebrospinal Fluid'. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 50 (3): 221–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.11.008>.
- Chagas, Andreza Campos, José Luis Ramirez, Nijole Jasinskiene, Anthony A. James, José M. C. Ribeiro, Osvaldo Marinotti, and Eric Calvo. 2014. 'Collagen-Binding Protein, Aegyptin, Regulates Probing Time and Blood Feeding Success in the Dengue Vector Mosquito, Aedes Aegypti'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (19): 6946–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404179111>.
- Champagne, D. E., and J. M. Ribeiro. 1994. 'Sialokinin I and II: Vasodilatory Tachykinins from the Yellow Fever Mosquito Aedes Aegypti'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1): 138–42.
- Chang, Christopher, Kristina Ortiz, Aftab Ansari, and M. Eric Gershwin. 2016. 'The Zika Outbreak of the 21st Century'. *Journal of Autoimmunity* 68 (April): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>.

- Charlab, R, M Barral-Netto, J G Valenzuela, A Barral, A Caldas, E Honda, E D Rowton, V Vinhas, J Costa, and J M Ribeiro. 2000. 'Human Immune Response to Sand Fly Salivary Gland Antigens: A Useful Epidemiological Marker?' *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62 (6): 740–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.740>.
- Chen, Wei-Chun, Chin-Kai Tseng, Chun-Kuang Lin, Shen-Nien Wang, Wen-Hung Wang, Shih-Hsien Hsu, Yu-Hsuan Wu, Ling-Chien Hung, Yen-Hsu Chen, and Jin-Ching Lee. 2018. 'Lucidone Suppresses Dengue Viral Replication through the Induction of Heme Oxygenase-1'. *Virulence* 9 (1): 588–603. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1421893>.
- Clé, Marion, Sara Salinas, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck, Serafin Gutierrez, Thierry Baldet, Philippe Vande Perre, Vincent Foulongne, and Yannick Simonin. 2018. 'Le virus Usutu : la menace fantôme'. *médecine/sciences* 34 (8–9): 709–16. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183408018>.
- Colpitts, Tonya M., Jonathan Cox, Dana L. Vanlandingham, Fabiana M. Feitosa, Gong Cheng, Sebastian Kurscheid, Penghua Wang, Manoj N. Krishnan, Stephen Higgs, and Erol Fikrig. 2011. 'Alterations in the *Aedes Aegypti* Transcriptome during Infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses'. *PLoS Pathogens* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002189>.
- Conway, Michael J., Berlin Londono-Renteria, Andrea Troupin, Alan M. Watson, William B. Klimstra, Erol Fikrig, and Tonya M. Colpitts. 2016. '*Aedes Aegypti* D7 Saliva Protein Inhibits Dengue Virus Infection'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004941>.
- Conway, Michael J., Alan M. Watson, Tonya M. Colpitts, Srdjan M. Dragovic, Zhiyong Li, Penghua Wang, Fabiana Feitosa, et al. 2014. 'Mosquito Saliva Serine Protease Enhances Dissemination of Dengue Virus into the Mammalian Host'. *Journal of Virology* 88 (1): 164–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.02235-13>.
- Cornelie, Sylvie, Franck Remoue, Souleymane Doucoure, Tofene NDiaye, Francois-Xavier Sauvage, Denis Boulanger, and Francois Simondon. 2007. 'An Insight into Immunogenic Salivary Proteins of *Anopheles Gambiae* in African Children'. *Malaria Journal* 6 (June): 75. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-75>.
- Couderc, Thérèse, Nassirah Khandoudi, Marc Grandadam, Catherine Visse, Nicolas Gangneux, Sébastien Bagot, Jean-François Prost, and Marc Lecuit. 2009. 'Prophylaxis and Therapy for Chikungunya Virus Infection'. *The Journal of Infectious Diseases* 200 (4): 516–23. <https://doi.org/10.1086/600381>.
- Couret, Jannelle, Ellen Dotson, and Mark Q. Benedict. 2014. 'Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae)'. *PloS One* 9 (2): e87468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087468>.
- Couto-Lima, Dinair, Yoann Madec, Maria Ignez Bersot, Stephanie Silva Campos, Monique de Albuquerque Motta, Flávia Barreto Dos Santos, Marie Vazeille, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, Ricardo Lourenço-de-Oliveira, and Anna-Bella Failloux. 2017. 'Potential Risk of Re-Emergence of Urban Transmission of Yellow Fever Virus in Brazil Facilitated by Competent *Aedes* Populations'. *Scientific Reports* 7 (1): 4848. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>.
- Cracknell Daniels, Bethan, Katy Gaythorpe, Natsuko Imai, and Ilaria Dorigatti. 2021. 'Yellow Fever in Asia-a Risk Analysis'. *Journal of Travel Medicine* 28 (3): taab015. <https://doi.org/10.1093/jtm/taab015>.
- Crawford, Jacob E., Joel M. Alves, William J. Palmer, Jonathan P. Day, Massamba Sylla, Ranjan Ramasamy, Sinnathamby N. Surendran, William C. Black, Arnab Pain, and

- Francis M. Jiggins. 2017. 'Population Genomics Reveals That an Anthropophilic Population of *Aedes Aegypti* Mosquitoes in West Africa Recently Gave Rise to American and Asian Populations of This Major Disease Vector'. *BMC Biology* 15 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0351-0>.
- Cromwell, Elizabeth A., Steven T. Stoddard, Christopher M. Barker, Annelies Van Rie, William B. Messer, Steven R. Meshnick, Amy C. Morrison, and Thomas W. Scott. 2017. 'The Relationship between Entomological Indicators of *Aedes Aegypti* Abundance and Dengue Virus Infection'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005429>.
- Cull, Benjamin. 2021. 'Potential for Online Crowdsourced Biological Recording Data to Complement Surveillance for Arthropod Vectors'. *PLoS ONE* 16 (4): e0250382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250382>.
- Cyrille, AMEGNRAN Yaotree. 2009. '« Problématiques de la gestion des déchets solides en Afrique » : 26 octobre 2009', October, 48. Daubney, R., J. R. Hudson, and P. C. Garnham. 1931. 'Enzootic Hepatitis or Rift Valley Fever. An Undescribed Virus Disease of Sheep Cattle and Man from East Africa'. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 34 (4): 545–79. <https://doi.org/10.1002/path.1700340418>.
- Degener, C. M., A. E. Eiras, T. M. F. Azara, R. A. Roque, S. Rösner, C. T. Codeço, A. A. Nobre, et al. 2014. 'Evaluation of the Effectiveness of Mass Trapping with BG-Sentinel Traps for Dengue Vector Control: A Cluster Randomized Controlled Trial in Manaus, Brazil'. *Journal of Medical Entomology* 51 (2): 408–20. <https://doi.org/10.1603/me13107>.
- Delaunay, P., T. Hubiche, V. Blanc, Y. Perrin, P. Marty, and P. Del Giudice. 2012. '[*Aedes albopictus* in metropolitan France]'. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie* 139 (5): 396–401; quiz 395, 402. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2011.12.005>.
- Delaunay, P., B. Mathieu, P. Marty, P. Fauran, and F. Schaffner. 2007. '[Chronology of the development of *Aedes albopictus* in the Alpes-Maritimes Department of France, from 2002 to 2005]'. *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial* 67 (3): 310–11.
- Di Luca, Marco, Luciano Toma, Francesco Severini, Daniela Boccolini, Salvatore D'Avola, Diego Todaro, Alessandra Stancanelli, et al. 2017. 'First Record of the Invasive Mosquito Species *Aedes (Stegomyia) Albopictus* (Diptera: Culicidae) on the Southernmost Mediterranean Islands of Italy and Europe'. *Parasites & Vectors* 10 (November): 543. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2488-7>.
- Diagne, Cheikh T., Oumar Faye, Mathilde Guerbois, Rachel Knight, Diawo Diallo, Ousmane Faye, Yamar Ba, et al. 2014. 'Vector Competence of *Aedes Aegypti* and *Aedes Vittatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal and Cape Verde Archipelago for West African Lineages of Chikungunya Virus'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 91 (3): 635–41. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0627>.
- Dick, G. W. A, S. F Kitchen, and A. J Haddow. 1952. 'Zika Virus (I). Isolations and Serological Specificity'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46 (5): 509–20. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).
- Dieng, Hamady, Tomomitsu Satho, Nur Khairatun Khadijah Binti Meli, Fatimah Abang, Cirilo Nolasco-Hipolito, Hafijah Hakim, Fumio Miake, et al. 2018. 'Occurrence of Sweet Refuse at Disposal Sites: Rainwater Retention Capacity and Potential Breeding Opportunities for *Aedes Aegypti*'. *Environmental Science and Pollution Research*, March, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1078-8>.

- Djegbe, Innocent, Sylvie Cornelie, Marie Rossignol, Edith Demette, Martial Seveno, Franck Remoue, and Vincent Corbel. 2011. 'Differential Expression of Salivary Proteins between Susceptible and Insecticide-Resistant Mosquitoes of *Culex Quinquefasciatus*'. *PLoS One* 6 (3): e17496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017496>.
- Doucoure, Souleymane, François Mouchet, Sylvie Cornelie, Jean Sébastien DeHecq, Abdul Hamid Rutee, Yelin Roca, Annie Walter, et al. 2012. 'Evaluation of the Human IgG Antibody Response to *Aedes Albopictus* Saliva as a New Specific Biomarker of Exposure to Vector Bites'. Edited by Michael J. Turell. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (2): e1487. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001487>.
- Doucoure, Souleymane, François Mouchet, Sylvie Cornelie, Papa Makhtar Drame, Eric D'Ortenzio, Jean Sébastien DeHecq, and Franck Remoue. 2014. 'Human Antibody Response to *Aedes Albopictus* Salivary Proteins: A Potential Biomarker to Evaluate the Efficacy of Vector Control in an Area of Chikungunya and Dengue Virus Transmission'. *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/746509>.
- Doucoure, Souleymane, François Mouchet, Amandine Cournil, Gilbert Le Goff, Sylvie Cornelie, Yelin Roca, Mabel Guerra Giraldez, et al. 2012. 'Human Antibody Response to *Aedes Aegypti* Saliva in an Urban Population in Bolivia: A New Biomarker of Exposure to Dengue Vector Bites'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (3): 504–10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0477>.
- Drahota, J., M. Lipoldová, P. Volf, and I. Rohousová. 2009. 'Specificity of Anti-Saliva Immune Response in Mice Repeatedly Bitten by *Phlebotomus Sergenti*'. *Parasite Immunology* 31 (12): 766–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01155.x>.
- Drame, Papa M., Anne Poinsignon, Patrick Besnard, Jacques Le Mire, Maria A. Dos-Santos, Cheikh S. Sow, Sylvie Cornelie, et al. 2010. 'Human Antibody Response to *Anopheles Gambiae* Saliva: An Immuno-Epidemiological Biomarker to Evaluate the Efficacy of Insecticide-Treated Nets in Malaria Vector Control'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (1): 115–21. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0684>.
- Drame, Papa M., Anne Poinsignon, Célia Dechavanne, Gilles Cottrell, Manon Farce, Rodolphe Ladekpo, Achille Massougboji, et al. 2015. 'Specific Antibodies to *Anopheles GSG6P1* Salivary Peptide to Assess Early Childhood Exposure to Malaria Vector Bites'. *Malaria Journal* 14 (July): 285. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0800-6>.
- Drame, Papa Makhtar, Anne Poinsignon, Patrick Besnard, Sylvie Cornelie, Jacques Le Mire, Jean-Claude Toto, Vincent Foumane, et al. 2010. 'Human Antibody Responses to the *Anopheles* Salivary GSG6-P1 Peptide: A Novel Tool for Evaluating the Efficacy of ITNs in Malaria Vector Control'. *PLoS ONE* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015596>.
- Etente Interdépartementale de Démoustication, 2022. Evolution et historique du moustique tigre <https://www.eid-med.org/historique-et-evolution-du-moustique/>. Consulté le 25 /06/2022 à 05 h 43.
- Eiras, Alvaro E., Laila H. Costa, Luciane G. Batista-Pereira, Kelly S. Paixão, and Elis P. A. Batista. 2021. 'Semi-Field Assessment of the Gravid *Aedes* Trap (GAT) with the Aim of Controlling *Aedes (Stegomyia) Aegypti* Populations'. *PLoS ONE* 16 (4): e0250893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250893>.
- El-Akkad, A. M. 1978. 'Rift Valley Fever Outbreak in Egypt. October--December 1977'. *The Journal of the Egyptian Public Health Association* 53 (3–4): 123–28.
- Elanga Ndille, Emmanuel, Souleymane Doucoure, Georgia Damien, François Mouchet, Papa Makhtar Drame, Sylvie Cornelie, Herbert Noukpo, et al. 2012. 'First Attempt to

- Validate Human IgG Antibody Response to Nterm-34kDa Salivary Peptide as Biomarker for Evaluating Exposure to *Aedes Aegypti* Bites'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (11): e1905. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001905>.
- Elanga Ndille, Emmanuel, Souleymane Doucoure, Anne Poinsignon, François Mouchet, Sylvie Cornelie, Eric D'Ortenzio, Jean Sébastien DeHecq, and Franck Remoue. 2016. 'Human IgG Antibody Response to Aedes Nterm-34kDa Salivary Peptide, an Epidemiological Tool to Assess Vector Control in Chikungunya and Dengue Transmission Area'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (12): e0005109. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005109>.
- Elfving, Karin, Anders Lindblom, and Kenneth Nilsson. 2008. 'Seroprevalence of Rickettsia Spp. Infection among Tick-Bitten Patients and Blood Donors in Sweden'. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 40 (1): 74–77. <https://doi.org/10.1080/00365540701509907>.
- Engel, Dimitri, Hanna Jöst, Michael Wink, Jessica Börstler, Stefan Bosch, Mutien-Marie Garigliany, Artur Jöst, et al. 2016. 'Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa'. *MBio* 7 (1): e01938-01915. <https://doi.org/10.1128/mBio.01938-15>.
- Engler, Olivier, Giovanni Savini, Anna Papa, Jordi Figuerola, Martin H. Groschup, Helge Kampen, Jolyon Medlock, et al. 2013. 'European Surveillance for West Nile Virus in Mosquito Populations'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (10): 4869–95. <https://doi.org/10.3390/ijerph10104869>.
- Eynde, Claudia Van den, Charlotte Sohier, Severine Matthijs, and Nick De Regge. 2022. 'Japanese Encephalitis Virus Interaction with Mosquitoes: A Review of Vector Competence, Vector Capacity and Mosquito Immunity'. *Pathogens* 11 (3). <https://doi.org/10.3390/pathogens11030317>.
- Fagbami, A. H. 1979. 'Zika Virus Infections in Nigeria: Virological and Seroepidemiological Investigations in Oyo State'. *The Journal of Hygiene* 83 (2): 213–19. <https://doi.org/10.1017/s0022172400025997>.
- Fe, Simons, and Peng Z. 2001. 'Mosquito Allergy: Recombinant Mosquito Salivary Antigens for New Diagnostic Tests'. *International Archives of Allergy and Immunology. Int Arch Allergy Immunol.* March 2001. <https://doi.org/10.1159/000053771>.
- Figueiredo, Ana C., Daniele de Sanctis, Ricardo Gutiérrez-Gallego, Tatiana B. Cereija, Sandra Macedo-Ribeiro, Pablo Fuentes-Prior, and Pedro José Barbosa Pereira. 2012. 'Unique Thrombin Inhibition Mechanism by Anophelin, an Anticoagulant from the Malaria Vector'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (52): E3649–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211614109>.
- Fofana, D, Blaise Koné, Naférima Koné, Konan Yao Lucien, Julien Doannio, and K N'goran. 2012. '*Culex Quinquefasciatus* Sensitivity to Insecticides in Relation to the Urbanization Level and Sewage Water in Yopougon, a Township of Abidjan (Côte d'Ivoire)'. *Bulletin de La Société de Pathologie Exotique (1990)* 105 (May): 230–36.
- Fontaine, Albin, Thierry Fusai, Sébastien Briolant, Sylvain Buffet, Claude Villard, Emilie Baudelet, Mathieu Pophillat, Samuel Granjeaud, Christophe Rogier, and Lionel Almeras. 2012. '*Anopheles* Salivary Gland Proteomes from Major Malaria Vectors'. *BMC Genomics* 13 (November): 614. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-614>.
- Fontaine, Albin, Aurélie Pascual, Eve Orlandi-Pradines, Ibrahima Diouf, Franck Remoué, Frédéric Pagès, Thierry Fusai, Christophe Rogier, and Lionel Almeras. 2011.

- ‘Relationship between Exposure to Vector Bites and Antibody Responses to Mosquito Salivary Gland Extracts’. *PLoS ONE* 6 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029107>.
- Fournet, Florence, Stéphane Rican, Zoé Vaillant, Anna Roudot, Aude Meunier-Nikiema, Daouda Kassié, Roch K. Dabiré, and Gérard Salem. 2016. ‘The Influence of Urbanization Modes on the Spatial Circulation of Flaviviruses within Ouagadougou (Burkina Faso)’. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (12). <https://doi.org/10.3390/ijerph13121226>.
- Francis, Sheena, Jervis Crawford, Sashell McKenzie, Towanna Campbell, Danisha Wright, Trevann Hamilton, Sherine Huntley-Jones, et al. 2020. ‘Comparative Toxicity of Larvicides and Growth Inhibitors on *Aedes Aegypti* from Select Areas in Jamaica’. *Royal Society Open Science* 7 (3): 192041. <https://doi.org/10.1098/rsos.192041>.
- Francischetti, Ivo M.B., Eric Calvo, John F. Andersen, Van M. Pham, Amanda J. Favreau, Kent D. Barbian, Alvaro Romero, Jesus G. Valenzuela, and José M.C. Ribeiro. 2010. ‘An Insight into the Sialome of the Bed Bug, *Cimex Lectularius*’. *Journal of Proteome Research* 9 (8): 3820–31. <https://doi.org/10.1021/pr1000169>.
- Francischetti, Ivo M.B., Anderson Sá-Nunes, Ben J. Mans, Isabel M. Santos, and José M.C. Ribeiro. 2009. ‘THE ROLE OF SALIVA IN TICK FEEDING’. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 14 (January): 2051–88.
- Gaibani, Paolo, Anna Pierro, Rosa Alicino, Giada Rossini, Francesca Cavrini, Maria Paola Landini, and Vittorio Sambri. 2012. ‘Detection of Usutu-Virus-Specific IgG in Blood Donors from Northern Italy’. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 12 (5): 431–33. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0813>.
- Garcia, Gustavo Rocha, Sandra Regina Maruyama, Kristina T. Nelson, José Marcos Chaves Ribeiro, Luiz Gustavo Gardinassi, Antonio Augusto Mendes Maia, Beatriz Rossetti Ferreira, Frans N. J. Kooyman, and Isabel K. F. de Miranda Santos. 2017. ‘Immune Recognition of Salivary Proteins from the Cattle Tick *Rhipicephalus Microplus* Differs According to the Genotype of the Bovine Host’. *Parasites & Vectors* 10 (March). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2077-9>.
- Garske, Tini, Maria D. Van Kerkhove, Sergio Yactayo, Olivier Ronveaux, Rosamund F. Lewis, J. Erin Staples, William Perea, and Neil M. Ferguson. 2014. ‘Yellow Fever in Africa: Estimating the Burden of Disease and Impact of Mass Vaccination from Outbreak and Serological Data’. *PLoS Medicine* 11 (5): e1001638. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001638>.
- Gaythorpe, Katy AM, Arran Hamlet, Kévin Jean, Daniel Garkauskas Ramos, Laurence Cibrelus, Tini Garske, and Neil Ferguson. n.d. ‘The Global Burden of Yellow Fever’. *ELife* 10: e64670. <https://doi.org/10.7554/eLife.64670>.
- Gonzalez, J. P., C. Du Saussay, J. C. Gautun, J. B. McCormick, and J. Mouchet. 1985. ‘[Dengue in Burkina Faso (ex-Upper Volta): seasonal epidemics in the urban area of Ouagadougou]’. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique Et De Ses Filiales* 78 (1): 7–14.
- Gould, E.A., and S. Higgs. 2009. ‘Impact of Climate Change and Other Factors on Emerging Arbovirus Diseases’. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103 (2): 109–21. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.07.025>.
- Guagliardo, Sarah Anne J., Yoosook Lee, Amanda A. Pierce, Jacklyn Wong, Yui Yin Chu, Amy C. Morrison, Helvio Astete, et al. 2019. ‘The Genetic Structure of *Aedes Aegypti* Populations Is Driven by Boat Traffic in the Peruvian Amazon’. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13 (9): e0007552. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007552>.

- Guagliardo, Sarah Anne, Amy C. Morrison, Jose Luis Barboza, Dawn M. Wesson, Loganathan Ponnusamy, Helvio Astete, Gonzalo Vazquez-Prokopec, and Uriel Kitron. 2015. 'Evidence for *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Oviposition on Boats in the Peruvian Amazon'. *Journal of Medical Entomology* 52 (4): 726–29. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv048>.
- Gubler, D. J. 1997. 'Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever : Its History and Resurgence as a Global Public Health Problem'. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10014773562/>.
- Gubler, D.J. 2010. 'The Global Threat of Emergent/Re-Emergent Vector-Borne Diseases'. *Vector Biology, Ecology and Control*, 39–62. https://doi.org/10.1007/978-90-4812458-9_4.
- Guy, Bruno, Fernando Noriega, R. Leon Ochiai, Maïna L'azou, Valentine Delore, Anna Skipetrova, François Verdier, Laurent Coudeville, Stephen Savarino, and Nicholas Jackson. 2017. 'A Recombinant Live Attenuated Tetravalent Vaccine for the Prevention of Dengue'. *Expert Review of Vaccines* 16 (7): 1–13. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1335201>.
- Halstead, Scott B., Suchitra Nimmannitya, and Mark R. Margiotta. 1969. 'Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962–1964: II. Observations on Disease in Outpatients'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18 (6): 972–83. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.972>.
- Hamlet, Arran, Katy A. M. Gaythorpe, Tini Garske, and Neil M. Ferguson. 2021. 'Seasonal and Inter-Annual Drivers of Yellow Fever Transmission in South America'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15 (1): e0008974. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008974>.
- Hansen, Gail R. 2004. 'West Nile Virus'. *The Kansas Nurse* 79 (4): 1–2.
- Haussig, Joana M., Johanna J. Young, Céline M. Gossner, Eszter Mezei, Antonino Bella, Anca Sirbu, Danai Pervanidou, Mitra B. Drakulovic, and Bertrand Sudre. 2018. 'Early Start of the West Nile Fever Transmission Season 2018 in Europe'. *Eurosurveillance* 23 (32): 1800428. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.32.1800428>.
- Huang, Yen-Wei, Chun-Ting Lee, Ta-Chen Wang, Yun-Chung Kao, Chih-Hui Yang, Yu-Mei Lin, and Keng-Shiang Huang. 2018. 'The Development of Peptide-Based Antimicrobial Agents against Dengue Virus'. *Current Protein & Peptide Science* 19 (10): 998–1010. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180531122724>.
- Hubálek Zdenek, and Jirí Halouzka. 1999. 'West Nile Fever—a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe - Volume 5, Number 5—October 1999 - Emerging Infectious Diseases Journal - CDC'. Accessed 7 January 2022. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>.
- Ibáñez-Justicia, Adolfo, Nathalie Smits, Wietse den Hartog, Bart van de Vossenbergh, Katrien De Wolf, Isra Deblauwe, Wim Van Bortel, et al. 2020. 'Detection of Exotic Mosquito Species (Diptera: Culicidae) at International Airports in Europe'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17 (10): 3450. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103450>.
- Imam, Imam Z. E., Medhat A. Darwish, and R. El-Karamany. 1979. 'An Epidemic of Rift Valley Fever in Egypt'. *Bulletin of the World Health Organization* 57 (3): 437–39.
- Jain, Jaspreet, Sunil Kumar Dubey, Jatin Shrinet, and Sujatha Sunil. 2017. 'Dengue Chikungunya Co-Infection: A Live-in Relationship?' *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Interdisciplinary approaches to the study of flavivirus, 492 (4): 608–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.008>.

- Jariyapan, Narissara, Wej Choochote, Atchariya Jitpakdi, Thasaneeya Harnnoi, Padet Siriyasatein, Mark C. Wilkinson, and Paul A. Bates. 2006. 'A Glycine- and Glutamate Rich Protein Is Female Salivary Gland-Specific and Abundant in the Malaria Vector *Anopheles Dirus B* (Diptera: Culicidae)'. *Journal of Medical Entomology* 43 (5): 867–74. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[867:agagpi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[867:agagpi]2.0.co;2).
- Javelle, Emilie, Alexandre Lesueur, Vincent Pommier de Santi, Franck de Laval, Thibault Lefebvre, Guillaume Holweck, Guillaume André Durand, Isabelle Leparc-Goffart, Gaëtan Texier, and Fabrice Simon. 2020. 'The Challenging Management of Rift Valley Fever in Humans: Literature Review of the Clinical Disease and Algorithm Proposal'. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 19 (January): 4. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0346-5>.
- Jin, Lin, Xiaomin Guo, Chuanbin Shen, Xue Hao, Peng Sun, Pengpeng Li, Tao Xu, et al. 2018. 'Salivary Factor LTRIN from *Aedes Aegypti* Facilitates the Transmission of Zika Virus by Interfering with the Lymphotoxin- β Receptor'. *Nature Immunology*, March. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0063-9>.
- Joshi, Vinod, R. C. Sharma, Yogesh Sharma, Sandeep Adha, Keerti Sharma, Himmat Singh, Anil Purohit, and Manju Singhi. 2006. 'Importance of Socioeconomic Status and Tree Holes in Distribution of *Aedes* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Jodhpur, Rajasthan, India'. *Journal of Medical Entomology* 43 (2): 330–36. [https://doi.org/10.1603/00222585\(2006\)043\[0330:iOSSat\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/00222585(2006)043[0330:iOSSat]2.0.co;2).
- Jupp, Peter G. 2001. 'The Ecology of West Nile Virus in South Africa and the Occurrence of Outbreaks in Humans'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 951 (1): 143–52. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02692.x>.
- Kamgang, Basile, Aurelie P. Yougang, Micareme Tchoupo, Jacob M. Riveron, and Charles Wondji. 2017. 'Temporal Distribution and Insecticide Resistance Profile of Two Major Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* in Yaoundé, the Capital City of Cameroon'. *Parasites & Vectors* 10 (October). <https://doi.org/10.1186/s13071-0172408-x>.
- Kamhawi, S., Y. Belkaid, G. Modi, E. Rowton, and D. Sacks. 2000. 'Protection against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies'. *Science (New York, N.Y.)* 290 (5495): 1351–54. <https://doi.org/10.1126/science.290.5495.1351>.
- Kamtchum-Tatuene, Joseph, Benjamin L. Makepeace, Laura Benjamin, Matthew Baylis, and Tom Solomon. 2017. 'The Potential Role of Wolbachia in Controlling the Transmission of Emerging Human Arboviral Infections'. *Current Opinion in Infectious Diseases* 30 (1): 108–16. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000342>.
- Kazimírová, Mária, and Iveta Štibrániová. 2013. 'Tick Salivary Compounds: Their Role in Modulation of Host Defences and Pathogen Transmission'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3: 43. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043>.
- Khongwichit, Sarawut, Jira Chansaenroj, Chintana Chirathaworn, and Yong Poovorawan. 2021. 'Chikungunya Virus Infection: Molecular Biology, Clinical Characteristics, and Epidemiology in Asian Countries'. *Journal of Biomedical Science* 28 (December): 84. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00778-8>.
- Klase, Zachary A., Svetlana Khakhina, Adriano De Bernardi Schneider, Michael V. Callahan, Jill Glasspool-Malone, and Robert Malone. 2016. 'Zika Fetal Neuropathogenesis: Etiology of a Viral Syndrome'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (8): e0004877. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004877>.
- Kolodziejek, Jolanta, Christof Jungbauer, Stephan W. Aberle, Franz Allerberger, Zoltán Bagó,

- Jeremy V. Camp, Katharina Dimmel, et al. 2018. 'Integrated Analysis of Human-Animal-Vector Surveillance: West Nile Virus Infections in Austria, 2015–2016'. *Emerging Microbes & Infections* 7 (March): 25. <https://doi.org/10.1038/s41426-0180021-5>.
- Kothera, Linda, John Phan, Enas Ghallab, Mark Delorey, Rebecca Clark, and Harry M. Savage. 2019. 'Using Targeted Next-Generation Sequencing to Characterize Genetic Differences Associated with Insecticide Resistance in *Culex Quinquefasciatus* Populations from the Southern U.S.' *PLoS ONE* 14 (7): e0218397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218397>.
- Kpan, Mintokapieu Didier Stéphane, Akéré Maurice Adja, Négnorogo Guindo-Coulibaly, Konan Fabrice Assouho, Affoué Mireille Nadia Kouadio, Konan Rodolphe Mardoché Azongnibo, Dounin Danielle Zoh, Bi Zahouli Julien Zahouli, Franck Remoue, and Florence Fournet. 2021. 'Spatial Heterogeneity and Seasonal Distribution of *Aedes (Stegomyia) Aegypti* (L) in Abidjan, Côte d'Ivoire'. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 21 (10): 769–76. <https://doi.org/10.1089/vbz.2021.0002>.
- Kraemer, Moritz U. G., Robert C. Reiner, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Marius Gilbert, David M. Pigott, Dingdong Yi, et al. 2019. 'Past and Future Spread of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*'. *Nature Microbiology* 4 (5): 854–63. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>.
- Kraemer, Moritz U. G., Marianne E. Sinka, Kirsten A. Duda, Adrian Q. N. Mylne, Freya M. Shearer, Christopher M. Barker, Chester G. Moore, et al. 2015. 'The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus*'. *ELife* 4 (June): e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.
- Kraemer, Moritz UG, Marianne E Sinka, Kirsten A Duda, Adrian QN Mylne, Freya M Shearer, Christopher M Barker, Chester G Moore, et al. n.d. 'The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus*'. *ELife* 4. Accessed 23 January 2018. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.
- Kramer, Laura D., Linda M. Styer, and Gregory D. Ebel. 2008. 'A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus'. *Annual Review of Entomology* 53: 61–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>.
- Krauer, Fabienne, Maurane Riesen, Ludovic Reveiz, Olufemi T. Oladapo, Ruth Martínez-Vega, Teegwendé V. Porgo, Anina Haefliger, Nathalie J. Broutet, and Nicola Low. 2017. 'Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review'. *PLoS Medicine* 14 (1): e1002203. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002203>.
- Lanciotti, Robert S., Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, Alison J. Johnson, Stephanie M. Stanfield, and Mark R. Duffy. 2008. 'Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007'. *Emerging Infectious Diseases* 14 (8): 1232–39. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>.
- Lazarus, Clément, Marie Guichard, Jean-Marc Philippe, Thierry Paux, and Benoit Vallet. 2016. 'The French Experience of the Threat Posed by Zika Virus'. *The Lancet* 388 (10039): 9–11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30509-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30509-8).
- L'Azou, Maïna, Tiphonie Succo, Mamadou Kamagaté, Abdoulaye Ouattara, Elia Gilbert, Edgar Adjogoua, and Christine Luxemburger. 2015. 'Dengue: Etiology of Acute Febrile Illness in Abidjan, Côte d'Ivoire, in 2011–2012'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 109 (11): 717–22. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv076>.

- Lednicky, John, Valery Madsen Beau De Rochars, Maha El Badry, Julia Loeb, Taina Telisma, Sonese Chavannes, Gina Anilis, et al. 2016. 'Zika Virus Outbreak in Haiti in 2014: Molecular and Clinical Data'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (4): e0004687. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004687>.
- Lestinova, Tereza, Iva Rohousova, Michal Sima, Camila I. de Oliveira, and Petr Volf. 2017. 'Insights into the Sand Fly Saliva: Blood-Feeding and Immune Interactions between Sand Flies, Hosts, and Leishmania'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (7): e0005600. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005600>.
- Leta, Samson, Tariku Jibat Beyene, Eva M. De Clercq, Kebede Amenu, Moritz U. G. Kraemer, and Crawford W. Revie. 2018. 'Global Risk Mapping for Major Diseases Transmitted by *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*'. *International Journal of Infectious Diseases* 67 (February): 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>.
- Lode, Himeline Ariane Délé. 2012. 'Contribution à l'élaboration d'un plan stratégique de gestion des ordures ménagères de la Commune rurale de Logobou (région de l'Est).', June, 69.
- Londono-Renteria, Berlin, Jenny C. Cardenas, Lucio D. Cardenas, Rebecca C. Christofferson, Daniel M. Chisenhall, Dawn M. Wesson, Michael K. McCracken, Daisy Carvajal, and Christopher N. Mores. 2013. 'Use of Anti-*Aedes Aegypti* Salivary Extract Antibody Concentration to Correlate Risk of Vector Exposure and Dengue Transmission Risk in Colombia'. *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081211>.
- Londono-Renteria, Berlin, Papa M. Drame, Thomas Weitzel, Reinaldo Rosas, Crystal Gripping, Jenny C. Cardenas, Marcela Alvares, et al. 2015. 'An. Gambiae GSG6-P1 Evaluation as a Proxy for Human-Vector Contact in the Americas: A Pilot Study'. *Parasites & Vectors* 8 (October). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1160-3>.
- Madison-Antenucci, Susan, Laura D. Kramer, Linda L. Gebhardt, and Elizabeth Kauffman. 2020. 'Emerging Tick-Borne Diseases'. *Clinical Microbiology Reviews* 33 (2): e0008318. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-18>.
- Mannasse, Batya, Ella Mendelson, Laor Orshan, Orna Mor, Uri Shalom, Tamar Yeger, and Yaniv Lustig. 2017. 'Usutu Virus RNA in Mosquitoes, Israel, 2014-2015'. *Emerging Infectious Diseases* 23 (10): 1699–1702. <https://doi.org/10.3201/eid2310.171017>.
- Manning, Jessica E, David M Morens, Shaden Kamhawi, Jesus G Valenzuela, and Matthew Memoli. 2018. 'Mosquito Saliva: The Hope for a Universal Arbovirus Vaccine?' *The Journal of Infectious Diseases* 218 (1): 7–15. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy179>.
- Marchette, N. J., R. Garcia, and A. Rudnick. 1969. 'Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18 (3): 411–15. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411>.
- Marquetti, M. C., V. Valdés, L. Aguilera, and A. Navarro. 2000. '[Entomological surveillance over *Aedes (S) aegypti* and other culicids in Ciudad de La Habana, Cuba 1991-1996]'. *Revista cubana de medicina tropical* 52 (2): 133–37.
- Martinet, Jean-Philippe, Hubert Ferté, Anna-Bella Failloux, Francis Schaffner, and Jérôme Depaquit. 2019. 'Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review'. *Viruses* 11 (11): 1059. <https://doi.org/10.3390/v11111059>.
- Martinez, Julien, Alicia Showering, Catherine Oke, Robert T. Jones, and James G. Logan. 2021. 'Differential Attraction in Mosquito–Human Interactions and Implications for Disease Control'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376 (1818): 20190811. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0811>.
- Massé, N, B Selisko, H Malet, F Peyrane, C Debarnot, E Decroly, and D Benarroch. 2022. 'Le virus de la dengue : cibles virales et antiviraux' 11: 13.

- Mathieu-Daudé, Françoise, Aurore Claverie, Catherine Plichart, Denis Boulanger, Fingani A. Mphande, and Hervé C. Bossin. 2018. 'Specific Human Antibody Responses to *Aedes Aegypti* and *Aedes Polynesiensis* Saliva: A New Epidemiological Tool to Assess Human Exposure to Disease Vectors in the Pacific'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006660>.
- Mattingly, P. F. 1957. 'Genetical Aspects of the *Aedes Aegypti* Problem. I. Taxonom: And Bionomics'. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 51 (4): 392–408.
- Mavalankar, Dileep, Priya Shastri, and Parvathy Raman. 2007. 'Chikungunya Epidemic in India: A Major Public-Health Disaster'. *The Lancet Infectious Diseases* 7 (5): 306–7. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70091-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70091-9).
- Mbogo, Charles M., Joseph M. Mwangangi, Joseph Nzovu, Weidong Gu, Guiyan Yan, James T. Gunter, Chris Swalm, et al. 2003. 'Spatial and Temporal Heterogeneity of *Anopheles* Mosquitoes and *Plasmodium Falciparum* Transmission along the Kenyan Coast'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68 (6): 734–42.
- Mbow, M. L., J. A. Bleyenbergh, L. R. Hall, and R. G. Titus. 1998. 'Phlebotomus Papatasi Sand Fly Salivary Gland Lysate Down-Regulates a Th1, but up-Regulates a Th2, Response in Mice Infected with *Leishmania Major*'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (10): 5571–77.
- Medlock, J. M., K. M. Hansford, V. Versteirt, B. Cull, H. Kampen, D. Fontenille, G. Hendrickx, H. Zeller, W. Van Bortel, and F. Schaffner. 2015. 'An Entomological Review of Invasive Mosquitoes in Europe'. *Bulletin of Entomological Research* 105 (6): 637–63. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000103>.
- Mellor, P. S., J. Boorman, and M. Baylis. 2000. 'Culicoides Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors'. *Annual Review of Entomology* 45: 307–40. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.307>.
- Meulen, K. M. van der, M. B. Pensaert, and H. J. Nauwynck. 2005. 'West Nile Virus in the Vertebrate World'. *Archives of Virology* 150 (4): 637–57. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0463-z>.
- Mohamed, Mohamed, Fausta Mosha, Janeth Mghamba, Sherif R. Zaki, Wun-Ju Shieh, Janusz Paweska, Sylvia Omulo, et al. 2010. 'Epidemiologic and Clinical Aspects of a Rift Valley Fever Outbreak in Humans in Tanzania, 2007'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (2 Suppl): 22–27. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0318>.
- Monath, Thomas P., and Pedro F. C. Vasconcelos. 2015. 'Yellow Fever'. *Journal of Clinical Virology* 64 (March): 160–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>.
- Montero, Antonio. 2015. 'Chikungunya Fever – A New Global Threat'. *Medicina Clinica (English Ed.)* 145 (3): 118–23. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2014.05.013>.
- Morales-Pérez, Arcadio, Elizabeth Nava-Aguilera, Carlos Hernández-Alvarez, Víctor Manuel Alvarado-Castro, Jorge Arosteguí, José Legorreta-Soberanis, Miguel Flores-Moreno, et al. 2020. 'Utility of Entomological Indices for Predicting Transmission of Dengue Virus: Secondary Analysis of Data from the Camino Verde Trial in Mexico and Nicaragua'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14 (10): e0008768. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008768>.
- Morris, Joan K, Helen Dolk, Pablo Durán, and Ieda Maria Orioli. 2020. 'Use of Infectious Disease Surveillance Reports to Monitor the Zika Virus Epidemic in Latin America and the Caribbean from 2015 to 2017: Strengths and Deficiencies'. *BMJ Open* 10 (12): e042869. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-042869>.

- Morris, R. V., C. B. Shoemaker, J. R. David, G. C. Lanzaro, and R. G. Titus. 2001. 'Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania Major* and Vaccinating against It Protects against *L. Major* Infection'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (9): 5226–30.
- Mourya, Devendra T., Mangesh D. Gokhale, Triparna D. Majumdar, Pragya D. Yadav, Vimal Kumar, and Mangala S. Mavale. 2018. 'Experimental Zika Virus Infection in *Aedes Aegypti*: Susceptibility, Transmission & Co-Infection with Dengue & Chikungunya Viruses'. *The Indian Journal of Medical Research* 147 (1): 88–96. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1142_17.
- Moyes, C. L., R. S. Lees, C. Yunta, K. J. Walker, K. Hemmings, F. Oladepo, P. A. Hancock, D. Weetman, M. J. I. Paine, and H. M. Ismail. 2021. 'Assessing Cross-Resistance within the Pyrethroids in Terms of Their Interactions with Key Cytochrome P450 Enzymes and Resistance in Vector Populations'. *Parasites & Vectors* 14 (February): 115. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04609-5>.
- Moyes, Catherine L., John Vontas, Ademir J. Martins, Lee Ching Ng, Sin Ying Kou, Isabelle Dusfour, Kamaraju Raghavendra, et al. 2017. 'Contemporary Status of Insecticide Resistance in the Major *Aedes* Vectors of Arboviruses Infecting Humans'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>.
- Murugesan, Amudhan, and Mythreyee Manoharan. 2020. 'Dengue Virus'. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*, 281–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-8194003.00016-8>.
- Musso, D., E. J. Nilles, and V.-M. Cao-Lormeau. 2014. 'Rapid Spread of Emerging Zika Virus in the Pacific Area'. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (10): 0595596. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>.
- Mutebi, John-Paul, and Alan D. T. Barrett. 2002. 'The Epidemiology of Yellow Fever in Africa'. *Microbes and Infection* 4 (14): 1459–68.
- Muturi, Ephantus J., Joseph M. Mwangangi, Benjamin G. Jacob, Josephat I. Shililu, Charles M. Mbogo, John I. Githure, and Robert J. Novak. 2009. 'Spatiotemporal Dynamics of Immature Culicines (Subfamily Culicinae) and Their Larval Habitats in Mwea Rice Scheme, Kenya'. *Parasitology Research* 104 (4): 851–59. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1266-z>.
- Muturi, Ephantus J., Josephat I. Shililu, Weidong Gu, Benjamin G. Jacob, John I. Githure, and Robert J. Novak. 2007. 'Larval Habitat Dynamics and Diversity of *Culex* Mosquitoes in Rice Agro-Ecosystem in Mwea, Kenya'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (1): 95–102.
- Nascimento, Kauani Larissa Campana, João Fernando Marques da Silva, João Antonio Cyrino Zequi, and José Lopes. 2020. 'Comparison Between Larval Survey Index and Positive Ovitrap Index in the Evaluation of Populations of *Aedes (Stegomyia) Aegypti* (Linnaeus, 1762) North of Paraná, Brazil'. *Environmental Health Insights* 14 (January). <https://doi.org/10.1177/1178630219886570>.
- Nderitu, Leonard, John S. Lee, Jared Omolo, Sylvia Omulo, Monica L. O'Guinn, Allen Hightower, Fausta Masha, et al. 2011. 'Sequential Rift Valley Fever Outbreaks in Eastern Africa Caused by Multiple Lineages of the Virus'. *The Journal of Infectious Diseases* 203 (5): 655–65. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq004>.
- Ndille, Emmanuel Elanga, Audrey Dubot-Pérès, Souleymane Doucoure, François Mouchet, Sylvie Cornelié, Bounpone Sidavong, Florence Fournet, and Franck Remoue. 2014a.

- 'Human IgG Antibody Response to Aedes Aegypti Nterm-34 KDa Salivary Peptide as an Indicator to Identify Areas at High Risk for Dengue Transmission: A Retrospective Study in Urban Settings of Vientiane City, Lao PDR'. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH* 19 (5): 576–80. <https://doi.org/10.1111/tmi.12280>.
- Neelakanta, Girish, and Hameeda Sultana. 2015. 'Transmission-Blocking Vaccines: Focus on Anti-Vector Vaccines against Tick-Borne Diseases'. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 63 (3): 169–79. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0324-8>.
- Nikolay, Birgit, Mawlouth Diallo, Cheikh Saad Bouh Boye, and Amadou Alpha Sall. 2011. 'Usutu Virus in Africa'. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 11 (11): 1417–23. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0631>.
- Nkoghe, Dieudonné, Roland Fabrice Kassa, Mélanie Caron, Gilda Grard, Illich Mombo, Branly Bikié, Christophe Paupy, Pierre Becquart, Ulrich Bisvigou, and Eric Maurice Leroy. 2012. 'Clinical Forms of Chikungunya in Gabon, 2010'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (2): e1517. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001517>.
- Ojwang, Joshua O., Shoukath Ali, Donald F. Smee, John D. Morrey, Craig D. Shimasaki, and Robert W. Sidwell. 2005. 'Broad-Spectrum Inhibitor of Viruses in the Flaviviridae Family'. *Antiviral Research* 68 (2): 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.06.002>.
- Organisation mondiale de la Santé. 2019. Propagation mondiale de la dengue (<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>)
- Organisation mondiale de la Santé. 2018. *Stratégie mondiale pour l'élimination des épidémies de fièvre jaune (EYE) 2017–2026*. Genève: Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272955>.
- Orlandi-Pradines, Eve, Lionel Almeras, Laure Denis de Senneville, Solenne Barbe, Franck Remoué, Claude Villard, Sylvie Cornelie, et al. 2007. 'Antibody Response against Saliva Antigens of Anopheles Gambiae and Aedes Aegypti in Travellers in Tropical Africa'. *Microbes and Infection* 9 (12–13): 1454–62. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.07.012>.
- Parker, Casey N., Roberto M. Pereira, Rebecca W. Baldwin, Alexandra Chaskopoulou, and Philip G. Koehler. 2017. 'Laboratory Evaluation of a Novel Lethal Ovitrap for Control of Aedes Aegypti'. *Journal of Medical Entomology* 54 (6): 1666–73. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx161>.
- Paupy, C., H. Delatte, L. Bagny, V. Corbel, and D. Fontenille. 2009. 'Aedes Albopictus, an Arbovirus Vector: From the Darkness to the Light'. *Microbes and Infection* 11 (14–15): 1177–85. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>.
- Paz, Shlomit, and Jan C. Semenza. 2016. 'El Niño and Climate Change--Contributing Factors in the Dispersal of Zika Virus in the Americas?' *Lancet (London, England)* 387 (10020): 745. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00256-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00256-7).
- Pecorari, M., G. Longo, W. Gennari, A. Grottola, Am Sabbatini, S. Tagliazucchi, G. Savini, et al. 2009. 'First Human Case of Usutu Virus Neuroinvasive Infection, Italy, August-September 2009'. *Euro Surveillace: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 14 (50): 19446.
- Peng, Z., W.W. Xu, Y. Sham, H. Lam, D. Sun, C. Li, N.F. Rasic, Q. Guan, A.A. James, and F.E.R. Simons. 2016. 'Mosquito Salivary Allergen Aed a 3: Cloning, Comprehensive Molecular Analysis, and Clinical Evaluation'. *Allergy* 71 (5): 621–28. <https://doi.org/10.1111/all.12812>.
- Peng, Zhikang, Hongbing Li, and F. Estelle R. Simons. 1998. 'Immunoblot Analysis of Salivary Allergens in 10 Mosquito Species with Worldwide Distribution and the Human IgE

- Responses to These Allergens'. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101 (4): 498–505. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70357-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70357-4).
- Peng, Zhikang, Nivez Rasic, Yan Liu, and F. Estelle R. Simons. 2002. 'Mosquito Saliva Specific IgE and IgG Antibodies in 1059 Blood Donors'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (5): 816–17. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.128736>.
- Peng, Zhikang, and F. Estelle R. Simons. 2004. 'Mosquito Allergy: Immune Mechanisms and Recombinant Salivary Allergens'. *International Archives of Allergy and Immunology* 133 (2): 198–209. <https://doi.org/10.1159/000076787>.
- Pingen, Marieke, Michael A. Schmid, Eva Harris, and Clive S. McKimmie. 2017. 'Mosquito Biting Modulates Skin Response to Virus Infection'. *Trends in Parasitology* 33 (8): 645–57. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.003>.
- Poinsignon, A., D. Boulanger, F. Binetruy, E. Elguero, F. Darriet, P. Gallian, X. De Lamballerie, R. N. Charrel, and F. Remoue. 2019. 'Risk Factors of Exposure to Aedes Albopictus Bites in Mainland France Using an Immunological Biomarker'. *Epidemiology and Infection* 147 (July). <https://doi.org/10.1017/S0950268819001286>.
- Poinsignon, Anne, Sylvie Cornelie, Fatou Ba, Denis Boulanger, Cheikh Sow, Marie Rossignol, Cheikh Sokhna, Badara Cisse, François Simondon, and Franck Remoue. 2009. 'Human IgG Response to a Salivary Peptide, GSG6-P1, as a New Immuno-Epidemiological Tool for Evaluating Low-Level Exposure to Anopheles Bites'. *Malaria Journal* 8 (August): 198. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-198>.
- Poinsignon, Anne, Franck Remoue, Marie Rossignol, Sylvie Cornelie, David Courtin, Pascal Grébaut, Andre Garcia, and Francois Simondon. 2008. 'Human IgG Antibody Response to Glossina Saliva: An Epidemiologic Marker of Exposure to Glossina Bites'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78 (5): 750–53.
- Poinsignon, Anne, Badara Samb, Souleymane Doucoure, Papa-Makhtar Drame, Jean Biram Sarr, Cheikh Sow, Sylvie Cornelie, et al. 2010. 'First Attempt to Validate the GSG6-P1 Salivary Peptide as an Immuno-Epidemiological Tool for Evaluating Human Exposure to Anopheles Funestus Bites: GSG6-P1 Salivary Peptide as an Immuno-Epidemiological Tool'. *Tropical Medicine & International Health* 15 (10): 1198–1203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02611.x>.
- Ponlawat, Alongkot, Prasan Kankaew, Somporn Chanaimongkol, Arissara Pongsiri, Jason H. Richardson, and Brian P. Evans. 2016. 'Semi-Field Evaluation of Metofluthrin Impregnated Nets on Host-Seeking Aedes Aegypti and Anopheles Dirus'. *Journal of the American Mosquito Control Association* 32 (2): 130–38. <https://doi.org/10.2987/moco-32-02-130-138.1>.
- Powell, Jeffrey R., and Walter J. Tabachnick. 2013. 'History of Domestication and Spread of Aedes Aegypti--a Review'. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108 Suppl 1: 11–17. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>.
- Regis, Lêda N., Ridelane Veiga Acioli, José Constantino Silveira, Maria Alice Varjal Melo Santos, Wayner Vieira Souza, Cândida M. Nogueira Ribeiro, Juliana C. Serafim da Silva, et al. 2013. 'Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities'. *PloS One* 8 (7): e67682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067682>.
- Remoli, Maria Elena, Maribel Jiménez, Claudia Fortuna, Eleonora Benedetti, Antonella Marchi, Domenico Genovese, Marina Gramiccia, Ricardo Molina, and Maria Grazia Ciufolini. 2016. 'Phleboviruses Detection in Phlebotomus Perniciosus from a Human Leishmaniasis Focus in South-West Madrid Region, Spain'. *Parasites & Vectors* 9 (April): 205. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1488-3>.

- Remoue, Franck, Eric Alix, Sylvie Cornelie, Cheikh Sokhna, Badara Cisse, Souleymane Doucoure, François Mouchet, Denis Boulanger, and François Simondon. 2007. 'IgE and IgG4 Antibody Responses to Aedes Saliva in African Children'. *Acta Tropica* 104 (2–3): 108–15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.07.011>.
- Remoue, Franck, Badara Cisse, Fatou Ba, Cheikh Sokhna, Jean-Pierre Herve, Denis Boulanger, and François Simondon. 2006. 'Evaluation of the Antibody Response to Anopheles Salivary Antigens as a Potential Marker of Risk of Malaria'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100 (4): 363–70. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.032>.
- Ribeiro, J. M. 1995. 'Blood-Feeding Arthropods: Live Syringes or Invertebrate Pharmacologists?' *Infectious Agents and Disease* 4 (3): 143–52.
- Ribeiro, José M. C., Bruno Arcà, Fabrizio Lombardo, Eric Calvo, Van My Phan, Prafulla K. Chandra, and Stephen K. Wikel. 2007. 'An Annotated Catalogue of Salivary Gland Transcripts in the Adult Female Mosquito, Aedes Aegypti'. *BMC Genomics* 8 (January): 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-6>.
- Ribeiro, José M. C., Rosane Charlab, Van My Pham, Mark Garfield, and Jesus G. Valenzuela. 2004. 'An Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of the Adult Female Mosquito Culex Pipiens Quinquefasciatus'. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (6): 543–63. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.02.008>.
- Ribeiro, José M. C., Ines Martin-Martin, Bruno Arcà, and Eric Calvo. 2016. 'A Deep Insight into the Sialome of Male and Female Aedes Aegypti Mosquitoes'. *PLoS ONE* 11 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151400>.
- Ribeiro, José M.C., Ines Martin-Martin, Fernando R. Moreira, Kristen A. Bernard, and Eric Calvo. 2018. 'A Deep Insight into the Male and Female Sialotranscriptome of Adult Culex Tarsalis Mosquitoes'. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 95 (April): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.001>.
- Ridde, Valéry, Isabelle Agier, Emmanuel Bonnet, Mabel Carabali, Kounbobr Roch Dabiré, Florence Fournet, Antarou Ly, Ivlabèhiré Bertrand Meda, and Beatriz Parra. 2016. 'Presence of Three Dengue Serotypes in Ouagadougou (Burkina Faso): Research and Public Health Implications'. *Infectious Diseases of Poverty* 5 (April): 23. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0120-2>.
- Ridde, Valéry, Mabel Carabali, Antarou Ly, Thomas Druetz, Seni Kouanda, Emmanuel Bonnet, and Slim Haddad. 2014. 'The Need for More Research and Public Health Interventions on Dengue Fever in Burkina Faso'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (6): e2859. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002859>.
- Robinson, Marion C. 1955. 'An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. I. Clinical Features'. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49 (1): 28–32. [https://doi.org/10.1016/00359203\(55\)90080-8](https://doi.org/10.1016/00359203(55)90080-8).
- Roche, Benjamin, Lucas Léger, Grégory L'Ambert, Guillaume Lacour, Rémi Foussadier, Gilles Besnard, Hélène Barré-Cardi, Frédéric Simard, and Didier Fontenille. 2015. 'The Spread of Aedes Albopictus in Metropolitan France: Contribution of Environmental Drivers and Human Activities and Predictions for a Near Future'. *PLoS ONE* 10 (5): e0125600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125600>.
- Rodhain, F. 2015. 'Les insectes comme vecteurs : systématique et biologie: -EN- Insects as vectors: systematics and biology -FR- -ES- Los insectos como vectores : sistemática y biología'. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 34 (1): 67–96. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2346>.

- Rohousová, Iva, and Petr Volf. 2006. 'Sand Fly Saliva: Effects on Host Immune Response and Leishmania Transmission'. *Folia Parasitologica* 53 (3): 161–71.
- Rossi da Silva, Karina, William Ribeiro da Silva, Bianca Piraccini Silva, Adriano Nobre Arcos, Francisco Augusto da Silva Ferreira, Joelma Soares-da-Silva, Grafe Oliveira Pontes, et al. 2021. 'New Traps for the Capture of *Aedes Aegypti* (Linnaeus) and *Aedes Albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) Eggs and Adults'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15 (4): e0008813. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008813>.
- Rossi, Shannan L., Ted M. Ross, and Jared D. Evans. 2010. 'West Nile Virus'. *Clinics in Laboratory Medicine* 30 (1): 47–65. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.006>.
- Russo, Gianluca, Lorenzo Subissi, and Giovanni Rezza. 2020. 'Chikungunya Fever in Africa: A Systematic Review'. *Pathogens and Global Health* 114 (3): 136–44. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1748965>.
- Sabatini, A., V. Raineri, G. Trovato, and M. Coluzzi. 1990. '[*Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area]'. *Parassitologia* 32 (3): 301–4.
- Sáez-Llorens, Xavier, Vianney Tricou, Delia Yu, Luis Rivera, Suely Tuboi, Pedro Garbes, Astrid Borkowski, and Derek Wallace. 2017. 'Safety and Immunogenicity of One versus Two Doses of Takeda's Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Asia and Latin America: Interim Results from a Phase 2, Randomised, Placebo-Controlled Study'. *The Lancet. Infectious Diseases* 17 (6): 615–25. [https://doi.org/10.1016/S14733099\(17\)30166-4](https://doi.org/10.1016/S14733099(17)30166-4).
- Sagna, André B., Daouda Kassié, Agnès Couvray, Akre Maurice Adja, Emmanuel Hermann, Gilles Riveau, Gérard Salem, Florence Fournet, and Franck Remoue. 2019. 'Spatial Assessment of Contact Between Humans and *Anopheles* and *Aedes* Mosquitoes in a Medium-Sized African Urban Setting, Using Salivary Antibody-Based Biomarkers'. *The Journal of Infectious Diseases* 220 (7): 1199–1208. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz289>.
- Sagna, André B., Mabo C. Yobo, Emmanuel Elanga Ndille, and Franck Remoue. 2018a. 'New Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to *Aedes* Vector Bites: From Concept to Applications'. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 3 (3). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3030080>.
- Sagna, André B., Mabo C. Yobo, Emmanuel Elanga Ndille and Franck Remoue. 2018. 'New Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to *Aedes* Vector Bites: From Concept to Applications'. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 3 (3). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3030080>.
- Salako, Albert Sourou, Razaki Ossè, Gil G. Padonou, Fortuné Dagnon, Rock Aïkpon, Casimir Kpanou, Hermann Sagbohan, Arthur Sovi, Michel Sèzonlin, and Martin C. Akogbeto. 2019. 'Population Dynamics of *Anopheles Gambiae* s.l. and *Culex Quinquefasciatus* in Rural and Urban Settings Before an Indoor Residual Spraying Campaign in Northern Benin'. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 19 (9): 674–84. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2409>.
- Sambri, V., M. Capobianchi, R. Charrel, M. Fyodorova, P. Gaibani, E. Gould, M. Niedrig, et al. 2013. 'West Nile Virus in Europe: Emergence, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention'. *Clinical Microbiology and Infection* 19 (8): 699–704. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12211>.
- Samy, Abdallah M., Arwa H. Elaagip, Mohamed A. Kenawy, Constância F. J. Ayres, A. Townsend Peterson, and Doaa E. Soliman. 2016. 'Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of the Mosquito *Culex Quinquefasciatus*, Vector of West

- Nile Virus and Lymphatic Filariasis'. *PLoS ONE* 11 (10): e0163863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163863>.
- Sang, Rosemary C., Ouledi Ahmed, Ousmane Faye, Cindy L. H. Kelly, Ali Ahmed Yahaya, Ibrahim Mmadi, Ali Toilibou, et al. 2008. 'Entomologic Investigations of a Chikungunya Virus Epidemic in the Union of the Comoros, 2005'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78 (1): 77–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.77>.
- Schmid, Michael A., Elizabeth Kauffman, Anne Payne, Eva Harris, and Laura D. Kramer. 2017. 'Preparation of Mosquito Salivary Gland Extract and Intradermal Inoculation of Mice'. *Bio-Protocol* 7 (14). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2407>.
- Schmidt, Alexander C., Leyi Lin, Luis J. Martinez, Richard C. Ruck, Kenneth H. Eckels, Alix Collard, Rafael De La Barrera, et al. 2017. 'Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (6): 1325–37. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0634>.
- Schneider, Bradley S., and Stephen Higgs. 2008. 'The Enhancement of Arbovirus Transmission and Disease by Mosquito Saliva Is Associated with Modulation of the Host Immune Response'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 (5): 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.024>.
- Schneider, Bradley S., Lynn Soong, Lark L. Coffey, Heather L. Stevenson, Charles E. McGee, and Stephen Higgs. 2010. 'Aedes Aegypti Saliva Alters Leukocyte Recruitment and Cytokine Signaling by Antigen-Presenting Cells during West Nile Virus Infection'. *PLoS ONE* 5 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011704>.
- Schoeler, George B., Sonya S. Schleich, Stephen A. Manweiler, and Victor Lopez Sifuentes. 2004. 'Evaluation of Surveillance Devices for Monitoring Aedes Aegypti in an Urban Area of Northeastern Peru'. *Journal of the American Mosquito Control Association* 20 (1): 6–11.
- Schwartz, Olivier, and Matthew L. Albert. 2010. 'Biology and Pathogenesis of Chikungunya Virus'. *Nature Reviews. Microbiology* 8 (7): 491–500. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>.
- Schwarz, Alexandra, Nora Medrano-Mercado, Peter F. Billingsley, Günter A. Schaub, and Jeremy M. Sternberg. 2010. 'IgM-Antibody Responses of Chickens to Salivary Antigens of Triatoma Infestans as Early Biomarkers for Low-Level Infestation of Triatomines'. *International Journal for Parasitology* 40 (11): 1295–1302. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.03.013>.
- Scott, T. W., and A. Morrison. 2004. 'Aedes Aegypti Density and the Risk of Dengue-Virus Transmission'. *Frontis*, March, 187–206.
- Sergon, Kibet, Charles Njuguna, Rosalia Kalani, Victor Ofula, Clayton Onyango, Limbaso S. Konongoi, Sheryl Bedno, et al. 2008. 'Seroprevalence of Chikungunya Virus (CHIKV) Infection on Lamu Island, Kenya, October 2004'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78 (2): 333–37. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.333>.
- Shi, Yingchao, Shihua Li, Qian Wu, Le Sun, Junjing Zhang, Na Pan, Qihui Wang, et al. 2018. 'Vertical Transmission of the Zika Virus Causes Neurological Disorders in Mouse Offspring'. *Scientific Reports* 8 (1): 3541. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21894w>.
- Simpson, D. I. 1964. 'ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 58 (July): 335–38.
- Smith, Leticia B., Shinji Kasai, and Jeffrey G. Scott. 2016. 'Pyrethroid Resistance in Aedes Aegypti and Aedes Albopictus: Important Mosquito Vectors of Human Diseases'.

- Pesticide Biochemistry and Physiology* 133 (October): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.005>.
- Smithburn, K. C., T. P. Hughes, A. W. Burke, and J. H. Paul. 1940. ‘A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda’. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1-20 (4): 471–92. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1940.s120.471>.
- Snyman, Jumari, Gert J. Venter, and Marietjie Venter. 2021. ‘An Investigation of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) as Potential Vectors of Medically and Veterinary Important Arboviruses in South Africa’. *Viruses* 13 (10): 1978. <https://doi.org/10.3390/v13101978>.
- Souza-Neto, Jayme A., Fábio P. Machado, José B. Lima, Denise Valle, and Paulo E. M. Ribolla. 2007. ‘Sugar Digestion in Mosquitoes: Identification and Characterization of Three Midgut Alpha-Glucosidases of the Neo-Tropical Malaria Vector Anopheles Aquasalis (Diptera: Culicidae)’. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 147 (4): 993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.008>.
- Souza-Neto, Jayme A., Jeffrey R. Powell, and Mariangela Bonizzoni. 2019. ‘Aedes Aegypti Vector Competence Studies: A Review’. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 67 (January): 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>.
- Sow, Abdourahmane, Oumar Faye, Mawlouth Diallo, Diawo Diallo, Rubing Chen, Ousmane Faye, Cheikh T. Diagne, et al. 2018. ‘Chikungunya Outbreak in Kedougou, Southeastern Senegal in 2009-2010’. *Open Forum Infectious Diseases* 5 (1): ofx259. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx259>.
- Sri-In, Chalida, Shih-Che Weng, Wen-Yu Chen, Betty A. Wu-Hsieh, Wu-Chun Tu, and Shin-Hong Shiao. 2019. ‘A Salivary Protein of Aedes Aegypti Promotes Dengue-2 Virus Replication and Transmission’. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 111 (August): 103181. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103181>.
- Staunton, Kyran M., Jacob E. Crawford, Devon Cornel, Peter Yeeles, Mark Desnoyer, Josh Livni, Jodi Holeman, F. Stephen Mulligan, Nigel Snoad, and Scott A. Ritchie. 2020. ‘Environmental Influences on Aedes Aegypti Catches in Biogents Sentinel Traps during a Californian “Rear and Release” Program: Implications for Designing Surveillance Programs’. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14 (6): e0008367. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008367>.
- Sudeep, A. B., and P. Shil. 2017. ‘Aedes Vittatus (Bigot) Mosquito: An Emerging Threat to Public Health’. *Journal of Vector Borne Diseases* 54 (4): 295–300. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.225833>.
- Sule, Waidi F., Daniel O. Oluwayelu, Luis M. Hernández-Triana, Anthony R. Fooks, Marietjie Venter, and Nicholas Johnson. 2018. ‘Epidemiology and Ecology of West Nile Virus in Sub-Saharan Africa’. *Parasites & Vectors* 11 (1): 414. <https://doi.org/10.1186/s13071018-2998-y>.
- Suman, Devi S., Yi Wang, and Randy Gaugler. 2015. ‘The Insect Growth Regulator Pyriproxyfen Terminates Egg Diapause in the Asian Tiger Mosquito, Aedes Albopictus’. *PloS One* 10 (6): e0130499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130499>.
- Sumarmo, H. Wulur, E. Jahja, D. J. Gubler, W. Suharyono, and K. Sorensen. 1983. ‘Clinical Observations on Virologically Confirmed Fatal Dengue Infections in Jakarta, Indonesia’. *Bulletin of the World Health Organization* 61 (4): 693–701.
- Surasombatpattana, Pornapat, Peeraya Ekchariyawat, Rodolphe Hamel, Sirilaksana Patramool, Supatra Thongrunkiat, Mélanie Denizot, Pascal Delaunay, et al. 2014. ‘Aedes Aegypti Saliva Contains a Prominent 34-KDa Protein That Strongly Enhances Dengue Virus

- Replication in Human Keratinocytes'. *The Journal of Investigative Dermatology* 134 (1): 281–84. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.251>.
- Svensjö, Erik, Elvira M. Saraiva, Rafael Silveira Amendola, Christina Barja-Fidalgo, Marcelo T. Bozza, Ethan A. Lerner, Mauro M. Teixeira, and Julio Scharfstein. 2012. 'Maxadilan, the *Lutzomyia Longipalpis* Vasodilator, Drives Plasma Leakage via PAC1–CXCR1/2-Pathway'. *Microvascular Research* 83 (2): 185–93. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2011.10.003>.
- Tarnagda, Zékiba, Assana Cissé, Brice Wilfried Bicaba, Serge Diabougou, Tani Sagna, Abdoul Kader Ilboudo, Dieudonné Tialla, et al. 2018. 'Dengue Fever in Burkina Faso, 2016'. *Emerging Infectious Diseases* 24 (1): 170–72. <https://doi.org/10.3201/eid2401.170973>.
- Tauxe, Genevieve M., Dyan MacWilliam, Sean Michael Boyle, Tom Guda, and Anandasankar Ray. 2013. 'Targeting a Dual Detector of Skin and CO₂ to Modify Mosquito Host Seeking'. *Cell* 155 (6): 1365–79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.013>.
- Tikhomirov, P. A. 1972. '[Use of trichlophos against the imago stage of *Aedes* under field and laboratory conditions]'. *Meditinskaiia Parazitologiia I Parazitarnye Bolezni* 41 (1): 107–8.
- Titus, R. G., and J. M. Ribeiro. 1988. 'Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia Longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity'. *Science (New York, N.Y.)* 239 (4845): 1306–8. <https://doi.org/10.1126/science.3344436>.
- Tong, Christelle, Emilie Javelle, Gilda Gard, Aissata Dia, Constance Lacrosse, Toscane Fourié, Patrick Gravier, et al. 2019. 'Tracking Rift Valley Fever: From Mali to Europe and Other Countries, 2016'. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 24 (8). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800213>.
- Trájer, Attila J. 2021. 'Aedes Aegypti in the Mediterranean Container Ports at the Time of Climate Change: A Time Bomb on the Mosquito Vector Map of Europe'. *Heliyon* 7 (9): e07981. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07981>.
- Traoré, Dipomin F., André B. Sagna, Akre M. Adja, Dounin D. Zoh, Kouassi A. Adou, Kouassi N. Lingué, Issa Coulibaly, et al. 2019. 'Exploring the Heterogeneity of Human Exposure to Malaria Vectors in an Urban Setting, Bouaké, Côte d'Ivoire, Using an Immuno-Epidemiological Biomarker'. *Malaria Journal* 18 (March). <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2696-z>.
- Traoré, Dipomin F., André B. Sagna, Serge B. Assi, Bertin N'Cho Tchikoi, Akre M. Adja, Mamadou Dagnogo, Alphonsine A. Koffi, Christophe Rogier, and Franck Remoue. 2020. 'Operational Evaluation of the Effectiveness of Long-Lasting Insecticidal Nets on Human-Vector Contact in an African Urban Malaria Context'. *Open Forum Infectious Diseases* 8 (2): ofaa635. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa635>.
- Tripathi, Nagesh K., and Ambuj Shrivastava. 2018. 'Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines'. *Frontiers in Immunology* 9 (August): 1919. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01919>.
- Tur, Carlos, David Almenar, Sandra Benlloch-Navarro, Rafael Argilés-Herrero, Mario Zacarés, Vicente Dalmau, and Ignacio Pla. 2021. 'Sterile Insect Technique in an Integrated Vector Management Program against Tiger Mosquito *Aedes Albopictus* in the Valencia Region (Spain): Operating Procedures and Quality Control Parameters'. *Insects* 12 (3). <https://doi.org/10.3390/insects12030272>.
- Vasconcelos, Pedro F. C., and Thomas P. Monath. 2016. 'Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health'. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 16 (8): 566–67. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2031>.

- Vasilakis, Nikos, Robert B. Tesh, Vsevolod L. Popov, Steve G. Widen, Thomas G. Wood, Naomi L. Forrester, Jean Paul Gonzalez, et al. 2019. 'Exploiting the Legacy of the Arbovirus Hunters'. *Viruses* 11 (5): 471. <https://doi.org/10.3390/v11050471>.
- Vicente, Creuza Rachel, Karl-Heinz Herbinger, Günter Fröschl, Camila Malta Romano, Aline de Souza Areias Cabidelle, and Crispim Cerutti Junior. 2016. 'Serotype Influences on Dengue Severity: A Cross-Sectional Study on 485 Confirmed Dengue Cases in Vitória, Brazil'. *BMC Infectious Diseases* 16 (July): 320. <https://doi.org/10.1186/s12879-0161668-y>.
- Walker, Kathleen R, Daniel Williamson, Yves Carrière, Pablo A Reyes-Castro, Steven Haenchen, Mary H Hayden, Eileen Jeffrey Gutierrez, and Kacey C Ernst. 2018. 'Socioeconomic and Human Behavioral Factors Associated With *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Immature Habitat in Tucson, AZ'. *Journal of Medical Entomology* 55 (4): 955–63. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy011>.
- Were, Fred. 2012. 'The Dengue Situation in Africa'. *Paediatrics and International Child Health* 32 Suppl 1 (May): 18–21. <https://doi.org/10.1179/2046904712Z.00000000048>.
- Whitehead, Stephen S. 2016. 'Development of TV003/TV005, a Single Dose, Highly Immunogenic Live Attenuated Dengue Vaccine; What Makes This Vaccine Different from the Sanofi-Pasteur CYD™ Vaccine?' *Expert Review of Vaccines* 15 (4): 509–17. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1115727>.
- Whiteman, Ari, Carmelo Gomez, Jose Rovira, Gang Chen, W. Owen McMillan, and Jose Loaiza. 2019. 'Aedes Mosquito Infestation in Socioeconomically Contrasting Neighborhoods of Panama City'. *EcoHealth* 16 (2): 210–21. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01417-3>.
- 'WHO | Dengue Fever – Burkina Faso'. n.d. WHO. World Health Organization. Accessed 21 April 2021. <http://www.who.int/csr/don/18-november-2016-dengue-burkina-faso/en/>. 'WHO | Dengue Fever – Côte d'Ivoire'. 2017. WHO. World Health Organization. 6 May 2017. <http://www.who.int/csr/don/04-august-2017-dengue-cote-d-ivoire/en/>.
- Wilson-Bahun, Theodel A., Basile Kamgang, Arsène Lenga, and Charles S. Wondji. 2020. 'Larval Ecology and Infestation Indices of Two Major Arbovirus Vectors, *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazzaville, the Capital City of the Republic of the Congo'. *Parasites & Vectors* 13 (September): 492. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04374-x>.
- Wolff, Gabriella H., and Jeffrey A. Riffell. 2018. 'Olfaction, Experience and Neural Mechanisms Underlying Mosquito Host Preference'. *The Journal of Experimental Biology* 221 (Pt 4): jeb157131. <https://doi.org/10.1242/jeb.157131>. World Health Organizations. 2014. 'A Global Brief on Vector-Borne Diseases', April. www.who.int/world-health-day.
- Wright, Daniel, Jeroen Kortekaas, Thomas A. Bowden, and George M. Warimwe. 2019. 'Rift Valley Fever: Biology and Epidemiology'. *The Journal of General Virology* 100 (8): 1187–99. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001296>.
- Wu, Jinhua, Alope Kumar Bera, Richard J. Kuhn, and Janet L. Smith. 2005. 'Structure of the Flavivirus Helicase: Implications for Catalytic Activity, Protein Interactions, and Proteolytic Processing'. *Journal of Virology* 79 (16): 10268–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10268-10277.2005>.
- Xavier, Morgana do Nascimento, Marina Praxedes Rodrigues, Danielle Cristina Tenório Varjal de Melo, Eloína Maria de Mendonça Santos, Rosângela Maria Rodrigues Barbosa, and Cláudia Maria Fontes de Oliveira. 2020. 'Double BR-OVT: A New Trap Model for

- Collecting Eggs and Adult Mosquitoes from *Culex Quinquefasciatus* and *Aedes Spp.*' *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 62 (March): e94. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062094>.
- Yobo, Céline Mabot, Cécile Agnimou Malanfoua Sadia-Kacou, Maurice Akéré Adja, Emmanuel Elanga-Ndille, André Barembaye Sagna, Négnorogo Guindo-Coulibaly, Anne Poinsignon, Franck Remoue, and Benjamin Guibéhi Koudou. 2018. 'Evaluation of Human Exposure to *Aedes* Bites in Rubber and Palm Cultivations Using an Immunoepidemiological Biomarker'. *BioMed Research International* 2018 (August). <https://doi.org/10.1155/2018/3572696>.
- Yoshida, Shigeto, Toshiki Sudo, Masashi Niimi, Lian Tao, Bing Sun, Junichi Kambayashi, Hiroyuki Watanabe, Enjie Luo, and Hiroyuki Matsuoka. 2008. 'Inhibition of Collagen-Induced Platelet Aggregation by Anopheline Antiplatelet Protein, a Saliva Protein from a Malaria Vector Mosquito'. *Blood* 111 (4): 2007–14. <https://doi.org/10.1182/blood2007-06-097824>.
- Zahouli, Julien B. Z., Benjamin G. Koudou, Pie Müller, David Malone, Yao Tano, and Jürg Utzinger. 2017. 'Effect of Land-Use Changes on the Abundance, Distribution, and Host-Seeking Behavior of *Aedes* Arbovirus Vectors in Oil Palm-Dominated Landscapes, Southeastern Côte d'Ivoire'. Edited by Richard Paul. *PLOS ONE* 12 (12): e0189082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189082>.
- Zientara, S., C. Beck, and S. Lecollinet. 2020. 'Arboviroses Émergentes : Fièvre West Nile, Fièvre Catarrhale Ovine et Virus Schmallenberg'. *Bulletin De L'Academie Nationale De Medecine* 204 (9): 992–99. <https://doi.org/10.1016/j.banm.2020.09.041>.