



Apport de la spectrométrie de masse MALO/-TOF à la surveillance des moustiques vecteurs d'arbovirus

Antsa Harivolana Ando Rakotonirina

► To cite this version:

Antsa Harivolana Ando Rakotonirina. Apport de la spectrométrie de masse MALO/-TOF à la surveillance des moustiques vecteurs d'arbovirus. Biodiversité et Ecologie. Université de Nouvelle Calédonie, 2021. Français. NNT : 2021NCAL0009 . tel-03725620v2

HAL Id: tel-03725620

<https://unc.hal.science/tel-03725620v2>

Submitted on 22 Feb 2023

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.



Université de la Nouvelle-Calédonie

Ecole doctorale du Pacifique

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

Unité de Recherche et d'Expertise en Entomologie Médicale

Doctorat

Discipline : Biologie des populations et écologie

**Apport de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la
surveillance des moustiques vecteurs d'arbovirus**

Présentée par **Antsa RAKOTONIRINA**

Thèse codirigée par Vincent RICHARD et Myrielle DUPONT-ROUZEYROL

Co-encadrée par Nicolas POCQUET

Soutenu le 24 juin 2021

Devant le jury composé de :

M. Hamid AMIR, Professeur Emérite	Examinateur
Mme. Anna-Bella FAILLOUX, Professeure	Rapporteur
M. Christophe PAUPY, Directeur de Recherche	Rapporteur
M. Vincent RICHARD, Docteur, HDR	Directeur de thèse
Mme. Myrielle DUPONT-ROUZEYROL, Docteur, HDR	Co-directrice de thèse
M. Nicolas POCQUET, Docteur	Co-encadrant de thèse

Remerciements

La thèse de doctorat représente l'aube de la maturité scientifique, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

Premièrement, je tiens à remercier Nicolas Pocquet, mon co-encadrant de thèse. Je te remercie d'avoir facilité mon installation en Nouvelle-Calédonie. Je te remercie de m'avoir guidée durant ces trois belles années d'aventures. Nos conversations scientifiques ont été de véritables moments d'échange au cours desquels tu m'as transmis tes qualités de réflexion, d'analyse et de synthèse. Pour ta rigueur que tu m'as patiemment inculquée, pour tes qualités rédactionnelles que tu m'as transmises, pour la confiance que tu m'as accordée en me chargeant de ce projet de thèse, pour ton soutien durant ces trois ans, pour ta gentillesse et tout le reste, Nicolas, Merci beaucoup !

Je remercie également Vincent Richard pour avoir accepté de diriger cette thèse. C'est en grande partie grâce à toi que j'ai pu obtenir le financement pour la réalisation de ce travail. Merci pour l'intérêt que tu as porté à cette étude, pour tes relectures, pour ton soutien et pour tes conseils notamment sur la partie statistique.

A Myrielle Dupont-Rouzeyrol. Merci d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Merci beaucoup pour les échanges qu'on a eus. Merci infiniment pour les relectures et corrections, toujours réalisées en un temps record. Tes encouragements et ton soutien m'ont été précieux durant cette thèse.

Ces quelques mots suffisent à peine pour exprimer ma reconnaissance envers Marc Jouan qui m'a ouvert la porte du doctorat, il y a trois ans, en m'accordant la bourse doctorale Calmette et Yersin du Réseau International des Instituts Pasteur. De plus, vous avez toujours été bienveillant avec moi depuis le premier jour où vous avez pris le poste de Directeur Général de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC). Pour cela, je vous en suis vraiment reconnaissante.

J'aimerais remercier Anna-Bella Failloux et Christophe Paupy pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire. Je remercie également Amir Hamid pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Christian Milles, Yvon Cavaloc, Hervé Jourdan et Sébastien Boyer pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse durant ces trois années. Ce fût un plaisir d'avoir échangé avec vous. Merci beaucoup pour vos encouragements et conseils avisés.

J'ai eu la chance d'avoir été accueillie dans une équipe géniale. Ainsi, je remercie du fond du cœur toute l'équipe de l'Unité de Recherche et d'Expertise en Entomologie Médicale (URE-EM) pour ces trois années. Véritables amis et collègues dévoués, chacun d'entre vous a accompagné cette thèse. Morgane, j'ai vu en toi sincérité, bienveillance, rigueur et de nombreuses qualités que je ne pourrais pas lister. Merci beaucoup pour tous les moments qu'on a passés ensemble. Tu as été une oreille patiente et tu trouvais toujours les mots justes pour m'encourager. Merci infiniment pour ton aide durant les manipulations au labo, les analyses des données mais surtout ton soutien et ton aide lors de la rédaction des papiers et de la thèse. Sosiasi, j'ai fait mes premières expériences de terrain avec toi, que j'ai particulièrement appréciées de par ta gentillesse et ta bienveillance. Merci de m'avoir partagé tes connaissances notamment en identification morphologique. Jordan, merci pour nos fous rires et pour ton aide durant l'élevage mais également l'extraction des protéines. Marine, merci beaucoup pour ta gentillesse et ton franc-parler, souvent nécessaire. Valentine, tu m'as permis d'être un peu soulagée en m'apportant ton aide au moment où j'en avais le plus besoin. Je te remercie pour ton énorme contribution à la réalisation de ce travail, pour ta rigueur ainsi que pour ton enthousiasme. Je te remercie également pour les mini-appels vidéo durant le premier confinement qui m'ont permis de me sentir moins seule. Sylvie, tes petites attentions m'ont énormément touchée et m'ont été précieuses durant la rédaction. Je te remercie pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton soutien et tout le reste. Je te remercie également pour ton dévouement et ton aide durant mes dernières manipulations bien que tu aies été débordée de ton côté. Un grand merci à Hugo, Bryan, Kenny, Jean-Louis et Jean-Pascal. Vous m'avez apporté, chacun à votre façon, de la motivation et du courage durant cette thèse, notamment lors de la rédaction du manuscrit. Merci infiniment pour tous ces beaux moments qu'on a partagés ensemble.

Je tiens à te remercier Emilie pour m'avoir initiée à l'utilisation du MALDI-TOF. Merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse. J'espère que ta thèse se passe bien et que, comme moi, tu

t'épanouiras. Malia, toutes ces heures passées devant le MALDI-TOF resteront d'excellents souvenirs de partage scientifique et humain ! Tu as vécu avec moi, avec sincérité, les satisfactions des manipulations réussies et les frustrations des celles échouées. Merci infiniment pour ta grande compréhension et ton aide, aussi bien à la paillasse que lors de l'analyse des données. Merci beaucoup Malia !

Julie, que dire de plus en dehors de tout ce qu'on s'est déjà dit ! Ta bienveillance, ton écoute et ton aide m'ont solidement épaulée durant cette thèse. Tes questions et remarques, toujours pertinentes, qui m'ont valu parfois quelques heures de biblio, ont enrichi ma réflexion scientifique. Nous avons appris à compter l'une sur l'autre. Nos soirées pizza, nos sorties, nos fous rires et tout le reste sont de beaux souvenirs que je n'oublierai jamais. J'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront un jour. Karl, tes capacités à me faire rire sont irremplaçables. Merci beaucoup pour ton soutien et tes encouragements particulièrement importants durant ces dernières semaines de rédaction.

Mariko...la liste est longue ! Merci pour ta gentillesse et pour tes petites attentions qui m'ont touchées. Merci d'avoir été une oreille, merci pour ton soutien et tous tes conseils.

Merci à Dominique, la personne la plus douce que je connaisse. Merci pour m'avoir transmis un peu de ta large connaissance scientifique et technique. Tu m'as appris, avec patience, à s'occuper des cellules et à réaliser les purifications bactériennes. Tu as continué à prendre de mes nouvelles et à me guider à distance sur les manipulations même après avoir pris ta retraite. Merci infiniment ma petite Domi !

Je tiens à remercier Cyrille Goarant, coordinateur scientifique de l'IPNC pour nos échanges scientifiques et humains.

Mes vifs remerciements à Laurent Guillaumot et Arnaud Cannet. Merci beaucoup pour votre gentillesse, pour les échanges qu'on a eus et les questions pertinentes qui m'ont été utiles durant la préparation de la thèse.

Je remercie toutes les personnes de l'IPNC que j'ai côtoyées au cours de ces trois ans. Je remercie particulièrement le personnel de la DAF qui se sont occupés de toutes les parties administratives et qui m'ont permis de rester sereine pendant toutes ces années.

Je remercie Nazha Selmaoui-Folcher et Cédric Caruzzo de l'Institut des Sciences Exactes et Appliquées de l'Université de Nouvelle-Calédonie pour leur aide et les échanges qu'on a eu notamment sur l'analyse des spectres par les techniques d'intelligence artificielle. Merci également à Marie Marin pour sa contribution à l'étude sur la détection de Wolbachia par MALDI-TOF.

Je voudrais remercier Yves Letourneur, les membres de l'Université de Nouvelle-Calédonie et de l'Ecole Doctorale du Pacifique pour leur aide et pour les différentes formations proposées pendant ces trois ans de thèse.

A ma famille, surtout à mes parents qui sont une vraie source d'inspiration, de courage et de ténacité. Vous m'avez appris à ne jamais baisser les bras malgré les difficultés de la vie. Vous m'avez permis de croire en mes rêves. Vous avez fait beaucoup de sacrifices pour que votre petite fille devienne Docteur.

Enfin, à Celui qui peut tout, Celui qui me berce de son Amour et de ses grâces, dans mes moments de doutes et dans mes joies. Ce Dieu auquel je crois est toujours resté fidèle. Merci d'avoir placé sur ma route toutes ces personnes, qui m'ont soutenue, guidée et éclairée tout au long de ce parcours.

Résumé

La région Pacifique est régulièrement touchée par des épidémies liées aux virus de la dengue (DENV), du Zika (ZIKV) et du chikungunya (CHIKV). Les moustiques impliqués dans la transmission de ces arbovirus sont notamment *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* et *Aedes polynesiensis*, ces deux derniers appartenant au groupe *Scutellaris*. Il existe également, dans le Pacifique, d'autres espèces du groupe *Scutellaris* impliquées ou suspectées dans la transmission du DENV. L'accélération des échanges internationaux pourrait favoriser la dispersion de ces espèces dans toute la région, voire dans le monde. L'introduction de ces espèces en Nouvelle-Calédonie, où le seul vecteur connu de DENV est *Ae. aegypti*, pourrait compromettre la stratégie de lutte mise en place au travers du *World Mosquito Program* (WMP). Cette stratégie vise à réduire les épidémies de dengue grâce aux lâchers d'*Ae. aegypti* infectés par *Wolbachia* sur le terrain, qui ont une capacité de transmission réduite des arbovirus.

Dans ce contexte, un renforcement de la surveillance entomologique via une bonne identification des moustiques est essentiel. Un suivi régulier de l'implémentation du WMP en Nouvelle-Calédonie est également nécessaire. Cette thèse s'est donc intéressée à : (i) optimiser et développer la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight*) pour l'identification des moustiques en Nouvelle-Calédonie, dans le Pacifique et dans le monde et (ii) à développer un outil permettant la détection de *Wolbachia* chez *Ae. aegypti* en associant l'utilisation du MALDI-TOF à des techniques modernes d'analyse des données. Ainsi, nous avons pu démontrer la capacité du MALDI-TOF à identifier les espèces de moustiques capturés sur le terrain, à une échelle locale, régionale et internationale. Cet outil a également permis d'identifier les *Aedes* du groupe *Scutellaris*, qui sont morphologiquement et phylogénétiquement proches. Le MALDI-TOF, couplé aux techniques d'analyse de données par l'intelligence artificielle, a également été capable de distinguer les *Ae. aegypti* infectés ou non par *Wolbachia*. Ces travaux ont notamment souligné l'importance d'approfondir les connaissances sur les *Aedes* du groupe *Scutellaris*, dans une perspective de mieux les contrôler.

Mots clés : *Aedes*, *Scutellaris*, Moustiques vecteurs, Spectrométrie de masse MALDI-TOF, Région Pacifique, *Wolbachia*, Nouvelle-Calédonie.

Abstract

The Pacific region is regularly affected by epidemics due to the dengue, Zika and chikungunya viruses (DENV, ZIKV and CHIKV). The mosquitoes involved in the transmission of these arboviruses are *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Aedes polynesiensis*, these last two species belonging to the *Scutellaris* group. The Pacific region also hosts other species of the *Scutellaris* group, involved or suspected in the DENV transmission. The threat of their dispersal in the Pacific region and other world regions is on the rise due to the expansion of human travel and international trade. The introduction of these species to New Caledonia, where the only known DENV vector is *Ae. aegypti*, could compromise the control strategy implemented through the World Mosquito Program (WMP). This strategy aims to reduce dengue epidemics by releasing *Ae. aegypti* infected with *Wolbachia* in the field, which have a reduced ability to transmit arboviruses.

In this context, strengthening entomological surveillance which relies on accurate mosquito species identification is required. In addition, improving the monitoring of WMP implementation in New Caledonia is also necessary. This thesis therefore focused on: (i) optimizing and developing MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) mass spectrometry for the identification of mosquitoes in New Caledonia, in the Pacific region and in the world and (ii) developing a tool allowing the detection of *Wolbachia* in *Ae. aegypti* by combining the use of MALDI-TOF with modern data analysis techniques. Thus, we demonstrated the ability of MALDI-TOF to identify mosquito species collected from the field, at a local, regional and international scales. This tool also allowed the identification of the *Aedes* of the *Scutellaris* group, which are morphologically and phylogenetically closely. In addition, MALDI-TOF, coupled with artificial intelligence techniques, was also able to distinguish *Wolbachia*-infected and uninfected *Ae. aegypti* collected from the field. This work has notably underlined the importance of improving the knowledge about the *Aedes* of the *Scutellaris* group in order to control these species.

Key words: *Aedes*, *Scutellaris*, Vector mosquitoes, MALDI-TOF Mass Spectrometry, Pacifique region, *Wolbachia*, New Caledonia.

x

Table des matières

Remerciements.....	iii
Résumé	vii
Abstract	ix
Table des matières	xi
Financements et récompenses.....	xiii
Collaboration et participation	xv
Articles scientifiques	xvii
Communications scientifiques.....	xix
Liste des figures	xxi
Liste des tableaux.....	xxi
Liste des abréviations.....	xxiii
Glossaire	xxv
Chapitre 1 : Introduction.....	3
I.1. Les maladies à transmission vectorielle dans le monde.....	3
I.1.1. Impact sur la santé humaine	3
I.1.2. Principaux pathogènes transmis par les <i>Culicidae</i>	5
I.1.3. Circulation d'arbovirus dans le Pacifique	6
I.2. Rôles des <i>Culicidae</i> dans la transmission d'arbovirus	9
I.2.1. Cycle de vie des <i>Culicidae</i>	9
I.2.2. Notion de compétence et de capacité vectorielles.....	11
I.2.3. Les <i>Culicidae</i> vecteurs d'arbovirus dans le Pacifique	13
I.3. Invasion des <i>Culicidae</i> : une menace pour la santé publique.....	19
I.3.1. Le processus d'invasion	19
I.3.2. Histoire de l'invasion d' <i>Aedes aegypti</i>	20
I.3.3. L'exemple récent d' <i>Aedes albopictus</i>	21
I.3.4. Le cas de la Nouvelle-Calédonie	22
I.4. Lutte contre les arboviroses	23
I.4.1. Les vaccins et traitements contre les arboviroses	23
I.4.2. Les méthodes de lutte antivectorielle.....	23
I.4.3. Blocage de la réplication virale chez <i>Aedes aegypti</i> via l'infection par <i>Wolbachia</i> : une méthode prometteuse dans la lutte contre les arboviroses.....	26

I.5. Importance de l'identification des moustiques	29
I.5.1. Adaptation de la lutte antivectorielle à l'espèce visée	29
I.5.2. Surveillance entomologique.....	30
I.6. Les méthodes d'identification	31
I.6.1. Méthode morphologique	31
I.6.2. Morphométrie des ailes	32
I.6.3. Méthodes moléculaires.....	33
I.7. MALDI-TOF MS : une méthode prometteuse en entomologie médicale.....	35
I.7.1. Principe du MALDI-TOF	35
I.7.2. Identification des espèces de moustiques par MALDI-TOF.....	38
I.7.3. Détection des microorganismes chez les moustiques	40
I.7.4. Apport des réseaux de neurones convolutifs dans l'analyse des données entomologiques.	41
I.8. Objectifs du travail de thèse.....	43
Chapitre 2 : Optimisation de l'utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des moustiques de Nouvelle-Calédonie	47
II.1. Contexte spécifique de l'étude	47
II.2. Principaux résultats et conclusion.....	48
II.3. Article 1	49
Chapitre 3 : Développement du MALDI-TOF pour l'identification des vecteurs du virus de la dengue à l'échelle régionale et internationale	53
III.1. Contexte spécifique de l'étude	53
III.2. Principaux résultats et conclusion.....	54
III.3. Article 2	55
Chapitre 4 : Développement du MALDI-TOF couplé aux réseaux de neurones convolutifs pour détecter <i>Wolbachia</i> chez les <i>Aedes aegypti</i> de Nouvelle-Calédonie	59
IV.1. Contexte spécifique de l'étude.....	59
IV.2. Principaux résultats et conclusion	60
IV.3. Article 3	61
Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives	65
Références bibliographiques	73

Financements et récompense

Financements :

Cette thèse a reçu le soutien financier :

- du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP, Bourse doctorale Calmette et Yersin),
- de l'Etat Français, via le Fonds de coopération économique, social et culturel pour le Pacifique sud,
- de l'institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC).

Récompense :

- Premier prix du Jury, ma thèse en 180 secondes, 2020, Université de Nouvelle-Calédonie.

Collaboration et participation

L'ensemble de ces travaux a pu être réalisé grâce à la participation de plusieurs partenaires notamment :

- L’Institut Pasteur de Madagascar, l’Institut Pasteur du Laos et l’Institut Pasteur du Cambodge qui nous ont fourni des échantillons de moustiques,
- L’Agence de Santé de Wallis et Futuna et le ministère de la Santé publique de Fidji qui ont participés aux collectes des échantillons sur le terrain,
- L’Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA, Nazha Selmaoui-Folcher et Cédric Caruzzo) de l’Université de Nouvelle-Calédonie (UNC) qui ont fait les analyses des spectres par les techniques d’intelligence artificielle.

Durant cette thèse, avec l'aide des différents membres de l'équipe de l'URE-EM et du groupe de Recherche en Bactériologie expérimentale, j'ai réalisé l'intégralité des travaux, notamment l'échantillonnage sur le terrain en Nouvelle-Calédonie et lors d'une mission à Madagascar, l'analyse des moustiques en laboratoire et l'analyse des données. Deux stagiaires (Marie Marin et Cédric Caruzzo) que j'ai co-encadrés ont également contribué à cette étude. J'ai personnellement rédigé la version initiale des trois publications scientifiques issues de cette thèse et suis correspondante du premier article.

Articles scientifiques

Articles scientifiques issus de ce travail de thèse (3) :

1. Rakotonirina A, Pol M, Kainiu M, Barsac E, Tutagata J, Kilama S, O'Connor O, Tarantola A, Colot J, Dupont-Rouzeyrol M, Richard V. and Pocquet N. MALDI-TOF MS: Optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasites and Vectors*. 2020;13(359):1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04234-8>
2. Rakotonirina A., Pol M., Raharimalala FN., Ballan V., Kainiu M, Boyer S., Kilama S, Barsac E, Marcombe S., Russet S., Girod R., Brey P., Colot J., Dupont-Rouzeyrol M, Richard V. and Pocquet N. MALDI-TOF MS: an effective tool for a global surveillance of dengue vector species. (in prep).
3. Rakotonirina A., Carruzzo C., Ballan V., Kainiu M, Marin M, Colot J., Richard V., Dupont-Rouzeyrol M, Selmaoui-Folcher N. and Pocquet N. *Wolbachia* detection in *Aedes aegypti* using MALDI-TOF MS coupled to artificial intelligence. (submitted).

Autre article scientifique (1) :

4. Tantely ML, Randrianambintsoa FJ, Rakotonirina A, Woog F, Boyer S and Girod R. Discrimination of *Uranotaenia* species (Diptera: Culicidae) from Madagascar based on morphology and wing morphometric traits. *Zootaxa*. 2020;4801(1):171–8. <https://doi.org/10.11164/zootaxa.4801.1.9>

Communications scientifiques

1. Rakotonirina, A., Pol, M., Barsac, E., Tutagata, J., Kilama, S., Richard, V., Colot, J., Pocquet, N. 2018. Identification moléculaire et par spectrométrie de masse des *Aedes* du groupe *Scutellaris*, moustiques vecteurs d'arbovirus dans le Pacifique. *Communication affichée*. Doctoriales. Université de Nouvelle-Calédonie. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
2. Rakotonirina, A., Pol, M., Kainiu, M., Barsac, E., Tutagata, J., Kilama, S., O'Connor, O., Tarantola, A., Colot, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Richard, V., Pocquet, N. 2019. La spectrométrie de masse MALDI-TOF : un outil pour l'identification des moustiques. *Communication orale*. Doctoriales. Université de Nouvelle-Calédonie. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
3. Rakotonirina, A., Pol, M., Kainiu, M., Barsac, E., Tutagata, J., Kilama, S., O'Connor, O., Tarantola, A., Colot, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Richard, V., Pocquet, N. 2019. La spectrométrie de masse MALDI-TOF : un outil pour l'identification des moustiques. *Communication orale*. Fête de la Science. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
4. Pocquet, N, Rakotonirina, A., Dupont-Rouzeyrol, M., Jouan, M. Projet VECPAE - Vecteurs d'arbovirus dans le Pacifique : diversité, répartition et outils d'identification des *Aedes* sp. pour la santé publique. Rapport de fin de projet. 2021. 1-30. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
5. Rakotonirina A., Carruzzo C., Ballan V., Kainiu M, Marin M, Colot J., Richard V., Dupont-Rouzeyrol M, Selmaoui-Folcher N. and Pocquet N. *Wolbachia* detection in *Aedes aegypti* using MALDI-TOF MS coupled to artificial intelligence. 2021. Monash/New Caledonia Scientific Meeting (zoom).

Liste des figures

Figure 1. Cycle de vie des moustiques.....	9
Figure 2. Vue dorsale de six espèces d'<i>Aedes</i> du groupe <i>Scutellaris</i>.....	14
Figure 3. Distribution mondiale d'<i>Ae. aegypti</i>	21
Figure 4. Distribution mondiale d'<i>Ae. albopictus</i>.....	22
Figure 5. Introduction d'<i>Ae. aegypti</i> infecté par <i>Wolbachia</i> dans une population de moustiques sauvages	27
Figure 6. Photo d'une aile de moustique avec les points de références.....	32
Figure 7. Exemple de spectres obtenus au MALDI-TOF	36
Figure 8. Principe du MALDI-TOF.....	37
Figure 9. Cadre d'action de l'OMS pour la lutte contre les moustiques vecteurs.....	71

Liste de tableau

Tableau 1. Liste des espèces du groupe <i>Scutellaris</i> impliquées ou suspectées dans la transmission d'arbovirus dans le Pacifique	18
--	----

Liste des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
CHIKV :	Virus du chikungunya
Cox1 :	Cytochrome Oxydase 1
DENV :	Virus de la dengue
IC :	Incompatibilité Cytoplasmique
IPNC :	Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
ISEA :	Institut des Sciences Exactes et Appliquées
ITS1 :	Internal Transcribed Spacer 1
ITS2 :	Internal Transcribed Spacer 2
LAMP :	Loop-mediated isothermal amplification
MALDI-TOF :	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP :	Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism
RIIP :	Réseau International des Institut Pasteur
TII :	Technique d'Insectes Incompatibles
TIS :	Technique d'Insectes Stériles
UNC :	Université de Nouvelle-Calédonie
URE-EM :	Unité de Recherche et d'Expertise en Entomologie Médicale
WMP :	World Mosquito Program
YFV :	Virus de la fièvre jaune
ZIKV :	Virus du Zika

Glossaire

Anthropophile :	caractère d'un moustique appréciant l'Homme ou son environnement.
Complexe d'espèces :	espèces morphologiquement identiques.
Culicidae :	la famille des moustiques.
Cycle gonotrophique :	cycle relatif à la prise d'un repas et à l'élaboration d'une ponte.
Endophile :	caractère d'un moustique ayant une préférence marquée de se reposer à l'intérieur des maisons.
Exophile :	caractère d'un moustique ayant une préférence marquée de se reposer à l'extérieur des maisons.
Exophage :	caractère d'un moustique ayant une préférence marquée de piquer son hôte à l'extérieur des maisons.
Exuvie :	chez les arthropodes, enveloppe cuticulaire acellulaire que le corps de l'animal a quittée lors de la mue.
Groupe d'espèces :	espèces morphologiquement proches.
Gy (ou Gray) :	unité utilisée pour mesurer la quantité totale de rayonnement auquel un individu est exposé. Un Gray (Gy) représente une énergie d'un Joule (J) absorbé dans 1 Kg de matière.
Scutum :	chez les insectes pièce de l'exosquelette, en position dorsale, sur le thorax.
Spermathèques :	chez les arthropodes, structure de l'appareil génital femelle qui emmagasine et préserve le sperme du mâle après la copulation.
Vecteur :	tout arthropode qui assure la transmission active (mécanique ou biologique) d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré ; ordinairement un insecte hématophage ou une tique.
Zoophile :	Caractère d'un moustique qui est attiré par les animaux ou leur proximité.

Chapitre 1 : Introduction



Photographie de larves d'Aedes aegypti (Crédit photo : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, M. Pol, 2017)

Chapitre 1 : Introduction

I.1. Les maladies à transmission vectorielle dans le monde

I.1.1. Impact sur la santé humaine

Les maladies à transmission vectorielle constituent un problème majeur de santé publique dans le monde. Elles représentent environ 17 % de l'ensemble des maladies infectieuses et sont responsables de plus d'un million de décès par an (OMS, 2020d). Elles touchent principalement les populations des zones tropicales et subtropicales, provoquant de nombreux décès et surchargeant les systèmes de santé (OMS, 2017a). Au cours des dernières décennies, une fréquence accrue de leur transmission et un élargissement de leur répartition géographique ont été observées (Gubler, 2009).

Parmi les principales maladies à transmission vectorielles humaines figurent le paludisme, la dengue, le Zika, le chikungunya et la fièvre jaune (OMS, 2017a). D'autres maladies vectorielles ont une importance plus locale touchant certaines zones ou populations bien spécifiques. C'est par exemple le cas de la loase, une filariose humaine cutanée due à un helminthe *Loa loa* et transmis par les *Chrysops*, qui est uniquement présente en Afrique de l'Ouest et Centrale (Zouré et al., 2011).

Le paludisme est la maladie vectorielle faisant le plus de victimes, avec plus de 400 000 morts en 2018 (OMS, 2019b). Cette maladie touche particulièrement les pays Africains. En effet, selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la région Afrique a enregistré, à elle seule, 94% des décès liés au paludisme dans le monde en 2018 (OMS, 2019b). La maladie se manifeste par de la fièvre cycliques, des maux de tête ou encore des vomissements et peut occasionner des troubles circulatoires (OMS, 2019b).

La dengue, quant à elle, est la maladie à transmission vectorielle qui se propage le plus rapidement dans le monde. Son incidence a été multipliée par plus de huit au cours des dernières

décennies (OMS, 2020b). Une étude sur la prévalence de la dengue estime à environ 390 millions le nombre de personnes touchées par cette maladie, avec plus de 9 000 décès par an (Bhatt et al., 2013; OMS, 2017a). Aujourd’hui, les pays d’Asie et d’Amérique du Sud sont les plus touchés ; la dengue y est devenue une cause majeure d’hospitalisation et de mortalité (OMS, 2017a, 2020b). Selon la classification de l’OMS, il existe deux formes de dengue : la dengue classique et la dengue sévère (OMS, 2017b). La première se manifeste par une forte fièvre pouvant être accompagnée de maux de tête, de nausées, de douleurs articulaires et musculaires et d’une éruption cutanée ressemblant à celle de la rougeole. En revanche, la forme sévère entraîne des hémorragies et des atteintes organiques sévères. Cette forme sévère peut mener à une forme mortelle de la maladie qui est la dengue avec syndrome de choc ou DSC (Martina et al., 2009; OMS, 2017b). Par ailleurs, il existe quatre sérotypes de dengue, pour lesquels il n’existe pas d’immunité croisée à long terme (Reich et al., 2013).

Le Zika une maladie ré-émergente, a également provoqué des flambées épidémiques en Afrique, dans les Amériques, en Asie et dans le Pacifique (Roth et al., 2014a; Cao-Lormeau and Musso, 2014; Musso et al., 2014; Roa, 2016; Marchi et al., 2020). Bien que les symptômes associés à cette maladie chez l’adulte soient généralement bénins, des réactions plus graves associées à des complications neurologiques ont été signalées comme des syndromes de Guillain Barré (Oehler et al., 2014). Chez les femmes enceintes, le Zika peut provoquer sur le fœtus des lésions cérébrales accompagnées d’une microcéphalie (Chang et al., 2016).

Le chikungunya s’est propagé rapidement en Asie, en Afrique et en Amérique depuis 2004 (OMS, 2020a). Une première incursion dans la zone tempérée a été enregistrée au nord-est de l’Italie en 2007 (Rezza et al., 2007). Le chikungunya peut engendrer des douleurs articulaires souvent invalidante et de durée variable (OMS, 2020a). Les complications graves liées au chikungunya sont peu fréquentes. Néanmoins, des cas occasionnels de problèmes oculaires, neurologiques ou cardiaques ont été signalés.

La fièvre jaune sévit dans les régions tropicales d’Afrique et des Amériques (Gaythorpe et al., 2021) et a été responsable d’environ 30 000 décès en 2018, dont la majorité survenu en Afrique (OMS, 2020c). Il existe trois cycles de transmission de la fièvre jaune : (i) un cycle selvatique ou forestier

qui touche les primates dans la jungle, (ii) un cycle intermédiaire observé dans les petits villages ruraux et (iii) un cycle urbain qui est le plus meurtrier impliquant potentiellement un nombre élevé d'être humain (Mutebi and Barrett, 2002). Chez l'Homme, l'infection peut être asymptomatique ou bénigne dans la plupart des cas, avec disparition des symptômes au bout de 3 à 4 jours. Toutefois, chez les cas graves, les personnes infectées entrent dans une deuxième phase plus critique de la maladie dans les 24 heures qui suivent la rémission initiale. Durant cette seconde phase, une fièvre élevée se réinstalle et plusieurs organes sont touchés, notamment le foie et les reins, pouvant causer des décès (OMS, 2019a).

I.1.2. Principaux pathogènes transmis par les *Culicidae*

Ces maladies vectorielles sont causées par des agents pathogènes, pouvant être des parasites ou des virus, et sont transmis à l'Homme par des moustiques, insectes de la famille des *Culicidae* (Müller et al., 2019). Les agents pathogènes du paludisme sont des protozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Sur plus d'une centaine d'espèce de *Plasmodium*, seules cinq peuvent infecter l'Homme (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*), mais la grande majorité des cas de paludisme est liée à *P. falciparum* (OMS, 2019b). Ces pathogènes sont transmis à l'Homme par des moustiques appartenant au genre *Anopheles*.

Les agents pathogènes de la dengue, du Zika, du chikungunya et de la fièvre jaune sont des arbovirus (de l'anglais *Arthropod-Borne Virus*). Le terme arbovirus s'applique aux virus qui sont transmis à un hôte vertébré par un arthropode vecteur hématophage infecté lors d'un repas sanguin. Le virus de la dengue (DENV) appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Ses quatre sérotypes, DENV-1 à DENV-4, (Henchal and Putnak, 1990) sont eux-mêmes sous-divisés en génotypes (Phadungsombat et al., 2018). Le virus du Zika (ZIKV) appartient également au genre *Flavivirus* (Musso and Gubler, 2016). Il est divisé en deux lignées génétiques : la lignée Africaine et la lignée Asiatique (Lanciotti et al., 2016). Par ailleurs, le virus de la fièvre jaune (YFV) appartient aussi au genre *Flavivirus* (Mukhopadhyay et al., 2005), tandis que celui du chikungunya (CHIKV) appartient à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*. Pour ce dernier, le séquençage du génome viral a permis de différencier trois lignées génétiques : (i) la

lignée Est/Centre/Sud africaine, (ii) la lignée Ouest africaine, et (iii) la lignée asiatique (Volk et al., 2010). Ces quatre arbovirus sont transmis à l'Homme par des moustiques appartenant principalement au genre *Aedes*.

I.1.3. Circulation d'arbovirus dans le Pacifique

Comme d'autres régions du monde, la région Pacifique est touchée par des épidémies d'arboviroses notamment de dengue, de Zika et de chikungunya. Les premières épidémies de dengue dans la région Pacifique ont été enregistrées vers la fin du XIX^{ème} siècle (Perry, 1950a). Elles se présentaient sous forme sporadique, avec un sérotype dominant balayant les îles tous les 3 à 5 ans (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014; Roth et al., 2014a). Lors de ces épidémies, un seul sérotype du DENV circulait avec un changement de sérotype d'une épidémie à une autre (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014). En revanche, depuis les années 2000, une co-circulation de plusieurs sérotypes de DENV est observée dans la région. Ainsi, le DENV-1 était le sérotype majoritaire avant 2017, circulant en Polynésie Française, à Wallis et Futuna et en Nouvelle-Calédonie (Cao-Lormeau and Musso, 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2014; Inizan et al., 2019). Le DENV-2 a émergé à Fidji et à Tuvalu en 2014, au Vanuatu et aux îles Salomon en 2016, puis en Polynésie Française et en Nouvelle-Calédonie en 2017 (Aubry et al., 2017; Inizan et al., 2020). Cette introduction du DENV-2 en Nouvelle-Calédonie a été suivie d'une co-circulation avec le DENV-1 et le DENV-3 en 2017. A partir de 2018, le DENV-2 était le sérotype majoritaire en Nouvelle-Calédonie ; il était le seul sérotype circulant sur le territoire Calédonien en 2020 (Inizan et al., 2020). Le DENV-3 a émergé en 2013-2014 dans différentes îles de la région, notamment au Vanuatu, à Fidji, au Kiribati, aux îles Salomon en Polynésie Française, ou encore la Nouvelle-Calédonie (Cao-Lormeau et al., 2014; Kucharski et al., 2018). Les épidémies de DENV-4 sont plus rares dans le Pacifique ; ce sérotype a été dernièrement observé dans la région entre 2007 et 2013 (Cao-Lormeau and Musso, 2014).

Après avoir été détecté pour la première fois dans le Pacifique en Nouvelle-Calédonie en 2011 (Dupont-Rouzeyrol et al., 2012), le chikungunya a circulé dans plusieurs îles de la région. Une grande épidémie a été décrite en Papouasie-Nouvelle-Guinée en 2012-2013, avec des dizaines

de milliers de cas estimés, causée par la lignée du virus Est/Centre/Sud-africain (Roth et al., 2014b). La lignée asiatique du CHIKV a quant à elle été responsable de l'épidémie dans l'État de Yap en 2013-2014 (Nhan et al., 2014). Cette lignée a été responsable d'une nouvelle vague de transmission du chikungunya en Nouvelle-Calédonie en 2013, où le CHIKV s'est réapparu au milieu d'une grande épidémie de DENV-1 et a provoqué une petite épidémie, similaire à l'épidémie de 2011 (Roth et al., 2014a). Une importante épidémie de chikungunya a été observée en Polynésie française entre 2014 et 2015, touchant environ 25 % de la population (Aubry et al., 2015; Nhan and Musso, 2015). Des études phylogéniques ont démontré que le CHIKV aurait été introduit en Polynésie française depuis les Caraïbes, et non depuis d'autres pays du Pacifique (Aubry et al., 2015). Des épidémies de chikungunya ont également été notifiées à Tonga, aux Samoa, aux Samoa Américaines et à Tokelau en 2014 (Cao-Lormeau and Musso, 2014).

Une première épidémie de Zika a été détectée à Yap en 2007 (Duffy et al., 2009). En 2013, le virus est réapparu en Polynésie Française, puis a disséminé dans tout le Pacifique (Cao-Lormeau and Musso, 2014; Musso et al., 2014). Lors de cette épidémie en Polynésie Française, des cas de syndrome de Guillain Barré et de microcéphalie ont été observés (Roth et al., 2014a). Une épidémie de Zika a eu lieu pour la première fois en Nouvelle-Calédonie en 2014-2015 (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015).

Enfin, aucune circulation de la fièvre jaune n'a été détectée dans la région Pacifique jusqu'à présent. L'absence de population simiesque dans la plupart des îles du Pacifique semble exclure la possibilité d'un cycle selvatique.

I.2. Rôles des *Culicidae* dans la transmission d'arbovirus

I.2.1. Cycle de vie des *Culicidae*

Chez les moustiques, le cycle de vie comporte deux phases : (i) une phase aquatique ou pré-imaginale, comprenant les stades d'œufs, de larves et de nymphes et (ii) une phase aérienne, dite imaginaire, concernant les adultes. Ce cycle de développement des moustiques est illustré par la flèche grise dans la **Figure 1**.

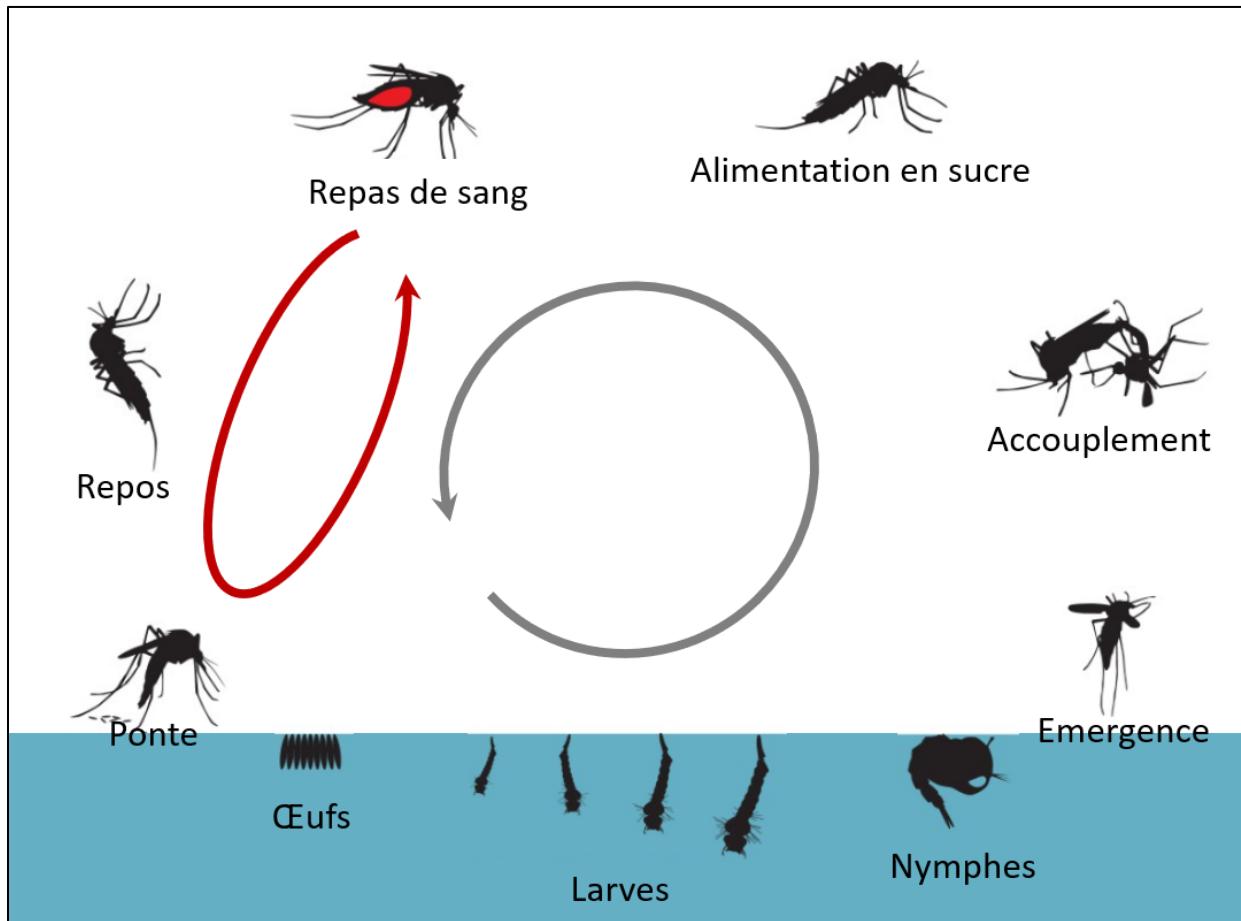


Figure 1. Cycle de vie des moustiques. Cette figure représente le cycle de développement des moustiques (en gris) et du cycle gonotrophique des femelles (en rouge). Adapté de (Achee et al., 2019).

Les œufs sont déposés par la femelle dans des gîtes de ponte, variables en fonction du biotope et des espèces. Ces gîtes peuvent notamment être des petites collections d'eau au sol, dans des plantes ou encore dans des collections d'eau créées par l'Homme. Selon les espèces, les œufs peuvent résister à la dessication et aux températures extrêmes (Nelson, 1986; Scholte and Schaffner, 2007). Après l'immersion dans l'eau, les œufs éclosent au bout d'un ou deux jours pour libérer les larves aquatiques.

Les larves sont généralement microphages, se nourrissant de petites particules dans l'eau, grâce à leur pièce buccale de type broyeur. Elles ont un siphon respiratoire, leur permettant d'accéder à l'oxygène aérien en se positionnant à la surface de l'eau. Le développement larvaire est constitué de quatre stades successifs séparés par des mues. La durée des stades larvaires est variable en fonction des espèces et des conditions environnementales comme la température, la disponibilité en nutriments ou encore la compétition interspécifique (Ho et al., 1989; Tun-Lin et al., 2000).

La larve de stade 4 va muer pour aboutir au stade nymphal. Les nymphes ne se nourrissent pas. Elles obtiennent l'oxygène de l'air grâce à leurs trompettes respiratoires. Ce stade dure en général 1 à 3 jours. C'est lors de ce stade nymphal qu'une métamorphose appelée nymphose va permettre au moustique de passer du mode aquatique au mode aérien lors de l'émergence.

Ce sont généralement les mâles qui émergent en premier. Ils ne sont pas hématophages et se nourrissent exclusivement de liquides sucrés par aspiration, notamment de sève de plantes, via leurs pièces buccales de type piqueur-suceur. D'une manière générale, l'espérance de vie des mâles est plus courte que celle des femelles, leur rôle étant essentiellement de s'accoupler avec les femelles. (Duvallet et al., 2017).

Fait intéressant et utilisé dans certaines stratégies de contrôle, la femelle n'est généralement fécondée que par un seul mâle. Elle conserve les spermatozoïdes du mâle dans des spermathèques et les utilise tout au long de sa vie pour féconder ces œufs. A l'inverse des mâles, le comportement des femelles est dominé par la réalisation de plusieurs cycles gonotrophiques (**Figure 1**) dont la finalité est la reproduction. Chaque cycle gonotrophique est successivement ponctué par la recherche d'un hôte vertébré, la prise d'un repas de sang, la digestion du sang

accompagnée de la maturation des œufs, puis, une fois que la femelle est devenue gravide, elle va rechercher un site de ponte pour déposer ses œufs. À ce stade, un nouveau cycle recommence. C'est lors de la prise du repas de sang que les femelles des espèces vectrices peuvent s'infecter en ingérant des arbovirus, ou transmettre ces arbovirus via l'injection de salive infectée à l'hôte.

I.2.2. Notion de compétence et de capacité vectorielles

La transmission d'un arbovirus d'une personne malade vers une personne saine est donc assurée par les moustiques femelles hématophage. Pour qu'une transmission ait lieu, différentes conditions doivent être réunies.

Premièrement, le moustique doit être compétent vis à vis du virus. En d'autres termes, il doit présenter une aptitude à s'infecter après ingestion d'un repas de sang infectieux (infection), puis assurer le développement du virus dans l'organisme du moustique (dissémination) et enfin le transmettre à un hôte sain lors d'une piqûre ultérieure (transmission) (Dye, 1992).

Cette compétence vectorielle dépend essentiellement de facteurs intrinsèques, d'origine génétique, qui contrôlent la réceptivité du moustique vecteur pour le virus. Ainsi, elle tient compte du génotype du moustique vecteur : il a été démontré que les populations de moustiques appartenant à une même espèce peuvent avoir une différence de compétence vectorielle vis-à-vis des virus comme celui de la dengue (Diallo et al., 2008) ou du Zika (Chouin-Carneiro et al., 2016). La compétence vectorielle tient également compte du génotype du virus. A titre d'exemple, *Aedes albopictus* présentait une faible compétence vectorielle pour le virus du chikungunya jusqu'à l'apparition d'un nouveau variant viral, détecté lors de l'épidémie de la Réunion en 2005-2006 (Schuffenecker et al., 2006). En effet, dans des conditions expérimentales, il semblerait que la mutation (E1-A226V) porté par ce variant offre une meilleure dissémination et transmission du virus par *Ae. albopictus* (Arias-Goeta et al., 2013). Le microbiote du moustique peut aussi influencer la compétence vectorielle. Chez *Ae. aegypti* par exemple, des espèces bactériennes ont été décrites pour avoir un impact sur la transmission du DENV, tel que certaines bactéries du genre *Proteus* qui semblent augmenter la résistance à l'infection du vecteur

(Ramirez et al., 2012). Enfin, la compétence vectorielle dépend de facteurs extrinsèques comme la température. Cela a été mis en évidence notamment pour le DENV. En effet, une étude sur *Ae. aegypti* a démontré que l'infection du vecteur au DENV-2 était favorisée par l'augmentation de la température de 26°C à 30°C (Chepkorir et al., 2014).

Deuxièmement, le vecteur doit avoir une bonne capacité vectorielle. La capacité vectorielle est un indicateur permettant de mesurer l'efficacité de transmission d'un pathogène en conditions naturelles. Sa définition mathématique a été formalisée par Mac Donald (1957) et modifiée par Garrett-Jones et Grab (1964) :

$$C = \frac{ma^2bp^n}{- \ln p}$$

Où :

- m = densité des vecteurs par rapport à l'hôte vertébré ;
 - a = probabilité journalière qu'un vecteur pique l'hôte ;
 - b = proportion de vecteurs infectés ;
 - p = probabilité journalière de survie du vecteur ;
 - n = durée de la période d'incubation extrinsèque ;
- 1/ – ln p = probabilité de survie du vecteur au-delà de la période d'incubation extrinsèque.

Ainsi, la capacité vectorielle tient compte de la compétence vectorielle du moustique (b, n), mais également d'autres facteurs comme le contact fréquent des vecteurs avec l'Homme (a), la densité du vecteur (m) et son taux de survie (p) (Failloux and Hervé, 2003).

I.2.3. Les *Culicidae* vecteurs d'arbovirus dans le Pacifique

D'après la classification taxonomique, la famille des *Culicidae* comprend la sous-famille des *Anophelinae* et la sous-famille des *Culicinae*. Cette dernière est constituée de 42 genres (Duvallet et al., 2017), dont deux, les genres *Culex* et *Aedes*, sont connus pour compter plusieurs espèces vectrices d'arbovirus. Le genre *Aedes*, et en particulier le sous-genre *Stegomyia* comprend des espèces impliquées dans la transmission des trois principaux arbovirus dans le Pacifique (DENV, CHIKV et ZIKV). Plus précisément, dans la région Pacifique, en dehors d'*Ae. aegypti* qui appartient au groupe *Aegypti*, toutes les espèces vectrices de ces trois arbovirus appartiennent au groupe *Scutellaris*.

Dans la région Pacifique, *Ae. aegypti* est l'une des espèces vectrices majeures de DENV, CHIKV et ZIKV (Calvez et al., 2017; Dupont-Rouzeyrol et al., 2012; Fernandes et al., 2020). Une étude récente de compétence vectorielle en laboratoire a également démontré que les souches d'*Ae. aegypti* de la région pourraient potentiellement transmettre le YFV (Lataillade et al., 2020). Cette espèce a une large répartition dans le monde et existe sous deux formes : une forme ancestrale ; *Ae. aegypti formosus* et une forme cosmotropicale ; *Ae. aegypti aegypti* (Duvallet et al., 2017). Dans la région Pacifique, c'est la forme *Ae. aegypti aegypti* qui est présente. La femelle d'*Ae. aegypti aegypti* est anthropophile, diurne et endophile (Huber et al., 2003). Ce moustique étant inféodé à l'Homme, la femelle pond ses œufs dans des gîtes artificiels comme des pots de fleurs ou encore des pneus usagés. Les œufs peuvent résister à la dessiccation pendant plusieurs mois voire plus d'un an (Nelson, 1986), permettant le maintien de l'espèce durant les périodes sèches. Les stades pré-imaginaux s'adaptent à des conditions climatiques extrêmes, notamment à des températures très élevées (allant jusqu'à 40 °C). En revanche, cette espèce ne peut résister aux températures négatives (Duvallet et al., 2017). *Ae. aegypti* est présent dans une grande partie de la région Pacifique notamment aux îles Solomon, au Vanuatu, en Nouvelle-Calédonie, à Fidji, à Tonga, à Wallis, en Polynésie Française, en Australie ou encore aux îles Cook (Belkin, 1962; Lee et al., 1987; Roth et al., 2014a). Elle est absente dans quelques îles isolées comme Hawaï ou Futuna (Roth et al., 2014a).

Les espèces du groupe *Scutellaris* sont caractérisées par la présence d'une ligne d'écaille blanche au niveau du scutum (partie supérieure du thorax) et sont morphologiquement très proches (**Figure 2**). Dans la région, les deux espèces du groupe *Scutellaris* vectrices d'arbovirus les plus répandues sont *Ae. albopictus* et *Aedes polynesiensis*.

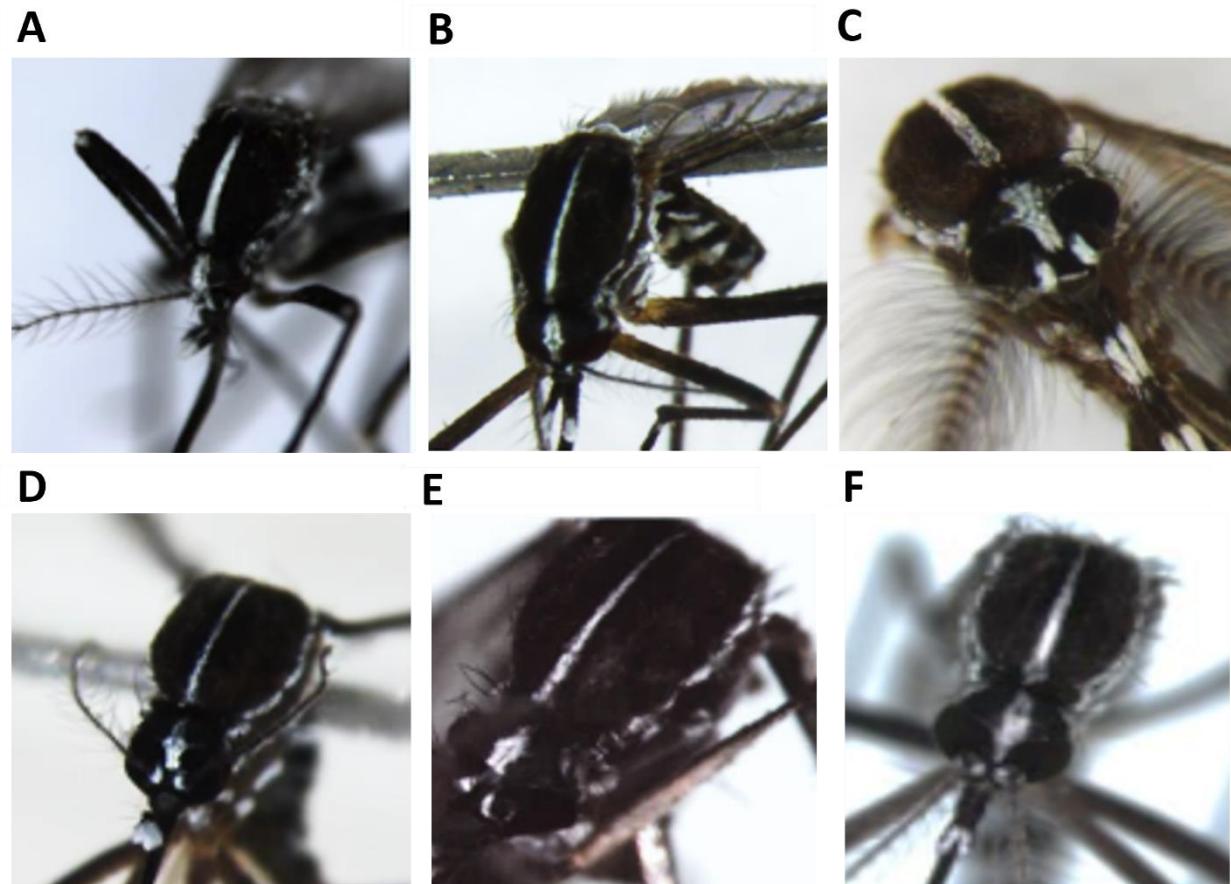


Figure 2. Vue dorsale de six espèces d'*Aedes* du groupe *Scutellaris*. A : *Aedes albopictus*, B : *Aedes futunae*, C : *Aedes malayensis*, D : *Aedes polynesiensis*, E : *Aedes pseudoscutellaris*, F : *Aedes scutellaris*. (Photo : IPNC).

Aedes albopictus est un vecteur de DENV, ZIKV, CHIKV (Fernandes et al., 2020; Kamgang et al., 2019; Vega-Rua et al., 2014) et peut également transmettre le YFV (Amraoui et al., 2016). C'est une espèce généraliste, avec une grande plasticité écologique et dont la répartition est mondiale.

La femelle de cette espèce est capable de piquer une large gamme d'hôtes animaux, voire des animaux à sang froid, en absence de l'Homme (Paupy et al., 2009; Scholte and Schaffner, 2007). Elle est diurne et exophage (Paupy et al., 2009). Elle peut pondre ses œufs dans des gîtes larvaires naturels, comme les trous d'arbre ou les creux de rocher, et artificiels tels que les pneus, les fûts ou encore les vases (Gratz, 2004). Ces caractéristiques lui permettent de coloniser des environnements selvatiques et anthropiques. Par ailleurs, contrairement à *Ae. aegypti*, les œufs de cette espèce peuvent résister aux températures basses et entrer en diapause (Scholte and Schaffner, 2007), ce qui a probablement permis son installation en zone tempérée, notamment en Italie dès les années 1990, et a favorisé sa diffusion dans plusieurs pays d'Europe (Pozza and Majori, 1992; Romiti et al., 2021). Dans la région Pacifique, *Ae. albopictus* étend progressivement son aire de répartition de l'Ouest vers l'Est de la région. Il est présent notamment en Papouasie Nouvelle-Guinée, aux îles Solomon, au Vanuatu, à Fiji et à Tonga (Cooper et al., 1994; Elliott, 1980; Guillaumot et al., 2012; Roth et al., 2014a). Curieusement, cette espèce n'a jamais été détectée en Nouvelle-Calédonie malgré les investigations de surveillance entomologique réalisées sur le territoire.

Aedes polynesiensis est un vecteur reconnu de ZIKV, CHIKV et DENV, même si aucune étude de compétence vectorielle n'ait pour le moment été réalisée sur cette espèce pour ce dernier (Calvez et al., 2018, 2020; Guillaumot, 2005; Richard and Cao-Lormeau, 2019). C'est une espèce endémique de la région Pacifique. Cette espèce est semi-domestique. La femelle est diurne et anthropophile, mais selon Belkin, les hôtes d'origine de cette espèce étaient probablement des oiseaux ou des chauves-souris (Belkin, 1962). Contrairement à *Ae. aegypti*, la femelle est exophile (Burkot et al., 2007). Elle peut pondre ses œufs dans des gîtes naturels, des contenants artificiels et même des petites accumulations d'eau sur le sol (Belkin, 1962; Burkot et al., 2007; Richard and Cao-Lormeau, 2019). Les œufs peuvent également résister à la dessication pendant une longue période (Lee et al., 1987). Comme *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* possède une plasticité écologique, ce qui aurait favorisé sa large répartition dans le Pacifique, probablement occasionnée par la migration des polynésiens (Shiu et al., 1997). Cette espèce est actuellement présente dans les îles de l'Est du Pacifique, à Fidji, en Polynésie Française, aux Samoa Américains,

à Wallis et Futuna, aux îles Cook, aux îles Pitcairn et aux îles Marquises (Belkin, 1962; Burkot *et al.*, 2007; Roth *et al.*, 2014a).

En plus de ces espèces, d'autres espèces d'*Aedes* du groupe *Scutellaris* présentes dans le Pacifique sont vectrices d'arbovirus, ou fortement suspectées. Il s'agit notamment d'*Aedes hensilli*, une espèce peu connue mais présente en forte densité à Yap (Ledermann *et al.*, 2014). Cette espèce aurait été responsable de la transmission du DENV à Yap en 1995 et de la transmission de ZIKV et CHIKV en 2007 et 2013-2014 sur cette même île (Ledermann *et al.*, 2014; Savage *et al.*, 2015). Lors d'une étude de compétence vectorielle d'*Ae. hensilli* en laboratoire, un taux de dissémination de 23%, 80% et 17% a été respectivement observé pour le ZIKV, CHIKV et DENV (Ledermann *et al.*, 2014). La femelle de cette espèce peut pondre ses œufs aussi bien dans des contenants naturels qu'artificiels (Savage *et al.*, 1998). *Ae. hensilli* a été détecté en Micronésie (Ledermann *et al.*, 2014; Savage *et al.*, 2015) et serait présent aux Philippines (Belkin, 1962; Lee *et al.*, 1987).

Aedes scutellaris est également vecteur du DENV. Une étude de 1946 avait suggéré l'implication de cette espèce dans la transmission du virus dans le nord de la Papouasie Nouvelle-Guinée durant la Seconde Guerre mondiale (Mackerras, 1946). Ce n'est que 60 ans plus tard qu'une étude sur la compétence vectorielle d'*Ae. scutellaris* a été réalisée. Les résultats démontrent qu'*Ae. scutellaris* serait plus compétent qu'*Ae. albopictus* à transmettre le DENV-2, avec un taux d'infection et de dissémination plus élevée (Moore *et al.*, 2007). La femelle de cette espèce pique à toute heure de la journée dans les zones ombragées, son pic d'agressivité étant en soirée (WRBU, 2021). Elle pond ses œufs dans des récipients à texture rugueuse avec de faibles niveaux de lumière réfléchie comme les crevasses des coques de noix de coco, les trous d'arbres ou les aisselles des feuilles de *Pandanus* mais également dans des réservoirs domestiques (Lee *et al.*, 1987). *Ae. scutellaris* est présent en Indonésie, en Malaisie, en Papouasie Nouvelle-Guinée, au Philippin, aux îles Carolines et en Australie (Belkin, 1962; Lee *et al.*, 1987).

Aedes pseudoscutellaris serait également vecteur du DENV (Guillaumot, 2005). Très peu d'informations sur la bionomique de cette espèce sont disponibles, probablement en raison de la confusion entre cette espèce, *Ae. polynesiensis* et *Aedes horrescens* qui sont

morphologiquement difficiles à distinguer (Belkin, 1962). Néanmoins, Lever (1943) a souligné que la femelle préfère pondre ses œufs dans des gîtes naturels comme les trous d'arbre ou encore les coques des noix de coco, et rarement dans des récipients artificiels (in Lee *et al.*, 1987). Cette espèce est endémique de Fidji (Belkin, 1962).

Par ailleurs, d'autres espèces présentes dans la région Pacifique pourraient être des vecteurs et ont été incriminées dans des épidémies de DENV sur la base d'observation de terrain. Il s'agit des espèces *Aedes mashallensis*, *Aedes hebrideus*, *Aedes cooki*, *Aedes tabu*, *Aedes kesseli* et *Aedes rotumae*. Le **tableau 1** résume les informations sur leurs gîtes potentiels et leur répartition dans le Pacifique.

Plusieurs autres espèces du groupe *Scutellaris* sont également présentes dans la région Pacifique, mais leur rôle dans la transmission d'arbovirus est à ce jour inconnu. C'est notamment le cas d'*Aedes aobae*, *Aedes futunae*, *Aedes gurneyi*, *Aedes hoguei*, *Aedes horrescens*, *Aedes pernotatus*, *Aedes quasiscutellaris*, *Aedes upolensis* et *Aedes varuae* (Belkin, 1962; Lee *et al.*, 1987).

Dans la région Pacifique, la majorité des *Aedes* du groupe *Scutellaris* ont une répartition fortement localisée. Néanmoins l'intensification des échanges régionaux et internationaux augmente le risque d'invasion de ces espèces dans les autres îles de la région, voire dans d'autres régions du monde.

Tableau 1. Liste des espèces du groupe *Scutellaris* impliquées ou suspectées dans la transmission d’arbovirus dans le Pacifique

Espèce	Gîtes larvaires	Répartition géographique	Statut vectoriel	Références
<i>Ae. albopictus</i>	Récepteurs naturels et artificiels	Papouasie Nouvelle-Guinée, îles Solomon, Vanuatu, Fiji, Tonga	Vecteur avéré de DENV, ZIKV et CHIKV	(Elliott, 1980; Cooper <i>et al.</i> , 1994; Gratz, 2004; Guillaumot <i>et al.</i> , 2012; Roth <i>et al.</i> , 2014a; Kamgang <i>et al.</i> , 2019)
<i>Ae. polynesiensis</i>	Récepteurs naturels et artificiels	Fidji, Polynésie Française, Samoa Américains, Wallis et Futuna, îles Cook, îles Pitcairn et îles Marquises	Vecteur suspecté de DENV, vecteur avéré de ZIKV et CHIKV	(Belkin, 1962; Burkot <i>et al.</i> , 2007; Calvez <i>et al.</i> , 2018, 2020; Guillaumot, 2005; Richard and Cao-Lormeau, 2019; Roth <i>et al.</i> , 2014a)
<i>Ae. hensilli</i>	Récepteurs naturels et artificiels	Micronésie, Philippines	Vecteur suspecté de DENV, ZIKV et CHIKV	(Belkin, 1962; Ledermann <i>et al.</i> , 2014; Lee <i>et al.</i> , 1987; Savage <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ae. scutellaris</i>	Récepteurs naturels et artificiels	Indonésie, Malaisie, Papouasie Nouvelle-Guinée, Philippines, îles Carolines, Australie	Vecteur avéré de DENV	(Belkin, 1962; Lee <i>et al.</i> , 1987; Moore <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ae. pseudoscutellaris</i>	Récepteurs naturels, rarement artificiels	Fidji	Vecteur suspecté de DENV	(Belkin, 1962; Guillaumot, 2005)
<i>Ae. marshallensis</i>	Récepteurs naturels	îles Marshall, Kiribati, îles Carolines, Korsae, Pohnpei	Vecteur suspecté de DENV	(Belkin, 1962; Guillaumot, 2005; Lee <i>et al.</i> , 1987; Noda <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ae. hebrideus</i>	Récepteurs naturels et artificiels	Vanuatu	Vecteur suspecté de DENV	(Belkin, 1962; Lee <i>et al.</i> , 1987; Perry, 1950a)
<i>Ae. cooki</i>	Récepteurs naturels et artificiels	Niue (île Cook)	Vecteur suspecté de DENV	(Belkin, 1962; Freier and Rosen, 1987; Y. M. Huang and Hitchcock, 1980; D. J. Lee <i>et al.</i> , 1987; H. L. Lee and Rohani, 2005)
<i>Ae. tabu</i>	Récepteurs naturels et artificiels	Tonga	Vecteur suspecté de DENV	(Lee <i>et al.</i> , 1987) (Freier and Rosen, 1987; Lee and Rohani, 2005)
<i>Ae. kesseli</i>	Récepteurs naturels	Tonga	Vecteur suspecté de DENV	(Huang and Hitchcock, 1980) (Lee <i>et al.</i> , 1987)
<i>Ae. rotumae</i>	Récepteurs naturels	Rotuma	Vecteur suspecté de DENV	(Belkin, 1962; Lee <i>et al.</i> , 1987)

I.3. Invasion des *Culicidae* : une menace pour la santé publique

I.3.1. Le processus d'invasion

D'une manière générale, une espèce invasive est une espèce dont certaines populations ont été transportées à partir de leur zone géographique naturelle vers une autre aire géographique distante et qui, une fois introduites, sont capables de s'installer et d'étendre leur distribution dans la zone nouvellement colonisée (Prentis et al., 2008).

Ainsi, la première étape du processus d'invasion est l'introduction. Celle-ci peut être intentionnelle, comme dans le cas de l'introduction d'*Ae. albopictus* aux îles Tuamotu dans les années 1970, dans le but de déplacer *Ae. polynesiensis*, le vecteur local de filaires (Guillaumot et al., 2012; Rosen et al., 1975). Cette introduction est le plus souvent accidentelle, comme cela a été le cas lors de l'introduction d'*Anopheles gambiae* au Brésil dans les années 1930 (Levine et al., 2004). Cette introduction est généralement favorisée par l'intensification du commerce et des échanges internationaux, permettant aux vecteurs de surmonter les barrières géographiques et de se déplacer sur de grandes distances (Tatem et al., 2006).

A la suite de cette introduction, la population de vecteurs introduite va être confrontée aux barrières environnementales locales. Si cette population introduite n'est pas en mesure de surmonter ces barrières, elle va s'éteindre. A l'inverse, si les individus surmontent ces barrières, l'espèce va pourvoir s'installer : c'est la deuxième phase de l'invasion. Le succès de cette installation peut être conditionné par un certain nombre de facteurs notamment des facteurs climatiques (Caminade et al., 2012) ou encore la plasticité écologique de l'espèce invasive (Paupy et al., 2009).

Enfin, la troisième étape du processus d'invasion est l'extension durant laquelle la population nouvellement installée et adaptée aux conditions locales se multiplie et étend progressivement son aire de répartition. Cette extension est souvent renforcée par des activités humaines comme l'urbanisation (Li et al., 2014).

I.3.2. Histoire de l'invasion d'*Aedes aegypti*

L'un des exemples les plus marquants d'invasion de moustique vecteur est celui d'*Ae. aegypti*. Cette espèce est originaire d'Afrique subsaharienne et était à l'origine inféodés aux environnements forestiers d'Afrique (Powell and Tabachnick, 2013). Suite à l'anthropisation des milieux, des populations d'*Ae. aegypti* se sont rapprochées des habitations humaines (Brown et al., 2014). L'assèchement de l'actuel désert de Sahara, il y a environ 4 000 ans, aurait conduit par la suite à l'isolement géographique de deux pools génétiques qui se sont peu à peu différenciés pour donner deux sous-espèces : *Ae. aegypti formosus* et *Ae. aegypti aegypti* (Tabachnick, 1991). *Aedes aegypti formosus* a conservé son aptitude à se développer en forêt et sa zoophilie, et n'est retrouvé qu'en Afrique, tandis qu'*Ae. aegypti aegypti* est devenue exclusivement domestique, anthropophile et s'est répandue dans les autres régions du monde (McBride et al., 2014; Powell et al., 2018; Powell and Tabachnick, 2013).

L'invasion d'*Ae. aegypti* s'est faite via des vagues successives de migrations humaines. La première vague de cette invasion concerne l'introduction dans le nouveau monde au XV^{ème} siècle suite à l'augmentation des échanges maritimes et à la traite des esclaves (Brown et al., 2014; Tabachnick, 1991). Une autre vague a eu lieu au XVIII^{ème} siècle vers l'Asie et aurait également été favorisée par des échanges commerciaux, puis *Ae. aegypti* a continué son expansion vers le Pacifique et l'Europe durant le XX^{ème} siècle (Brown et al., 2014; Guillaumot, 2005; Lwande et al., 2020). De nos jours, cette espèce est présente dans toutes les régions tropicales et subtropicales (**Figure 3**). *Aedes aegypti* a également été détecté en zone tempérée notamment en Russie, au Pays-Bas, au Portugal, en Turquie ou encore en Géorgie (Lwande et al., 2020; Scholte et al., 2010), mais son installation dans ces régions est probablement limitée par les basses températures.

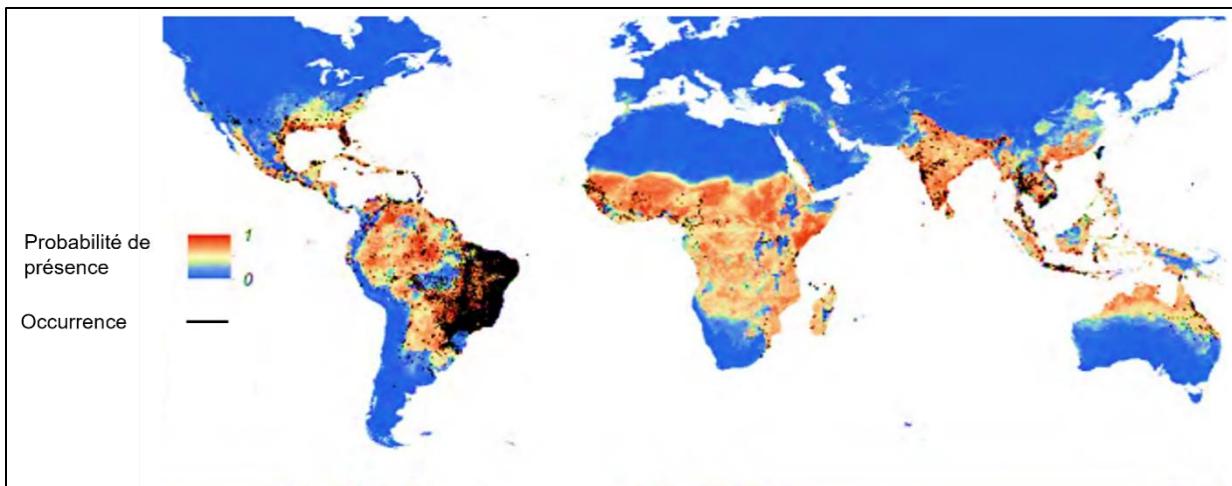


Figure 3. Distribution mondiale d'*Ae. aegypti* (Kraemer et al., 2015).

I.3.3. L'exemple récent d'*Aedes albopictus*

Aedes albopictus, originaire d'Asie tropicale et tempérée (Bonizzoni et al., 2014; Lwande et al., 2020; Paupy et al., 2009; Romiti et al., 2021) est également une espèce invasive. La dispersion de cette espèce à l'échelle internationale a été favorisée par les échanges commerciaux, plus particulièrement l'intensification du commerce des pneus usagés (Ammar et al., 2019; Gratz, 2004; Reiter, 1998; Yee, 2016). Ceci provient du fait que les œufs d'*Ae. albopictus* sont résistants à la dessication et que les pneus peuvent constituer un site de ponte pour les femelles (Ammar et al., 2019). Contrairement à la dispersion d'*Ae. aegypti*, celle d'*Ae. albopictus* est plus récente ; elle a commencée à la fin des années 1970 et au début des années 1980 où le moustique a été détecté en Albanie, au Texas et au Brésil (Lwande et al., 2020). Il s'est établi également dans d'autres parties des Amériques et d'Europe, en Afrique occidentale et centrale, et dans les îles du Pacifique et de l'océan Indien (Gratz, 2004; Kraemer et al., 2015; Lwande et al., 2020). La **Figure 4** présente la répartition d'*Ae. albopictus* dans le monde de nos jours (Kraemer et al., 2015).

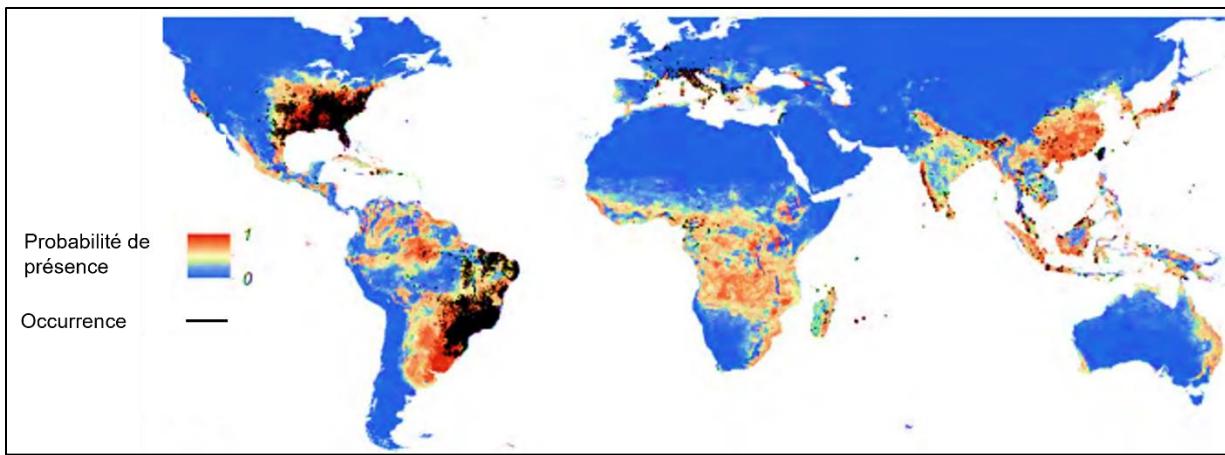


Figure 4. Distribution mondiale d'*Ae. albopictus* (Kraemer et al., 2015).

I.3.4. Le cas de la Nouvelle-Calédonie

En Nouvelle-Calédonie, il existe 19 espèces de moustiques décrites dont 5 espèces d'*Aedes* (*Ae. aegypti*, *Aedes vigilax*, *Aedes vexans*, *Aedes notoscriptus* et *Aedes alternans*), 11 espèces de *Culex* (*Culex quinquefasciatus*, *Culex australicus*, *Culex iyengari*, *Culex annulirostris*, *Culex sitiens*, *Culex bitaeniorhynchus*, *Culex starckae*, *Culex cheesmanna*, *Culex dumbletoni*, *Culex gaufini* et *Culex millironi*) une espèce de *Coquillettidia* (*Coquillettidia xanthogaster*) et deux espèces de *Tripteroides* (*Tripteroides melanesiensis* et *Tripteroides caledonicus*) (Source IPNC, 2016).

Le territoire a fait récemment l’expérience d’introduction de nouvelles espèces vectrices de pathogènes. En effet, *Ae. scutellaris* (vecteur de DENV) a été introduit en Nouvelle-Calédonie en 2016 (IPNC, 2016; Rakotonirina et al., 2020) et *Anopheles bancroftii* (vecteur de *Plasmodium*) en 2017 (Pol et al., 2018). Bien qu’*Ae. scutellaris* n’ait plus été détecté après 2017, *An. bancroftii* a quant à lui réussi à s’installer durablement sur le territoire Calédonien. Ces deux événements récents soulignent l’importance du risque de nouvelles introductions et installation de *Culicidae* en Nouvelle-Calédonie, et l’impérieuse nécessité d’anticiper ces phénomènes pour mettre en place une réponse adaptée.

I.4. Lutte contre les arboviroses

I.4.1. Les vaccins et traitements contre les arboviroses

A l'heure actuelle, aucun médicament spécifique contre la dengue, le Zika, le chikungunya et la fièvre jaune n'est disponible (Aubry, 2020). Les traitements actuels sont uniquement symptomatiques. Alors qu'un vaccin efficace existe depuis des années contre la fièvre jaune (Monath, 2005), aucun vaccin opérationnel n'existe pour se protéger contre les infections par les virus du Zika et du chikungunya. Des vaccins contre la dengue ont été développés, mais leur potentielle utilisation se heurte à divers obstacles. En effet, le vaccin Dengvaxia® (Sanofi Pasteur, Paris), seul ayant une autorisation de mise sur le marché, est recommandé chez les personnes de plus de 9 ans ayant déjà été infectés par la dengue au préalable (Thomas and Yoon, 2019). Le vaccin de TAK-003 (Takeda, Osaka), semble quant à lui être inefficace contre le sérotype DENV-4 du virus (Biswal et al., 2019).

I.4.2. Les méthodes de lutte antivectorielle

En l'absence de traitements ou de vaccins efficaces contre ces arboviroses, la lutte contre le vecteur constitue le seul moyen pour limiter l'incidence de ces maladies. Il existe différentes méthodes de lutte antivectorielle. Elles peuvent permettre (i) une protection individuelle visant à réduire le contact Homme-vecteur (OMS, 2015) ou (ii) une protection collective (Rozendaal, 1997) pour prévenir ou réduire l'intensité de la transmission en agissant sur différents paramètres clés de la capacité vectorielle, comme la densité ou encore la longévité des vecteurs.

La protection individuelle peut être assurée par différents outils notamment les moustiquaires, l'usage des moustiquaires de lit remontant à des temps très anciens. Elles sont efficaces contre les espèces nocturnes si elles sont correctement installées et non trouées (Darriet, 2007) ou imprégnées d'insecticides (Mouchet et al., 2004), mais leur intérêt est moindre contre les espèces diurnes comme les *Aedes*. Cette protection individuelle peut également être assurée par l'utilisation de produits répulsifs. Il existe une large variété de répulsifs ; l'un des plus célèbres

est le N,N-diethyl-m-toluamide, ou DEET, dont l'efficacité et la rémanence varie fortement en fonction de la dose utilisée ou de l'espèce de moustique visée (Badolo et al., 2004; Barnard and Xue, 2004).

Pour une protection collective, de nombreuses méthodes de lutte ciblant les larves ou les adultes peuvent être utilisées. Parmi ces méthodes figure la lutte physique qui consiste principalement à détruire les gîtes larvaires aquatiques ou, lorsque cela est impossible, à les traiter par des barrières physiques comme des huiles minérales ou de billes de polystyrène pour empêcher les larves de respirer (Curtis, 2005). Des méthodes de lutte biologique comme l'utilisation de prédateurs peuvent également être employées pour contrôler les larves. A titre d'exemple, des crustacés prédateurs peuvent être utilisés pour lutter contre les larves d'*Aedes* (Howard, 2013).

L'utilisation des insecticides en lutte antivectorielle est devenue la stratégie la plus courante, depuis le développement des insecticides synthétiques au cours du siècle dernier. Elle inclut l'application de larvicides et d'adulticides dont l'objectif est la destruction massive et rapide de la population de vecteurs. Les insecticides les plus utilisées sont les modulateurs du canal sodium (pyréthrinoïdes et pyrétrines), les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (carbamates et organophosphorés), les perturbateurs du fonctionnement du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (Cuervo-Parra et al., 2016) ou encore les inhibiteurs de croissance (Suman et al., 2013). Des insecticides d'origine bactérienne, comme le *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), sont également utilisés (Ibarra et al., 2003). Les principaux obstacles à leur utilisation sont les problèmes de toxicité pour les organismes non-cibles, et les phénomènes de résistances observés de plus en plus fréquemment (Moyes et al., 2017). Par ailleurs, leur utilisation nécessite la collaboration de la population qui est parfois réticente à ce type de stratégie.

D'autres méthodes de lutte plus moderne, visant elles aussi à réduire la densité de vecteurs, sont en cours de développement ou d'essais sur le terrain. C'est notamment le cas de la technique de l'insecte stérile (TIS). Elle consiste à irradier des moustiques mâles élevés en masse au laboratoire et à les relâcher par la suite sur le terrain pour qu'ils s'accouplent avec des femelles sauvages (Dyck et al., 2005). Les femelles n'étant généralement inséminées qu'une seule fois et par un seul mâle au cours de leur vie, cet accouplement permet une stérilisation induite des femelles et

diminue le nombre de moustiques vecteurs à la génération suivante. Néanmoins, des études réalisées notamment sur *Ae. albopictus* ont montré que des doses d'irradiations supérieures à 40 Gy pouvait affecter la capacité d'accouplement des mâles stériles, les rendant moins performants comparés aux mâles sauvages (Balestrino et al., 2010). Par ailleurs, durant cette même étude, une nette diminution de la longévité des mâles irradiés a été notée à des doses d'irradiation supérieures à 60 Gy (Balestrino et al., 2010). Il en résulte la nécessité d'augmenter le ratio de mâles stériles à lâcher sur le terrain (Oliva et al., 2012). Ainsi, le ratio de mâles stériles par rapport aux mâles et femelles de terrain doit atteindre 5 : 1 : 1 pour permettre une réduction de moitié de la fertilité de la population sauvage (Oliva et al., 2012). Bien que des résultats encourageants aient été obtenus sur *Ae. albopictus* (Bellini et al., 2013), le coût opérationnel de la stratégie constitue toujours un obstacle important à sa mise en place à grande échelle (Achee et al., 2019).

La technique de l'insectes incompatibles, ou TII a également été développée chez *Ae. aegypti*. Cette technique est basée sur l'utilisation de *Wolbachia* qui est une α -protéobactérie intracellulaire décrite pour la première fois en 1924, dans les ovaires du moustique *Culex pipiens* (Hertig and Wolbach, 1924; Marshall Hertig, 1936). Cette bactérie est présente naturellement chez environ 60% des espèces d'insectes (De Oliveira et al., 2015) et est héritée maternellement (Bonneau et al., 2018). *Wolbachia* n'est quasiment pas présente à l'état naturel chez *Ae. aegypti* (Gloria-Soria et al., 2018), mais cette espèce peut-être transfecté artificiellement (Mains et al., 2019). La TII est basée sur le mécanisme de l'incompatibilité cytoplasmique (IC) induite par *Wolbachia* (Bourtzis et al., 2003). Concrètement, lors de l'accouplement de mâles *Ae. aegypti* artificiellement infectés par *Wolbachia* avec des femelles non infectées, l'IC induit la mort des embryons, et donc une réduction quasi-totale du taux d'éclosion des œufs. Cette technique a été testée en Floride pour réduire la densité d'une population d'*Ae. aegypti* sur le terrain (Mains et al., 2019). Lors de ce test, plus de 6 millions d'*Ae. aegypti* mâles infectés par *Wolbachia* (souche wAlB) ont été lâchés pendant 6 mois pour traiter une surface de 0,7 km², ce qui a permis une baisse significative du taux d'éclosions d'œufs sur le terrain et de la quantité de femelles capturées dans la zone traitée (Mains et al., 2019). En revanche, en cas d'erreur lors du tri de mâles, une introduction accidentelle de femelles infectées dans la population sauvage pourrait

favoriser l'implantation d'une souche infectée par *Wolbachia* sur le terrain et donc compromettre l'efficacité de cette stratégie.

I.4.3. Blocage de la réPLICATION virale chez *Aedes aegypti* via l'infection par *Wolbachia* : une méthode prometteuse dans la lutte contre les arboviroses

La découverte de souches de *Wolbachia* comme nouvelle stratégie de lutte contre les arbovirus transmis par *Ae. aegypti* constitue une méthode de lutte prometteuse, en complément des autres méthodes de lutte antivectorielle. En effet, la bactérie présente une autre caractéristique que l'IC lorsqu'elle est introduite artificiellement chez *Ae. aegypti*. Plus précisément, des études ont démontré que la souche wMel de *Wolbachia* (provenant de *Drosophila melanogaster*) réduit la capacité du moustique à transmettre des arbovirus comme le DENV, CHIKV et ZIKV (Walker *et al.*, 2011; Aliota, *et al.*, 2016a, 2016b; Dutra *et al.*, 2016; Carrington *et al.*, 2017). Après de nombreuses années de recherche, le Brésil, la Colombie, le Mexique, l'Indonésie, le Sri Lanka, le Vietnam, l'Australie, Fidji, le Kiribati, le Vanuatu et la Nouvelle-Calédonie bénéficient de l'implémentation de cette stratégie de lutte au travers du *World Mosquito Program*, ou WMP (WMP, 2021). Plus concrètement, cette stratégie consiste à relâcher sur le terrain des *Ae. aegypti*, mâles et femelles, infectés par la bactérie afin de remplacer la population d'*Ae. aegypti* locale par une souche artificiellement infectée par *Wolbachia* (**Figure 5**) et ainsi réduire le risque de survenue des épidémies.

En Nouvelle-Calédonie, cette stratégie permet aujourd'hui d'espérer pouvoir réduire de façon significative la transmission du virus de la dengue pour diverses raisons : *Ae. aegypti* est à ce jour le seul vecteur de DENV sur le territoire (O'connor *et al.*, 2020), la stratégie ne présente aucun danger connu pour l'homme, la faune et l'environnement (Murray *et al.*, 2016) et la méthode se maintient sur le terrain, avec une stabilité de l'infection au sein de la population d'*Ae. aegypti* même sept ans après les lâchers (Ross and Hoffmann, 2018). En outre, cette stratégie a présenté d'excellents résultats épidémiologiques, montrant une réduction supérieure à 70% de l'incidence de la dengue à Jogjakarta en Indonésie (Indriani *et al.*, 2020) et est aujourd'hui reconnue comme une stratégie d'intérêt pour lutter contre la dengue par l'OMS (OMS, 2020e).

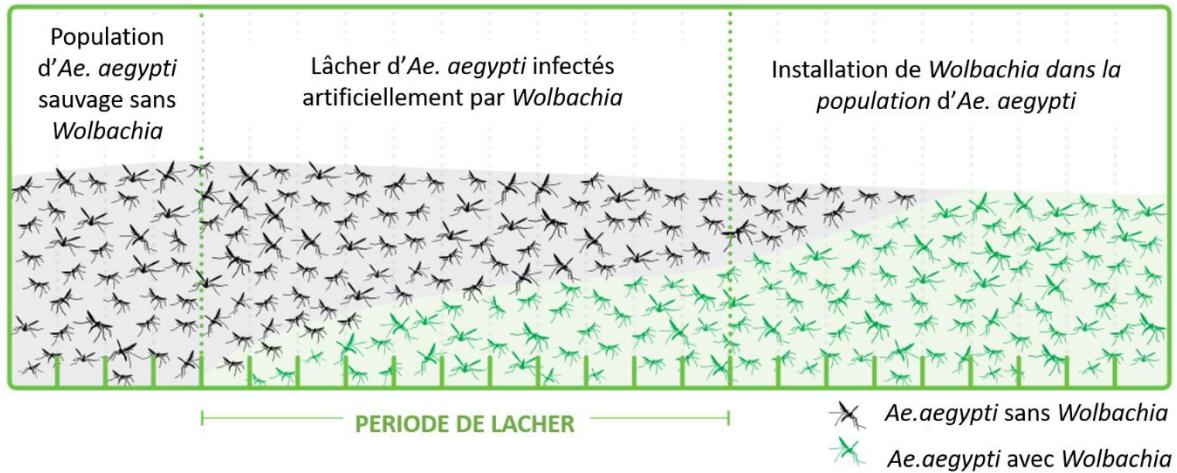


Figure 5. Introduction d'Ae. aegypti infecté par Wolbachia dans une population de moustiques sauvages. Adapté de World Mosquito Program

I.5. Importance de l'identification des moustiques

I.5.1. Adaptation de la lutte antivectorielle à l'espèce visée

Pour une lutte antivectorielle efficace, il est important de choisir les méthodes les plus appropriées au contexte local ou régional, en fonction des espèces vectrices ciblées. Par exemple, les moustiquaires représentent un bon outil contre les moustiques nocturnes et endophages, comme certains moustiques du genre *Anopheles*, mais leur utilité est plus limitée vis-à-vis des vecteurs diurnes comme *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* ou *Ae. polynesiensis*. A l'inverse, les répulsifs cutanés ou en imprégnation de vêtements peuvent être utilisés contre ces vecteurs diurnes (OMS, 2021).

La pulvérisation des insecticides à l'intérieur des habitations est efficace contre les espèces de moustiques endophiles qui sont exposés à ces produits lorsqu'ils se reposent sur les murs (Pates and Curtis, 2005), ce qui est généralement le cas d'*Ae. aegypti*. En revanche, les espèces comme *Ae. albopictus*, une espèce exophage (Paupy et al., 2009) et *Ae. polynesiensis*, de par son comportement exophile (Burkot et al., 2007), sont peu impactées par ce type de lutte (The Pacific Community and WHO, 2020).

Enfin, la méthode de remplacement d'une population de moustique sauvage par une population artificiellement infectée par la souche *wMel* est utilisée pour *Ae. aegypti* car les infections naturelles des populations d'*Ae. aegypti* par *Wolbachia* sont très peu décrites à l'échelle mondiale (Gloria-Soria et al., 2018). Cette infection artificielle contribue au blocage de la transmission d'arbovirus chez *Ae. aegypti* (Walker et al., 2011; Aliota, et al., 2016a, 2016b; Dutra et al., 2016; Carrington et al., 2017). En revanche, la majorité des *Aedes* du groupe *Scutellaris*, dont *Ae. albopictus* et *Ae. polynesiensis*, sont naturellement infectés par d'autres souches de *Wolbachia* (Behbahani et al., 2005; Kittayapong et al., 2002). L'introduction de la souche *wMel* chez *Ae. albopictus* semble réduire sa capacité à transmettre le DENV et le CHIKV, mais seulement après avoir éliminé les autres souches de *Wolbachia* naturellement présentes chez le moustique (Blagrove et al., 2012, 2013). En effet, une auto-incompatibilité a été observée lorsque

la souche wMel a été introduite sans enlever les souches de *Wolbachia* déjà présentes chez *Ae. albopictus* (Ant and Sinkins, 2018). Ainsi, cette méthode de lutte semble plus adaptée pour *Ae. aegypti* que pour *Ae. albopictus*.

1.5.2. Surveillance entomologique

L'identification des moustique vecteurs est une composante indispensable à la mise en place d'une surveillance entomologique systématique, tel que recommandée par l'OMS (OMS, 2009, 2017a). Cette surveillance fournit des informations sur la présence et la densité des moustiques, permettant de déterminer les zones et les périodes à risque de présence des populations de vecteurs. Ces informations sont utiles aux autorités de santé publique afin d'agir en amont, notamment par la mise en place de méthodes de prévention auprès des populations humaines.

Selon l'OMS, cette surveillance entomologique doit être renforcée au niveau des ports et des aéroports, qui constituent des points d'entrées pour les espèces vectrices lors de leur introduction (OMS, 2016, 2017a). L'objectif de cette surveillance est de réagir rapidement et de manière efficace lors d'une détection d'espèces introduites afin de limiter leur installation.

Le protocole utilisé dans le cadre d'une surveillance entomologique s'appuie généralement sur l'échantillonnage des larves, des nymphes et des adultes sur le terrain (Focks, 2003; Scott and Morrison, 2010; Wijayanti et al., 2016) suivi par l'identification des espèces de moustiques collectées. Ainsi, une identification correcte et rapide des espèces, via une ou plusieurs méthodes d'identification, est essentielle.

I.6. Les méthodes d'identification

I.6.1. Méthode morphologique

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour identifier les espèces de moustiques. La méthode d'identification morphologique est la plus utilisée. Elle est basée sur l'utilisation de critères morphologiques discriminants pour identifier les espèces de moustiques. Elle nécessite l'utilisation de clés d'identification pouvant être dichotomiques ou polytomiques (Joudain et al., 2018), sous forme de livres (Belkin, 1962; D. J. Lee et al., 1987) ou de logiciels (Gunay et al., 2018). Les critères observés peuvent être la forme, la couleur ou encore l'ornementation de certaines parties du corps. Cette technique nécessite parfois la dissection et le montage entre lame et lamelle de certains organes comme les génitalia des mâles.

Cette méthode ne nécessite que peu de moyens techniques (loupe binoculaire, parfois un microscope) et peut être réalisée sur le terrain (Beebe and Cooper, 2000). Néanmoins, les clés d'identifications, lorsqu'elles sont disponibles, sont souvent anciennes ou incomplètes car elles ne contiennent généralement que les espèces d'une région donnée. De plus, les spécimens sont parfois abîmés lors du piégeage sur le terrain, conduisant à la perte de certains critères nécessaires pour leur identification (Kent et al., 2010; Yssouf et al., 2016). Même si l'on dispose de clés d'identifications détaillées et de spécimens en bon état, il faut une bonne connaissance en taxonomie afin de pouvoir identifier les espèces. Enfin de nombreuses espèces sont morphologiquement très semblables, notamment les espèces appartenant à un même groupe comme le groupe *Scutellaris* (**Figure 2**), ou indifférenciable dans le cas des complexes d'espèces, rendant leur identification morphologique difficile voire impossible (Kent et al., 2010; Lobo et al., 2015; Zhong et al., 2020a). Ainsi, la technique d'identification morphologique doit souvent être complétée par d'autres méthodes.

I.6.2. Morphométrie des ailes

La morphométrie, appliquée à l'identification des moustiques, vise à étudier les formes et la tailles d'une partie du corps, comme les ailes (Lorenz *et al.*, 2017; Tantely *et al.*, 2020). Les études morphométriques s'appuient notamment sur des mesures entre points de référence (**Figure 6**), traitées par des programmes informatiques.

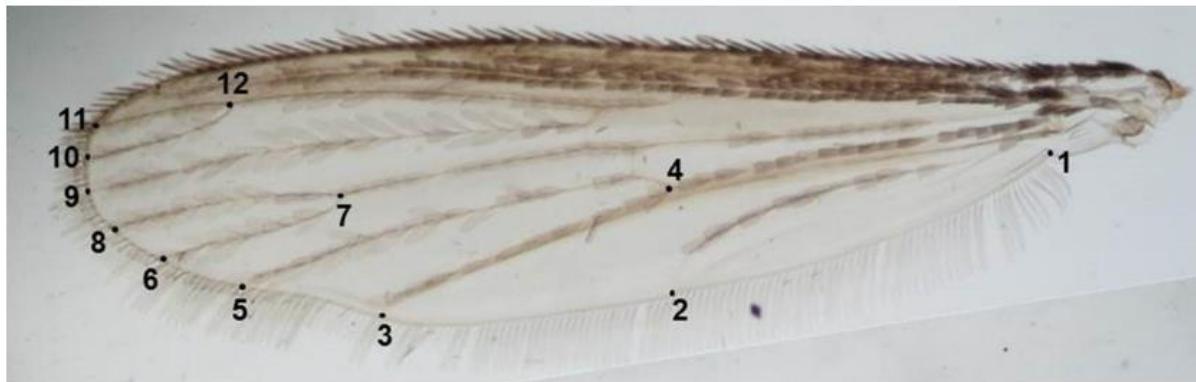


Figure 6. Photo d'une aile de moustique avec les points de références

Des études ont démontré la fiabilité de cette technique pour identifier les espèces de moustiques (Tantely *et al.*, 2020; Vidal *et al.*, 2011; Wilke *et al.*, 2016), même celles qui ne peuvent pas être identifiées avec la technique morphologique classique (Börstler *et al.*, 2014; Chatpiyaphat *et al.*, 2020). De plus, la morphométrie des ailes est peu coûteuse et nécessite très peu d'expérience entomologique par rapport à l'identification morphologique classique (Sauer *et al.*, 2020).

Cependant, les résultats obtenus avec cette technique peuvent être influencés par des erreurs lors de la pose des points de référence, pouvant entraîner une surestimation de la variation entre les groupes étudiés (Lorenz *et al.*, 2017). Ainsi, des auteurs suggèrent l'utilisation des traitements physiques et/ou chimiques dans le but d'enlever les écailles et les tâches afin de mieux repérer les nervures (Lorenz and Suesdek, 2013). Par ailleurs, des études ont démontré une influence de différents facteurs, notamment l'humidité relative ou encore l'altitude sur la taille des ailes de différentes populations d'*Aedes* (Kuclu *et al.*, 2011; Morales Vargas *et al.*, 2010). Une variation

temporelle de la taille des ailes a été également observée chez *Ae. albopictus* (Kuclu et al., 2011). Ces paramètres doivent, ainsi, être considérés lors de l'utilisation de cette technique.

I.6.3. Méthodes moléculaires

Le développement des techniques moléculaires a permis de surmonter les difficultés liées à l'identification morphologique. En effet, elles peuvent être adaptées aux spécimens endommagés et permettent de distinguer les espèces morphologiquement proches (groupe d'espèces) ou identiques (complexe d'espèces) (Fanello et al., 2002; Lobo et al., 2015; Mathys et al., 2007; Zhong et al., 2020b). L'étape d'amplification par PCR (de l'anglais *Polymerase Chain Reaction*) de fragments d'ADN constitue le point commun des méthodes moléculaires (Duvallet et al., 2017).

Parmi les méthodes moléculaires les plus utilisées pour identifier les espèces de moustiques figure le barcoding qui s'intéresse aux polymorphismes des régions mitochondrielles (Ferri et al., 2009), notamment de la région de la cytochrome oxydase 1 ou *cox1* (Folmer et al., 1994). L'analyse de cette région est intéressante car les amores utilisées durant la PCR permettent d'amplifier l'ADN d'un grand nombre de groupes d'insectes dont les moustiques (Batovska et al., 2016; Gutiérrez et al., 2014; Pramual and Adler, 2014). De plus, les résultats du séquençage démontrent un fort polymorphisme interspécifique et un faible polymorphisme intraspécifique dans cette région mitochondriale (Batovska et al., 2016; Gutiérrez et al., 2014; Pramual and Adler, 2014). L'identification moléculaire des espèces de moustiques peut également se baser sur le polymorphisme des régions ribosomales comme ITS1 ou ITS2 (*Internal Transcribed Spacer* 1 ou 2). Ces régions ont notamment été utilisées pour identifier certaines espèces d'*Aedes* du groupe *Scutellaris* (Beebe et al., 2007; Behbahani et al., 2005). Le principe de ces types d'identification est de comparer la séquence d'ADN du moustique à identifier avec des séquences d'ADN de référence dans des bases de données publiques comme GenBank ou BOLD Systems (Schaffner and Mathieu, 2020). La réussite de l'identification est ainsi conditionnée par la disponibilité de séquences de l'espèce à identifier dans ces bases de données. Il n'existe pas de séquences d'ADN de référence pour la plupart des espèces d'*Aedes* du groupe *Scutellaris*.

D'autres techniques moléculaires peuvent être utilisées pour identifier les espèces de moustiques. Il s'agit notamment des tests de type PCR-RFLP (de l'anglais *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) consistant à amplifier un locus connu du génome, qui est digéré par la suite à l'aide d'une enzyme de restriction. A titre d'exemple, cette technique a été utilisée pour identifier les espèces d'*Anopheles* du complexe *farauti* (Beebe et al., 2000). On peut également citer la PCR quantitative en temps réel. Elle a été développée pour identifier notamment les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles maculipennis* (Bass et al., 2007, 2008; Lühken et al., 2016). Enfin, la technique LAMP (de l'anglais *Loop-mediated isothermal amplification*) figure elle aussi parmi les techniques moléculaires développées en entomologie médicale. Un premier essai spécifique LAMP, basé sur les séquences ITS1 et ITS2, a permis d'identifier les espèces invasives comme *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (Schenkel et al., 2019). Un autre essai a démontré la possibilité d'identifier les espèces d'*Anopheles* du groupe *funestus* et du complexe *gambiae*, qui comprennent des vecteurs majeurs de paludisme en Afrique (Kamber et al., 2020)

Malgré la sensibilité et la spécificité élevée des techniques moléculaires, ce sont des méthodes qui coûtent généralement cher car elles requièrent l'utilisation de réactifs et matériels spécifiques (Schaffner and Mathieu, 2020).

I.7. MALDI-TOF MS : une méthode prometteuse en entomologie médicale

I.7.1. Principe du MALDI-TOF

Une nouvelle méthode d'identification commence à émerger en entomologie médicale. Il s'agit de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (de l'anglais *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight*). Cette technique consiste à générer des spectres de masse, qui sont comme des « signatures spectrales protéiques » caractéristique de chaque espèce, pouvant être utilisés en identification (Bizzini et al., 2010; Carbonnelle et al., 2011; Croxatto et al., 2012). Au début des années 2000, le MALDI-TOF a été utilisé pour identifier les micro-organismes comme les bactéries (Sauer et al., 2008). Depuis lors, le MALDI-TOF a été introduit dans les analyses de routine en microbiologie clinique, pour l'identification systématique des micro-organismes (Bizzini et al., 2010; Croxatto et al., 2012; Seng et al., 2010). Récemment, le MALDI-TOF a été utilisé pour la détection du SARS-CoV-2 (Tran et al., 2021). Les résultats ont démontré une précision supérieure à 96% lors de l'analyse des spectres avec des techniques d'analyse des données par intelligence artificielle.

Différents types de systèmes MALDI-TOF sont commercialisés à ce jour, dont le Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™ et l'Axima-Assurance-Shimadzu/SARAMIS-AnagnosTec (Seng et al., 2010; Welker and Moore, 2011). Une comparaison de ces deux systèmes a démontré une performance plus élevée du Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™ dans l'identification des bactéries (Carbonnelle et al., 2012). Ce dernier est actuellement le plus utilisé en pratique courante.

Une extraction des molécules d'intérêt, notamment des protéines, est préalablement requise avant l'analyse au MALDI-TOF. Les extraits ainsi obtenus sont alors déposés sur une plaque et recouverts par une matrice. Chaque échantillon est soumis à l'action d'un rayon laser (Pasternak, 2012). Ainsi, la matrice va absorber l'énergie provenant du laser, ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes (Carbonnelle and Nassif, 2011; Liu and Schey, 2005). Les molécules ionisées sont par la suite aspirées dans un tube à vide et vont migrer vers le détecteur. La durée de cette migration dépend de la taille des molécules ; celles

de petites tailles atteignant les premières le détecteur (Carbonnelle and Nassif, 2011). Ainsi, le spectre obtenu est composé de multiples pics ; un pic correspond à une molécule, en l'occurrence un peptide ou une protéine. L'axe des abscisses donne les valeurs du ratio masse/charge (m/z) et l'axe des ordonnées correspond à l'intensité du signal (**Figure 7**).

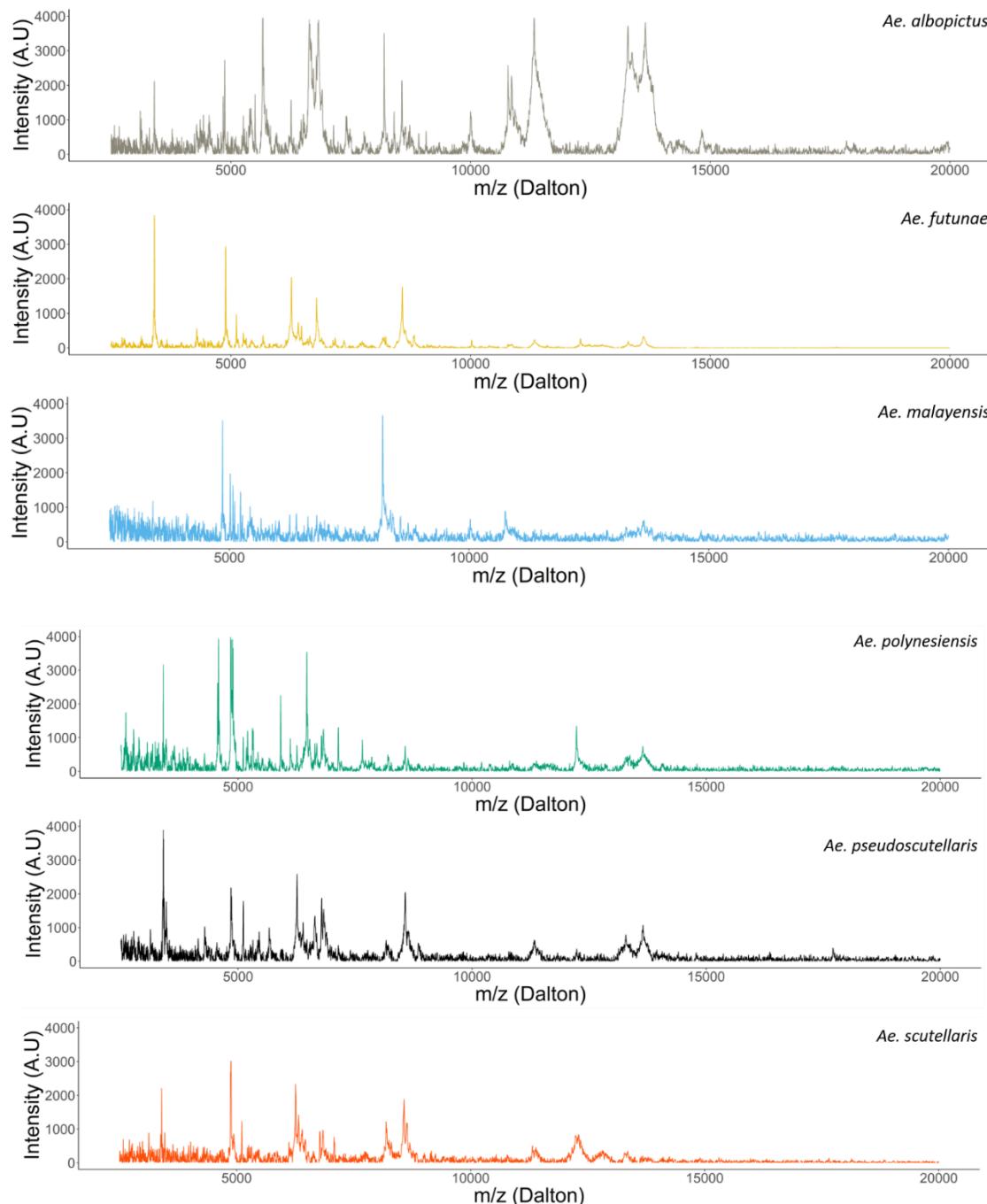


Figure 7. Exemple de spectres obtenus au MALDI-TOF

Pour une analyse au MALDI-TOF, la première étape consiste à créer une base de données (**figure 8**) (Becker et al., 2014; Crossay et al., 2017). Afin de créer cette base, il faut disposer de plusieurs espèces, mais également de plusieurs spécimens de chaque espèce (Duvallet et al., 2017). La base de données est constituée de plusieurs spectres de référence représentatifs par espèce, sélectionnés en fonction de leur reproductibilité intraspécifique et de leur variabilité interspécifique (Yssouf et al., 2016).

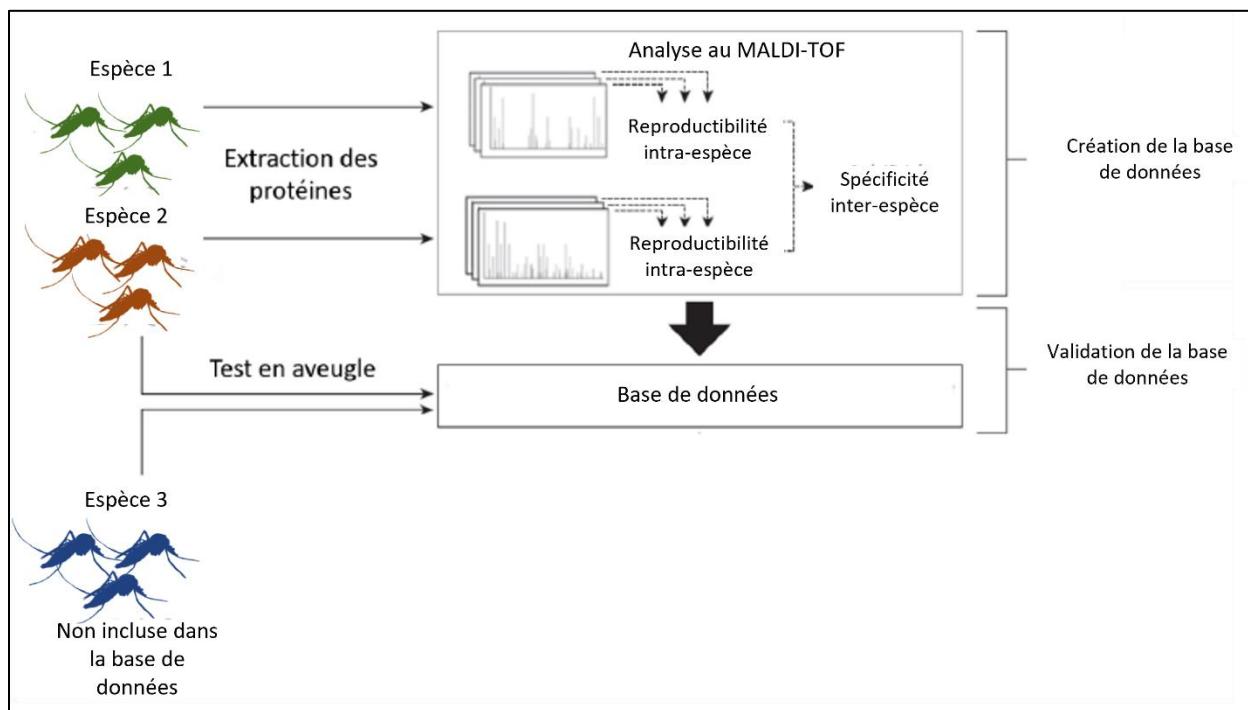


Figure 8. Principe du MALDI-TOF. Adaptée de (Duvallet et al., 2017).

La deuxième étape consiste ensuite à valider la base de données créée en utilisant des spectres issus de nouveaux spécimens, dont l'espèce est incluse ou non dans la base de données (Crossay et al., 2017; Yssouf et al., 2016). La comparaison de ces nouveaux spectres aux spectres de référence permet l'obtention d'un score d'identification, reflétant la similarité entre le spectre du spécimen et les spectres de référence (Crossay et al., 2017). Ce score est calculé par multiplication de trois facteurs : (i) le nombre de signaux du spectre du spécimen à identifier

ayant une correspondance étroite avec les signaux du spectre de référence, (ii) le nombre de signaux du spectre de référence ayant une correspondance étroite avec les signaux du spectre du spécimen et (iii) la similitude du profil d'intensité des pics correspondants (Kostrzewa and Maier, 2016). Chaque facteur peut avoir une valeur maximale égale à 1. Le logarithme de ces scores calculés (multiplié par 1000) donne une valeur de log (score) allant de 0 à 3 ($\log(1 \times 1 \times 1 \times 1000) = 3$). Si ce score est supérieur ou égal à la valeur du seuil d'identification défini (ex. 2,3 pour les bactéries ; 1,8 pour les moustiques), l'identification est considérée comme valide. Dans le cas contraire, il s'agit d'une espèce non incluse dans la base de données.

I.7.2. Identification des espèces de moustiques par MALDI-TOF

La première étude démontrant la possibilité d'utiliser le MALDI-TOF pour identifier les espèces de moustiques date de 2013 (Müller et al., 2013), durant laquelle des souches d'*Anopheles* de laboratoire et de terrain ont été analysées. Les résultats ont mis en évidence que les spectres obtenus à partir de la tête et du thorax des moustiques, permettait de distinguer correctement les espèces, même celles du complexe *gambiae* qui sont morphologiquement identiques.

Une vingtaine de travaux sur l'identification des moustiques par MALDI-TOF ont, par la suite, été publiés. Ces travaux concernaient les différents stades de développement du moustique, notamment les œufs (Schaffner et al., 2014), les larves de différents stades (Dieme et al., 2014; Nebbak et al., 2016, 2017, 2018), les exuvies des nymphes, c'est-à-dire l'enveloppe cuticulaire que le corps de l'animal a quittée lors de la mue (Nebbak and Almeras, 2020) et les adultes (Briolant et al., 2020; Diarra et al., 2019; Lawrence et al., 2018; Mewara et al., 2018; Nabet et al., 2021; Raharimalala et al., 2017; Tandina et al., 2016, 2018; Vega-Rúa et al., 2018; Yssouf et al., 2014, 2013). Ces investigations ont mis en évidence la capacité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à identifier correctement les espèces. En revanche, ces études n'ont pas abouti à un consensus sur le nombre de spectres de référence par espèce requis pour la création d'une base de données MALDI-TOF. De plus, les bases de données sont parfois constituées de moustiques de laboratoire, ce qui limite la possibilité d'observer de la variabilité inter-individuelle souvent rencontrée chez les moustiques de terrain.

Le choix de la partie du corps à analyser est cruciale lors d'une identification par le MALDI-TOF (Yssouf et al., 2016). Ainsi, différents travaux ont été réalisés afin de déterminer les parties du corps qui seraient adéquates pour une identification des espèces de moustiques. Dans la littérature, les spectres de l'abdomen des moustiques adultes sont décrits comme potentiellement biaisés par la présence de microbiotes et de sang non digéré (Müller et al., 2013; Vega-Rúa et al., 2018; Yssouf et al., 2016). En revanche, les travaux pionniers d'Yssouf (2013) ont démontré que l'utilisation des pattes est suffisante pour l'extraction des protéines, permettant une identification sans ambiguïté de l'espèce. Ainsi, cette partie du corps a été plusieurs fois utilisée lors de travaux ultérieurs (Diarra et al., 2019; Lawrence et al., 2018; Nebbak et al., 2016; Raharimalala et al., 2017; Tandina et al., 2018; Yssouf et al., 2014). Malheureusement, lors des captures des moustiques sur le terrain, une perte d'une partie ou de la totalité des pattes peut survenir, de par leur fragilité. Ainsi, l'utilisation des spectres de la tête avec le thorax (Müller et al., 2013), ou encore du thorax avec ou sans les ailes (Briolant et al., 2020; Nabet et al., 2021; Vega-Rúa et al., 2018) peut constituer une alternative. Une étude récente a également démontré une identification correcte des espèces de moustiques en utilisant des spectres de la tête des adultes (Nabet et al., 2021). Chez les larves, des travaux ont démontrés que différentes parties du corps comme la tête avec le thorax (Dieme et al., 2014), l'abdomen (Nebbak et al., 2017) ou encore le corps en entier (Dieme et al., 2014; Nebbak et al., 2017) peuvent également être utilisées pour une identification des espèces par le MALDI-TOF.

Durant la capture des moustiques, notamment dans le cadre d'une surveillance entomologique, les pièges sont parfois déployés pendant une longue période sur le terrain. Les moustiques restent ainsi exposés à des variations non contrôlées de température et d'humidité relative, ce qui pourrait impacter la qualité des spectres obtenus au MALDI-TOF. Ce paramètre n'a jamais été étudié lors des études précédentes.

D'une manière générale, l'utilisation de moustiques frais a été recommandée pour maximiser la fiabilité de l'identification à l'espèce au MALDI-TOF (Sevestre et al., 2021; Yssouf et al., 2016) alors que les moustiques collectés sur le terrain peuvent parfois être conservés pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois avant analyse. Les méthodes de conservations utilisées constituent ainsi un paramètre important dans l'identification des moustiques. Une conservation dans de

l'azote liquide ou une congélation à - 20°C pendant plusieurs mois ne semble pas impacter négativement la qualité des spectres des moustiques obtenus au MALDI-TOF (Dieme et al., 2014; Nebbak et al., 2016). Par ailleurs, des études ont démontré que l'utilisation du silica gel et coton serait adéquate pour une conservation des moustiques pendant 2 mois avant l'identification de l'espèce (Diarra et al., 2019; Nebbak et al., 2016) ou du repas sanguin au MALDI-TOF (Niare et al., 2016). A l'inverse, la littérature décrit que la conservation dans de l'éthanol à 70% peut altérer la qualité des spectres des moustiques (Dieme et al., 2014; Nebbak et al., 2016). Lors de ces différentes études, les spectres des moustiques de laboratoire analysés ont été comparés avec plusieurs spectres de référence (Dieme et al., 2014; Nebbak et al., 2016), ce qui aurait pu augmenter artificiellement les scores d'identification et biaiser les résultats. L'utilisation des moustiques de terrain (Diarra et al., 2019) aurait également pu favoriser une variabilité des spectres liés à d'autres paramètres notamment la durée de piégeage.

Chez les moustiques, un seuil d'identification de 1,8 a été retenu lors d'une étude réalisée en 2013 (Yssouf et al., 2013). Ce seuil a été déterminé de façon empirique, sans analyse statistique. Il permettait d'identifier 100% des individus analysés, dont l'espèce était présente dans la base de données (Yssouf et al., 2013). Ce seuil a été utilisé durant les études ultérieures (Briolant et al., 2020; Diarra et al., 2019; Mewara et al., 2018; Nebbak et al., 2016; Nebbak and Almeras, 2020; Vega-Rúa et al., 2018; Yssouf et al., 2014).

I.7.3. Détection des microorganismes chez les moustiques

En plus de l'identification des espèces, le MALDI-TOF permet également la détection de micro-organismes chez les moustiques. En effet, une étude réalisée en 2017, avait évalué la capacité de la technique à détecter la présence de *Plasmodium* chez *Anopheles stephensi*, en utilisant les spectres de la tête et du thorax (Laroche et al., 2017). Les résultats ont démontré une classification correcte de plus de 90% des moustiques infectés durant l'analyse.

Une autre étude publiée la même année a démontré que la détection des filaires chez *Ae. aegypti* était possible par MALDI-TOF, en utilisant des spectres de différentes parties du corps (Tahir et

al., 2017). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les spectres de la tête et du thorax avec une sensibilité supérieure à 60% pour les différentes espèces de filaires analysées.

Aucune étude sur la détection des bactéries intra-cellulaires, notamment de *Wolbachia*, chez les moustiques n'a été faite à ce jour en utilisant le MALDI-TOF. En revanche, une étude a démontré que cet outil permet de détecter la présence de *Rickettsia*, une bactérie intra-cellulaire, chez 100% des tiques infectées (Yssouf et al., 2015). L'apport des différents logiciels du MALDI-TOF avait permis de détecter des pics spécifiques des tiques infectées, dont certains étaient retrouvés dans les spectres obtenus sur les bactéries seules.

I.7.4. Apport des réseaux de neurones convolutifs dans l'analyse des données entomologiques

Au cours de la dernière décennie, les réseaux de neurones convolutifs ont révolutionnés les analyses des données dans différents domaines (Albawi et al., 2017), notamment en entomologie médicale (Banerjee et al., 2008; Lorenz et al., 2015; Park et al., 2020). Il s'agit de systèmes de traitement informatique, fortement inspirés du fonctionnement des systèmes nerveux biologiques (O'Shea and Nash, 2015). Ainsi, ils sont principalement composées d'un grand nombre de nœuds de calcul interconnectés, appelés neurones (Basheer and Hajmeer, 2000).

Une étude sur l'apport de ces réseaux de neurones à la reconnaissance des profils de spectres MALDI-TOF de pattes et de thorax des moustiques du genre *Anopheles* a été publiée récemment (Nabet et al., 2020). Ce travail a démontré que ces réseaux de neurones sont capables de reconnaître les variations du profil de spectre des *Anopheles* liées à l'âge, au statut d'infection par *Plasmodium* et au repas sanguin. Une bonne prédiction du statut d'infection et de repas sanguin a été observée en analysant les spectres des pattes et du thorax par les réseaux de neurones. Par ailleurs, une bonne prédiction de l'âge par les réseaux de neurones a également été observée en utilisant les spectres de thorax (précision supérieure à 72%).

I.8. Objectifs du travail de thèse

La région Pacifique est de plus en plus impactée par des épidémies occasionnées par le DENV, ZIKV et CHIKV qui peuvent être transmis par *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et *Ae. polynesiensis*. La région abrite également au moins 12 espèces d'*Aedes* impliquées ou suspectées dans la transmission d'arbovirus notamment du DENV, ce qui en fait certainement la région du monde comptant le plus grand nombre d'espèces de moustiques capables de transmettre cet arbovirus (Guillaumot, 2005). En dehors d'*Ae. aegypti*, toutes ces espèces vectrices de DENV appartiennent au groupe *Scutellaris*. Il paraît particulièrement important d'évoquer ici que les connaissances sur les espèces de ce groupe sont insuffisantes. En effet, les études réalisées sur la majorité de ces espèces datent du siècle dernier, avec peu d'informations sur leur écologie, leur comportement ou encore leur implication dans la transmission de pathogènes. L'identification de ces espèces du groupe *Scutellaris* est particulièrement difficile, de par leur ressemblance morphologique et l'absence de séquence d'ADN de référence pour la majorité de ces espèces. De plus, ce groupe renferme des espèces potentiellement invasives comme *Ae. polynesiensis*. Ainsi, elles pourraient rapidement devenir un problème mondial, à l'image d'*Ae. albopictus* ; ce qui plaide pour un renforcement de la surveillance entomologique via une identification correcte des espèces.

Par ailleurs, la Nouvelle-Calédonie a récemment adopté une méthode de lutte contre les arboviroses par remplacement de la population d'*Ae. aegypti* sauvage par une souche artificiellement infectée par *Wolbachia*, souche présentant une capacité réduite à transmettre ces virus. Cette méthode est prometteuse, étant donné qu'*Ae. aegypti* est le seul vecteur connu sur le territoire Calédonien. En revanche, afin de s'assurer de son efficacité, il est nécessaire de suivre l'installation et le maintien de la souche infectée sur le terrain. De plus, les récentes introductions d'espèces vectrices sur le territoire montrent que la Nouvelle-Calédonie est également vulnérable vis-à-vis de l'introduction, voire de l'installation d'autres espèces vectrices, notamment d'*Aedes* du groupe *Scutellaris*. Cette situation pourrait, à termes, compromettre la nouvelle méthode de lutte contre les arboviroses mis en place au travers du WMP sur le territoire Calédonien.

L'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF a récemment été introduite en entomologie médicale, notamment pour identifier les espèces de moustiques et détecter la présence de micro-organismes dans leur corps. Cet outil est intéressant mais nécessite une optimisation afin de pouvoir être utilisé pour identifier des moustiques vecteurs, à une échelle locale et internationale.

Face à ce contexte, ce travail de thèse vise à répondre à la problématique d'identification des moustiques vecteurs d'arbovirus dans le Pacifique, notamment les *Aedes* du groupe *Scutellaris*. Elle vise également à répondre au besoin de suivi de la dispersion des *Ae. aegypti* infectés par *Wolbachia* en Nouvelle-Calédonie. Ainsi deux objectifs spécifiques ont été fixés. Le premier objectif consistait à optimiser et développer la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des moustiques en Nouvelle-Calédonie, dans la région Pacifique et dans le monde. Le deuxième objectif concernait le développement d'un outil permettant la détection de *Wolbachia* chez *Ae. aegypti* en associant l'utilisation du MALDI-TOF à des techniques modernes d'analyse des données.

Les résultats de ces travaux seront présentés sous forme d'articles scientifiques, constituant chacun un chapitre de ce manuscrit. Le premier article a été publié dans le journal *Parasites and Vectors* et concerne l'optimisation et le développement du MALDI-TOF pour l'identification des moustiques de Nouvelle-Calédonie. Le deuxième article, qui sera prochainement soumis à PlosNTD, consiste au développement du MALDI-TOF pour identifier les vecteurs d'arbovirus à l'échelle régionale et internationale. Il inclut également une première analyse phylogénétique de certaines espèces du groupe *Scutellaris*. Enfin les résultats du troisième article, qui sera soumis à *Nature Scientific Report*, concerne le développement de l'outil MALDI-TOF couplé avec les techniques d'analyse de données par l'intelligence artificielle pour détecter la présence de *Wolbachia* chez les *Ae. aegypti* de terrain.

Chapitre 2

Optimisation de l'utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des moustiques de Nouvelle- Calédonie



Photographie d'un *Culex quinquefasciatus* femelle (Crédit photo : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie,
M. Pol, 2017)

Chapitre 2 : Optimisation de l'utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des moustiques de Nouvelle-Calédonie

II.1. Contexte spécifique de l'étude

La Nouvelle-Calédonie n'est pas épargnée par la circulation d'arbovirus, notamment du virus de la dengue (Inizan et al., 2019), du chikungunya (Dupont-Rouzeyrol et al., 2012; Roth et al., 2014a) et du Zika (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015) où la transmission est actuellement assurée par *Ae. aegypti*.

Les échanges commerciaux et touristiques étant importants entre la Nouvelle-Calédonie et les autres pays de la région (ex. Australie, Fidji, Vanuatu...) et d'Asie, elle est malheureusement menacée par l'introduction d'autres arbovirus comme les virus de la fièvre du Nil occidental, de la fièvre de la vallée du Rift, de l'encéphalite japonaise ou encore le virus de la rivière de Ross. En effet, des espèces capables de transmettre ces virus sont déjà présentes sur le territoire, notamment *Culex quinquefasciatus*, *Culex annulirostris*, *Culex sitiens*, *Aedes vigilax*, *Aedes vexans* et *Aedes notoscriptus* (Richards et al., 2014; Tiawsirisup et al., 2008; Turell and Kay, 1998; Van Den Hurk et al., 2003; Watson and Kay, 1998).

Par ailleurs, le risque d'introduction d'autres espèces de moustiques vecteurs en Nouvelle-Calédonie est lui aussi important. A titre d'exemple, *Aedes scutellaris*, une espèce vectrice du virus de la dengue (Moore et al., 2007) et *Anopheles bancroftii*, un vecteur du *Plasmodium* (Nigel W. Beebe et al., 2013), ont respectivement été introduits sur le territoire en 2016 et 2017 (IPNC, 2016; Pol et al., 2018). Cette situation requiert un renforcement de la capacité d'identification des moustiques en Nouvelle-Calédonie. Ceci permettrait, d'une part, de contribuer à l'évaluation du risque d'émergence de maladies vectorielles en identifiant les différentes espèces sur le territoire et, d'autre part, d'identifier rapidement une espèce introduite afin de permettre aux autorités compétentes de prendre les mesures adéquates.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est de plus en plus utilisée en entomologie médicale pour identifier des espèces d'arthropodes vecteurs, notamment les moustiques (Lawrence et al., 2018; Raharimalala et al., 2017; Yssouf et al., 2013). Néanmoins, différents paramètres pourraient influencer la qualité et la fiabilité des résultats obtenus. Le but de cette étude était d'optimiser l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour renforcer la capacité d'identification des moustiques en Nouvelle-Calédonie. Ainsi, des objectifs spécifiques ont été fixés qui consistaient à (i) évaluer l'effet de la durée de piégeage des moustiques sur les résultats obtenus au MALDI-TOF, (ii) étudier l'impact des méthodes et durées de conservation des échantillons sur la qualité des spectres protéiques, (iii) déterminer le nombre de spectres de référence requis par espèce pour optimiser les scores d'identification. Sur la base de ces résultats, une première base de données MALDI-TOF contenant les espèces de Nouvelle-Calédonie a été créée. Enfin un seuil d'identification des espèces de moustiques, maximisant la sensibilité et la spécificité de l'outil MALDI-TOF, a été déterminé.

II.2. Principaux résultats et conclusion

Cette étude a mis en évidence que la durée du piégeage impacte négativement les scores d'identification obtenus au MALDI-TOF. En effet, une baisse des scores a été observée même au bout de 24h de piégeage.

Par ailleurs, cette étude démontre que l'éthanol à 70% n'est pas préconisé pour la conservation des moustiques destinées à être analysés au MALDI-TOF. En revanche, la congélation à -20°C et la conservation à température ambiante sur silica gel et coton sont des méthodes avantageuses pour conserver des échantillons jusqu'à 2 mois avant l'analyse au MALDI-TOF. Enfin, la congélation à -80°C est à privilégier pour une conservation sur le long-terme (jusqu'à 4 ans). Ce travail a également démontré qu'au moins 5 spectres de référence par espèces sont nécessaires pour optimiser les scores d'identification.

En tenant compte de tous ces paramètres, une première base de données MALDI-TOF contenant des espèces collectées en Nouvelle-Calédonie a été créée, en utilisant des spectres des

pattes. Cette base est constituée de 11 espèces dont *An. bancroftii*, *Ae. scutellaris*, *Ae. aegypti*, *Ae. notoscriptus*, *Ae. vigilax*, *Ae. vexans*, *Cx. quinquefasciatus*, *Culex iyengari*, *Cx. sitiens*, *Cx. annulirostris* et *Tripteroides melanosiensis*.

Le seuil d'identification des moustiques a été ensuite déterminé en calculant la sensibilité et la spécificité de la technique pour les différentes valeurs de seuil possibles. Ainsi, un seuil d'identification de 1,8 a été retenu. A cette valeur, la sensibilité du MALDI-TOF est de 87% et la spécificité est de 100%. Par ailleurs, ce seuil a permis d'identifier correctement 92% des moustiques analysés ($n = 224$).

Cette étude a mis en évidence que le MALDI-TOF est une méthode sensible et spécifique permettant d'identifier les moustiques de Nouvelle-Calédonie. Il constitue ainsi un outil prometteur en santé publique, permettant une identification précise des espèces vectrices.

II.3. Article 1 : Rakotonirina A, Pol M, Kainiu M, Barsac E, Tutagata J, Kilama S, O'Connor O, Tarantola A, Colot J, Dupont-Rouzeeyrol M, Richard V. and Pocquet N. **MALDI-TOF MS: Optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasites and Vectors.* 2020;13(359):1–12.**

<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04234-8>

RESEARCH

Open Access



MALDI-TOF MS: optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia

Antsa Rakotonirina^{1*} , Morgane Pol¹, Malia Kainiu², Emilie Barsac², Jordan Tutagata¹, Sosiasi Kilama¹, Olivia O'Connor³, Arnaud Tarantola⁴, Julien Colot², Myrielle Dupont-Rouzeyrol³, Vincent Richard⁵ and Nicolas Pocquet¹

Abstract

Background: Mosquito vectors cause a significant human public health burden through the transmission of pathogens. Due to the expansion of international travel and trade, the dispersal of these mosquito vectors and the pathogens they carry is on the rise. Entomological surveillance is therefore required which relies on accurate mosquito species identification. This study aimed to optimize the use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for mosquito identification.

Methods: *Aedes aegypti* of the Bora-Bora strain and 11 field-sampled mosquito species were used in this study. Analyses were performed to study the impact of the trapping duration on mosquito identification with MALDI-TOF MS. The best preservation methods to use for short, medium and long-term preservation before MALDI-TOF MS analysis were also assessed. In addition, the number of specimens per species required for MALDI-TOF MS database creation was determined. The first MALDI-TOF database of New Caledonian mosquitoes was assembled and the optimal threshold for mosquito species identification according to the sensitivity and specificity of this technique was determined.

Results: This study showed that the identification scores decreased as the trapping duration increased. High identification scores were obtained for mosquitoes preserved on silica gel and cotton at room temperature and those frozen at -20°C , even after two months of preservation. In addition, the results showed that the scores increased according to the number of main spectrum patterns (MSPs) used until they reached a plateau at 5 MSPs for *Ae. aegypti*. Mosquitoes ($n = 67$) belonging to 11 species were used to create the MALDI-TOF reference database. During blind test analysis, 96% of mosquitoes tested ($n = 224$) were correctly identified. Finally, based on MALDI-TOF MS sensitivity and specificity, the threshold value of 1.8 was retained for a secure identification score.

Conclusions: MALDI-TOF MS allows accurate species identification with high sensitivity and specificity and is a promising tool in public health for mosquito vector surveillance.

Keywords: Mosquitoes' identification, MALDI-TOF mass spectrometry, New Caledonia

*Correspondence: arakotonirina@pasteur.nc

¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Entomologie Médicale, Nouméa 98845, New Caledonia

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Vector-borne diseases are among the most significant public health burdens in the world. In addition to dengue fever which is responsible for 390 million infections per year, the emergence or re-emergence of yellow fever, chikungunya fever and Zika fever resulted in pandemics with significant morbidity [1–3]. These diseases are caused by arboviruses that are transmitted to humans through the bites of vector mosquitoes.

New Caledonia is a subtropical island located in the southwestern Pacific Ocean where dengue is the most prevalent arthropod-borne viral infection with epidemics occurring regularly [4]. Chikungunya and Zika infections have been also reported on the territory [2, 5]. The major vector of these arboviruses is *Aedes aegypti*. There is also a risk of other arboviruses being introduced in New Caledonia such as West Nile virus, Rift Valley fever virus, Japanese encephalitis virus or Ross River virus, as suitable vector species are present: *Culex quinquefasciatus*; *Culex annulirostris*; *Culex sitiens*; *Aedes vigilax*; *Aedes vexans*; and *Aedes noto-scriptus* [6–10]. In addition, the risk for introduction of exotic mosquito species is also important because other vector species are documented in neighboring countries [11–13]. For example, two vector species were recently introduced: *Aedes scutellaris*, a vector of dengue virus, detected in 2016 and *Anopheles bancroftii*, a secondary vector of *Plasmodium* sp., detected in 2017 [14, 15].

Given the threat of introduction of both exotic vector mosquito species and other arboviruses in New Caledonia, enhanced surveillance is crucial. Strengthening of surveillance has been identified by the World Health Organization as one of the four pillars of effective vector control in the Global Vector Control Response plan for 2017–2030 [16]. This surveillance relies on accurate mosquito species identification. Indeed, knowledge of existing vector mosquito species on the territory allows a better risk assessment for vector borne diseases. Rapid detection thanks to reliable identification of introduced vector species limits their installation through timely and adequate vector control measures.

Several techniques can be used to identify mosquitoes. Morphological identification is widely used, it is inexpensive and can be readily conducted in the field [17]. However, it requires expertise in entomology that is often unavailable. Furthermore, morphological identification is difficult due to the similarity within cryptic species and/or damage to the specimen during sampling [17, 18]. The molecular method, specifically DNA sequencing, is necessary when mosquitoes belong to cryptic species complexes that cannot be distinguished morphologically. This method is one of the most sensitive and specific

techniques but requires pre-existing DNA sequence information for species identification [17]. This method remains also expensive and time consuming; it is therefore not suitable for routine mosquito identification [19].

Recently, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was introduced for mosquito species identification [19, 20]. This method generates unique protein mass spectra, “fingerprints” specific to each species [21]. When the spectrum is compared to a database of reference spectra, the software calculates a score that indicates the reliability of the identification provided. The score is then compared to a threshold value and allows species identification [21]. This method is much less costly than the molecular method [22]. In addition, the MALDI-TOF MS technique can be used for mosquito species complex identification (i.e. morphologically indistinguishable species) [19, 20].

Although this technique is promising for mosquitoes' identification, some parameters have to be considered prior to MALDI-TOF MS analysis. Indeed, previous studies on several arthropods have underlined the impact of trap type used for sampling, the preservation methods and the body part used for protein extraction on the spectra profile [23–26]. The impact of trapping duration on MALDI-TOF identification, however, has never been evaluated. In addition, no clear consensus for the minimum number of specimens per species required for a robust MALDI-TOF database is available. Regarding the threshold value for mosquito species identification, there is no value registered by the software manufacturer. The threshold value at 1.8 established following mosquito blind testing [19] should be confirmed to allow routine mosquito species identification with MALDI-TOF MS.

The overall aim of this study was to optimize the use of MALDI-TOF MS for mosquito identification, while taking into account the parameters previously described. The specific objectives were: (i) to determine whether trapping duration affects MALDI-TOF MS identification; (ii) to determine the best methods to use for short, medium and long-term preservation before MALDI-TOF MS analysis; and (iii) to determine the number of specimens per species required for the MALDI-TOF MS database creation. The threshold value for mosquito identification with the database was also determined, based on MALDI-TOF MS sensitivity and specificity.

Methods

Biological material

Laboratory-reared mosquitoes were used to measure the effect of trapping duration and preservation methods on MALDI-TOF MS results. *Aedes aegypti* (Bora-Bora strain) were raised in the insectarium at 28 °C ± 2 °C and a relative humidity of 80 ± 10%. Larvae were reared until

the pupal stage in a plastic tray containing 1.5 l of water and fed with beer yeast *ad libitum*. Pupae were then collected and transferred to a mosquito cage. Adults that emerged were fed with a 10% glucose solution and were harvested when they were 3–5-days-old and killed before MALDI-TOF MS analysis.

Eleven species of field-collected mosquitoes were used to create and validate the MALDI-TOF database (Table 1). Field-collection of both larval and adult stages was undertaken from March 2016 to April 2019. Different sampling methods were used to collect adults according to the target species: CDC light trap with CO₂; BG-sentinel trap (Biogents); and human landing catch. During these samplings, traps were set for a maximum of 24 h. Larvae were collected in their breeding sites and raised to adults in the laboratory. All these mosquitoes were preserved at –20 °C, or at –80 °C if storage exceeded 3 weeks before MALDI-TOF MS analysis.

Morphological and molecular identification of mosquitoes

All mosquitoes used in this study were morphologically identified using dichotomous identification keys before all experiments [11, 27–29]. As no mosquito species complex is currently reported to be present in New Caledonia, all mosquito species were morphologically distinguishable. Morphological identification was confirmed through double-blind evaluation by experienced entomologists.

In addition to morphological identification, molecular analysis was also performed for all the specimens used as references for the creation of the MALDI-TOF database. For this, the head, thorax and abdomen of each mosquito were removed and transferred in 1.5 ml microtubes for DNA extraction. DNA was extracted using a DNA Blood

and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendation.

The extracted DNA was subsequently amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers targeting the cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) region: LCO1490 (forward: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') and HC02198 (reverse: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') [30]. Primers targeting the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the ribosomal RNA gene cluster (forward: 5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA T-3'; reverse: 5'-TAT GCT TAA ATT CAG GGG GT-3') were also used for the molecular identification of *An. bancroftii* [31]. The PCR conditions were: 0.2 μM forward primer; 0.2 μM reverse primer; 1× master mix (Qiagen); distilled water; and template DNA (between 10 ng/μl and 100 ng/μl). The PCR was performed in a total volume of 25 μl under different thermal conditions according to the primers used. To amplify *cox1*, cycling involved an initial denaturation at 94 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. To amplify ITS2, the thermal conditions were: 4 min at 94 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 120 s at 51 °C and 1 min at 72 °C, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

Finally, PCR products were sequenced (Genoscreen, Lille, France) and the sequences were assembled and analyzed using PREGAP and GAP software (version 4.10.2, 2019; The GAP Group, GAP-Groups, Algorithms and Programming, Aachen, Germany). Obtained sequences were compared with mosquito sequences available in the GenBank database using the BLAST platform (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Table 1 Mosquitoes used for MALDI-TOF MS analysis

Species	No. of specimens in database	No. of specimens used in blind testing	Species identified via GenBank	cox1 [31] sequence similarity (%)	ITS2 [32] sequence similarity (%)
<i>An. bancroftii</i>	3	7	<i>An. bancroftii</i>	na	100
<i>Ae. scutellaris</i>	5	10	<i>Ae. scutellaris</i>	> 99	na
<i>Ae. aegypti</i>	10	30	<i>Ae. aegypti</i>	> 99	na
<i>Ae. notoscriptus</i>	5	19	<i>Ae. notoscriptus</i>	> 96	na
<i>Ae. vigilax</i>	5	20	<i>Ae. vigilax</i>	> 99	na
<i>Ae. vexans</i>	5	20	<i>Ae. vexans</i>	> 99	na
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	9	30	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	> 98	na
<i>Cx. iyengari</i>	5	18	na	na	na
<i>Cx. sitiens</i>	5	20	<i>Cx. sitiens</i>	> 99	na
<i>Cx. annulirostris</i>	10	30	<i>Cx. annulirostris</i>	> 97	na
<i>T. melanesiensis</i>	5	20	na	na	na
Total	67	224	–	–	–

Abbreviation: na, not available

Protein extraction for MALDI-TOF analysis

For protein extraction, the experiment was focused using only legs, which is the widely used method for MALDI-TOF MS mosquito database creation. This reduces bias caused by potential traces of blood-meals or microbiota in the spectra [19]. The sample preparation method used was adapted to the protocol described by Raharimalala et al. [32]. All the legs of each mosquito were removed and rinsed in a microtube with 1 ml of 70% ethanol for 60 s, followed by 1 ml of distilled water for 60 s. After total elimination of water, 3 metal beads of 2.4 mm diameter, 15 µl of acetonitrile (50%) and 15 µl of formic acid (70%) were added to the microtube. Each sample was subsequently homogenized using a MagnaLyser, version 1.1 (Roche, Mannheim, Germany) with 3 cycles of 30 s at a frequency of 3000× rpm. The homogenates were transferred into 1.5 ml Eppendorf microtubes and centrifuged at 10,000× g for 2 min. To improve deposit homogeneity and ensure the rapidity of spectra acquisition, 1 µl of sample was deposited directly on a steel MALDI plate (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) and allowed to dry before adding another 1 µl of the same sample over the first spot. As per a previous study on mosquito identification with MALDI-TOF, 8 spots of the same sample were deposited on the plate to create the reference main spectrum patterns (MSP) [32]. Conversely, only one spot was deposited for each sample intended to be queried against these reference spectra in order to assess all MALDI-TOF analyses without score optimization caused by multiple spots. After drying at room temperature, all spots were recovered with 1 µl of matrix solution (α -cyano-4-hydroxycynamique solubilized into 50% acetonitrile, 2.5% trifluoroacetic and 47.5% high-performance liquid chromatography-grade water; Honeywell, North Carolina, USA). Matrix solution, deposited in duplicate on the plate, was used as a control for matrix quality. Finally, the plate was dried at room temperature before MALDI-TOF MS analysis.

MALDI-TOF parameters and analysis

Spectra ranging from 2000 to 20,000 Daltons were acquired using a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker). Measurements were performed with flexControl software, version 3.3 (Bruker) with detection in the linear positive-ion mode at a laser frequency of 60 Hz and laser power between 40–50%. Each spectrum obtained corresponds to an accumulation of 240 laser shots from the same spot performed in 6 regions.

For each reference sample used to create MSP, the 8 replicates were individually measured 3 times. The quality of the spectra obtained was verified with MALDI flex analysis software, version 3.3 (Bruker). Then, a selection

of 20–24 high quality mass spectra per sample, obtained with the 8 spots measured 3 times, were imported into the MALDI Biotype compass software, version 3.1 (Bruker). MSP containing the average of peak mass, the average of peak intensity and peak frequency information was subsequently calculated for each reference sample.

For the sample intended to be queried against the MSP, one measurement was realized for each spot (one spot per sample). The mass spectrum of each sample was compared to the MSPs in the MALDI-TOF database with the MALDI Biotype compass software. This software calculates a log-score value (LSV) ranging from zero to three, reflecting the similarity between sample spectra and MSP. A Log-score value greater than or equal to a threshold value supports the accuracy of the sample identification.

Effect of trapping duration on MALDI-TOF identification

To assess only the impact of trapping duration on mosquito identification with MALDI-TOF MS and to limit inter-individual variability, *Ae. aegypti* females belonging to the same laboratory strain (Bora-Bora strain) and the same generation were used. These were raised in the same laboratory conditions. Five BG-sentinel traps were placed in field conditions. Mosquitoes were quickly anesthetized at 4 °C and 30 alive specimens were placed in each trap. Then, each trap's funnel was covered up to avoid the introduction of other mosquitoes. Traps were harvested after 24, 48, 72, 96 and 168 h, respectively. Fresh specimens ($n = 30$) were also included in the analysis. Each mosquito was subjected to MALDI-TOF MS analysis. To limit the impact of the multiple MSPs on MALDI-TOF results, they were compared with only one MSP created from a fresh specimen.

Determination of the best methods of preservation

Three preservation methods were studied: (i) freezing at –20 °C; (ii) preservation in 70% ethanol; and (iii) preservation on silica gel and cotton at room temperature (c.25 °C). A total of 338 *Ae. aegypti* females belonging to the same laboratory strain (Bora-Bora strain), the same generation and raised in the same laboratory condition were also included in analysis. Mosquitoes were sampled and individualized in 1.5 µl microtubes. They were preserved using each of the 3 preservation methods described, for 9, 32, 62 and 218 days. Thirty fresh specimens were also included in the analysis. All these mosquitoes were submitted individually to MALDI-TOF MS analysis, and compared with one MSP created from a fresh specimen to limit score optimization due to multiple MSPs being included.

Determination of the required number of MSPs per species for database creation

Analysis was performed in order to determine the required number of specimens per species for MALDI-TOF MS database creation. The assessment was investigated for three species from the field: *Ae. aegypti*; *Cx. quinquefasciatus*; and *Cx. annulirostris*. Nine MSPs were created for *Cx. quinquefasciatus* while 10 MSPs per species were created for *Ae. aegypti* and *Cx. annulirostris*. The spectra of 30 mosquitoes per species were compared with 1 to 9 corresponding MSPs for *Cx. quinquefasciatus* and from 1 to 10 MSPs for the other species. The objective was to test the number of required MSPs to obtain the best identification score. The LSV median was computed for the 3 species for each number of MSPs tested.

Creation and validation of the MALDI-TOF MS database of mosquitoes from New Caledonia

The findings observed during these previous steps were taken into consideration during the database creation. For this, 11 mosquito species collected in the field were used to create the MALDI-TOF database of New Caledonian mosquitoes. A total of 67 fresh specimens were used to create MSPs entered in the database.

Seven to 30 specimens from the field belonging to these 11 species underwent MALDI-TOF analysis to evaluate the accuracy of this newly created MALDI-TOF database. Their spectra were blindly queried, regardless of the presence of the species' MSPs in the database. The reliability of species identification was estimated using the LSVs obtained from the MALDI Biotyper software (Bruker).

Determination of the threshold value for mosquito identification with MALDI-TOF

The database was used as a reference to determine the threshold value for which both the sensitivity and the specificity of the MALDI-TOF identifications were optimal. This was achieved by comparing the spectra of field-collected specimens in a blinded experiment. In this process, all the field specimens belonging to the 11 species were first blindly queried against MSPs for each species individually. Then, these were also queried against MSPs for a random selection of 6 species on the one hand, and of the 5 other species on the other hand. For these analyses, sensitivity (Se) and specificity (Sp) were calculated at various threshold values, ranging from 0 to 3. In addition, positive and negative predictive values were determined.

The receiver operating characteristics (ROC) curve was also established. For this, area under the curve (AUC) values were evaluated to assess the discrimination of the

MALDI-TOF MS analysis compared with the morphological technique.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R software (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A non-parametric Wilcoxon test was carried out to compare LSV medians. A Kruskal-Wallis non-parametric test was also used to compare medians across multiple groups. The statistical significance threshold for these tests was set at 0.05. The ROC analysis and graphs were also developed with R software.

Results

Mosquito identification

The mosquitoes used in this study were morphologically identified as belonging to 11 different species: *An. bancroftii* ($n = 10$); *Ae. scutellaris* ($n = 15$); *Ae. aegypti* ($n = 40$); *Ae. notoscriptus* ($n = 24$); *Ae. vigilax* ($n = 25$); *Ae. vexans* ($n = 25$); *Cx. quinquefasciatus* ($n = 39$); *Cx. iyengari* ($n = 23$); *Cx. sitiens* ($n = 25$); *Cx. annulirostris* ($n = 40$) and *Tripteroides melanosiensis* ($n = 25$).

cox1 sequences were generated for all the 67 mosquitoes used to create the reference database. *Anopheles bancroftii* ITS2 spacer was also sequenced. The *cox1* query and ITS2 sequences in the GenBank database allowed us to obtain reliable species identification for all the mosquito species of which reference sequences were available (Table 1); no *cox1* sequences were available on GenBank for *An. bancroftii*, *Cx. iyengari* and *T. melanosiensis*. All sequences obtained in this study are available in GenBank database under the accession numbers MN733743-MN733814.

Impact of trapping duration on MALDI-TOF MS results

MALDI-TOF MS spectra for protein extracts from fresh mosquitoes ($n = 30$) and specimens trapped inside of BG-sentinel for durations ranging from 24 h to 1 week (30 per trapping duration) were compared with one fresh mosquito MSP. High LSVs were obtained for the fresh specimens (median of 2.23). The LSVs decreased as trapping duration increased (Fig. 1). Despite the significant difference between the mosquitoes trapped during 24 h and fresh specimens (Wilcoxon test: $Z = 4.28$, $P = 1.92 \times 10^{-5}$), LSV medians remained above 1.8 (i.e. 1.93). The comparison between spectra for fresh mosquitoes and for those harvested at each time point showed modification of spectra profile even after 24 h of trapping (Additional file 1: Figure S1).

Effect of mosquitoes' preservation method and duration on MALDI-TOF results

For each preservation method, 18–30 *Ae. aegypti* per day point were submitted individually to MALDI-TOF MS. Thirty fresh mosquitoes were also included in this experiment. Their spectra were compared to one MSP created from a fresh reference sample. The results showed a high LSV median (2.08) for the fresh mosquitoes (Fig. 2). The same result was observed for mosquitoes preserved on silica gel and cotton and those frozen during 62 days: LSV medians were of 2.01 and 2.02, respectively. LSV medians for these mosquitoes did not differ significantly from those for fresh mosquitoes (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 0.3$, $df = 2$, $P = 0.8$). Despite the significant difference between the mosquitoes preserved on silica gel and cotton during 32 days and fresh specimens (Wilcoxon test: $Z = 2.06$, $P = 0.04$), LSV medians remained above 1.8 (i.e. 1.89). At 218 days of preservation, the LSV medians decreased for frozen mosquitoes and those preserved on silica gel and cotton. However, the LSV medians in frozen specimens remained greater than 1.8 (i.e. 1.85) despite their significant difference with fresh mosquitoes (Wilcoxon test: $Z = -2.29$, $P = 0.02$). Low LSVs were observed for mosquitoes preserved in 70% ethanol, including at day 9 for which the LSV median was 1.38. These differed significantly from those found in fresh mosquitoes (Wilcoxon test: $Z = -4.31$, $P = 1.6 \times 10^{-5}$).

Number of required MSPs per species to obtain the best identification score

Before the creation of the MALDI-TOF database, analysis was performed to determine the number of MSPs required per species for the optimization of LSVs. Three species were used for the experiment: *Ae. aegypti*; *Cx. annulirostris*; and *Cx. quinquefasciatus*. For all three species, the analysis showed that the LSV medians increased according to the number of MSPs used until they reached a plateau (Fig. 3). For *Ae. aegypti*, this plateau was reached after using 5 MSPs. Indeed, no significant difference was observed between the LSV medians when using 5–10 MSPs (Kruskal-Wallis test H-test: $\chi^2 = 0.7$, $df = 5$, $P = 1$). The plateau was reached when using 3 MSPs for *Cx. annulirostris* and *Cx. quinquefasciatus*: no significant difference was observed when using 3–10 MSPs (Kruskal-Wallis test H-test: $\chi^2 = 3.8$, $df = 7$, $P = 0.8$ for *Cx. annulirostris* and Kruskal-Wallis test H-test: $\chi^2 = 10.3$, $df = 6$, $P = 0.1$ for *Cx. quinquefasciatus*).

Creation and validation of MALDI-TOF MS database

Five MS reference spectra per species were used to create the database except for four species. Only 3 *An. bancroftii* MSPs were created due to the small number of specimens available (Table 1). Further MSPs were created for *Ae. aegypti* ($n = 10$), *Cx. quinquefasciatus* ($n = 9$) and *Cx. annulirostris* ($n = 10$). These were created during the previous step (i.e. determination of the number required of MSPs per species) and were not removed from the database during analysis. The visualization of

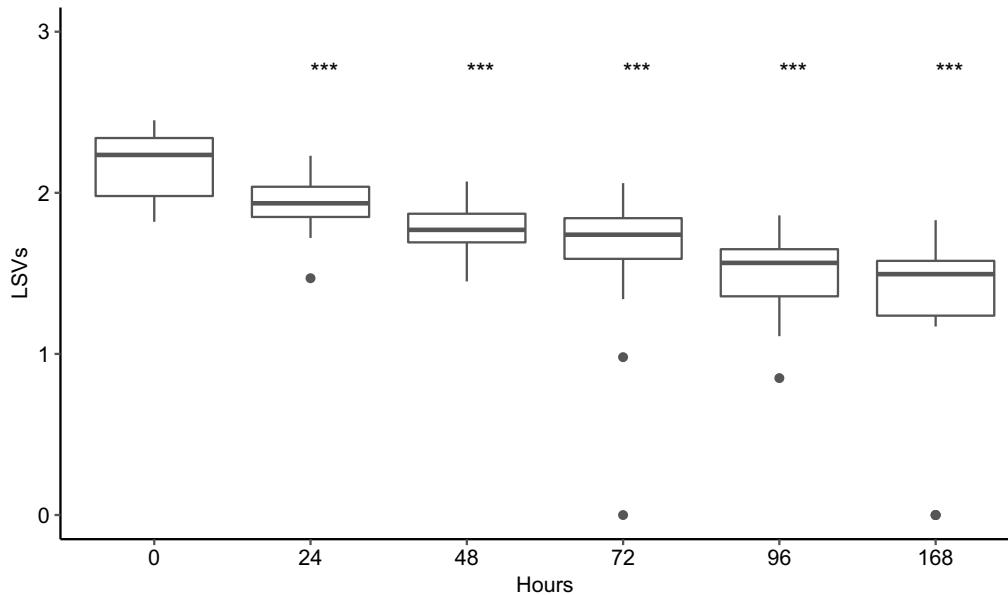


Fig. 1 Impact of trapping durations on *Ae. aegypti* identification scores. Comparison of log-score values (LSVs) of fresh mosquitoes ($n = 30$) and mosquitoes trapped from 24 h to one week ($n = 30$ per point). Wilcoxon test, *** $P < 0.001$

the relationship between MSPs in the database displayed in a dendrogram showed that MSPs of each species clustered together, with distance levels under 500 (Additional file 2; Figure S2). A total of 224 field-collected mosquitoes belonging to 11 species, consisting of 7–30 specimens per species, were queried against this database. All these mosquitoes used to create and validate the MALDI-TOF database were analyzed no later than 5 months after sampling, except for *Ae. scutellaris* and *An. bancroftii* which were collected in 2016 and 2017, respectively (Table 1) and were preserved at -80°C .

Except for the 9 mosquitoes for which no spectrum was obtained, all the specimens were matched with MSP of the correct species in the database. Specifically, reliable matching was acquired for 96% (95% CI: 93–98%) of the specimens from each species during the blind test analysis (Fig. 4). Species in the same group matched also correctly including 100% of the *Sitiens* group (*Cx. sitiens* and *Cx. annulirostris*) and 100% of the *Pipiens* group (*Cx. quinquefasciatus* and *Cx. iyengari*).

Other analyses were performed to determine the identification threshold value for these mosquito species and calculated MALDI-TOF MS sensitivity and specificity values. The results showed that the optimal threshold value which maximized the MALDI-TOF MS sensitivity and the specificity ranged from 1.48 to 1.79 when only one species was used in the database (Table 2). When approximately half the species in the database were included in the analysis, this threshold value ranged from

1.63 to 1.7 (Table 2; Additional file 3: Figure S3). High positive predictive values and negative predictive values were obtained (Table 2). High AUC (area under the curve) values (0.85 to 1) were found regardless of the species used.

Discussion

MALDI-TOF MS is an innovative tool for arthropod identification [17]. To optimize its use for routine mosquito identification and entomological surveillance, some parameters must be taken into consideration. In the present study, the effect of trapping duration and three preservation methods on MALDI-TOF results were evaluated. To the best of our knowledge, the required number of specimens per species for MALDI-TOF MS database creation and the optimal threshold for mosquitoes' identification were determined for the first time. The first MALDI-TOF MS reference spectra for the identification of a selection of New Caledonian mosquito species is presented in this study.

In entomological surveillance, traps are sometimes deployed for a long period in the field. Mosquitoes therefore remain trapped several days and exposed to uncontrolled temperature and relative humidity variations. Here, the consequence of this trapping duration on MALDI-TOF MS analysis was assessed. The results show that long-term trapping could alter the identification score for MALDI-TOF MS identification. This alteration was important from 48 hours of trapping.

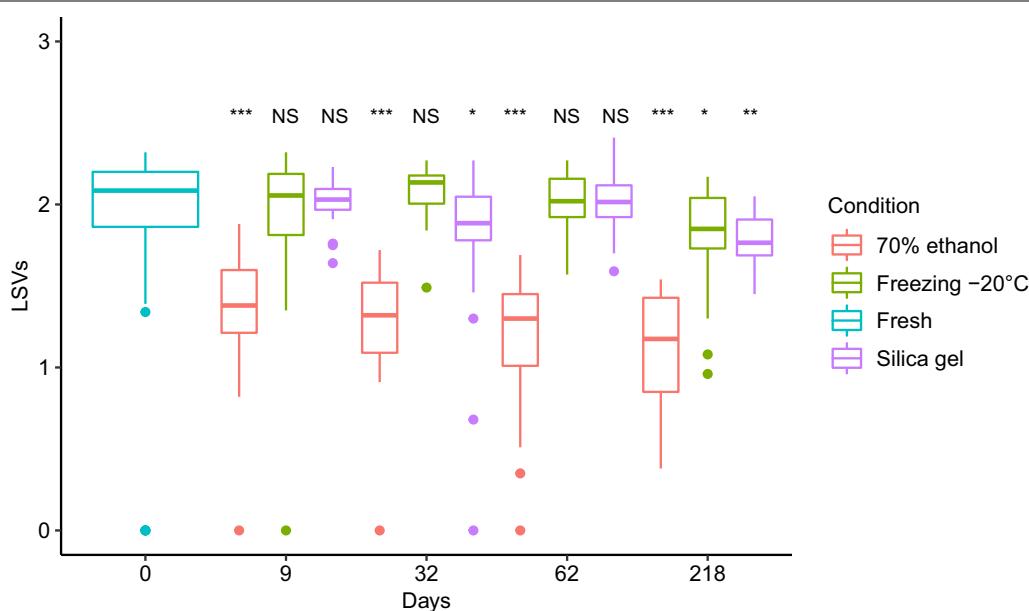


Fig. 2 Impact of methods and durations of preservation on *Ae. aegypti* identification scores. Comparison of LSVs of fresh mosquitoes ($n = 30$) and mosquitoes preserved in 70% ethanol, at -20°C and on silica gel and cotton at room temperature from 9 to 218 days ($n = 18$ to 30 per duration and per condition). Wilcoxon test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Abbreviation: NS, not significant

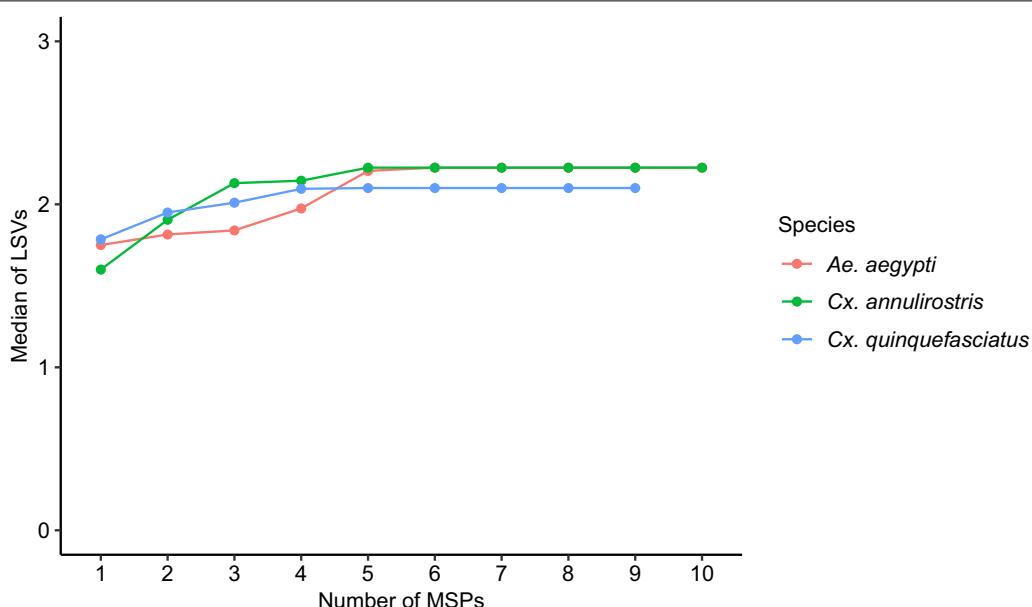


Fig. 3 Progression of log-score values according to the number of MSPs used in the analysis. Three mosquito species from the field were used, *Ae. aegypti*, *Cx. annulirostris* and *Cx. quinquefasciatus*. X-axis corresponds to the number of MSPs used in the database. Y-axis corresponds to the median of LSVs. Colors illustrate each species tested

Indeed, at 24 hours of trapping, the LSV medians remained above the threshold value for mosquito identification (i.e. 1.8) and 87% of the mosquitoes had LSVs greater than or equal to this threshold. This alteration of MALDI-TOF results may be explained by the mosquitoes' exposure to variations in relative humidity in the BG-trap. According to these findings, the trapping duration should therefore not exceed 24 hours for reliable identification using MALDI-TOF MS.

The mosquitoes collected from field traps may sometimes be preserved for several weeks or months before MALDI-TOF MS identification. The results show that preserving mosquitoes in ethanol alters the MALDI-TOF MS identification results: low LSVs for the mosquitoes preserved in 70% ethanol was found, even after preservation for nine days. These observations are certainly related to the decrease of protein solubility which could lead to the qualitative and quantitative loss in spectra profiles, as others have shown [33]. To circumvent these limitations, some authors have suggested the query of specimens against MS reference spectra of specimens similarly preserved in ethanol for the same duration [25, 34, 35]. In supplementary experiments, LSVs improvement of specimens preserved in 70% ethanol was observed, when they were compared with MSP created from mosquitoes preserved under similar conditions for one day (Additional file 4: Figure S4a). In all cases, however, fast LSVs degradation was observed for the ethanol group. In addition, the LSVs for mosquitoes of this group

remained lower than those of frozen specimens (Additional file 4: Figure S4b) and mosquitoes preserved on silica gel and cotton (Additional file 4: Figure S4c).

The second preservation method evaluated was the preservation on silica gel and cotton. Stable LSVs for the mosquitoes preserved with this method was observed, even after two months of preservation. This LSV stability could be linked to the property of silica gel in controlling the relative humidity of the samples [36]. This preservation method is therefore suitable for mosquito species identification with MALDI-TOF MS. In addition, this method is operationally and financially more accessible than the freezing method for transporting samples from the field to the laboratory. Other work showed that this preservation method is also suitable for identification of mosquito blood-meal sources [26].

The third preservation method tested in this study was $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezing. The results showed high LSVs for the frozen mosquitoes even after 62 days of preservation. In agreement with previous works, these findings suggest that freezing at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ is one of the best preservation methods [17, 25]. A decrease of LSVs was however observed after seven months of freezing (day 218), with only 60% of the mosquitoes having LSVs greater than or equal to the 1.8 threshold. During an additional experiment, the spectra obtained from *Ae. aegypti* preserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ during four years were also compared to MSPs of fresh field-collected mosquitoes (Additional file 5: Figure S5). All these mosquitoes ($n = 20$) were correctly

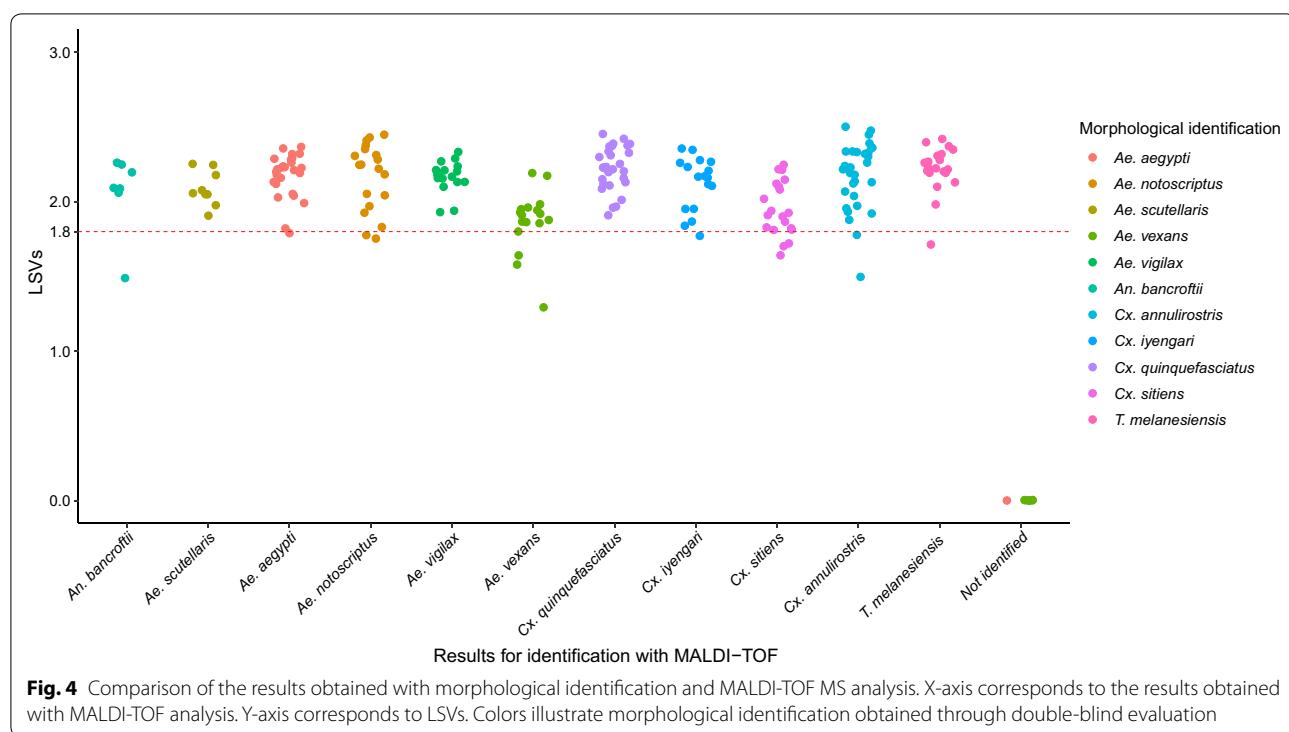


Table 2 Overview of results obtained during the determination of the optimal threshold for MALDI-TOF MS identification

Species in the database	Optimal threshold	TP	FN	TN	FP	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	AUC	95% CI (AUC)
<i>An. bancroftii</i>	1.48	7	0	217	0	1	1	1	1	1	1–1
<i>Ae. scutellaris</i>	1.75	9	1	214	0	0.9	1	0.9	1	0.90	0.77–1
<i>Ae. aegypti</i>	1.77	18	1	205	0	0.97	1	0.95	1	0.97	0.92–1
<i>Ae. notoscriptus</i>	1.75	19	0	205	0	1	1	1	1	1	1–1
<i>Ae. vigilax</i>	1.57	17	3	204	0	0.85	1	0.85	1	0.85	0.75–0.96
<i>Ae. vexans</i>	1.57	16	4	204	0	0.8	1	0.80	1	0.85	0.75–0.96
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1.79	29	1	190	4	0.97	0.98	0.97	0.98	0.97	0.92–1
<i>Cx. iyengari</i>	1.77	18	0	205	1	1	0.99	1	0.99	0.99	0.99–1
<i>Cx. sitiens</i>	1.64	20	0	214	0	1	1	1	1	1	1–1
<i>Cx. annulirostris</i>	1.78	29	1	190	4	0.97	0.98	0.97	0.98	0.99	0.97–1
<i>T. melanesiensis</i>	1.7	20	0	204	0	1	1	1	1	1	1–1
Six species ^a	1.70	109	8	100	7	0.93	0.93	0.93	0.93	0.94	0.91–0.97
Five species ^b	1.63	101	6	110	7	0.94	0.95	0.94	0.94	0.96	0.94–0.99

^a *An. bancroftii*, *Ae. scutellaris*, *Ae. aegypti*, *Ae. vigilax*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. sitiens*

^b *Ae. notoscriptus*, *Ae. vexans*, *Cx. iyengari*, *Cx. annulirostris*, *T. melanesiensis*

Abbreviations: AUC, area under the curve; TP, true positives; FN, false negatives; TN, true negatives; FP, false positives; PPV, positive predictive values; NPV, negative predictive values

identified with LSVs greater than 1.8. Storage at -80°C is therefore compatible as a long-term preservation method before MALDI-TOF MS analysis.

To the best of our knowledge, the required number of specimens per species needed to create a MALDI-TOF

MS mosquito database was determined for the first time. The assessment for three field-collected species showed that optimal LSVs were achieved when using three MSPs for *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. annulirostris* and five MSPs for *Ae. aegypti* (Fig. 3); for optimal LSVs, at least

five MSPs per species were used to create this database except for *An. bancroftii* because of the low number of available individuals.

This MALDI-TOF database included only field mosquitoes identified into 11 species. Two of these mosquito species were recently introduced in New Caledonia: *Ae. scutellaris*, vector of dengue virus; and *An. bancroftii*, vector of *Plasmodium* sp. [14, 15]. Other species included in the database are also vectors: *Ae. aegypti* is the main vector of dengue, Zika and chikungunya viruses in the Pacific region [37]; *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. annulirostris*, *Cx. sitiens*, *Ae. notoscriptus*, *Ae. vigilax* and *Ae. vexans* are known vectors of other viruses such as West Nile virus, Rift Valley fever virus, Japanese encephalitis virus and Ross River virus [6–10]. In addition, some of these species are morphologically similar to one another: *Cx. quinquefasciatus/Cx. iyengari* (*Pipiens* group); and *Cx. sitiens/Cx. annulirostris* (*Sitiens* group).

Using a cut-off distance level of 500 set by previous studies, all MSPs species in this database were reliably classified [38]. During blind testing, with the exception of the nine specimens for which no spectrum was obtained, all mosquitoes were correctly identified to the species level using MALDI-TOF MS. The absence of spectrum for these nine specimens is likely to be attributable to a few legs being available (i.e. less than four legs) which could lead to a failure to acquire sufficient protein for analysis. No mismatch was observed even for the species belonging to the same group such as *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. iyengari* (*Pipiens* group) or *Cx. sitiens* and *Cx. annulirostris* (*Sitiens* group). Likewise, differentiation of mosquitoes within a species complex was also achieved using MALDI-TOF MS [19]. These observations show that MALDI-TOF MS is an effective method to identify cryptic mosquito species. MALDI-TOF MS could also distinguish species which are morphologically closely related but with a dissimilar vector status (*Cx. quinquefasciatus* and *Cx. sitiens*). This accuracy of MALDI-TOF MS in mosquito species identification can also be exploited to circumvent limitations of morphological method in identifying damaged specimens. It also represents an interesting complementary method in mosquito identification, all the more that experts in systematics have decreased resulting from lack of expertise transmission.

In this study, the optimal threshold for mosquito identification which maximized both MALDI-TOF MS sensitivity and specificity using ROC analysis was determined. The higher threshold value was found for *Cx. quinquefasciatus* (i.e. 1.79). The optimal threshold value remained comparable to the results for each species when half of the database was included in the analysis (1.63 vs 1.70). High positive and negative predictive values at these

thresholds show the ability of the MALDI-TOF MS to correctly differentiate mosquito species (Table 2). Based on the results and for optimal identification, the threshold value was rounded to 1.8. The same threshold value as previously stated was therefore attained [17, 19, 24]. At this threshold value, 92% of mosquitoes were correctly identified.

All these findings suggest that MALDI-TOF MS is reliable for mosquito identification. In addition, the comparison of cost and workload requirement between MALDI-TOF MS analysis and molecular identification during experimentation confirmed other authors' findings [22]. In terms of required expenses, MALDI-TOF MS is much cheaper than the molecular technique (about 1 Euro vs 20 Euro per sample in these experiments). Moreover, mosquito species identification by MALDI-TOF MS can be obtained after an eight-hour procedure (starting from protein extraction to obtaining of results), which is significantly shorter than the time needed to perform molecular identification (about one week, starting from DNA extraction to sequence analysis).

This study may suffer from bias and limitations. The first possible limitation of the study is the low number of MSPs for *An. bancroftii* due to their insufficient number in the reference database. In spite of that, high identification scores for six of the seven *An. bancroftii* used for the blind testing were achieved. In the future, other samples should be added to the database to have at least five MSPs.

Secondly, only legs were used for protein extraction during this study. These are more breakable during trapping or storage. As observed during analysis, the use of less than four legs for protein extraction could compromise MALDI-TOF identification. Another study has suggested the use of the thorax, which is not prone to degradation during sampling [24]. The creation of another database using mosquito thoraxes for these species should be undertaken in the future to strengthen MALDI-TOF identification, in case few or no legs are available.

Thirdly, unlike other studies during which several spots per sample was realized with consideration of the highest LSV, one single spot for each sample was deposited in order to assess each parameter individually (trapping duration, preservation methods and duration, number of MSPs required for MALDI-TOF database creation and threshold value determination) without score improvement caused by depositing multiple spots. Consequently, the LSVs obtained are not optimized. Indeed, supplementary experiments showed that the LSVs improved when three spots of each sample were deposited onto the target plate with consideration of the highest scoring spectrum within the triplets (Additional file 6: Figure S6).

However, with one single spot, 92% of these mosquitoes identified showed an identification LSV that was higher than the threshold (1.8) during the blind test analysis. In the future, at least two spots per sample should be deposited, especially when using MALDI-TOF MS to identify newly introduced species.

Fourthly and finally, the optimal threshold was determined using the current MALDI-TOF database. The determination of this threshold score could depend on the richness of species diversity in the database. Adding more species in this database could potentially increase or decrease this threshold value. This value should therefore be revised when more species belonging to the same group become included in analyses.

Conclusions

In conclusion, MALDI-TOF MS is a highly sensitive and highly specific method for mosquito identification in New Caledonia. This emerging identification method is a promising tool in public health for mosquito vector surveillance, allowing both accurate identification of mosquito species vectors in a region and rapid detection of introduced vector species. Other vector mosquito species recorded in the Pacific region including the other *Aedes* members of the *scutellaris* group are not present in this MALDI-TOF MS database. The inclusion of these species in the database is needed for MALDI-TOF to be used as an effective entomological surveillance and risk assessment tool in the Pacific region. Thus, this MALDI-TOF MS database will be able to provide a rapid response to vectors identification/introduction and help public health responses.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04234-8>.

Additional file 1: Figure S1. MALDI-TOF MS spectra of fresh mosquitoes and those harvested from BG-sentinel at each same point.

Additional file 2: Figure S2. MSP dendrogram of all the mosquitoes included in the New Caledonian MALDI-TOF database ($n = 67$).

Additional file 3: Figure S3. ROC to determine the threshold value which maximizes the sensitivity and specificity of MALDI-TOF MS for mosquito species identification.

Additional file 4: Figure S4. Impact of preservation duration on *Ae. aegypti* identification scores.

Additional file 5: Figure S5. Comparison of LSVs of *Ae. aegypti* collected in 2015 and preserved for four years at -80°C ($n = 20$) and LSVs of *Ae. aegypti* collected in 2018 and analyzed no later than five months following sampling ($n = 30$).

Additional file 6: Figure S6. Comparison of log-score values according to number of spots per sample.

Abbreviations

CDC: Center for Diseases, Control and Prevention; cox1: cytochrome c oxidase subunit 1; DNA: deoxyribonucleic acid; ITS2: internal transcribed spacer 2; LSV: log-score value; MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; MSP: main spectrum pattern; PCR: polymerase chain reaction; ROC: receiver operating characteristics.

Acknowledgments

The authors thank Laurent Millet (IRD, Nouméa) for his help on sequence production and analysis.

Authors' contributions

AR, MP, VR, MDR and NP designed the study. AR, MP, SK and JT collected mosquitoes. AR, MP, MK, EB, OOC and JC performed the experiments. AR, MP, AT, VR and NP analyzed the data. AR, MP, AT and NP wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The project leading to this publication received funding from the French Fund for Economic, Social, Cultural and Scientific Cooperation in the Pacific ("Pacific Fund") and the Institut Pasteur of New Caledonia. AR obtained a scholarship from the Institut Pasteur International Network (Bourse Calmette & Yersin).

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files. Raw data are available from the corresponding authors upon reasonable request. Sequences have been deposited in the GenBank database under the accession numbers MN733743-MN733814.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval for the collection of mosquitoes was granted by authorities from the South Province of New Caledonia (ordinance No. 1415-2019/ARR/DENV).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Entomologie Médicale, Nouméa 98845, New Caledonia. ² Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Groupe de Recherche en Bactériologie Expérimentale, Nouméa 98845, New Caledonia. ³ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Dengue et autres Arboviroses, Nouméa 98845, New Caledonia. ⁴ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Epidémiologie, Nouméa 98845, New Caledonia. ⁵ Institut Pasteur, Direction internationale, Paris 75015, France.

Received: 3 March 2020 Accepted: 15 July 2020

Published online: 20 July 2020

References

- WHO. Dengue and severe dengue. Geneva: World Health Organization; 2019. <https://www.who.int/respiratory/dengue/en/>.
- Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. Lancet. 2014;384:1571–2.
- Espinal MA, Andrus JK, Jauregui B, Waterman SH, Morens DM, Santos JI, et al. Emerging and reemerging *Aedes*-transmitted arbovirus infections in the region of the Americas: implications for health policy. Am J Public Health. 2019;109:387–92.
- Inizan C, Tarantola A, O'Connor O, Mangeas M, Pocquet N, Forfait C, et al. Dengue in New Caledonia: knowledge and gaps. Trop Med Infect Dis. 2019;4:95.
- Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. Emerg Infect Dis. 2015;21:381–2.

6. Watson TM, Kay BH. Vector competence of *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) for Ross River virus in Queensland, Australia. J Med Entomol. 1998;35:104–6.
7. Turell MJ, Kay BH. Susceptibility of selected strains of Australian mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Rift Valley fever virus. J Med Entomol. 1998;35:132–5.
8. Richards SL, Anderson SL, Lord CC. Vector competence of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) for West Nile virus isolates from Florida. Trop Med Int Health. 2014;19:610–7.
9. Van Den Hurk AF, Nisbet DJ, Hall RA, Kay BH, Mackenzie JS, Ritchie SA. Vector competence of Australian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for Japanese encephalitis virus. J Med Entomol. 2003;40:82–90.
10. Vytilingam I, Tan SB, Krishnasamy M. Short communication: susceptibility of *Culex sitiens* to Japanese encephalitis virus in peninsular Malaysia. Trop Med Int Health. 2002;7:539–40.
11. Belkin JN. The mosquitoes of the south pacific (Diptera, Culicidae), vol. 1. Los Angeles: University of California Press; 1962. p. 608.
12. Guillaumot L. Arboviruses and their vectors in the Pacific—status reports. Pac Health Dialog. 2005;12:45–52.
13. Guillaumot L, Ofanoa R, Swillen L, Singh N, Bossin HC, Schaffner F. Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in southwestern Pacific countries, with a first report from the Kingdom of Tonga. Parasit Vectors. 2012;5:247.
14. Rapport d'activité -Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Nouvelle-Calédonie; 2016. <http://www.institutpasteur.nc/wp-content/uploads/2016/04/Rapport2016Final.pdf>. Accessed 5 July 2020.
15. Pol M, Kilama S, Duperier S, Soupé-Gilbert ME, Calvez E, Pocquet N. Introduction of the *Anopheles bancroftii* mosquito, a malaria vector, into New Caledonia. Emerg Infect Dis. 2018;24:604–5.
16. WHO. Global Vector Control Response 2017–2030. Geneva: World Health Organization; 2017. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259205>.
17. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. Future Microbiol. 2016;11:549–66.
18. Kent RJ, Deus S, Williams M, Savage HM. Development of a multiplexed polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay to identify common members of the subgenera *Culex* (*Culex*) and *Culex* (*Phenacomyia*) in Guatemala. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:285–91.
19. Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath MO, Sougoufara S, Dehecq JS, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. PLoS ONE. 2013;8:e72380.
20. Müller P, Pflüger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, et al. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. PLoS ONE. 2013;8:e57486.
21. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2010;48:1549–54.
22. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clin Biochem. 2011;44:104–9.
23. Halada P, Hlaváčková K, Risueño J, Berriatua E, Volf P, Dvorak V. Effect of trapping method on species identification of phlebotomine sandflies by MALDI-TOF MS protein. Med Vet Entomol. 2018;32:388–92.
24. Vega-Rúa A, Pages N, Fontaine A, Nuccio C, Hery L, Goindin D, et al. Improvement of mosquito identification by MALDI-TOF MS biotyping using protein signatures from two body parts. Parasit Vectors. 2018;11:574.
25. Nebbak A, El Hamzaoui B, Berenger JM, Bitam I, Raoult D, Almeras L, et al. Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. Med Vet Entomol. 2017;31:438–48.
26. Niare S, Berenger JM, Dieme C, Doumbo O, Raoult D, Parola P, et al. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. Malar J. 2016;15:87.
27. Belkin JN. The mosquitoes of the south pacific (Part B). Los Angeles: University of California Press; 1962. p. 416.
28. Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. Zootaxa. 2004;589:1–60.
29. Lee DJ, Debenham ML. The Culicidae of the Australian region, vol. 4. Canberra: Australian Government; 1987.
30. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 1994;3:294–9.
31. Beebe NW, Maung J, Van Den Hurk AF, Ellis JT, Cooper RD. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and Papua New Guinea. Insect Mol Biol. 2001;10:407–13.
32. Raharimalala FN, Andrianinarivomanana TM, Rakotondrasoa A, Collard JM, Boyer S. Usefulness and accuracy of MALDI-TOF mass spectrometry as a supplementary tool to identify mosquito vector species and to invest in development of international database. Med Vet Entomol. 2017;31:289–98.
33. Feltens R, Gorner R, Kalkhoff S, Groger-Arndt H, von Bergen M. Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. BMC Evol Biol. 2010;10:95.
34. Diarra AZ, Almeras L, Laroche M, Berenger JM, Koné AK, Bocoum Z, et al. Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria in Mali. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005762.
35. Zurita A, Djeghar R, Callejón R, Cutillas C, Parola P, Laroche M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a useful tool for the rapid identification of wild flea vectors preserved in alcohol. Med Vet Entomol. 2019;33:185–94.
36. Yu D, Klein S, Reindl D. An evaluation of silica gel for humidity control in display cases. WAAC Newslett. 2001;23:1–18.
37. Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, et al. Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e2305.
38. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS ONE. 2008;3:e2843.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Chapitre 3

Développement du MALDI-TOF pour l'identification des vecteurs du virus de la dengue à l'échelle régionale et internationale



Photographie d'un *Aedes scutellaris* femelle (Crédit photo : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, M. Pol, 2017)

Chapitre 3 : Développement du MALDI-TOF pour l'identification des vecteurs du virus de la dengue à l'échelle régionale et internationale

III.1. Contexte spécifique de l'étude

Le deuxième chapitre de ce manuscrit a mis en évidence qu'en prenant en compte différents paramètres, le MALDI-TOF permet d'identifier les moustiques Calédoniens dont *Ae. aegypti*. Cette espèce joue un rôle important dans la circulation d'arbovirus sur le territoire Calédonien, mais également dans toute la région Pacifique (Calvez et al., 2016; Inizan et al., 2019). En plus de cette espèce, il existe dans le Pacifique Sud au moins onze autres espèces d'*Aedes*, appartenant toutes au groupe *Scutellaris*, dont le rôle dans la transmission du DENV, du ZIKV et du CHIKV a été établi ou est fortement suspect (Guillaumot, 2005). Ce groupe *Scutellaris* comprend également d'autres espèces dont le rôle dans la transmission de pathogènes est, à l'heure actuelle, inconnu (Belkin, 1962; Lee et al., 1987).

La plupart des espèces du groupe *Scutellaris* ont une répartition fortement localisées (Belkin, 1962; Lee et al., 1987). Pourtant, avec l'intensification des échanges régionaux et internationaux, ces espèces sont susceptibles de se propager dans toute la région Pacifique, voire dans d'autres régions du monde. La surveillance de ces vecteurs est donc essentielle et passe nécessairement par une bonne identification de ces espèces.

Malheureusement, les espèces du groupe *Scutellaris* sont morphologiquement proches et donc difficiles à distinguer avec la technique morphologique (Belkin, 1962; Lee et al., 1987). De plus, les documents permettant l'identification de ces espèces sont souvent anciens (datant du milieu du siècle dernier) ou incomplets (Belkin, 1962; Y. Huang and Hitchcock, 1980; Lee et al., 1987; Marks, 1954; Rueda, 2004). De même, très peu de séquences d'ADN de référence existent pour les espèces de ce groupe, rendant l'identification par séquençage difficile, voire impossible.

Face à ce contexte, le but de cette étude était d'étendre l'utilisation du MALDI-TOF à l'identification de ces vecteurs d'arbovirus à l'échelle internationale. Deux objectifs spécifiques

ont été déterminés qui consistait à : (i) évaluer la capacité de la base de données MALDI-TOF créée à partir des moustiques du Pacifique à identifier les moustiques capturés dans les autres régions du monde et (ii) comparer la performance du MALDI-TOF pour l'identification des *Aedes* du groupe *Scutellaris* à celle du séquençage, qui est considérée aujourd'hui comme la technique de référence.

III.2. Principaux résultats et conclusion

Cette étude a démontré que la base de données MALDI-TOF créés à partir des moustiques de la région Pacifique permettait d'identifier correctement les moustiques de la région, mais aussi ceux d'Asie et d'Afrique. En effet, en utilisant cette base de données, 96% (IC₉₅: 87–99%) des *Cx. quinquefasciatus* et 95% (IC₉₅: 90–98 %) des moustiques du genre *Aedes* ont correctement été identifiés avec des scores d'identification supérieurs ou égales à 1,8. L'ajout de spectres de référence de moustiques d'Asie dans la base de données MALDI-TOF n'a entraîné qu'une légère augmentation des scores d'identification. Ceci démontre que les spectres de références créés à partir des moustiques du Pacifique est suffisant pour identifier les moustiques des autres régions.

Sur l'ensemble des moustiques analysés, seul deux *Aedes pseudoscutellaris* ont été mal classés. L'obtention de ce résultat nous a incité à réviser le seuil d'identification pour les espèces appartenant à ce groupe. Ainsi, un seuil d'identification de 2 a été retenu, ce seuil permet d'identifier 85% des *Aedes* du groupe *Scutellaris* (n = 116).

Les séquences du gène mitochondrial cytochrome oxydase sous-unité 1 (*cox1*) et de l'ADN ribosomal ITS2 (*Internal Transcribed spacer 2*) des *Aedes* du groupe *Scutellaris* ont été utilisées pour réaliser une analyse phylogénétique. Les résultats ont mis en évidence une distance génétique faible entre *Ae. polynesiensis* et *Ae. pseudoscutellaris* en analysant les séquences du gène *cox1*. Cette distance était plus importante lors de l'analyse des séquences ITS2 et en concaténant les séquences des deux gènes. Par ailleurs, aucune distance génétique n'a été observée entre *Ae. malayensis* et *Ae. scutellaris* en analysant les séquences du gène ITS2. Ces

résultats mettent en évidence les limites du séquençage pour identifier les *Aedes* du groupe *Scutellaris*.

Cette étude a permis de démontrer que la spectrométrie de masse MALDI-TOF est un outil permettant une identification à l'échelle régionale et internationale des moustiques vecteurs d'arbovirus. Cet outil permet de distinguer des espèces qui sont morphologiquement et phylogénétiquement proches, et pourrait être utilisé en complément des autres techniques d'identification des moustiques.

III.3. Article 2 : Rakotonirina A., Pol M., Raharimalala FN., Ballan V., Kainiu M., Boyer S., Kilama S, Barsac E, Marcombe S., Russet S., Girod R., Brey P., Colot J., Dupont-Rouzeyrol M, Richard V. and Pocquet N. **MALDI-TOF MS: an effective tool for a global surveillance of dengue vector species.** (in prep).

1 **MALDI-TOF MS: an effective tool for a global surveillance of dengue vector**
2 **species.**

3
4 **Antsa Rakotonirina^{1*}, Morgane Pol¹, Fara Nantenaina Raharimalala², Valentine Ballan¹,**
5 **Malia Kainiu³, Sébastien Boyer⁴, Sosiasi Kilama¹, Sébastien Marcombe⁵, Sylvie Russet¹,**
6 **Emilie Barsac³, Rama Vineshwaran⁶, Romain Girod², Paul T. Brey⁵, Julien Colot³,**
7 **Myrielle Dupont-Rouzeyrol⁷, Vincent Richard⁸, Nicolas Pocquet¹.**

8
9 ¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Entomologie Médicale, Nouméa 98845, New
10 Caledonia

11 ² Institut Pasteur de Madagascar, Unité d'entomologie médicale, 101 Antananarivo,
12 Madagascar

13 ³ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Groupe de Recherche en Bactériologie Expérimentale,
14 Nouméa 98845, New Caledonia

15 ⁴ Institut Pasteur du Cambodge, Medical and Veterinary Entomology Unit, P.O Box 983,
16 Phnom Penh, Cambodia

17 ⁵Institut Pasteur du Laos, Vector Borne Disease Laboratory, P.O Box 3560, Vientiane, Lao
18 PDR

19 ⁶Ministry of health of Fiji, Suva, Fiji

20 ⁷Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Dengue et autres Arboviroses, Nouméa 98845,
21 New Caledonia

22 ⁸Institut Pasteur, Direction internationale, Paris 75015, France

23

24 *Correspondence: arakotonirina@pasteur.nc

25

26

27

28 **Abstract**

29 **Background**

30 Dengue, Zika and chikungunya viruses cause significant human public health burdens in the
31 world. These arboviruses are transmitted by vector mosquito species notably *Aedes aegypti* and
32 *Aedes albopictus*. In the Pacific region, more vector species of arboviruses are present
33 belonging to the *Scutellaris* group which are morphologically very similar. Due to the
34 expansion of human travel and international trade, the threat of their dispersal in other world
35 regions is on the rise. Strengthening of entomological surveillance ensuring rapid detection of
36 introduced vector species is therefore required in order to avoid their establishment and the risk
37 of arbovirus outbreaks. This surveillance relies on accurate species identification. The aim of
38 this study was to assess the use of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-
39 Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) as a tool for an international identification and
40 surveillance of these mosquito vectors of arboviruses.

41 **Methodology/Principal findings**

42 Field-mosquitoes belonging to 8 species (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Aedes polynesiensis*,
43 *Aedes scutellaris*, *Aedes pseudoscutellaris*, *Aedes malayensis*, *Aedes futunae* and *Culex*
44 *quinquefasciatus*) from 6 countries in the Pacific, Asian and African regions, were included in
45 this study. Analysis provided evidence that a MALDI-TOF database created using mosquitoes
46 from the Pacific region allowed suitable identification of mosquito species from the other
47 regions. This technic was as efficient as the DNA sequencing method in identifying mosquito
48 species. Indeed, with the exception of two *Ae. pseudoscutellaris*, an exact species identification
49 was observed for all individual mosquitoes.

50 **Conclusions/Significance**

51 These findings highlight that the MALDI-TOF MS is a promising tool that could be used for a
52 global comprehensive arbovirus vector surveillance.

53

54 **Author summary**

55 Dengue, Zika and chikungunya viruses are transmitted to humans through the bite of
56 mosquitoes belonging to the genus *Aedes*, subgenus *Stegomyia*. The Pacific region hosts several
57 *Aedes* species vectors of these arboviruses. Except for *Aedes aegypti*, all these species belong
58 to the *Scutellaris* group and are morphologically similar. Their morphological identification is
59 therefore difficult and requires expertise in mosquito taxonomy that is often unavailable. Here,
60 we showed the efficiency of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight
61 Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in global identification and surveillance of arbovirus
62 vectors when using mosquito legs. This tool was as performant as the sequencing method,
63 allowing correct distinction of the *Aedes* of the *Scutellaris* group. Therefore MALDI-TOF MS
64 represent an interesting complementary tool in mosquito species identification.

65

66 **Introduction**

67 The past 50 years have seen a dramatic emergence or re-emergence of arboviral diseases [1].
68 Their rapid worldwide spread has raised international concern. For example, chikungunya
69 emerged from Africa in 2004, spread to the Indian Ocean islands and shortly after to Asia,
70 Europe, Americas and the Pacific [2]. This is an acute febrile illness with sudden onset of fever
71 and joint pains, particularly affecting the hands, wrists, ankles and feet [3]. Furthermore Zika
72 fever emerged in the Pacific region and subsequently spread in several countries around the
73 world leading to a massive outbreak in 2015 - 2016, especially in the Americas [4,5]. This

74 disease lead to dramatic consequences in pregnant women causing fetal brain damage and
75 microcephaly [5]. In addition, dengue fever is endemo-epidemic in most intertropical countries,
76 and is responsible of 390 million infections and more than 9000 deaths per year [6,7].

77 These diseases are caused by arboviruses like chikungunya, Zika and dengue viruses (CHIKV,
78 ZIKV and DENV) that are transmitted to humans through the bites of vector mosquitoes,
79 mainly belonging to the genus *Aedes*, subgenus *Stegomyia*. The spread and the establishment
80 of these vector mosquitoes are linked to the increase in urbanization, human travel, international
81 trade and climate change [8–10]. The invasive mosquito *Ae. aegypti* represents one of the best
82 examples of the global spread of vector species. This species is native to Africa and spread into
83 the New World during the slave trade in the 15th century [10]. This, subsequently spread into
84 Asia in the 18th century and into Europe and the Pacific region in the 20th century [10,11].
85 *Aedes albopictus*, native to Southeast Asia, is another widespread vector species. Its first
86 expansion outside Asia was in the late of 1970s [10,11] and was increased during the
87 intercontinental trade in the 20th century [12]. Despite its recent dispersal, this species is
88 currently established in all continents, except Antarctica. These two species (*i.e.*, *Ae. aegypti*
89 and *Ae. albopictus*) are considered are the primary vectors of DENV, ZIKV, CHIKV [13–17]
90 and could also transmit the Yellow fever virus (YFV) [18,19].

91 The Pacific region encompasses a vast area containing more than 20,000 islands. To date, the
92 main *Aedes* vectors of DENV, CHIKV and ZIKV of the Pacific region are *Ae. aegypti*,
93 *Ae. albopictus* [13–17] and *Aedes polynesiensis* [20–22], these last two species belonging to the
94 *Scutellaris* group [23,24]. In addition, at least 9 other *Aedes* species of the *Scutellaris* group
95 present in the region are vectors, or highly suspected to be vectors of DENV such as
96 *Ae. scutellaris* and *Ae. pseudoscutellaris* [23,25]. Seven other species belonging to the
97 *Scutellaris* group are also documented in the Pacific region, but their potential implication in
98 arboviruses transmission has not yet been established [24,26]. Except for *Ae. albopictus* and

99 *Ae. polynesiensis* which are widely distributed, some species of the *Scutellaris* group are often
100 highly localized [24]. For example, *Ae. Futunae* is an endemic species of Futuna island [24].
101 However, globalization increases the risks of vectors dispersal and establishment in other
102 Pacific islands, and in other world regions. This expansion risk highlights the need for improved
103 entomological surveillance. This surveillance relies on accurate mosquito species identification,
104 ensuring rapid detection of vector species introduced and prevention of their establishment
105 through timely and adequate measures.

106 Morphological observations can be used to identify the *Aedes* species members of the
107 *Scutellaris* group [24] (<https://www.wrbu.si.edu/vectorspecies/keys>). However, the distinction
108 of these similar species is very difficult. In addition, dichotomous keys currently used for their
109 morphological identification need to be updated [24,27,28]. Their correct determination can
110 also be compromised for specimens damaged during sampling.

111 DNA sequencing method, considered as the gold standard, is promising to solve taxonomic and
112 identification problems, but remains expensive and time-consuming. In addition, the pre-
113 existing DNA sequence information is also often unavailable for some species of the *Scutellaris*
114 group, making comparison impossible.

115 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-
116 TOF MS) has been more recently used for mosquito species identification [29–31]. This
117 proteomic method generates protein spectra specific for each species [32]. The comparison of
118 these spectra to a MALDI-TOF database composed of reference spectra allows to obtain a log
119 score-value (LSV). This LSV is then compared to a threshold value to supports the accuracy of
120 sample identification [29].

121 This method allowed reliable identification of mosquito species with distinction of specimens
122 within a species complex (*i.e.* morphologically indistinguishable species) [30,33] or from

123 distant geographical areas. As an example, mosquito collected in Africa were species-identified
124 by using a reference database created with mosquitoes collected from La Reunion Island [34].
125 Our recent work has underlined that the trapping duration, preservation condition and number
126 of main spectrum pattern (MSPs) per species for the MALDI-TOF MS database creation must
127 be optimized for mosquito species identification [29].

128 To our best knowledge, no study has investigated the accuracy of the MALDI-TOF MS to
129 identify the major vectors of dengue in the Pacific region including the *Aedes* species members
130 of the *Scutellaris* group. In addition, the accuracy of a MALDI-TOF database created from
131 specimens collected in the Pacific region to identify mosquitoes from other regions has never
132 been evaluated. Therefore, taking into account the parameters previously described for the
133 optimization of mosquito identification with MALDI-TOF MS, the aim of this study was to
134 assess the use of the MALDI-TOF MS in surveillance of arboviruses vector species. For this
135 purpose, our specific objectives were: (i) to assess whether the MALDI-TOF database of the
136 Pacific region could be used to identify mosquitoes collected on a global scale and (ii) to
137 evaluate the performance of this technique compared to the DNA sequencing method in
138 identifying the *Aedes* species members of the *Scutellaris* group.

139

140 **Methods**

141 **Biological material**

142 Adult and larvae mosquitoes used in this study were collected in six countries (Table 1). Three
143 countries (Fiji, Wallis & Futuna, New Caledonia) are located in the Pacific region, two
144 countries (Laos, Cambodia) in Southeast Asia and one country (Madagascar) in the African
145 region. Six mosquito species included in this study are vectors of DENV: *Ae. aegypti*,
146 *Ae. albopictus*, *Ae. malayensis*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. pseudoscutellaris* and *Ae. scutellaris*.

147 *Culex quinquefasciatus*, a cosmopolitan mosquito vector of other arboviruses was also
 148 analyzed. This species was not the focus of this study. It was included in order to test the
 149 MALDI-TOF effectiveness for international-scale identification. Field collections were
 150 undertaken from May 2018 to December 2020 except for *Ae. scutellaris*, collected on March
 151 2016 and used in our previous work which has consisted of optimizing the use of the MALDI-
 152 TOF MS for mosquito species identification [29]. For adult collection, several sampling
 153 methods were used including the BG-sentinel® trap and BG-Gravid® *Aedes* trap (Biogents,
 154 Regensburg, Germany) and CDC light trap with CO₂ (BioQuip, Compton, USA). As suggested
 155 by a previous study, traps were set in the field for a maximum of 24 h [29]. Larvae were
 156 collected in their breeding sites and reared to adults and then kept in -80C freezer for further
 157 analyses. Adults that emerged were harvested and killed. All mosquitoes were preserved on
 158 silica gel and cotton in the field and during the transport from the originating country to New
 159 Caledonia. When arrived in the laboratory, they were preserved at -80°C.
 160

160

161 **Table 1. Mosquitoes collected from each region**

Regions	Countries	Species	No. of mosquitoes used to create database	No. of mosquitoes used in blind testing
Pacific	Fiji	<i>Ae. aegypti</i>	5#	20
		<i>Ae. albopictus*</i>	6#	20
		<i>Ae. pseudoscutellaris*</i>	5#	20
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	5#	16
	Wallis	<i>Ae. aegypti</i>	-	4
		<i>Ae. polynesiensis*</i>	5#	20
		<i>Ae. futunae*</i>	5#	19
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	-	2
	New Caledonia [29]	<i>Ae. scutellaris*</i>	5#	9
		<i>Ae. aegypti</i>	10#	-
Asia	Cambodia	<i>Ae. aegypti</i>	5+	20
		<i>Ae. albopictus*</i>	3+	3
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	5+	19
	Laos	<i>Ae. aegypti</i>	5+	20
	Africa	<i>Ae. albopictus*</i>	5+	5
		<i>Ae. malayensis*</i>	2+	-
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	-	14
Total			71	231

162 * *Aedes* members of the *Scutellaris* group.

163 #Specimens used in the Pacific database.

164 * Specimens added to the Pacific database to generate the global database.

165

166 **Morphological and molecular identification of specimens**

167 Before all experiments, mosquitoes were morphologically identified under stereo microscope
168 using dichotomous identification keys [24,27,28]. Morphological identification was confirmed
169 through double-blind evaluation by two experienced entomologists. All mosquitoes were
170 subsequently dissected and for each specimen, legs were removed and transferred in 1.5 mL
171 Eppendorf tube while the mosquito body was transferred in another tube.

172 Molecular analysis was realized for all the specimens used for the creation of the MALDI-TOF
173 database. Since the species belonging to the *Scutellaris* group are morphologically close, DNA
174 sequencing was also assessed for those used in blind test analysis. For this, DNA was
175 individually extracted from the body of each mosquito using a DNA Blood and Tissue Kit
176 (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction. The extracted DNA
177 was subsequently quantified using a NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer (Thermo
178 Scientific, Wilmington, USA) and amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific
179 primers targeting the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) [35]. Primers targeting the internal
180 transcribed spacer 2 (ITS2) region of the ribosomal RNA gene cluster were also used for the
181 molecular identification of the species members of the *Scutellaris* group [36]. The PCR
182 conditions were: 0.2 μ M forward primer; 0.2 μ M reverse primer; 1x master mix (Qiagen);
183 distilled water; and template DNA (between 10 ng/ μ l and 100 ng/ μ l). The PCR was performed
184 in a total volume of 25 μ l under different thermal conditions according to the primers used. To
185 amplify *cox1*, cycling involved an initial denaturation at 94 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C
186 for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by a final extension step at 72 °C for
187 10 min. To amplify ITS2, the thermal conditions were: 5 min at 95 °C, 35 cycles of 1 min at
188 95 °C, 1 min at 50 °C and 90 s at 72 °C, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

189 PCR Products were revealed on 1.5% agarose gel and those products showing unambiguous
190 bands were processed for sequencing. The sequences obtained (Genoscreen, Lille, France) were
191 assembled with PREGAP and GAP software (version 4.10.2, 2019; The GAP Group, GAP-
192 Groups, Algorithms and Programming, Aachen, Germany) and compared with mosquito
193 sequences available in the GenBank database using the BLAST platform
194 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

195

196 **Phylogenetic Analysis**

197 Phylogenetic analysis was carried out for the *Aedes* species members of the *Scutellaris* group.
198 Mosquitoes belonging to the *Ae. aegypti* species were included in the analysis as outgroup taxa.
199 During the study, a total of 49 *cox1* nucleotide sequences were used in analysis, among which
200 40 *cox1* sequences were generated in the current work and 9 *cox1* sequences were retrieved
201 from the GenBank database. In addition, 49 ITS2 nucleotide sequences were also analyzed
202 including 45 ITS2 sequences generated during this study and 4 ITS2 sequences from the
203 GenBank database. Multiple sequence alignment of these sequences was achieved with Clustal
204 W 1.7 integrated in Bioedit software (version 7.2.5). A maximum likelihood phylogenetic
205 analysis was subsequently assessed using the MEGA software (version 10.1.7). The
206 evolutionary distances were computed using the General Time Reversible methods, defined as
207 the best evolutionary method with MEGA for the *cox1* and the concatenated data sets.
208 Regarding the ITS2 dataset, the Kimura 2-parameter model was used. For all analyses, support
209 for internal nodes was estimated using the nonparametric bootstrap method with 1000
210 replications.

211

212 **Protein extraction for MALDI-TOF analysis**

213 For protein extraction, the protocol used was the same as previously described [29]. To create
214 the reference main spectrum pattern (MSP), 8 spots of the same sample were deposited on the
215 plate. Conversely, each sample intended to be queried against these reference spectra were
216 deposited in duplicate, as suggested by previous work [29]. To control matrix quality (*i.e.*
217 absence of MS peaks due to matrix buffer impurities), the matrix solution was loaded in
218 duplicate onto each MALDI-TOF plate.

219

220 **MALDI-TOF MS parameters and analysis**

221 The setting parameters of the MALDI-TOF were identical to those previously used [29]. Protein
222 mass profiles were obtained using a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker,
223 Wissembourg, France) within a mass range of 2000 – 20,000 Daltons. Each spectrum
224 corresponds to ions obtained from 240 laser shots performed in six regions of the same spot and
225 automatically acquired using the Flex Control software, version 2.4 (Bruker Daltonics).

226 As previously stated, for each reference sample used to create MSP, the 8 replicates were
227 individually measured 3 times in order to obtain 24 spectra [29]. Their MS spectra profiles were
228 firstly visualized using MALDI flexAnalysis software, version 3.3 (Bruker Daltonics) to control
229 MS spectra reproducibility. Then, a selection of 20-24 high quality spectra per sample were
230 imported into the MALDI Biotype compass software, version 3.1 (Bruker Daltonics) and used
231 to create the MSP.

232 Conversely, one measurement per spot was realized for the sample used during the blind testing.
233 The mass spectrum obtained was compared to the MSPs with the MALDI Biotype compass
234 software. This software calculates a log-score value (LSV) ranging from zero to three, reflecting
235 the similarity between sample spectra and MSP. The Biotype software showed the 10-best
236 matching MSPs in an identification ranking list ordered according to the LSVs of each

237 identification. For each sample analysis, the highest scoring spectrum was considered within
238 the duplicate. According to the manual user of the MALDI Biotyper compass software, when
239 two best matching MSPs belonged to two different species, the result was considered doubtful.

240

241 **Creation and validation of Pacific and Asian MALDI-TOF MS database**

242 Main spectrum pattern created during our previous work, consisting of 10 *Ae. aegypti*-MSPs
243 and 5 *Ae. scutellaris* MSPs from New Caledonia were used [29]. Other MSPs were also created
244 during this current study. These were created from 31 mosquitoes belonging to 6 species
245 collected from other Pacific islands (Fiji and Wallis). All these MSPs formed the Pacific region
246 database. In a second step, 25 other MSPs were created from Asian mosquitoes belonging to 4
247 species (Table 1). These formed the Asian region database. According to previous work, at least
248 5 MSPs per species were created [29]. Cluster analyses (MSP dendrogram) based on
249 comparison of the MSPs were performed for the *Aedes* members of the *Scutellaris* group.

250 Spectra of 222 mosquitoes from the Pacific, Asia and Africa regions were tested against the
251 MALDI-TOF database. The spectra of 9 *Ae. scutellaris* collected from New Caledonia were
252 also included during the blind test analysis.

253

254 **Revision of the threshold value for the *Scutellaris* group**

255 During this study, analyses were also carried out in order to determine the threshold value that
256 allows correct differentiation between mosquito species belonging to the *Scutellaris* group. For
257 this, field specimens including *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. scutellaris*,
258 *Ae. pseudoscutellaris* and *Ae. futunae* were used. In order to test the MALDI-TOF accuracy
259 when the MSPs of the species is not represented in the database, all mosquitoes belonging to

260 these 5 species were first blinded queried against the MSPs for each species individually. These
261 were also queried against MSP for a random selection of 3 species on the one hand, and of the
262 other 2 species on the other hand. For these analyses, sensitivity (Se) and specificity (Sp) were
263 computed as the rates of correctly classified spectra in the positive and negative labelled classes,
264 respectively. These were calculated at various threshold values, ranging from 0 to 3. The
265 positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and classification accuracy
266 were also determined. The Receiver Operating Characteristics (ROC) curve was established.
267 For this, Area Under Curve (AUC) values were evaluated to assess the discrimination of the
268 MALDI-TOF MS analysis compared with the reference technique (*i.e.* DNA sequencing).

269

270 **Statistical analysis**

271 Data were analyzed using R software (R Core Team (2017). R: A language and environment
272 for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A non-
273 parametric Wilcoxon test was carried out to compare LSV medians. Results with a two-sided
274 p-value ≤ 0.05 were scored as being significant. The ROC analysis and graphs were also
275 developed with R software.

276

277 **Results**

278 **Morphological identification and molecular validation**

279 The mosquitoes used in this study were classified morphologically into 8 distinct species:
280 *Ae. aegypti* (n = 79), *Ae. albopictus* (n = 62), *Ae. polynesiensis* (n = 25), *Ae. pseudoscutellaris*
281 (n = 25), *Ae. malayensis* (n = 2), *Ae. scutellaris* (n=14), *Ae. futunae* (n = 24) and
282 *Cx. quinquefasciatus* (n = 61). Six of these species belonged to the *Scutellaris* group:

283 *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. pseudoscutellaris*, *Ae. malayensis*, *Ae. scutellaris* and
284 *Ae. futunae*.

285 DNA sequencing was carried out in order to validate the morphological identification. A total
286 of 266 sequences were generated (GenBank accession numbers: MW662168 to MW662252
287 and MW664678 to MW664858). The query of *cox1* gene and ITS2 sequences against the
288 GenBank database allowed to obtain reliable mosquito species identification for all the
289 mosquito species of which reference sequences were available (Table 2). No *cox1* sequences
290 were available for *Ae. polynesiensis*, *Ae. pseudoscutellaris* and *Ae. futunae* in the GenBank
291 database. No ITS2 sequences were also available for *Ae. scutellaris*, *Ae. malayensis* and
292 *Ae. futunae*.

293

294 **Table 2. Overview of mosquito identification by *cox1* and ITS2 molecular typing**

Morphological identification	Species identified via GenBank database	Range of <i>cox1</i> sequence similarity (%)	Range of ITS2 sequence similarity (%)
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. aegypti</i>	99 – 100	98 – 100
<i>Ae. albopictus</i>	<i>Ae. albopictus</i>	99 – 100	98 – 99
<i>Ae. scutellaris</i>	<i>Ae. scutellaris</i>	99	na
<i>Ae. malayensis</i>	<i>Ae. malayensis</i>	100	na
<i>Ae. polynesiensis</i>	<i>Ae. polynesiensis</i>	na	99
<i>Ae. pseudoscutellaris</i>	<i>Ae. pseudoscutellaris</i>	na	99 – 100
<i>Ae. futunae</i>	na	na	na
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	98 – 100	na

295 Abbreviation: na: not available; *cox1*: cytochrome c oxidase subunit 1; ITS2: internal transcribed spacer 2.

296

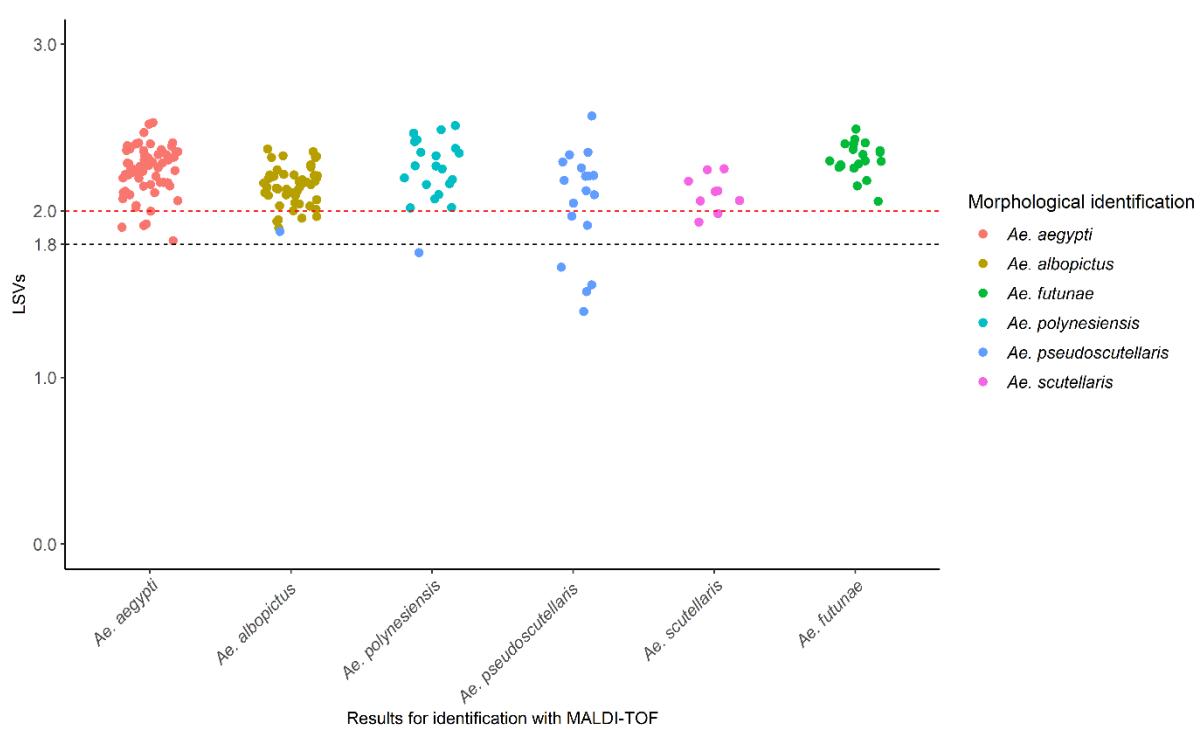
297 **Accuracy of the MALDI-TOF Pacific region database for mosquito species identification**

298 The spectra of 231 mosquitoes collected from the 3 regions were firstly queried against the
299 Pacific region database created during this study. The result showed reliable identification for
300 96% (95% CI: 87–99%) of *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes with LSVs greater than or equal
301 to the threshold of 1.8 retained for mosquito species identification [29,30]. In addition, 95%

302 (95% CI: 90–98 %) of *Aedes* mosquitoes were also correctly identified with LSVs greater than
303 or equal to the 1.8 (Fig. 1). For all these mosquitoes, the top two matching MSPs belonged to
304 the same mosquito species.

305 Two *Ae. pseudoscutellaris* were not correctly identified. These were identified as
306 *Ae. polynesiensis* (LSV = 1.75) and *Ae. albopictus* (LSV = 1.88), respectively (Fig 1). However,
307 their top two matching MSPs belonged to two different mosquito species. In addition, four
308 *Aedes* of the *Scutellaris* group also showed a discordance between the species of their top two
309 matching MSPs.

310



311

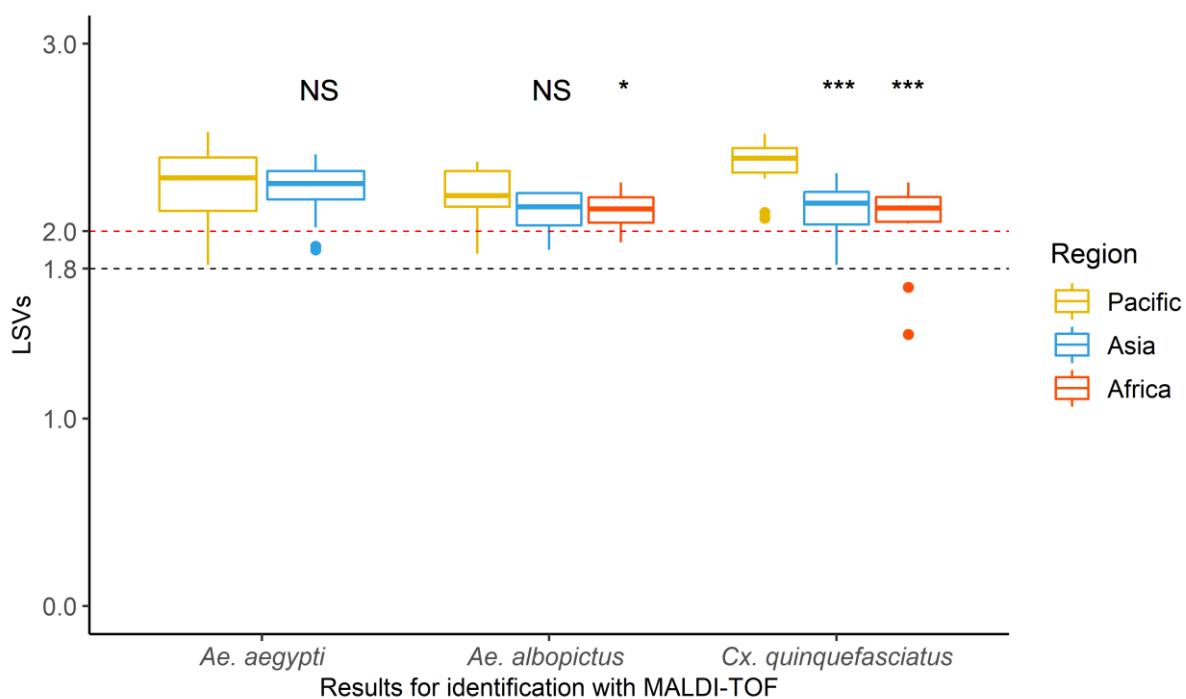
312 **Fig 1. Comparison of the results obtained with morphological identification and**
313 **MALDI-TOF analysis for the *Aedes* species.** X-axis corresponds to the results obtained with
314 MALDI-TOF analysis. Y-axis corresponds to Log-score values (LSVs). Colors illustrate
315 morphological identification obtained through double-blind evaluation and confirmed with
316 DNA sequencing for the *Aedes* of the *Scutellaris* group. Black dashed-line corresponds to the
317 threshold value for mosquito species identification, stated during previous study [29]. Red

318 dashed-line corresponds to the threshold value for the identification of mosquito species
319 belonging to the *Scutellaris* group.

320

321 A second analysis was performed in order to compare LSVs obtained for the Pacific mosquitoes
322 to those collected from the Asian and African regions when using Pacific region database. Three
323 cosmopolitan species *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Cx. quinquefasciatus* were used (Fig 2).
324 The result showed high LSVs for all the mosquitoes analyzed. Although the significant
325 difference between LSVs median of *Ae. albopictus* from the Pacific islands and those from
326 Madagascar (2.13 and 2.12, respectively; Wilcoxon test, p-value = 0.01), high LSV median
327 were obtained. A significant difference was also observed between *Cx. quinquefasciatus* from
328 the Pacific and Asian regions (2.39 and 2.15, respectively; Wilcoxon test, p-value = 6.3×10^{-6})
329 and between those from the Pacific and African regions (2.39 and 2.12, respectively; Wilcoxon
330 test, p-value = 4.4×10^{-5}). However, LSVs median remained above 2 (Fig 2).

331



332

333 **Fig 2. Scores of mosquitoes collected from the three regions when using the Pacific region**
334 **MALDI-TOF database.** Three mosquito species were analyzed: *Aedes aegypti*, *Aedes*
335 *albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. Colors illustrate the region of collection. Each boxplot
336 consists of 9 to 40 LSVs per species and region. Black dashed-line corresponds to the threshold
337 value for mosquito species identification, stated during previous study [29]. Red dashed-line
338 corresponds to the threshold value for the identification of mosquito species belonging to the
339 *Scutellaris* group. Wilcoxon test, *p-value < 0.05, ***p-value < 0.001. Abbreviation: NS, not
340 significant.

341

342 The results also showed a slight increase of LSVs medians for *Ae. aegypti* (from 2.26 to 2.3,
343 Wilcoxon test, p-value = 0.009) and *Cx. quinquefasciatus* (from 2.2 to 2.24, Wilcoxon test, p-
344 value = 0.04) when they were compared with the global database including Pacific and Asian
345 MSPs (S1 Fig). Conversely, no significant difference was observed between the LSVs median
346 of *Ae. albopictus* regardless of the MSPs included in analysis (Wilcoxon test, p-value = 0.63).

347

348 **Threshold value for the mosquito species belonging to the *Scutellaris* group**

349 Other analyses were performed on species belonging to the *Scutellaris* group, in order to test
350 the accuracy of the threshold value of 1.8, set during previous studies. The optimal threshold
351 values which maximized the MALDI-TOF MS sensitivity and specificity ranged from 1.87 to
352 2.01 when only one species was included in the MALDI-TOF database (Table 3). High PPV
353 and NPV at these thresholds was obtained, except when only *Ae. pseudoscutellaris* MPSs were
354 used. Indeed, for this species, at a threshold-value of 1.87, PPV of 0.38 was obtained, with 24
355 false-positive specimens (Table 3). Among these false-positives, 15 were *Ae. polynesiensis*
356 mosquitoes and 9 were *Ae. albopictus* mosquitoes.

357 When approximately half the species of the *Scutellaris* group were used in the database, the
358 optimal threshold value was 1.99 (*i.e.* approximately 2). PPV ranging from 0.76 to 0.97, NPV

359 ranging from 0.68 to 0.9 and AUC values ranging from 0.88 to 0.98 were also observed (Table
360 3; S2 Fig; S3 Fig).

361

362 **Table 3. Overview of results obtained during the determination of the optimal threshold**
363 **for *Aedes* of the *Scutellaris* group identification with MALDI-TOF MS.**

364

Species in the database	Optimal threshold	TP	FN	TN	FP	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	AUC	CI ₉₅ (AUC)
<i>Ae. scutellaris</i>	1.92	9	0	107	0	1	1	1	1	1	[1-1]
<i>Ae. albopictus</i>	1.94	46	2	62	6	0.94	0.94	0.88	0.97	0.99	[0.97-1]
<i>Ae. polynesiensis</i>	2.01	20	0	94	2	1	0.98	0.91	1	0.99	[0.97-1]
<i>Ae. pseudoscutellaris</i>	1.87	15	5	72	24	0.7	0.75	0.38	0.93	0.77	[0.65-0.90]
<i>Ae. futunae</i>	1.93	19	0	97	0	1	1	1	1	1	[1-1]
3 species ⁽¹⁾	1.99	39	9	56	12	0.82	0.82	0.76	0.68	0.88	[0.81-0.96]
2 species ⁽²⁾	1.99	63	5	46	2	0.93	0.96	0.97	0.90	0.98	[0.95-1]

365 ⁽¹⁾ *Ae. scutellaris*, *Ae. pseudoscutellaris* and *Ae. futunae*.

366 ⁽²⁾ *Ae. polynesiensis* and *Ae. albopictus*.

367 Abbreviations: AUC, area under the curve; TP, true positives; FN, false negatives; TN, true negatives; FP, false
368 positives; PPV, positive predictive values; NPV, negative predictive values. CI₉₅, Confidence Intervals at 95%.

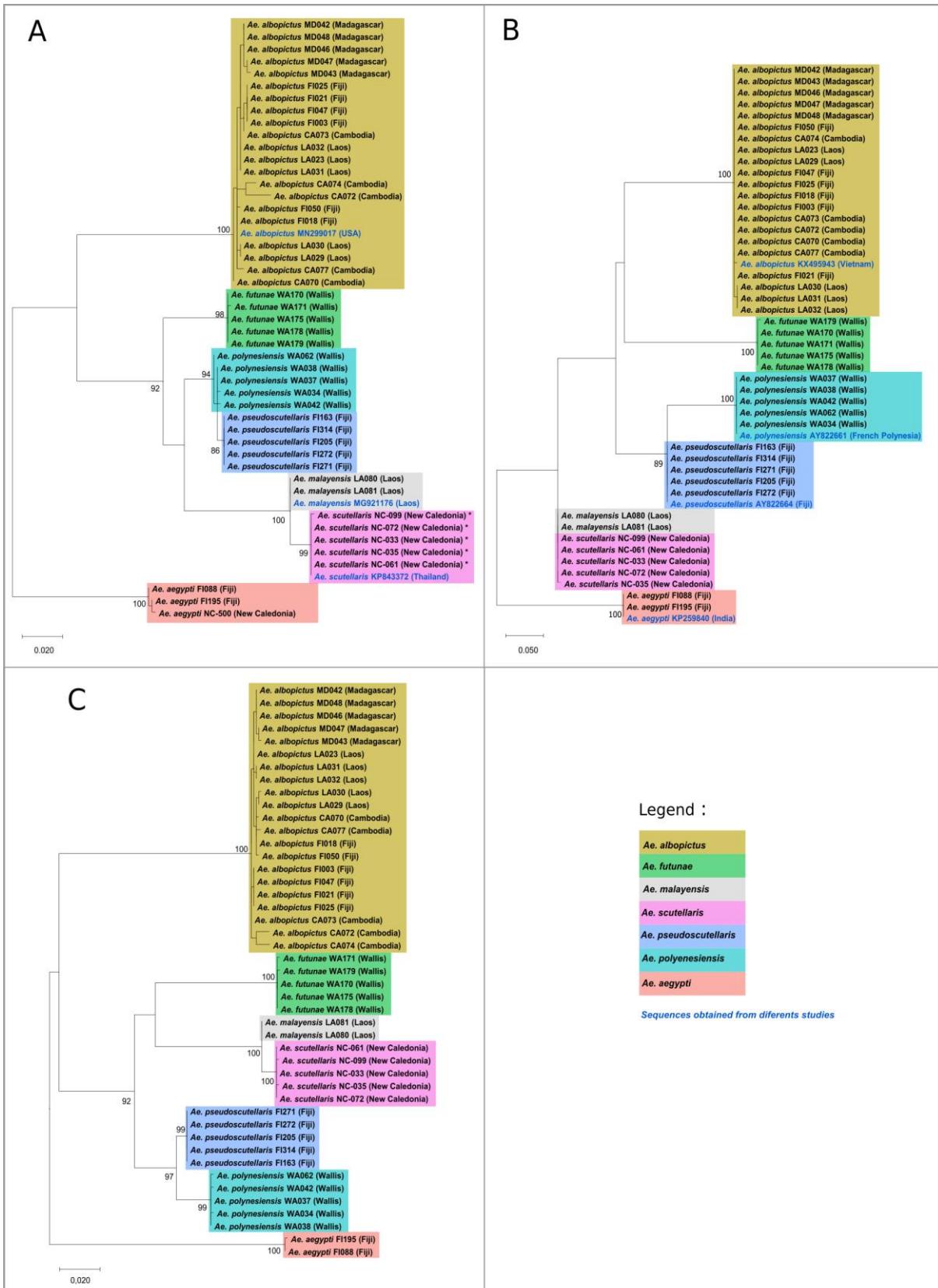
369

370

371 Phylogenetic analysis of *Aedes* members of the *Scutellaris* group

372 The *cox1* and ITS2 sequences of 616 and 234 nucleotides respectively obtained from the *Aedes*
373 of the *Scutellaris* group was aligned. The aligned and concatenated sequences from *cox1* and
374 ITS2 resulted in a block of 850 nucleotides. The result showed that *Ae. albopictus* formed a
375 well-supported monophyletic group, with 100% of bootstrap value (Figs 3A, 3B and 3C), but
376 without evidence for a distinction between geographic origin, regardless of the sequence used
377 in the analysis (*i.e.*, *cox1*, ITS2 and the concatenated sequences). Analysis based on the *cox1*
378 gene alone indicated few difference (*i.e.*, three substitutions) between sequences of
379 *Ae. polynesiensis* collected in Wallis and *Ae. pseudoscutellaris* collected in Fiji, resulting in a

380 short evolutionary distance (Fig 3A). The evolutionary distance between these two species
381 were, however, much greater when using the ITS2 and concatenated sequences (Fig 3B and
382 3C). No evolutionary distance was observed between *Ae. malayensis* and *Ae. scutellaris*, when
383 analyzing the ITS2 sequence (Fig 3B). Finally, the sister clade of *Ae. futunae* changed
384 according to nucleotide sequences analyzed (Fig 3A, 3B and 3C). However, this species formed
385 a single well-supported monophyletic group (*i.e.*, bootstrap value ≥ 98).



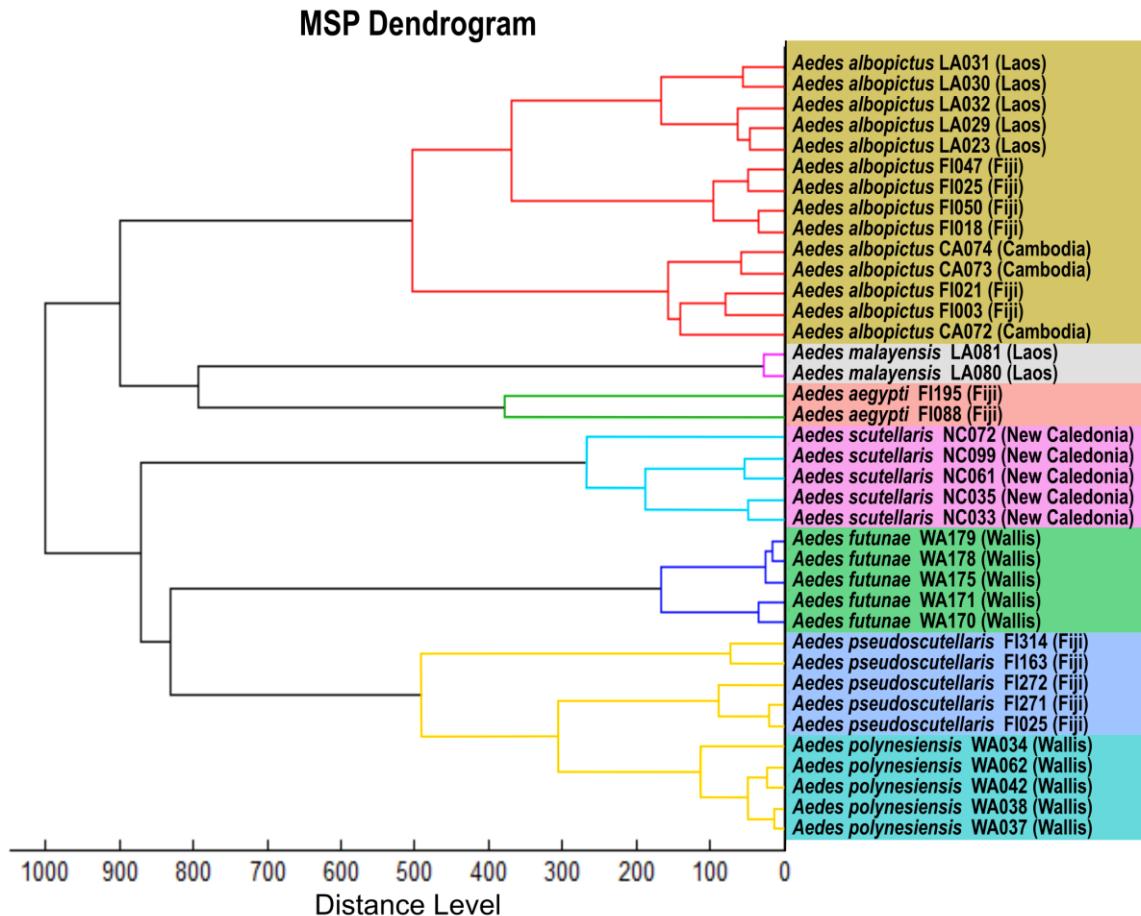
387 **Fig 3. Maximum likelihood evolutionary (MLE) relationships of mosquito species of the**
 388 ***Scutellaris* group.** A - Maximum likelihood tree derived from 49 *cox1* nucleotide sequences.
 389 Forty sequences generated during the current study (in black), 6 sequences generated during

390 our previous study and deposited in the GenBank database (in black) [29] and 3 sequences
391 retrieved from the GenBank database (in blue). B - Maximum likelihood tree derived from 49
392 ITS2 nucleotide sequences. Forty-five sequences were generated during this study (in black)
393 and 4 sequences were retrieved from the GenBank database (in blue). C - Maximum likelihood
394 tree derived from 45 concatenated sequences. For all analyses, the percentage of replicate trees
395 in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown
396 for values over 80. The country of collection is indicated along with the specimen number.
397 Colors indicate mosquito species.

398

399 A dendrogram was also created according to the protein mass profiles of the *Aedes* members of
400 the *Scutellaris* group. Specimens from the same species were clustered on the same branch and
401 no species were intertwining with the exception of *Ae. polynesiensis* and *Ae. pseudoscutellaris*
402 (Fig 4). Unlike for phylogenetic tree, much greater distances were observed between
403 *Ae. malayensis* and *Ae. scutellaris*.

404



405

406 **Fig 4. MSP dendrogram of all the mosquitoes belonging to the *Scutellaris* group in the**
 407 **MALDI-TOF database.** The two *Aedes aegypti* was used as outgroup taxa. Colors indicate
 408 mosquito species.

409

410 Discussion

411 In this study, 7 mosquito species from 3 islands in the Pacific region were initially used to create
 412 the MALDI-TOF database. The collected mosquitoes from the three regions showed that the
 413 Pacific region database allowed the species identification of all the specimens analyzed from
 414 Fiji, Wallis & Futuna (Pacific region), Cambodia, Laos (Asian region) and Madagascar
 415 (African region). Likewise, the difference of sampling sites between the mosquitoes used to

416 create the database and those to be identified did not alter the accuracy of the MALDI-TOF for
417 species identification [34]. In contrast, leg spectra heterogeneity for *Anopheles gambiae*
418 according to their geographical origins lead to high proportions of incorrect identifications
419 when using a database without specimens from the same field collection [37]. Their results
420 might have been impacted by the preservation method and duration of some specimens [37].
421 Indeed, mosquito preservation is one of the important parameters needed to be considered for
422 a successful species identification [29]. But, while considering optimized recommendations
423 (*i.e.*, the trapping duration, the preservation method and the number of MSPs per species in the
424 database), MALDI-TOF MS is an efficient technique for the identification of mosquitoes
425 collected from distant geographical regions.

426 In a second step, other MSPs were created using mosquito species from Asia including
427 *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Cx. quinquefasciatus*. During this analysis, a slight
428 improvement of LSVs was found for *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* collected from Asia.
429 This finding suggests that the addition in the database of specimens of the same origin may
430 improve the identification result. A significant increase of LSVs was also found during a
431 previous studies, when the database was upgraded with MSPs created from specimens of the
432 same origin as the specimens to be tested [37]. In our case, however, high LSV medians were
433 observed even when only MSPs from the mosquitoes collected in the Pacific region were used.
434 Therefore, the MALDI-TOF database of the Pacific region could be sufficient to identify
435 mosquito species from other regions.

436 During the analysis, *Ae. futunae* has been successfully distinguished from other species of
437 group which are vectors of arboviruses. In addition, no mismatch was observed for all the *Aedes*
438 species of the *Scutellaris* group, except for two *Ae. pseudoscutellaris*. These were misidentified
439 as *Ae. polynesiensis* and *Ae. albopictus*, respectively. Some mismatches were also found for
440 mosquitoes within a species complex during previous studies [33,37]. In our case, for these two

misidentified mosquitoes, the top two matching MSPs belonged to two different species of the *Scutellaris* group. Likewise, four other *Aedes* of the *Scutellaris* group (*i.e.*, three *Ae. pseudoscutellaris* and one *Ae. polynesiensis*) showed mismatches between their top two corresponding MSPs species. These findings highlighted a possible proximity of protein profiling for the *Aedes* of the *Scutellaris* group. The concordance between species of the top two matching MSPs could be a parameter to be check for precise species identification, as it is the case for identification of bacterial species in medical diagnosis. Thus, these mosquitoes were considered as not identified by the MALDI-TOF MS software.

These observations prompted us to revise the threshold value for the accuracy of the *Scutellaris* group identification. The result showed an optimal threshold value greater than that determined during previous studies [29,30] regardless of MSPs used during analysis. As previously supposed, the threshold value of 1.8 could depend on the richness of mosquito species diversity in the MALDI-TOF database [29]. The result of this current study suggests that, for a secure identification score, a threshold value of 2 should be retained for the *Aedes* of the *Scutellaris* group. During this revision of the threshold value, high PPV and NPV were obtained regardless the analysis, except when only *Ae. pseudoscutellaris* MSPs were present in the database. This low PPV obtained was due to the high number of false-positive specimens; the majority of which were *Ae. polynesiensis* mosquitoes. This finding demonstrates that the spectra of the *Aedes* of the *Scutellaris* group could have similarities, especially those of *Ae. pseudoscutellaris* and *Ae. polynesiensis*.

All the *Aedes* of the *Scutellaris* group included in this study were sequenced using *cox1* and *ITS2* primers. The first *cox1* sequences of *Ae. polynesiensis*, *Ae. pseudoscutellaris* and *Ae. futunae* and the first *ITS2* sequences of *Ae. scutellaris*, *Ae. malayensis* and *Ae. futunae* were presented in this work. Phylogenetic analysis was subsequently assessed for the specimens used to create MSPs. Few sequence differences were observed between *Ae. polynesiensis* and

466 *Ae. pseudoscutellaris* when using the *cox1* gene. Controversial hypotheses are known
467 concerning the taxonomic status of these two species. Due to the absence of reproductive barrier
468 under experimental conditions, some authors have suggested that *Ae. polynesiensis* and
469 *Ae. pseudoscutellaris* formed an unique species [38]. Other author has suggested that these are
470 two distinct species recently separated [24]. In all cases, however, our result showed that the
471 *cox1*-based DNA barcoding, widely used for mosquito species identification, is not sufficient
472 to distinguish *Ae. polynesiensis* to *Ae. pseudoscutellaris*. In contrast, the analysis of the ITS2
473 sequence allowed a distinction between these two species. Likewise, a previous study showed
474 an important difference between these two species when using the ITS2 sequence [36].

475 During analysis, the results also indicated that *Ae. scutellaris* was phylogenetically closely
476 related to *Ae. malayensis* with no phylogenetic distance when analyzing the ITS2 sequence. No
477 phylogenetic distance was found between *Ae. scutellaris* and some species of the *Scutellaris*
478 group when using 16S ribosomal RNA and 28S ribosomal RNA genes during previous work
479 [39]. These findings demonstrated that although the increasing of the use of DNA sequencing
480 in mosquito surveillance programs, this technique shows some limitations regarding the
481 distinction between species of the *Scutellaris* group. The MALDI-TOF MS represents,
482 therefore, an interesting complementary tool in identification of mosquito species of the
483 *Scutellaris* group.

484 In the dendrogram obtained with MALDI-TOF MS, each species of the *Scutellaris* group
485 clustered together, except for *Ae. polynesiensis* and *Ae. pseudoscutellaris*. Indeed, the
486 separation was not clear for these two species in the MSP dendrogram. Nevertheless, all
487 mosquitoes belonging to these two species were correctly distinguished during the blind test
488 analysis, except for two *Ae. pseudoscutellaris*. Moreover, unlike for the phylogenetic trees, high
489 distance level was observed between *Ae. malayensis* and *Ae. scutellaris*. Some authors have
490 also found this discordance between results obtained with MSP dendograms and phylogenetic

491 trees for *Anopheles* species from French Guiana and Australian mosquito species [40,41]. These
492 observations confirmed other authors' finding that MALDI-TOF MS cannot yet be used for
493 phylogenetic analyses [40].

494 This study may suffer from biases and limitations. First, only 6 *Aedes* species of the *Scutellaris*
495 group were included in this database. However, about 40 species is currently classified in this
496 group with at least 12 species vectors of DENV [23,24,26,42]. In the future, the other species
497 of the *Scutellaris* group must therefore be added to this database.

498 Secondly, only 2 MSPs were created for *Ae. malayensis*, a species vector of DENV and CHIKV
499 [42], due to the insufficient number of specimen available. In addition, no mosquito belonging
500 to this species was used for blind testing. As observed during previous study, at least 5 MSPs
501 per species is required to optimize a MALDI-TOF database. Other *Ae. malayensis* should be
502 added to the database and queried against MSPs.

503

504 Conclusion

505 The MALDI-TOF MS provides an accurate and international-scale identification of mosquitoes
506 even for morphologically and phylogenetically closely related species. Therefore, it can be used
507 to reinforce the sequencing method for a rapid identification of introduced vector species,
508 allowing rapid intervention of public health authorities. The inclusion of other vector mosquito
509 species in this database is needed to use the MALDI-TOF MS as an effective method for global
510 surveillance. In addition, the creation of a MALDI-TOF database platform is required for a
511 collection and sharing of mosquito species spectra, especially for the neglected potentially
512 invasive species like some *Aedes* of the *Scutellaris* group. Finally, the assessment of the
513 taxonomic status of these *Aedes* belonging to the *Scutellaris* group, using a phylogenetic
514 approach based on multiple genes is also necessary.

515

516 **Acknowledgements**

517 The authors thank to Fidelis Maminirina Ambinintsoa, Etienne Tata and Haja Johnson
518 Velonirina, technicians at Institut Pasteur of Madagascar (Medical Entomology Unit), to Eliuti
519 Gahetau, Setefana Fomeku, Vincent Jessop and Kalemeli Selemago of the Agence de Santé de
520 Wallis & Futuna (ADSWF) and to Cyrille Goarant of Institut Pasteur of New Caledonia for
521 help during mosquito collection.

522

523 **Funding**

524 The project leading to this publication received funding from the French Fund for Economic,
525 Social, Cultural and Scientific Cooperation in the Pacific (“Pacific Fund”) and the Institut
526 Pasteur of New Caledonia. AR obtained a scholarship from the Institut Pasteur International
527 Network (Bourse Calmette & Yersin).

528

529 **Author contributions**

530 AR, VR, MDR and NP designed the study. AR, MP, FNR, SK, RV and NP collected
531 mosquitoes. SB, SM, RG and PB provided specimens. AR, MP, VB, MK, SR, EB, and JC
532 performed the experiments. AR and NP analyzed the data. AR wrote the original draft. All
533 authors read and approved the final manuscript.

534

535 **References**

536 1. Wilder-Smith, A., Gubler, DJ., Weaver, SC., Monath, TP., Heymann, DL., Scott, TW.

- 537 2016. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect*
538 Dis [Internet]. : pp 1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/S1473->
539 3099(16)30518-7
- 540 2. Coffey, LL., Failloux, A., Weaver, SC. 2014. Chikungunya virus–vector interactions.
541 *Viruses.* 6: pp 4628–63.
- 542 3. OMS. 2020. Chikungunya [Internet]. 2020. Available from:
543 <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
- 544 4. Cao-Lormeau, V-M., Musso, D. 2014. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*
545 [Internet]. 384: pp 1571–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140->
546 6736(14)61977-2
- 547 5. Chang, C., Ortiz, K., Ansari, A., Gershwin, ME. 2016. The Zika outbreak of the 21st
548 century. *J Autoimmun* [Internet]. 68: pp 1–13. Available from:
549 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>
- 550 6. WHO. 2020. Dengue and severe dengue. 2020.
- 551 7. WHO. 2017. Global Vector Control Response 2017 - 2030. 2017. 51 p.
- 552 8. Tatem, AJ., Hay, SI., Rogers, DJ. 2006. Global traffic and disease vector dispersal. *Proc*
553 *Natl Acad Sci U S A.* 103(16): pp 6242–7.
- 554 9. Caminade, C., Medlock, JM., Ducheyne, E., McIntyre, KM., Leach, S., Baylis, M.,
555 Morse, AP. 2012. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes*
556 *albopictus*: Recent trends and future scenarios. *J R Soc Interface.* 9: pp 2708–17.
- 557 10. Duvallet, G., Fontenille, D., Robert, V. 2017. Entomologie médicale et vétérinaire. IRD
558 Edition. Marseille, Versailles; 2017. 687 p.

- 559 11. Lwande, OW., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J., Bucht,
560 G. 2020. Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus
561 Pandemics. Vector-Borne Zoonotic Dis. 20(2): pp 71–81.
- 562 12. Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., Fontenille, D. 2009. *Aedes albopictus*, an
563 arbovirus vector: From the darkness to the light. Microbes Infect [Internet]. 11: pp 1177–
564 85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- 565 13. Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thibierge,
566 J-M., Baroux, N., Gourinat, A-C., Grandadam, M., Failloux, A-B. 2012. Chikungunya
567 Virus and the Mosquito Vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region).
568 Vector-Borne Zoonotic Dis [Internet]. 12(12): pp 1036–41. Available from:
569 <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2011.0937>
- 570 14. Calvez, E., Guillaumot, L., Girault, D., Richard, V., O'Connor, O., Paoaafaite, T.,
571 Teurlai, M., Pocquet, N., Cao-Lormeau, VM., Dupont-Rouzeyrol, M. 2017. Dengue-1
572 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from
573 New Caledonia. Parasit Vectors. 10(381): pp 1–8.
- 574 15. Fernandes, RS., Connor, OO., Bersot, MIL., Girault, D., Dokunengo, MR., Pocquet, N.,
575 Dupont-rouzeyrol, M., Lourenço-de-oliveira, R. 2020. Vector Competence of *Aedes*
576 *aegypti* , *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia
577 for Three Zika Virus Lineages. Pathogens. 9(575): pp 1–17.
- 578 16. Vega-Rua, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A-B., Lourenco-de-Oliveira, R. 2014.
579 High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten
580 American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. J Virol.
581 88(11): pp 6294–306.
- 582 17. Kamgang, B., Vazeille, M., Tedjou, AN., Wilson-Bahun, TA., Yougang, AP., Mousson,

- 583 L., Wondji, CS., Failloux, AB. 2019. Risk of dengue in central africa: Vector competence
584 studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) populations and
585 dengue 2 virus. PLoS Negl Trop Dis. 13(12): pp 1–12.
- 586 18. Amraoui, F., Vazeille, M., Failloux, A. 2016. French *Aedes albopictus* are able to
587 transmit yellow fever virus Experimental infection of mosquitoes. Euro Surveill
588 [Internet]. 21(39): pp 1–3. Available from: www.eurosurveillance.org
- 589 19. Lataillade, L de G de., Vazeille, M., Obadia, T., Madec, Y., Mousson, L., Kamgang, B.,
590 Chen, CH., Failloux, A-B., Yen, PS. 2020. Risk of yellow fever virus transmission in the
591 Asia-Pacific region. Nat Commun [Internet]. 11(5801): pp 1–10. Available from:
592 <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19625-9>
- 593 20. Calvez, E., Pocquet, N., Malau, A., Kilama, S., Taugamoa, A., Labrousse, D., Boussès,
594 P., Failloux, AB., Dupont-Rouzeyrol, M., Mathieu-Daudéid, F. 2020. Assessing
595 entomological risk factors for arboviral disease transmission in the French Territory of
596 the Wallis and Futuna Islands. PLoS Negl Trop Dis. 14(5): pp 1–16.
- 597 21. Calvez, E., Mousson, L., Vazeille, M., O'Connor, O., Cao-Lormeau, V-M., Mathieu-
598 Daudé, F., Pocquet, N., Failloux, A-B., Dupont-Rouzeyrol, M. 2018. Zika virus outbreak
599 in the Pacific: Vector competence of regional vectors. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. :
600 pp 1–12. Available from:
601 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30016372%0Ahttp://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006637>
- 603 22. Richard, V., Cao-Lormeau, VM. 2019. Mosquito vectors of arboviruses in French
604 Polynesia. New Microbes New Infect [Internet]. 31(100569): pp 1–5. Available from:
605 <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100569>
- 606 23. Guillaumot, L. 2005. Arbovirus and their vectors in Pacific-Status report. Pacific Heal

- 607 Surveill Response. 12(2): pp 45–52.
- 608 24. Belkin, JN. 1962. The mosquitoes of the south pacific (Part B). Los Angeles: University
609 of California Press; 1962. 416 p.
- 610 25. Moore, PR., Johnson, PH., Smith, GA., Ritchie, SA., Van Den Hurk, AF. 2007. Infection
611 and dissemination of dengue virus type 2 in *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes*
612 *scutellaris* from the Torres Strait, Australia. J Am Mosq Control Assoc. 23(4): pp 383–
613 8.
- 614 26. Harbach, RE. 2021. Mosquito taxonomic inventory [Internet]. 2021. Available from:
615 <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonony/term/8734> [accessed on 06
616 December 2020]
- 617 27. Lee, DJ., Hicks, MM., Griffiths, M., Debenham, ML., Bryan, JH., Russel, RC., Geary,
618 M., Marks, E. 1987. The Culicidae of Australian region. Volume 4. Australian. Canberra;
619 1987.
- 620 28. Rueda, LM. 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae)
621 associated with Dengue Virus Transmission. Zootaxa. 589: pp 1–60.
- 622 29. Rakotonirina, A., Pol, M., Kainiu, M., Barsac, E., Tutagata, J., Kilama, S., O'Connor,
623 O., Tarantola, A., Colot, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Richard, V., Pocquet, N. 2020.
624 MALDI-TOF MS: Optimization for future uses in entomological surveillance and
625 identification of mosquitoes from New Caledonia. Parasites and Vectors. 13(359): pp 1–
626 12.
- 627 30. Yssouf, A., Socolovschi, C., Flaudrops, C., Ndiath, MO., Sougoufara, S., Dehecq, JS.,
628 Lacour, G., Berenger, JM., Sokhna, CS., Raoult, D., Parola, P. 2013. Matrix-Assisted
629 Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry: An Emerging Tool for

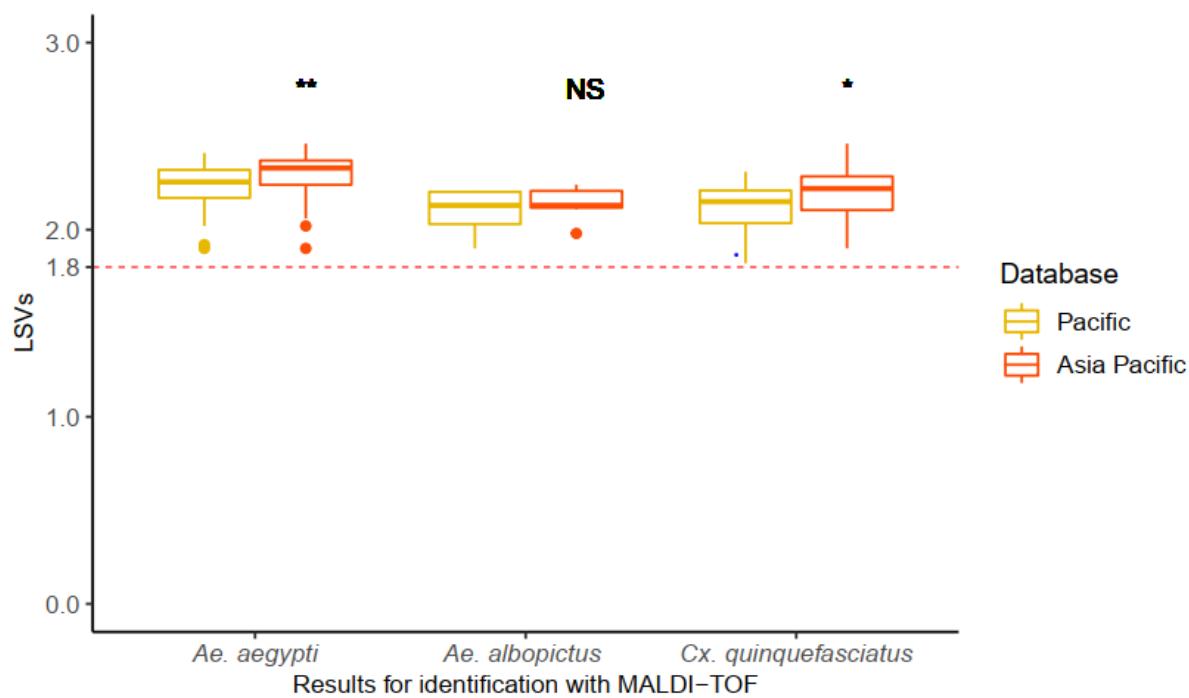
- 630 the Rapid Identification of Mosquito Vectors. PLoS One. 8(8): pp 1–10.
- 631 31. Müller, P., Pflüger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., Lengeler, C.
632 2013. Identification of Cryptic *Anopheles* Mosquito Species by Molecular Protein
633 Profiling. PLoS One. 8(2): pp 1–13.
- 634 32. Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., Prod'hom, G. 2010. Performance of
635 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for
636 identification of bacterial strains routinely isolated in a Clinical Microbiology
637 Laboratory. J Clin Microbiol. 48(5): pp 1549–54.
- 638 33. Raharimalala, FN., Andrianinarivomanana, TM., Rakotondrasoa, A., Collard, JM.,
639 Boyer, S. 2017. Usefulness and accuracy of MALDI-TOF mass spectrometry as a
640 supplementary tool to identify mosquito vector species and to invest in development of
641 international database. Med Vet Entomol. : pp 1–10.
- 642 34. Tandina, F., Niaré, S., Laroche, M., Koné, AK., Diarra, AZ., Ongoiba, A., Berenger,
643 JM., Doumbo, OK., Raoult, D., Parola, P. 2018. Using MALDI-TOF MS to identify
644 mosquitoes collected in Mali and their blood meals. Parasitology. : pp 1–13.
- 645 35. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for
646 amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan
647 invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 3(5): pp 294–9.
- 648 36. Behbahani, A., Dutton, TJ., Davies, N., Townson, H., Sinkins, SP. 2005. Population
649 differentiation and *Wolbachia* phylogeny in mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group.
650 Med Vet Entomol. 19: pp 66–71.
- 651 37. Nabet, C., Kone, AK., Dia, AK., Sylla, M., Gautier, M., Yattara, M., Thera, MA., Faye,
652 O., Braack, L., Manguin, S., Beavogui, AH., Doumbo, O., Gay, F., Piarroux, R. 2021.

- 653 New assessment of *Anopheles* vector species identification using MALDI - TOF MS.
- 654 Malar J [Internet]. 20(33): pp 1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03557-2>
- 655
- 656 38. Rozeboom, LE., Gilford, BN. 1954. The genetic relationships of *Aedes pseudoscutellaris*
657 theobald and *Aedes polynesiensis* marks (diptera: *Culicidae*). Am J Hyg. 60: pp 117–34.
- 658 39. Sota, T., Mogi, M. 2006. Origin of Pitcher Plant Mosquitoes in *Aedes (Stegomyia)*: A
659 Molecular Phylogenetic Analysis Using Mitochondrial and Nuclear Gene Sequences. J
660 Med Entomol [Internet]. 43(5): pp 795–800. Available from:
661 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017211>
- 662 40. Briolant, S., Costa, MM., Nguyen, C., Dusfour, I., de Santi, VP., Girod, R., Almeras, L.
663 2020. Identification of French Guiana *Anopheline* mosquitoes by MALDI-TOF MS
664 profiling using protein signatures from two body parts. PLoS One. 15(8): pp 1–16.
- 665 41. Lawrence, AL., Batovska, J., Webb, CE., Lynch, SE., Blacket, MJ., Jan, Š., Parola, P.,
666 Laroche, M. 2018. Accurate identification of Australian mosquitoes using protein
667 profiling. Parasitology. : pp 1–10.
- 668 42. Mendenhall, IH., Manuel, M., Moorthy, M., Lee, TTM., Low, DHW., Missé, D., Gubler,
669 DJ., Ellis, BR., Ooi, EE., Pompon, J. 2017. Peridomestic *Aedes malayensis* and *Aedes*
670 *albopictus* are capable vectors of arboviruses in cities. PLoS Negl Trop Dis. 11(6): pp
671 1–17.
- 672
- 673

674 **Supporting information Captions**

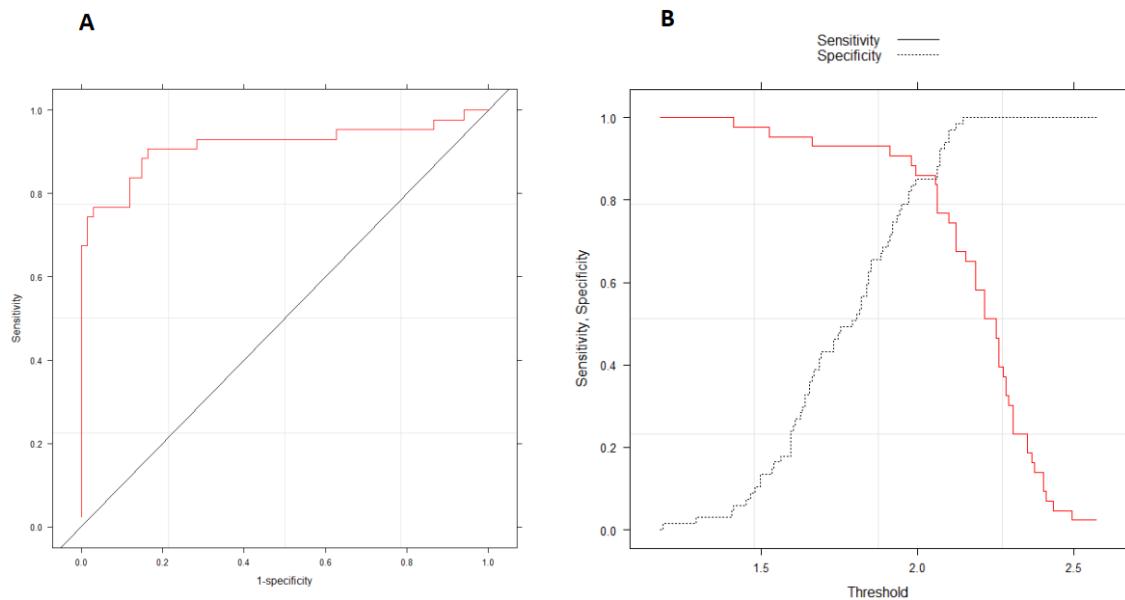
675 **S1 Fig. impact of reference spectra used in the database on the Asia mosquito species**
676 **identification.** Comparison of Log-score values (LSVs) obtained for *Aedes aegypti* (n = 40),
677 *Aedes albopictus* (n = 8) and *Culex quinquefasciatus* (n = 19) according to reference spectra
678 used in the MALDI-TOF database. Colors illustrate the database used in analysis. Red dashed-
679 line corresponds to the threshold value for mosquito species identification, stated during
680 previous study. Wilcoxon test, *p-value < 0.05, **p-value < 0.01. Abbreviation: NS, not
681 significant. (PDF)

682



686 **S2 Fig. Determination of the threshold value of MALDI-TOF MS for *Aedes* of *Scutellaris***
687 **group identification when using *Aedes scutellaris*, *Aedes pseudoscutellaris* and *Aedes***
688 ***futunae* reference spectra in the MALDI-TOF database.** A- Representation of the AUC
689 (Area under curve). B – Representation of the threshold value which maximizes the sensitivity
690 and specificity of the technique. (PDF)

691

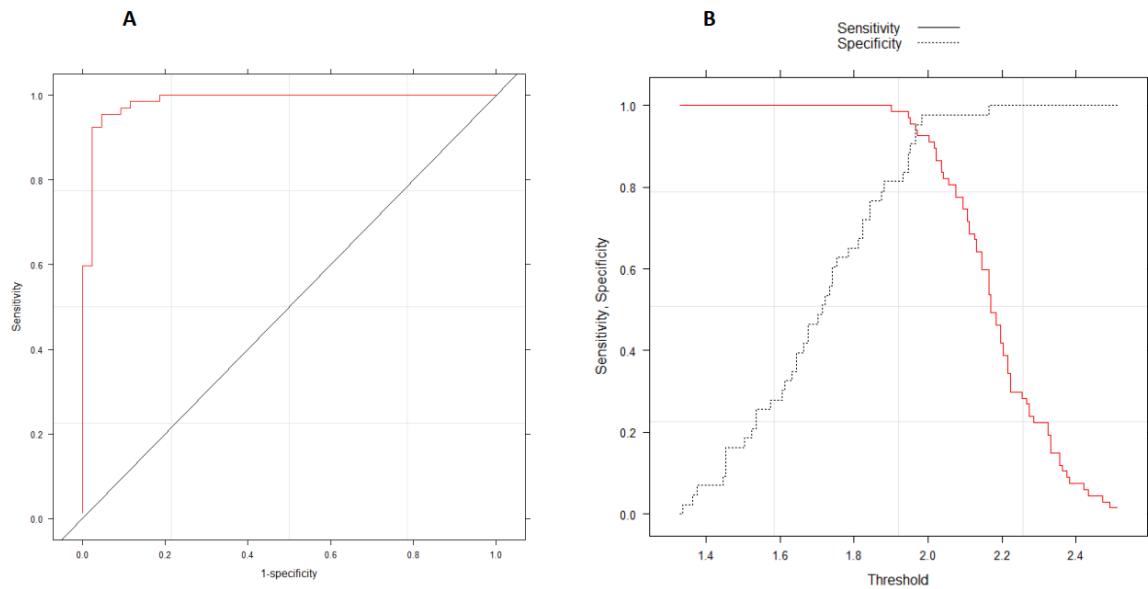


692

693

694 **S3 Fig. Determination of the threshold value of MALDI-TOF MS for *Aedes* of *Scutellaris***
695 **group identification when using *Aedes polynesiensis*, *Aedes albopictus* reference spectra in**
696 **the MALDI-TOF database.** A- Representation of the AUC (Area under curve). B –
697 Representation of the threshold value which maximizes the sensitivity and specificity of the
698 technique. (PDF)

699



700

Chapitre 4

Développement du MALDI-TOF couplé aux réseaux de neurones convolutifs pour détecter *Wolbachia* chez les *Aedes aegypti* de Nouvelle-Calédonie



Photographie d'un *Aedes aegypti* femelle (Crédit photo : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, M. Pol, 2017)

Chapitre 4 : Développement du MALDI-TOF couplé aux réseaux de neurones convolutifs pour détecter *Wolbachia* chez les *Aedes aegypti* de Nouvelle-Calédonie

IV.1. Contexte spécifique de l'étude

Le MALDI-TOF est un outil performant permettant d'identifier les vecteurs de DENV, à l'échelle régionale et internationale. Il est intéressant de constater que cette technique constitue un outil complémentaire pour identifier les espèces morphologiquement et phylogénétiquement proches, que sont les *Aedes* du groupe *Scutellaris*. Toujours dans cette perspective d'utilisation du MALDI-TOF en Entomologie médicale, ce quatrième chapitre présente le développement de cet outil, couplé aux réseaux de neurones convolutifs, dans le but de distinguer les *Ae. aegypti* infectés et non infectés par *Wolbachia*.

En effet, afin de réduire les épidémies de dengue, la Nouvelle-Calédonie a récemment implémenté une nouvelle stratégie au travers du *World Mosquito Program* (WMP). Cette stratégie consiste à remplacer la population d'*Ae. aegypti* sur le terrain par une souche artificiellement infectée par la bactérie *Wolbachia* qui présente une capacité réduite de transmission des arbovirus (Walker *et al.*, 2011; Aliota, *et al.*, 2016a; 2016b, Carrington *et al.*, 2017).

Ces lâchers sont poursuivis jusqu'à ce que la proportion de moustiques infectés par *Wolbachia* sur le terrain soit suffisante pour permettre la propagation de la bactérie et son maintien dans la population de moustique ciblée (O'Neill *et al.*, 2019, 2020). Ainsi, durant les lâchers, un suivi de l'installation de la souche doit être effectué. Par ailleurs, A la fin des lâchers, un suivi de la stabilité de la population d'*Ae. aegypti* infectée par la bactérie devra être réalisé car la fréquence de moustiques infectés sur le terrain doit rester élevée pour assurer l'efficacité de la stratégie (Ross *et al.*, 2020). A cet effet, des *Ae. aegypti* devront être capturés et analysés au laboratoire afin de détecter la présence de *Wolbachia* dans leur corps.

Les techniques actuellement utilisées pour la détection de *Wolbachia* chez *Ae. aegypti* sont la PCR quantitative et la LAMP. Ces deux techniques sont sensibles et spécifique (Gonçalves et al., 2019; Lee et al., 2012) mais coûtent cher.

Ce travail a donc consisté à mettre en place un outil complémentaire (MALDI-TOF couplé avec le réseau de neurones convolutif), rapide et peu couteux, afin de détecter la présence de *Wolbachia* chez les *Ae. aegypti* de terrain. Durant l'étude, la performance de la LAMP et du MALDI-TOF à distinguer les moustiques infectés des non infectés a été comparée à celle de la qPCR, qui est considérée comme la technique de référence.

IV.2. Principaux résultats et conclusion

Une bonne capacité de la LAMP à détecter la présence de *Wolbachia* chez les moustiques de terrain a été observée. En effet, par rapport à la qPCR, sur les 194 moustiques de terrain analysés, aucun faux positif n'a été observé et seulement 11 faux négatifs ont été obtenus. Pour ces faux négatifs, une densité faible de la bactérie (inférieure à 1) a été constatée. Ainsi, la LAMP a présenté une sensibilité de 80% ($IC_{95} = 67 - 90\%$), et une spécificité de 100% ($IC_{95} = 97 - 100\%$).

L'observation visuelle des spectres créés à partir de la tête et du thorax de moustiques en utilisant le logiciel du MALDI-TOF (Flex analysis, Bruker Daltonics) ont permis de détecter un pic à 4073 Daltons, présents chez tous les moustiques de laboratoire infectés et absents chez les moustiques non infectés. En considérant ce pic comme étant caractéristique de la présence de *Wolbachia* chez *Ae. aegypti*, la performance du MALDI-TOF à distinguer les moustiques de terrain infectés des non infectés a été évaluée. Un faux positif a été trouvé et 13 faux négatifs ont été obtenus. Comme pour la LAMP, ces faux négatifs correspondaient à des moustiques dont la densité de *Wolbachia* était inférieure à 1, à l'exception de deux individus. Sur la base de cette simple analyse visuelle, le MALDI-TOF a donc permis de détecter la bactérie chez les *Ae. aegypti* de terrain avec une sensibilité de 77% ($IC_{95} = 64 - 87\%$) et une spécificité de 99% ($IC_{95} = 96 - 100\%$), comparable aux performances du test LAMP.

Ces résultats ont pu être améliorés en analysant les spectres des moustiques obtenus au MALDI-TOF par un réseau de neurones convolutifs. En effet, cette analyse a permis de détecter *Wolbachia* même chez la majorité des individus (9 sur 11) dont la densité bactérienne était faible. Ainsi, avec cet apport des réseaux de neurones convolutifs, la sensibilité obtenue a été de 92% ($IC_{95} = 80 - 98\%$), sans baisse majeure de la spécificité (98% ; $IC_{95} = 95-100\%$).

Une analyse supplémentaire a été effectuée afin d'identifier les zones du spectre utilisés par le réseau de neurones convolutif pour établir son classement. Au total, 12 points de chaque spectre sont considérés en priorité par le réseau de neurones pour la distinction du statut d'infection des moustiques. Parmi ces points discriminants, le pic à 4073 Da et son voisinage proche sont déterminants pour discriminer les moustiques infectés et non-infectés par *Wolbachia*.

Ce travail a donc démontré que le MALDI-TOF couplé avec le réseau de neurones convolutif, constitue un outil intéressant pour suivre l'installation, la dispersion et le maintien, à court, moyen et long-terme des *Ae. aegypti* infectés par *Wolbachia* sur le terrain.

IV.3. Article 3 : Rakotonirina A., Carruzzo C., Ballan V., Kainiu M., Marin M., Colot J., Richard V., Dupont-Rouzeyrol M., Selmaoui-Folcher N. and Pocquet N. ***Wolbachia* detection in *Aedes aegypti* using MALDI-TOF MS coupled to artificial intelligence.** (submitted).

1 ***Wolbachia* detection in *Aedes aegypti* using MALDI-TOF MS coupled to
2 artificial intelligence**

3

4 **Antsa Rakotonirina¹, Cédric Caruzzo², Valentine Ballan¹, Malia Kainiu³, Marie Marin¹,**
5 **Julien Colot³, Vincent Richard⁴, Myrielle Dupont-Rouzeyrol⁵, Nazha Selmaoui-Folcher²,**
6 **Nicolas Pocquet^{1*}.**

7

8 ¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Entomologie Médicale, Nouméa 98845, New
9 Caledonia

10 ² Institut des Sciences Exactes et Appliquées, Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa 98851,
11 New Caledonia

12 ³ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Groupe de Recherche en Bactériologie Expérimentale,
13 Nouméa 98845, New Caledonia

14 ⁴ Institut Pasteur, Direction internationale, Paris 75015, France

15 ⁵ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Dengue et autres Arboviroses, Nouméa 98845,
16 New Caledonia

17

18 *Correspondence: npocquet@pasteur.nc

19

20

21 **Abstract**

22 The mosquito *Aedes aegypti* is the major vector of arboviruses like dengue, Zika and chikungunya
23 viruses. Attempts to reduce arboviruses emergence focusing on *Ae. aegypti* control has proven
24 challenging due to the increasing of insecticide resistances. An emerging strategy which consists
25 of releasing *Ae. aegypti* artificially infected with *Wolbachia* in natural mosquito populations is
26 currently being developed. The monitoring of *Wolbachia*-positive *Ae. aegypti* in the field is
27 performed in order to ensure the program effectiveness. Here, the reliability of the Matrix-Assisted
28 Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) coupled with the machine learning
29 methods like Convolutional Neural Network (CNN) to detect *Wolbachia* in field *Ae. aegypti* was
30 assessed for the first time. For this purpose, laboratory reared and field *Ae. aegypti* were analyzed.
31 The results showed that the CNN recognized *Ae. aegypti* spectral patterns associated with
32 *Wolbachia*-infection. The MALDI-TOF coupled with the CNN was more efficient than the loop-
33 mediated isothermal amplification (LAMP) for *Wolbachia* detection. It therefore represents an
34 interesting method to evaluate the prevalence of *Wolbachia* in field *Ae. aegypti* mosquitoes.

35

36 **Introduction**

37 Dengue, Zika and chikungunya diseases are emerging globally as a major public health problem
38 in the world. These diseases attracted interest in recent years due to their increasing incidence and
39 their expanding geographical range. Dengue fever is endemic in several countries with 390 million
40 infections estimated per year¹. Zika and chikungunya outbreaks also affected several regions and
41 were responsible for high rates of morbidity and mortality²⁻⁴.

42 These diseases are caused by arboviruses that are transmitted to human by vector mosquitoes
43 which one of the most widespread is *Aedes aegypti*. To date, no specific antiviral treatments are
44 available. In addition, no vaccines for Zika and chikungunya are commercially available and the
45 recently licensed dengue vaccine has limitations for its uses^{5,6}. Efforts to reduce the dengue, Zika
46 and chikungunya incidence therefore rely on *Ae. aegypti* control. Since the mosquito control
47 weakened by increased insecticide resistances, the implementation of alternative and efficient
48 strategies for arboviruses control is required⁷.

49 Recently, biocontrol strategy using *Wolbachia*, an endosymbiotic bacterium was developed by the
50 World Mosquito Program (WMP). This strategy has been established in several countries⁸⁻¹¹
51 (<https://www.worldmosquitoprogram.org/>) and consist to the release of *Ae. aegypti* artificially
52 infected with *Wolbachia* in natural mosquito populations. The program is implemented in New
53 Caledonia (NC) since 2019 with releasing of *Wolbachia* carrying mosquitoes across Nouméa, the
54 main city. Its efficiency relies on several features of the bacterium including: (i) maternal-
55 inheritance infections resulting in *Wolbachia* maintain in progeny, (ii) cytoplasmic incompatibility
56 mechanism which contributes to uninfected mosquito population reduction and (iii) significant
57 inhibition of arboviruses transmission¹².

58 However, for effective arboviruses control, *Wolbachia* infections should remain at high
59 frequencies in *Ae. aegypti* populations¹³. Thus, the monitoring of *Ae. aegypti* infected through
60 diagnostic testing remains an ongoing requirement to ensure the proper implementation and the
61 effectiveness of the program.

62 Two methods are currently used for diagnosing *Wolbachia* infection in *Ae. aegypti*: the TaqMan™
63 quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and the LAMP assay. The TaqMan™ qPCR
64 remains the reference method¹⁴. This technic has the advantage of being sensitive and specific.

65 Furthermore, it allows simultaneously: (i) *Ae. aegypti* species verification, (ii) *Wolbachia* infection
66 detection and (iii) *Wolbachia* density quantification¹⁵. However, no information concerning the
67 mosquito species is obtained in situations where *Ae. aegypti* internal control is not amplified. In
68 addition, the method is expensive and requires technical expertise.

69 The LAMP technique was described as suitable for high throughput application due to its good
70 sensitivity and specificity¹⁴. Compared to qPCR, the result interpretation is also more accessible,
71 and the technique allowed a rapid screening of sample. Nevertheless, the main disadvantage of
72 LAMP method is the use of a single target nucleic acid test, allowing only the detection of
73 *Wolbachia*.

74 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF
75 MS) has recently emerged for identification tool in medical entomology. This technics allowed
76 arthropod species identification and the detection of pathogens they carried¹⁶⁻¹⁸. In 2015, Yssouf
77 *et al.* showed the ability of MALDI-TOF MS to identify the tick species and to detect the presence
78 of *Rickettsia* pathogen, an intracytoplasmic bacterium, in a single assay¹⁹. In addition, in terms of
79 required expenses, MALDI-TOF MS is much cheaper than the qPCR and LAMP techniques.

80 Current advances in machine learning approaches could complement and enhance performance of
81 the MALDI-TOF MS to analyze mosquito spectra. For example, this was used to recognize
82 MALDI-TOF MS spectral patterns associated with *Anopheles* ages, blood-feeding and
83 *Plasmodium* infection²⁰.

84 To our knowledge, no studies have investigated the use of the MALDI-TOF MS coupled with
85 machine learning (deep learning) methods like convolutional neural network (CNN) for field-
86 mosquitoes recognition. Its application in *Wolbachia* detection has also never been tested.

87 Therefore, the aim of this work was to investigate the use of MALDI-TOF MS and the CNN for
88 *Wolbachia* detection, in the context of implementing an arbovirus control strategy based on the
89 use of this endosymbiotic bacterium. Our ultimate goal was to develop this tool for a rapid and
90 reliable monitoring of *Wolbachia* infection rate in *Ae. aegypti* collected from the field.

91

92 **Methods**

93 **Biological material**

94 During this study, laboratory-reared *Ae. aegypti* were used including mosquitoes infected with
95 *Wolbachia* (*w*Mel-strain) and uninfected specimens (Wild Type-strain, or WT). They were raised
96 in the insectarium until adult stage, with temperature of $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of 80%
97 $\pm 10\%$. Adult mosquitoes were subsequently harvested.

98 In addition, males and females *Ae. aegypti* collected from the field were also used during this
99 study. Field sampling was conducted in Nouméa, NC, from November 2019 to April 2020 using
100 BG-sentinel® traps (Biogents, Regensburg, Germany). This sampling was assessed during the first
101 phase of releases in Nouméa (*i.e.* September 2019 to June 2020). A maximum trapping duration
102 of 24 hours was set to avoid mosquito proteins degradation as previously described²¹.

103 All mosquitoes were killed by freezing at -20°C and were morphologically identified to the species
104 level using morphological keys^{22–25}. Then, *Ae. aegypti* mosquitoes were dissected into two body
105 parts: (i) head and thorax, and (ii) abdomen and preserved at -80°C .

106

107 **qPCR and LAMP analysis**

108 DNA extraction was carried out for both laboratory and field mosquitoes using abdomen.
109 Extraction was performed using DNA blood and tissues kit (Qiagen, Hilden, Germany) according
110 to the manufacturer's instruction.

111 DNA extracted was subsequently amplified by multiplex qPCR using specific primers targeting
112 *Ae. aegypti* house-keeping *Rps17* and *Wolbachia* specific *wsp* genes, as previously described¹⁴.
113 Briefly, qPCR conditions were: 0,25 µM each of forward and reverse primers, 0,1 µM each of
114 probes, 1X Lightcycler 480 Probes Master reaction mix, 1 µL of target DNA in a total reaction
115 volume of 10 µl. Thermal cycling was performed using Roche LightCycler 480 (Roche Life
116 Science, USA), with 1 cycle at 95°C for 5 minutes for pre-incubation, followed by 45 cycles of
117 95°C for 10 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 1s for amplification followed by a final
118 cooling step of 40°C for 10 seconds¹⁴. In addition, *Wolbachia* density in mosquitoes were
119 calculated using relative quantification algorithm in the LightCycler 480 software¹⁵.

120 For each field-mosquito, DNA extracted were also subjected to LAMP assay. For this experiment,
121 three pairs of primers were used as described by Gonçalves *et al*, 2019¹⁴. Samples were amplified
122 with an uniform temperature at 65°C for 30 minutes and held at 12 °C until scoring¹⁴. LAMP
123 technic provides a drop of pH when DNA amplification occurs, modifying the color of the mix:
124 pink indicates negative, orange indicates equivocal and yellow indicates positive sample. Results
125 were interpreted by direct observation and photos were taken with a tablet computer for data
126 storage.

127

128 **Protein extraction protocol**

129 For each mosquito, protein extraction was performed using head with thorax according to the
130 protocol previously published²¹. Briefly, these were put into individual microtubes and rinsed with
131 1 mL of 70% ethanol for 60 s, followed by 1 mL of distilled water for 60 s. The remaining water
132 was then eliminated using a micropipette and left to evaporate. Three metal beads, 15 µL of
133 acetonitrile (50%) and 15 µL of formic acid (70%) were subsequently added to the microtube.
134 Each sample was homogenized. After homogenization, 1 µL of sample was deposited directly on
135 a steel MALDI plate (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) and allowed to dry before adding
136 another 1 µL of the same sample over the first spot²¹. To create the reference main spectrum pattern
137 (MSP), a total of 8 spots were spotted of the same sample²¹. Conversely, each sample intended to
138 be queried against these reference spectra were deposited in duplicate, as suggested by previous
139 work²¹. Matrix solution was also loaded in duplicate onto each MALDI-TOF plate in order to
140 control matrix quality.

141

142 **MALDI-TOF MS analysis**

143 During this study, laboratory reared *Ae. aegypti* were used to create the MSPs. Specifically, a total
144 of 10 MSPs were created consisting of 5 wMel MSPs and 5 WT MSPs (Table 1).

145 For the blind test analysis, laboratory mosquitoes including 30 wMel-strain and 30 WT-strain were
146 analyzed. In addition, 194 mosquitoes from the field were also included in analyses (Table 1). For
147 this, the spectra acquired from the duplicate of each sample was compared to the created MSPs.
148 Then, the MALDI Biotyper Compass software version 3.1 (Bruker Daltonics) calculates Log-score
149 value (LSV) ranging from zero to three, reflecting the similarity between sample spectra and MSP.
150 As previously stated, a LSV ≥ 1.8 support the mosquito species identification^{21,26}.

151 For all laboratory and field-mosquitoes, the spectra obtained were also imported into the
152 FlexAnalysis software (Bruker Daltonics). These were visually inspected in order to compare
153 protein profiling of the *wMel* and WT mosquitoes.

154

155 **Table 1. Overview of mosquitoes used for MALDI-TOF analysis.**

	MSPs creation	Blind testing
Laboratory strain <i>wMel</i>	5	30
Laboratory strain WT	5	30
Field-mosquito <i>wMel</i>	-	56
Field-mosquito WT	-	138
Total	10	254

156

157 **Comparison of LAMP and MALDI-TOF MS performance**

158 The performance of the two technics (*i.e.*, LAMP and MALDI-TOF) to detect *Wolbachia* in field-
159 mosquitoes was compared to the performance of the reference qPCR analysis. Sensitivity (Se) and
160 specificity (Sp) were calculated. The positive predictive value (PPV), negative predictive values
161 (NPV) and classification accuracy were also computed.

162

163 **CNN training for mass spectra classification**

164 All spectra of field and laboratory mosquitoes generated during this study were exported from the
165 FlexAnalysis software (Bruker Daltonics). Then, they were uploaded to train a CNN model. This
166 CNN consisted of a succession of convolutional, MaxPooling, flatten and dropout layers²⁷.

167 During analysis, when spectra were acquired from the duplicate of each sample, each spectrum
168 was considered as a single input (considered as data augmentation). Thus, a total of 471 spectra
169 were included in analysis. This consisted of 120 spectra of laboratory-mosquitoes and 351 spectra
170 of field-specimens. The data were split into a training dataset (80%) and test dataset (20%). In
171 order to avoid overfitting and to generalize model, we use the k-fold cross-validation technique.
172 This consisted in randomly dividing the dataset into k (here, k=5) subgroups containing the same
173 proportion of samples per class. One group (*i.e.* test dataset) was used for the model validation,
174 while the k-1 groups (*i.e.* training dataset) were dedicated to the model training. K-fold results
175 were then averaged to produce a single estimate of the performance indicators (accuracy, precision,
176 recall, etc.). In addition, 15 CNN were trained in parallel in order to integrate them into an
177 ensemble learning architecture and therefore reduce the variance due to the randomness of the
178 optimization algorithm. Their votes provided the final result.

179 Finally, based on the output of the test dataset, we performed a quantitative evaluation of the CNN
180 performance to recognize *Ae. aegypti* spectral patterns associated with *Wolbachia* infection. Then,
181 Se, Sp, PPV, NPV and classification accuracy were computed.

182

183 **Feature extraction**

184 Features were extracted in order to identify the spectra region used by CNN to discriminate
185 infected and uninfected *Ae. aegypti*. The data containing the major mass points within the spectra
186 used by the CNN to discriminate infected and uninfected *Ae. aegypti*, and their corresponding
187 intensities were exported. This was analyzed with R software (R Core Team (2017). R: A language

188 and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna,
189 Austria).

190

191 **Results**

192 **Mosquito species confirmation and *Wolbachia* detection with the reference qPCR method**

193 During this study, the morphological identification of field and laboratory-mosquitoes was
194 confirmed using qPCR technic. Results supported amplification of the *Rps17* gene which target
195 *Ae. aegypti* DNA, confirming the mosquito species identification.

196 In addition, *Wolbachia* screening was realized for laboratory-strain *Ae. aegypti* using qPCR
197 method. The mosquitoes infected with *Wolbachia* (*wMel*-strain) showed amplification of the *wsp*
198 gene. The mean of their *Wolbachia* density was of 15 (95% CI = 12 – 19) copies of *wMel* per copy
199 of the *Rps17* gene. Conversely, all the WT-strain showed absence of amplification of *wsp* gene.

200 A total of 194 *Ae. aegypti* from the field were analyzed with qPCR technic. All were positive for
201 *Rps17* gene. Results showed 56 *Wolbachia*-infected mosquitoes. The mean of *Wolbachia* density
202 was of 30 (95% CI = 19 – 41) copies of *wMel* per copy of the *Rps17* gene. Conversely, qPCR
203 result showed that 138 field-*Ae. aegypti* were not infected by *Wolbachia*.

204

205 ***Wolbachia* detection with LAMP technic**

206 All mosquitoes from the field were also analyzed using LAMP method. Among the 56 *Wolbachia*
207 infected mosquitoes (results obtained with the reference qPCR), the bacterium was detected in 45
208 individuals. Equivocal and negative results were obtained for 4 and 145 mosquitoes, respectively.

209

210 **MALDI-TOF MS results**

211 Firstly, laboratory-mosquito spectra were queried against the reference MSPs created from *wMel*
212 and WT *Ae. aegypti*, using the MALDI- compass software (Bruker Daltonics). Results showed
213 LSVs ≥ 1.8 for 98% of mosquito analyzed ($n = 60$), supporting mosquito species identification.

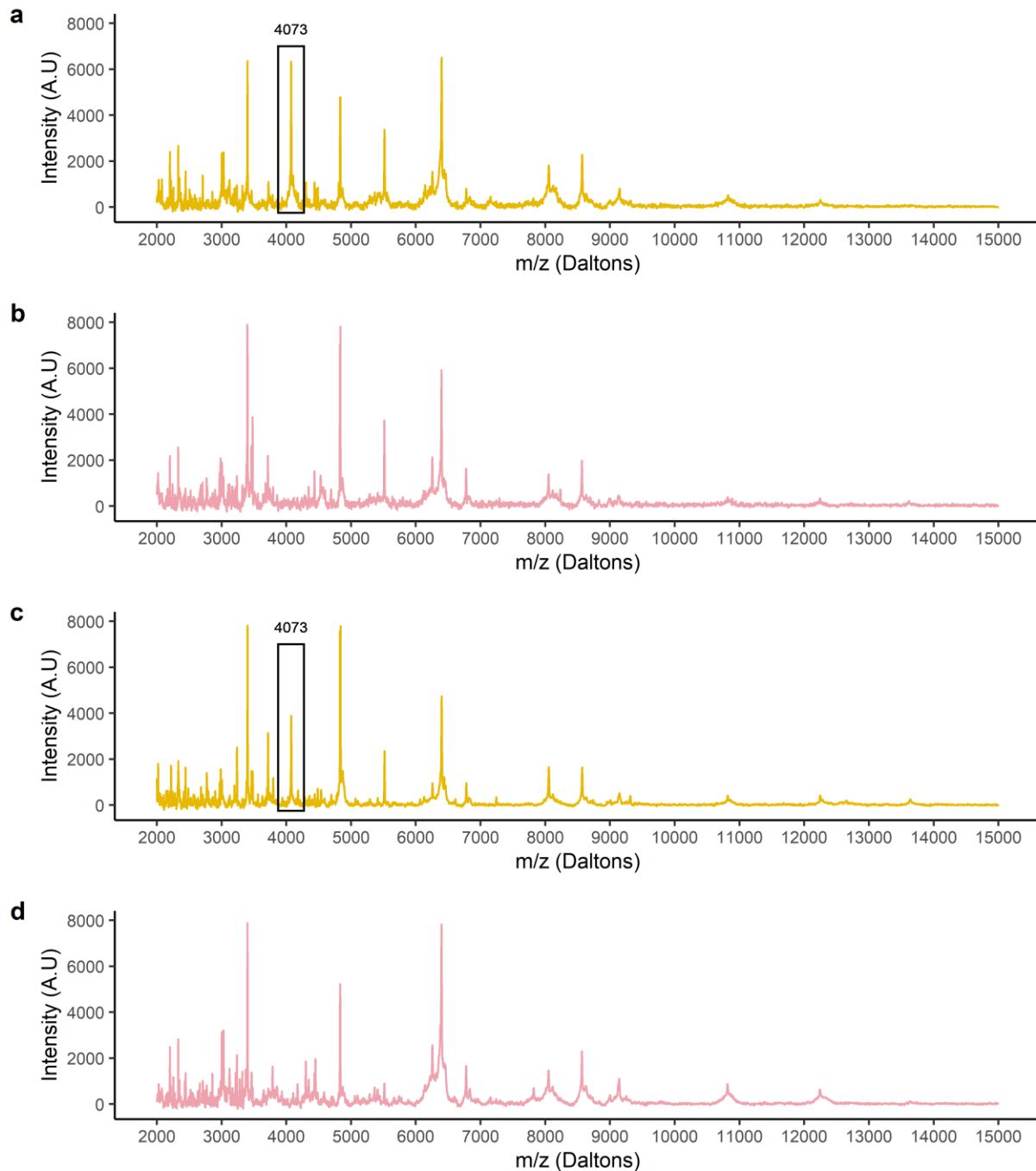
214 However, 47% (95% CI = 28 – 66%) of *wMel* laboratory-mosquitoes incorrectly matched with
215 WT MSPs and 27% (95% CI = 12 – 46%) of WT specimens incorrectly matched with *wMel* MSPs.

216 The spectra of field mosquitoes were also queried against these *wMel* an WT-MSPs. Thus, 90%
217 of mosquitoes ($n = 194$) had LSVs ≥ 1.8 . We also observed misclassification, with 70% (95% CI
218 = 56 – 81%) of *wMel* mosquitoes matched with WT MPSs and 16% (95% CI = 10 – 23%) of *wMel*
219 mosquitoes matched with WT MSPs.

220 Secondly, the spectra of laboratory-mosquitoes were visually observed using the FlexAnalysis
221 software (Bruker, France). A peak at 4073 Da was detected in 100% of *wMel* laboratory
222 *Ae. aegypti* ($n = 30$) spectra. Conversely, this peak was not visually observed in the 30 WT
223 laboratory-mosquito spectra (Fig. 1).

224 When observing the spectra of field-specimens, the peak at 4073 Da was also detected in 43
225 mosquito spectra among the 56 *Wolbachia* infected field-mosquitoes and was present in the
226 spectrum of one WT-mosquito (qPCR results). This peak was absent in the other 150 field-
227 specimen spectra.

228



229

230 **Figure 1. Comparison between the spectra of *Ae. aegypti* infected with *Wolbachia* and**
 231 ***Ae. aegypti* uninfected using FlexAnalysis software.** a: spectra of infected *Ae. aegypti* from the
 232 laboratory. b: spectra of uninfected *Ae. aegypti* from the laboratory. c: spectra of infected

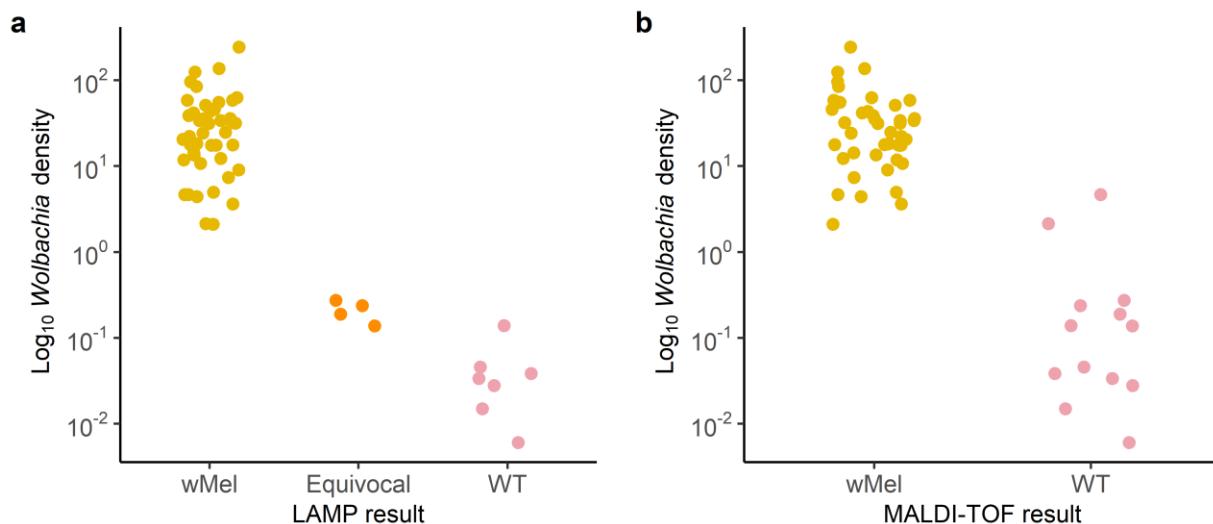
233 *Ae. aegypti* from the field. d: spectra of uninfected *Ae. aegypti* from the field. Abbreviations: A.U,
234 arbitrary unity; m/z, mass-to-charge ratio.

235

236 **Comparison of the LAMP and MALDI-TOF performances to detect *Wolbachia* in field-
237 mosquitoes**

238 Relative to the qPCR reference method, no LAMP false positive was observed when analyzing
239 field-mosquitoes. Conversely, false negatives results (*i.e.*, equivocal and negatives) were observed
240 for 11 mosquitoes. For these mosquitoes, low wMel densities (*i.e.*, < 1) were found (Fig. 2a).

241



242

243 **Figure 2. Classification of wMel *Ae. aegypti* by LAMP and MALDI-TOF techniques according
244 to their *Wolbachia* densities.** a: results obtained with LAMP assay. b: results obtained with
245 MALDI-TOF analysis when visualizing the mosquito spectra with the FlexAnalysis software.

246

247 According to these results, a sensitivity of 80% (95% CI: 69 – 90%), a specificity of 100% (95%
248 CI: 97 – 100%) and an accuracy of 94% (95% CI: 90 – 97%) were achieved for LAMP method
249 (Table 2).

250

251 **Table 2. Comparison of LAMP and MALDI-TOF (without CNN) performances when**
252 **analyzing field-mosquitoes (n = 194).**

Technic	Se [95% CI]	Sp [95% CI]	PPV [95% CI]	NPV [95% CI]	Accuracy [95% CI]
MALDI-TOF	77% [64 – 87]	99% [96 – 100]	98% [86 – 100]	91% [87 – 94]	93% [88 - 96]
LAMP	80% [68 – 90]	100% [97 – 100]	100%	93% [88 – 95]	94% [90 – 97]

253 Abbreviations: Se, sensitivity; Sp, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

254

255 Concerning the MALDI-TOF technic, when we consider the presence of the peak at 4073 Da as
256 indicating the presence of *Wolbachia* in *Ae. aegypti*, one false positive result was observed for
257 field-mosquitoes. Thirteen false negatives were found. With the exception of two specimens, low
258 wMel densities (*i.e.*, < 1) were observed for these false negative specimens (Fig. 2b). With only a
259 visual analysis of the spectra, a sensitivity of 77% (95% CI: 64 – 87%), a specificity of 99% (95%
260 CI: 96 – 100%) and an accuracy of 93% (95% CI: 88 – 96%) were obtained (Table 2).

261

262 **Distinction between spectra of *Wolbachia* infected and uninfected *Ae. aegypti* with CNN**

263 With the architecture of the proposed CNN model, we first used a dataset of 471 spectra in order
264 to train and validate the model (one or two spectra per specimen, corresponding to the two deposits
265 per specimen on the MALDI-TOF plate). For the laboratory-strain, the results showed 55

266 *Wolbachia*-infected spectra and 65 uninfected spectra. A discordance between the result within the
267 duplicate was observed for 3 mosquitoes. Regarding the result of field-mosquitoes, 100 infected
268 spectra and 251 uninfected spectra were found. For 4 mosquitoes, a discordance between of the
269 result within the duplicate was also observed. Moreover, when using the CNN, the bacterium was
270 detected in 9 of 11 mosquitoes with low *Wolbachia* densities.

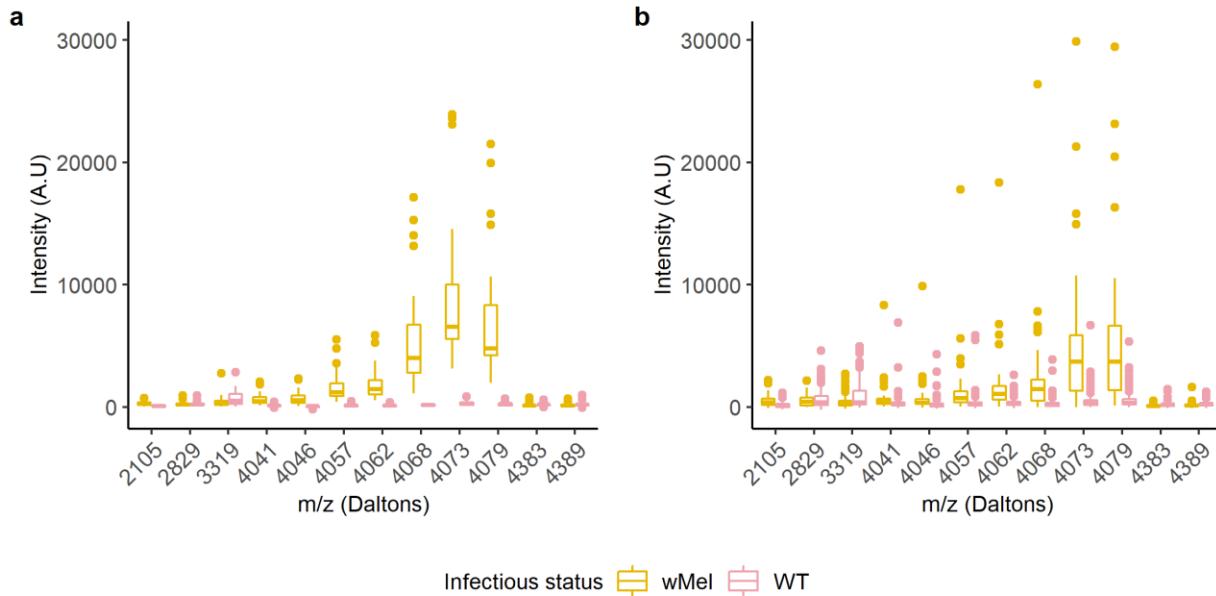
271 The performance of the CNN to discriminate spectra of *Wolbachia*-infected and uninfected
272 mosquitoes was also evaluated using only field specimens. The result showed a sensitivity of 91%
273 (95% CI: 89-93 %), a specificity of 98% (95% CI: 97-99%) and an accuracy of 96% (95% CI: 94-
274 97 %).

275

276 **Analysis of *Aedes aegypti* spectra profiles according to CNN results**

277 Feature extraction allowed to observe a total of 60 mass points within the spectra which were over
278 80% used by the CNN to discriminate the spectra of *Wolbachia* infected and uninfected *Ae. aegypti*
279 (Supplementary Fig. S1). The observation of the result showed that the single peak visually
280 observed when using the FlexAnalysis software (Bruker Daltonics) was a set of mass points
281 forming a bell curve around 4073 Da. Regarding the spectra areas used at more than 85% by the
282 CNN, a total of 12 mass points within the spectra were used, including 7 points located in the 4073
283 Da region for the laboratory and field mosquito spectra (Fig. 3a and 3b, respectively).

284



285

286 **Figure 3. Boxplot showing the 12 mass points of distinct m/z (Daltons) considered over 85%**
 287 **by the CNN to discriminate *Ae. aegypti* infected and uninfected with *Wolbachia*.** a: results
 288 obtained for laboratory-reared mosquitoes. b: results obtained for field mosquitoes. Abbreviations:
 289 A.U, arbitrary unity; m/z, mass-to-charge ratio.

290

291 **Discussion**

292 The release of *Ae. aegypti* mosquitoes artificially infected with the endosymbiotic bacterium
 293 *Wolbachia* in the field is one of the most promising ongoing intervention against arboviruses. The
 294 World Health Organization has recently published that this strategy demonstrates public health
 295 value against dengue virus²⁸. However, in order to evaluate the effectiveness of this program, the
 296 prevalence of *Wolbachia* in the field *Ae. aegypti* must be assessed through screening trapped

297 mosquitoes. In this study, we present the first assessment of the accuracy of the MALDI-TOF MS
298 and artificial intelligence to detect the presence of *Wolbachia* in field *Ae. aegypti*.

299 In *Ae. aegypti* artificially infected with *Wolbachia*, the bacterium is localized throughout most
300 tissues such as the fat body, midgut, muscle, nervous tissue and Malpighian tubules²⁹. The
301 bacterium is also present in the salivary gland, which is located at the anterior portion of the thorax,
302 and is more abundant in their ovaries, located in the abdomen³⁰. During this study, the abdomen
303 was not used for MALDI-TOF MS analysis to reduce bias caused by potential traces of blood-
304 meal and microbiota in the spectra²⁶. This was used for qPCR and LAMP assays. Conversely, the
305 head and thorax were used for MALDI-TOF analysis.

306 In this study, the performance of MALDI-TOF to detect *Wolbachia* in field-mosquitoes was
307 compared to the reference qPCR method. However, as the LAMP technique is currently used to
308 monitor the progress of the wMel *Wolbachia* establishment in Nouméa, NC, we also compared the
309 MALDI-TOF and LAMP performance. Results showed a robustness of the LAMP technique as a
310 diagnostic method for monitoring the establishment of wMel *Ae. aegypti* in the field. Indeed, a
311 sensitivity of 80% and a specificity of 100% was obtained. When comparing our results with those
312 from a previously reported assay¹⁴, our study showed a lower sensitivity value. However, in this
313 previous paper, equivocal samples have been excluded from their analysis¹⁴. In our case, equivocal
314 mosquitoes were considered as negative samples to allow the comparison of the three techniques.
315 Moreover, we also found that the false-negative and equivocal samples observed during LAMP
316 analysis corresponded to field-specimens with low *Wolbachia* density. Previous works have shown
317 that the reduction of *Wolbachia* density in mosquito resulted in weakness of cytoplasmic
318 incompatibility and maternal transmission^{7,31} and potentially reduced arbovirus blockage¹². Thus,

319 the LAMP false-negatives and equivocal could be considered as uninfected mosquitoes due to the
320 potential loss of traits necessary for the strategy success.

321 Regarding the MALDI-TOF analysis, the result showed that the routine analysis, using the
322 MALDI-compass software (Bruker Daltonics), consisting in comparing the mosquito spectra with
323 the reference spectra (*i.e.*, MSPs), did not allow a successful distinction between *Wolbachia*-
324 infected and uninfected *Ae. aegypti*. Indeed, mismatches between mosquito' infectious status were
325 found. Previous work consisting in the detection of filariae in *Ae. aegypti* has shown a variation of
326 correct identification rates according to the compartment tested during the blind testing¹⁷. In
327 contrast, other works have shown the 100% reliability of the MALDI-TOF blind testing to detect
328 the presence of bacterium such as *Rickettsia* in tick legs and haemolymph^{19,32}. These contradictory
329 results suggest that care should be taken when using the blind test analysis for microorganism
330 detection in arthropods.

331 The observation of the spectral profile of laboratory reared *Ae. aegypti* allowed to visually detect
332 a peak at 4073 Da in 100% of wMel mosquitoes, which was absent in WT specimens. When
333 considering this peak as specific of *Wolbachia*-infected mosquitoes, the performance of the
334 MALDI-TOF MS to detect the bacterium in field-mosquitoes was evaluated. Results showed a
335 sensitivity of 77% which was similar than the LAMP sensitivity. However, like for LAMP technic,
336 most false-negative samples observed had low *Wolbachia* densities, with the exception of two field
337 *Ae. aegypti*. These findings highlighted that despite the sensitivity of 77% of the MALDI-TOF MS
338 when using only the FlexAnalysis software, it allows the detection of *Wolbachia* in the field-
339 mosquitoes when the density of the bacteria is high (> 1); these mosquitoes could have strong
340 pathogen blocking and could show a complete cytoplasmic incompatibility and maternal
341 transmission^{7,12,31}.

342 When analysing the MALDI-TOF spectra with the CNN, an improvement of the performance was
343 found. Indeed, the results showed a sensitivity of 91%, which was higher than the LAMP
344 sensitivity observed in this current study. The specificity was of 98% and the accuracy was of
345 96%. In addition, among the 11 mosquitoes with low *Wolbachia* density, 9 mosquitoes were
346 considered as positive with the CNN. These results demonstrated that the CNN could recognize
347 the spectral pattern of *Wolbachia*-infected and uninfected *Ae. aegypti*, allowing a robust
348 classification according to their infectious status. Similarly, other authors have shown the ability
349 of artificial intelligence to predict *Anopheles* aging, their blood feeding status and *Plasmodium*
350 infection when using MALDI-TOF MS spectral profile²⁰. These proofs of concept extend the field
351 of applications of MALDI-TOF MS coupled with artificial intelligence in medical entomology.
352 As performant as the reference qPCR, it represents an interesting complementary method for the
353 monitoring of *Ae. aegypti* infected with *Wolbachia* in the field.

354 Furthermore, the results obtained during the feature extraction showed that the set of mass points
355 forming a bell curve around 4073 Da stood out from the other mass points considered for the
356 classification. These mass points could correspond to *Wolbachia*-specific proteins. These could
357 also correspond to a response of the mosquitoes to the bacterial infection. Indeed, previous work
358 has shown that the *Wolbachia* infection in *Ae. aegypti* contributed to up-regulation of proteins such
359 as defensin A, an antimicrobial peptide which could be implicated in dengue virus inhibition³³.
360 The mass value of this peptide when analyzing with MALDI-TOF MS was of 4075 Da³⁴. Thus,
361 this could correspond to the bell curve (*i.e.*, around 4073 Da) considered by the CNN during our
362 study. However, complementary experiments are needed to test this hypothesis.

363 All these findings suggest that the MALDI-TOF coupled to CNN is reliable for *Wolbachia*
364 detection in *Ae. aegypti* from the field. Unlike the LAMP technique, it allows *Ae. aegypti* species

365 verification. This information on mosquito species is crucial to avoid a false-negative
366 interpretation in case of non-*Ae. aegypti* mosquitoes. Moreover, the cost of reagents and
367 consumables required for MALDI-TOF MS is about ten times cheaper than for qPCR and LAMP.
368 Finally, spectra acquisition with MALDI-TOF MS can be obtained in 30 minutes for one plate (*i.e.*
369 96 samples), which is shorter than the time required for DNA amplification with qPCR and LAMP
370 techniques (about 1h and 40 minutes, respectively).

371 This study has potential bias and limitations. The possible limitation of this work was the
372 unavailability of information on the identity and functions of the proteins corresponding to the
373 mass points used by the CNN during analysis. However, the distinction between spectra of
374 *Wolbachia*-infected and uninfected *Ae. aegypti* was completed despite the non-identification of
375 these peaks. It will be interesting in the future to carry out analysis using high-end mass
376 spectrometers such as LC-MS/MS systems or MALDI-TOF/TOF in order to have more
377 information on the proteins corresponding to these mass points.

378 In addition, as previously showed, a trapping duration of more than 24 hours could led to protein
379 degradation and alter the MALDI-TOF results²¹. The daily sampling of trap in the field represents
380 a particular challenge for the use of this tool to detect *Wolbachia* in field *Ae. aegypti* adults. To
381 circumvent this limitation, *Wolbachia* detection could be assessed using eggs or larvae mosquitoes
382 collected by ovitraps or in their breeding site. In the future, the accuracy of MALDI-TOF MS
383 coupled to CNN for *Wolbachia* detection in larvae mosquitoes should be therefore tested.

384

385 **Conclusions**

386 In conclusion, the MALDI-TOF MS coupled to CNN is a reliable tool for the field-monitoring of
387 *Ae. aegypti* infected with *Wolbachia*. It allows detection of the bacterium, with high sensitivity
388 and specificity. The use of artificial intelligence in MALDI-TOF MS spectra analysis is an
389 emerging approach in medical entomology. It will be interesting to apply this tool in other
390 entomological fields such as the pathogen detection in arthropods or determination of the age
391 structure of field-mosquito population.

392

393 **References**

- 394 1. OMS. Dengue and severe dengue. Published 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- 395
- 396 2. Cao-Lormeau V-M, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*.
397 2014;384:1571-1572. doi:10.1016/S0140-6736(14)61977-2
- 398 3. Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Lessons learned on Zika virus vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):15-17. doi:10.1371/journal.pntd.0005511
- 399
- 400 4. Coffey LL, Failloux A, Weaver SC. Chikungunya virus–vector interactions. *Viruses*.
401 2014;6:4628-4663. doi:10.3390/v6114628
- 402 5. Thomas SJ, Yoon IK. A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Hum Vaccines Immunother*. 2019;15(10):2295-2314. doi:10.1080/21645515.2019.1658503
- 403
- 404 6. Biswal S et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and
405 Adolescents. *N Engl J Med*. 2019;381(21):2009-2019. doi:10.1056/nejmoa1903869
- 406 7. Ant TH, Herd CS, Geoghegan V, Hoffmann AA, Sinkins P. The *Wolbachia* strain wAu

- 407 provides highly efficient virus transmission blocking in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.*
408 Published online 2018:1-19.
- 409 8. Hoffmann AA et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes populations* to
410 suppress dengue transmission. *Nature*. 2011;476:454-459. doi:10.1038/nature10356
- 411 9. Anders KL et al. Update to the AWED (Applying *Wolbachia* to Eliminate Dengue) trial
412 study protocol: A cluster randomised controlled trial in Yogyakarta, Indonesia. *Trials*.
413 2020;19(302):1-16. doi:10.1186/s13063-020-04367-2
- 414 10. Dutra HLC et al. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive
415 Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis.*
416 Published online 2015:1-22. doi:10.1371/journal.pntd.0003689
- 417 11. Nguyen TH et al. Field evaluation of the establishment potential of wmelpop *Wolbachia*
418 in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasites and Vectors*. 2015;8(563):1-14.
419 doi:10.1186/s13071-015-1174-x
- 420 12. Lu P, Bian G, Pan X, Xi Z. *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue
421 virus in mosquito cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7):1-8.
422 doi:10.1371/journal.pntd.0001754
- 423 13. Ross PA et al. Heatwaves cause fluctuations in wMel *Wolbachia* densities and frequencies
424 in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(1):e0007958.
425 doi:10.1371/journal.pntd.0007958
- 426 14. Gonçalves DDS et al. Detecting wMel *Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti*
427 mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasites and Vectors*.

- 428 2019;12(1):1-5. doi:10.1186/s13071-019-3666-6
- 429 15. Lee SF, White VL, Weeks AR, Hoffmann AA, Endersby NM. High-throughput PCR
430 assays to monitor *Wolbachia* infection in the dengue mosquito (*Aedes aegypti*) and
431 *Drosophila simulans*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(13):4740-4743.
432 doi:10.1128/AEM.00069-12
- 433 16. El Hamzaoui B et al. Detection of *Bartonella* spp. in fleas by MALDI-TOF MS. *PLoS
434 Negl Trop Dis*. 2018;12(2):1-14. doi:10.1371/journal.pntd.0006189
- 435 17. Tahir D et al. Assessment of MALDI-TOF mass spectrometry for filariae detection in
436 *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(12):1-18.
437 doi:10.1371/journal.pntd.0006093
- 438 18. Laroche M et al. MALDI-TOF MS as an innovative tool for detection of *Plasmodium*
439 parasites in *Anopheles* mosquitoes. *Malar J*. 2017;16(5):1-10. doi:10.1186/s12936-016-
440 1657-z
- 441 19. Yssouf A et al. Detection of *Rickettsia* spp in Ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop
442 Dis*. 2015;9(2):1-16. doi:10.1371/journal.pntd.0003473
- 443 20. Nabet C et al. Prediction of malaria transmission drivers in *Anopheles* mosquitoes using
444 artificial intelligence coupled to MALDI-TOF mass spectrometry. *Sci Rep*.
445 2020;10(11379):1-13. doi:10.1038/s41598-020-68272-z
- 446 21. Rakotonirina A et al. MALDI-TOF MS: Optimization for future uses in entomological
447 surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasites and Vectors*.
448 2020;13(359):1-12.

- 449 22. Belkin JN. *The Mosquitoes of the South Pacific (Part B)*. University of California Press;
450 1962.
- 451 23. Belkin JN. *The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae)*. Vol 1. University of
452 California Press; 1962.
- 453 24. Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: *Culicidae*)
454 associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*. 2004;589:1-60.
- 455 25. Lee DJ et al. *The Culicidae of Australian Region. Volume 4*. Australian.; 1987.
- 456 26. Yssouf A et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass
457 Spectrometry: An Emerging Tool for the Rapid Identification of Mosquito Vectors. *PLoS*
458 *One*. 2013;8(8):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0072380
- 459 27. Ismail Fawaz H, Forestier G, Weber J, Idoumghar L, Muller PA. Deep learning for time
460 series classification: a review. *Data Min Knowl Discov*. Published online 2019:1-44.
461 doi:10.1007/s10618-019-00619-1
- 462 28. OMS. *Thirteenth Meeting of the WHO Vector Control Advisory Group.*; 2020.
- 463 29. Moreira LA et al. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue,
464 Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 2009;139(7):1268-1278.
465 doi:10.1016/j.cell.2009.11.042
- 466 30. Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces
467 resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):1-10.
468 doi:10.1371/journal.ppat.1000833
- 469 31. Ross PA et al. *Wolbachia* Infections in *Aedes aegypti* Differ Markedly in Their Response

470 to Cyclical Heat Stress. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):1-17. doi:10.1371/journal.ppat.1006006

471 32. Yssouf A et al. Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph
472 by MALDI-TOF MS. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6(5):579-586.
473 doi:10.1016/j.ttbdis.2015.04.013

474 33. Pan X et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of
475 the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad
476 Sci U S A.* 2012;109(1):E23-E31. doi:10.1073/pnas.1116932108

477 34. Kokozza V et al. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin
478 a and Defensin a in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
479 2010;107(18):8111-8116. doi:10.1073/pnas.1003056107

480

481 **Acknowledgements**

482 The authors thank to Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de la Nouvelle-Calédonie and
483 the Mairie de Nouméa for their contribution during mosquito sampling. We also thank to the
484 University of Monash and the WMP for providing LAMP protocol and reagents. We are grateful
485 to Thomas Crossay for the conversation about data analysis.

486

487 **Funding**

488 The project leading to this publication received funding from the French Fund for Economic,
489 Social, Cultural and Scientific cooperation in the Pacific (“Pacific Fund”) and the Institut Pasteur
490 of New Caledonia. AR obtained a scholarship from the Institut Pasteur International Network
491 (Bourse Calmette & Yersin).

492

493 **Ethics approval and consent to participate**

494 Mosquito collection authorization was granted by authorities from the South Province of New
495 Caledonia (ordinance No. 1415-2019/ARR/DENV).

496

497 **Author contributions**

498 AR, VR, MDR, NSF and NP designed the study. AR and VB collected mosquitoes. AR, VB, MK,
499 MM and JC performed the experiments. AR, CC, VB and NP analyzed the data. All authors read
500 and approved the final manuscript.

501

502 **Competing interest**

503 The author declare that they have no competing interest.

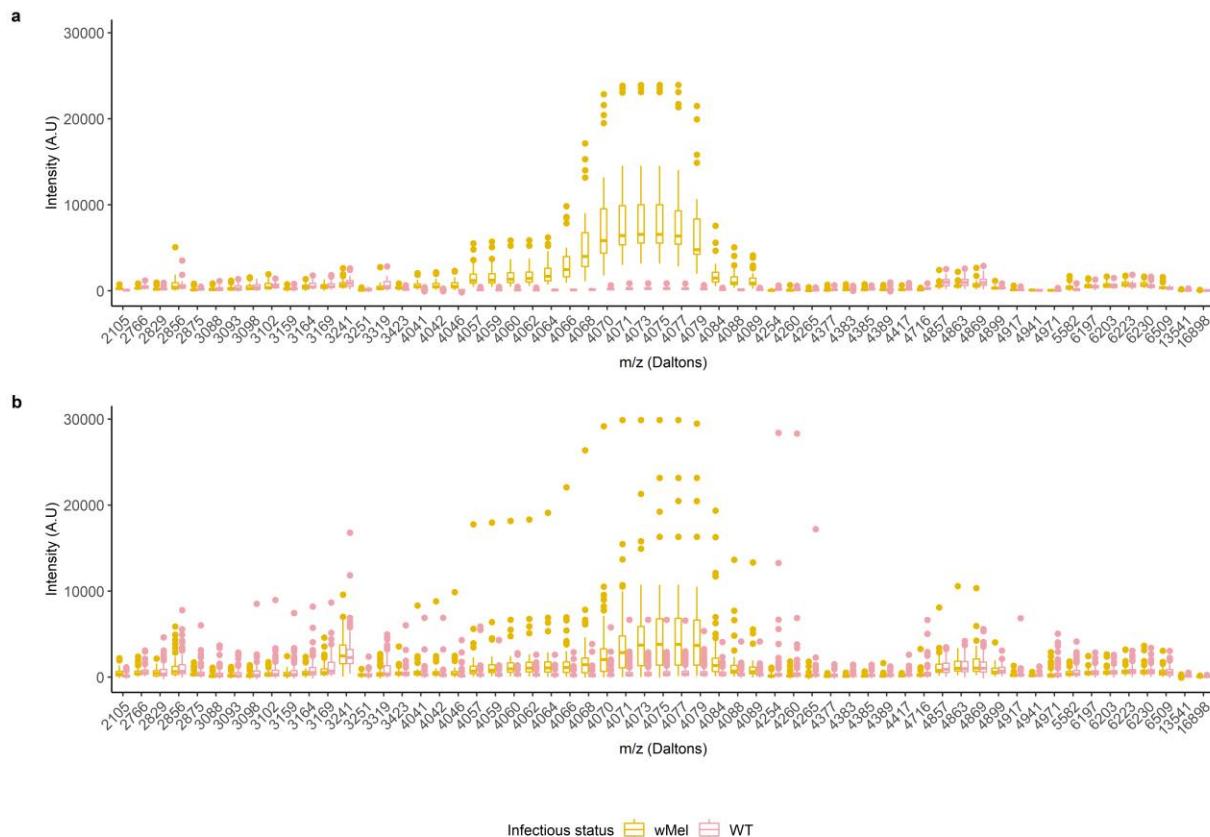
504

505 **Data availability**

506 Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

507

508 **Supplementary information**



509

510 **Supplementary Figure S1. Boxplot showing the 60 mass points of distinct m/z (Daltons)**
511 **considered over 80% by the CNN to discriminate *Ae. aegypti* infected and uninfected with**
512 ***Wolbachia*.** a: results obtained for laboratory-reared mosquitoes. b: results obtained for field
513 mosquitoes. Abbreviations: A.U, arbitrary unity; m/z , mass-to-charge ratio.

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives



Photographie de deux *Aedes aegypti* femelles (Crédit photo : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, M. Pol, 2017)

Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

Ae. albopictus et *Ae. aegypti*, deux espèces vectrices de DENV, ZIKV et CHIKV, présentent aujourd’hui une large répartition dans la région Pacifique (Belkin, 1962; Elliott, 1980; Lee *et al.*, 1987; Cooper *et al.*, 1994; Guillaumot *et al.*, 2012; Roth *et al.*, 2014a). Le Pacifique regorge également d’autres vecteurs potentiels ou avérés, notamment du DENV, que sont les *Aedes* du groupe *Scutellaris* (Guillaumot, 2005). A la faveur de l’augmentation des échanges internationaux et/ou d’une meilleure adaptation au milieu anthropique, certaines de ces espèces pourraient se disperser dans toutes la région, voir dans le monde. Pouvoir identifier ces espèces est un point essentiel en santé publique, afin de détecter au plus tôt leur introduction et de limiter leur installation par des mesures de lutte adaptés. En Nouvelle-Calédonie, en plus de la nécessité de renforcer la surveillance entomologique, il est également important de suivre l’efficacité de l’installation et de la dispersion des *Ae. aegypti* infectés par *Wolbachia* sur le terrain, afin de s’assurer de la bonne implémentation de cette nouvelle stratégie de lutte et de son maintien sur le long terme.

Devant ce contexte, ce travail de thèse s’est intéressé à développer un outil innovant permettant d’identifier les vecteurs d’arbovirus, notamment les *Aedes* du groupe *Scutellaris*, et de détecter la présence de *Wolbachia* chez les *Ae. aegypti*. Ce travail a ainsi permis de démontrer : (i) la capacité du MALDI-TOF à identifier les espèces de moustiques capturées sur le terrain, à une échelle locale, régionale et internationale, (ii) la capacité de cet outil à distinguer les espèces du groupe *Scutellaris* qui sont morphologiquement et phylogénétiquement proches et (iii) la performance du MALDI-TOF, couplé aux techniques d’analyse de données par l’intelligence artificielle, à distinguer les *Ae. aegypti* infectés ou non par *Wolbachia*.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF : un outil efficace pour identifier les moustiques à l'échelle locale, régionale et internationale.

Quelques études ont déjà démontré la capacité du MALDI-TOF à identifier les espèces de moustiques (Briolant et al., 2020; Lawrence et al., 2018; Müller et al., 2013; Nabet et al., 2021; Nebbak et al., 2016; Raharimalala et al., 2017; Vega-Rúa et al., 2018; Yssouf et al., 2013). Néanmoins, ce travail a permis de mettre en avant que différents paramètres comme la durée de piégeage sur le terrain, les méthodes et durées de conservation avant l'analyse au MALDI-TOF ainsi que le nombre de spectres de références par espèces peuvent influencer les résultats d'identification par MALDI-TOF. La prise en considération de ces paramètres permet d'optimiser l'identification des moustiques de Nouvelle-Calédonie, de la région Pacifique et des autres régions du monde. Il est particulièrement intéressant de constater que les spectres de références créés à partir des moustiques de la région Pacifique permettent d'identifier les moustiques d'Asie et de Madagascar. Il s'avère ainsi que le MALDI-TOF est un outil prometteur pour identifier les moustiques à l'échelle internationale, même avec une base de données créée à une échelle plus locale.

Cet outil présente un intérêt majeur dans le cadre de programmes de surveillances des moustiques vecteurs dans le monde. Il ne pourra cependant prendre son essor qu'à la condition qu'une base de données partagée soit mise en place, constituée de spectres de référence des différentes espèces de moustiques dans les différentes régions du monde. Ainsi, il conviendrait de concevoir une interface Web, permettant d'accéder librement et gratuitement aux spectres des moustiques, et de faire des comparaisons pour l'identification d'un individu, à l'image de GenBank et de l'outil Blast pour les séquences d'ADN, ou encore de la plateforme internet SpectraBank, contenant des spectres MALDI-TOF de bactéries (Böhme et al., 2012). Une telle base de données pourrait profiter aux différents organismes de lutte antivectorielle et de recherche en entomologie médicale.

En revanche, comme les profils protéiques peuvent être modifiés durant la métamorphose des moustiques (Yssouf et al., 2016), des librairies de spectres devront être réalisées à chacun des stades de développement des espèces contenues dans cette base de données partagée. Il

faudrait également des spectres de référence représentant les différentes parties du corps des moustiques vu que le profil de spectres peut varier selon la partie du corps utilisée (Sevestre et al., 2021; Yssouf et al., 2016). Par ailleurs, afin de s'assurer de la qualité des spectres dans la base, il conviendra de prendre en compte les différents paramètres pouvant impacter la qualité des spectres obtenus au MALDI-TOF, et d'uniformiser les protocoles d'extraction protéique.

Cas des *Aedes* du groupe *Scutellaris*

Dans ce travail, un intérêt particulier a été porté à l'identification des *Aedes* du groupe *Scutellaris*. Le MALDI-TOF s'est avéré au moins aussi performant que la technique de séquençage pour distinguer les espèces de ce groupe. Il a entre autres permis de distinguer *Ae. polynesiensis* et *Ae. pseudoscutellaris* alors que l'utilisation du gène *cox1* seul ne le permet pas. Ce groupe est constitué d'une quarantaine d'espèces, retrouvée dans la zone Asie-Pacifique (Belkin, 1962; Harbach, 2021; Lee et al., 1987). La majorité de ces espèces ont été peu étudiées, et certaines ne le sont plus du tout. Pourtant, elles pourraient jouer un rôle considérable dans une épidémie d'arbovirus au moment le plus inattendu. Un des exemples les plus frappants est celui d'*Ae. hensilli*, espèce peu connue, endémique des îles de Micronésie, qui aurait réussi à provoquer des épidémies de dengue, de Zika et de chikungunya à Yap (Ledermann et al., 2014; Savage et al., 2015). Il paraît donc particulièrement important d'approfondir les connaissances sur ces espèces, notamment sur leur dispersion, leur densité, leur préférence trophique ou encore leur capacité à transmettre des arbovirus, avec la perspective de mieux les contrôler.

Il existe plusieurs interrogations sur les *Aedes* du groupe *Scutellaris* du Pacifique, notamment sur leur origine, leur évolution et leur diffusion. Une hypothèse de Belkin (1962) suggère que les premiers *Scutellaris* du Pacifique seraient originaires d'Asie et seraient arrivées dans la région à l'occasion des migrations humaines. Selon ce même auteur, les espèces de l'Est du Pacifique semblent être plus primitives et ont été préservées de par leur isolement, tandis que les espèces de l'Ouest du Pacifique seraient plus évoluées. Cette évolution se serait produite plusieurs fois et à différentes périodes dans le passé, entraînant l'accumulation de nombreuses formes dans la zone intermédiaire entre les îles Santa Cruz et Samoa. Par ailleurs, toujours selon Belkin, *Ae. polynesiensis* et *Ae. pseudoscutellaris* sont deux espèces qui se seraient séparées récemment

(Belkin, 1962). D'autres auteurs suggèrent que ces dernières ne forment qu'une seule et même espèce de par leur capacité à se reproduire entre elles et à donner une descendance viable (Rozeboom and Gilford, 1954). Les données produites dans le présent travail, aussi bien génétique que protéique, ont confirmées une proximité forte de ces deux espèces. Il est donc possible que nous soyons face à deux espèces en cours de spéciation.

A ce jour, seules deux études sur la phylogénie classique de quelques espèces d'*Aedes* du groupe *Scutellaris* ont été publiées (Behbahani et al., 2005; Sota and Mogi, 2006), et ne permettent pas à elles seules de comprendre l'évolution de ces espèces dans le Pacifique. L'une des approches permettant de répondre à ces questions et de vérifier ces hypothèses est la technique d'horloge moléculaire, qui aiderait à retracer l'histoire de la spéciation et de la dispersion de ces espèces, en estimant le temps de divergence entre les espèces depuis leur dernier ancêtre commun. Pour ce faire, il serait intéressant de compléter les données des séquences obtenues lors de ce travail de thèse par d'autres séquences de gènes mitochondriaux et ribosomaux et d'élargir cette étude à d'autres espèces du groupe *Scutellaris* non incluses dans nos travaux. L'analyse d'un grand nombre de génomes via les méthodes de séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing*, NGS) serait également intéressante. Ce type d'étude permet d'analyser des fragments plus longs et d'observer ainsi plus de variations génétiques, par rapport aux techniques classiques de séquençage. Le NGS a récemment permis d'étudier la phylogénie et d'estimer le temps de divergence de plusieurs espèces de moustiques de différents genres, dont trois *Aedes* du groupe *Scutellaris* : *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* et *Aedes riversi* (da Silva et al., 2019).

Intérêt du MALDI-TOF couplé à des réseaux de neurones convolutifs dans le suivi et l'évaluation des stratégies de lutte.

Ce travail a également mis en évidence la capacité du MALDI-TOF, couplé à des techniques d'analyse de données par intelligence artificielle, à détecter la présence de *Wolbachia* chez des *Ae. aegypti* de terrain. Le MALDI-TOF constitue donc un outil intéressant, en complément des

autres techniques, pour suivre la dispersion des moustiques infectés par *Wolbachia* dans le temps et dans l'espace.

L'infection artificielle de la population d'*Ae. aegypti* par la souche wMel de *Wolbachia* permet de réduire sa compétence vectorielle vis-à-vis des arbovirus (Walker *et al.*, 2011; Aliota, *et al.*, 2016a, 2016b; Dutra *et al.*, 2016; Carrington *et al.*, 2017). De plus, il semble que cette infection artificielle par *Wolbachia* présente un coût pour le moustique et réduise légèrement sa durée de vie au laboratoire (Axford *et al.*, 2016). La probabilité de survie d'une population de moustique est l'un des paramètres clés de la capacité vectorielle (Johnson *et al.*, 2019), et il n'est pas impossible que ce coût de *Wolbachia* sur la durée de vie des femelles d'*Ae. aegypti*, associé à la réduction de leur compétence vectorielle, participe à l'efficacité épidémiologique de la nouvelle stratégie récemment confirmée en Indonésie (Indriani *et al.*, 2020). Il serait donc intéressant de conduire une expérimentation sur le terrain afin de comparer la structure d'âge de différentes populations d'*Ae. aegypti*, infectées ou non par la bactérie *Wolbachia*.

Cette détermination de la structure d'âge des moustiques adultes sur le terrain est également essentielle pour mesurer l'efficacité des autres stratégies de lutte antivectorielles visant à réduire la durée de vie des moustiques adultes. Plus précisément, après la mise en place de ce type de stratégie, la présence majoritaire de moustiques jeunes sur le terrain, en comparaison d'une zone non traitée, témoignerait de l'efficacité de la méthode.

Différentes techniques peuvent être utilisées pour définir l'âge des moustiques capturés sur le terrain notamment l'approche morphologique qui consiste à disséquer les ovaires pour observer les changements anatomiques induits par la reproduction (Hugo *et al.*, 2008) ou encore biochimique comme l'étude des hydrocarbures cuticulaires par chromatographie en phase gazeuse (Desena *et al.*, 1999). Ces techniques se sont avérées difficiles à mettre en œuvre et de faible précision. L'expression de certains gènes par RT-PCR a également été testée pour estimer l'âge de moustiques de terrain (Hugo *et al.*, 2010). L'efficacité de cette technique peut cependant être compromise lors des collectes de moustiques sur le terrain du fait de l'instabilité de l'ARNm. Enfin, la spectroscopie dans le proche infra-rouge a permis d'obtenir de bonnes prédictions sur

des individus de laboratoire, mais les premiers tests sur les individus de terrains se sont avérés peu concluants (Ong et al., 2020).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF, couplée avec les réseaux de neurones convolutifs, semble être un outil prometteur pour cette détermination de la structure d'âge des moustiques. En effet, cette technique a permis de prédire l'âge d'*Anopheles stephensi* de laboratoire avec une précision supérieure à 70% (Nabet et al., 2020). Ainsi, il conviendrait de développer cet outil et d'en tester la fiabilité pour déterminer la structure d'âge des populations d'*Ae. aegypti* de terrain. Un tel outil serait déterminant dans l'évaluation des stratégies de lutte et de leur cout-efficacité, comme par exemple les traitements par pulvérisation spatiale d'insecticides dont l'efficacité est de plus en plus discutée. Cet outil pourrait également être utilisé dans l'évaluation de l'impact des stratégies plus modernes, comme celles basées sur l'utilisation de *Wolbachia*, sur la structure d'âge des populations de moustiques.

Conclusions

Ce travail de thèse a permis le développement d'un outil d'identification des moustiques pouvant être utilisé à une échelle internationale. Cet outil va permettre de renforcer les capacités de réponse et de surveillance des moustiques vecteurs de dengue en Nouvelle-Calédonie et pour la région Pacifique. Ce travail a également permis d'apporter de nouveaux éléments sur les *Aedes* du groupe *Scutellaris* qui pourront servir de base pour de futures études sur ces espèces. Enfin, cette étude a permis de développer un autre outil pour évaluer l'installation et la dispersion des *Ae. aegypti* infectés par *Wolbachia*, durant et après l'implémentation d'une nouvelle stratégie de contrôle des épidémies, qui pourra être utilisé dans les autres pays ayant adoptés ce programme de lutte.



Figure 9. Cadre d'action de l'OMS pour la lutte contre les moustiques vecteurs

Les résultats de ce travail de thèse s'inscrivent donc parfaitement dans la démarche plus globale proposée par le plan d'action mondiale de lutte antivectorielle 2017-2030, élaboré par l'OMS (OMS, 2017a). En effet, ce plan préconise de renforcer la recherche fondamentale et appliquée sur les moustiques vecteurs d'arbovirus ; recherche qui constitue l'une des bases du cadre d'action de l'OMS (**figure 9**).

L'outil développé durant ces travaux va également permettre de répondre au troisième pilier de ce plan d'action de l'OMS (renforcer la surveillance des vecteurs et le suivi de l'évaluation des interventions) et de mettre en place une lutte antivectorielle efficace et durable, adaptée au contexte local.

Références bibliographiques

A

- Achee, N. L., Grieco, J. P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., Martins, A. J., Juntarajumnong, W., Corbel, V., Gouagna, C., David, J. P., Logan, J. G., Orsborne, J., Marois, E., Devine, G. J., and Vontas, J. (2019). Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>
- Albawi, S., Mohammed, T. A., and Al-Zawi, S. (2017). Understanding of a Convolutional Neural Network. *ieee.*
- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Velez, I. D., and Osorio, J. E. (2016). The wMel strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 6(28792 |), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep28792>
- Aliota, M. T., Walker, E. C., Uribe Yepes, A., Dario Velez, I., Christensen, B. M., and Osorio, J. E. (2016). The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004677>
- Ammar, S. E., McIntyre, M., Swan, T., Kasper, J., Derraik, J. G. B., Baker, M. G., and Hales, S. (2019). Intercepted mosquitoes at New Zealand's ports of entry, 2001 to 2018: Current status and future concerns. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(101), 1–18. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4030101>
- Amraoui, F., Vazeille, M., and Failloux, A. (2016). French *Aedes albopictus* are able to transmit yellow fever virus Experimental infection of mosquitoes. *Euro Surveill.*, 21(39), 1–3. www.eurosurveillance.org
- Ant, T. H., and Sinkins, S. P. (2018). A *Wolbachia* triple-strain infection generates self-incompatibility in *Aedes albopictus* and transmission instability in *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 11(295), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2870-0>
- Arias-Goeta, C., Mousson, L., Rougeon, F., and Failloux, A. B. (2013). Dissemination and Transmission of the E1-226V Variant of Chikungunya Virus in *Aedes albopictus* Are Controlled at the Midgut Barrier Level. *PLoS ONE*, 8(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057548>
- Aubry, M., Teissier, A., Roche, C., Richard, V., Yan, A. S., Zisou, K., Rouault, E., Maria, V., Lastère, S., Cao-Lormeau, Van-Mai, and Musso, D. (2015). Chikungunya Outbreak ,French Polynesia,2014. *Letters*, 21(4), 724–726.
- Aubry, M., Teissier, Y., Mapotoeke, M., Teissier, A., Giard, M., Musso, D., and Cao-Lormeau, V. (2017). High risk of dengue type 2 outbreak in French Polynesia, 2017. *Eurosurveillance*, 22(14), 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.14.30505>

- Aubry, P. (2020). Arboviroses tropicales. *Medecine Tropicale*, 1–28. www.medecinetropicale.com
- Axford, J. K., Ross, P. A., Yeap, H. L., Callahan, A. G., and Hoffmann, A. A. (2016). Fitness of wAlbB Wolbachia Infection in *Aedes aegypti*: Parameter estimates in an outcrossed background and potential for population invasion. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3), 507–516. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0608>

B

- Badolo, A., Ilboudo-Sanogo, E., Ouédraogo, A. P., and Costantini, C. (2004). Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Tropical Medicine and International Health*, 9(3), 330–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01206.x>
- Balestrino, F., Medici, A., Candini, G., Carrieri, M., MacCagnani, B., Calvitti, M., Maini, S., and Bellini, R. (2010). γ Ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. *Journal of Medical Entomology*, 47(4), 581–591. <https://doi.org/10.1603/ME09272>
- Banerjee, A. K., Kiran, K., Murty, U. S. N., and Venkateswarlu, C. (2008). Classification and identification of mosquito species using artificial neural networks. *Computational Biology and Chemistry*, 32, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.compbiochem.2008.07.020>
- Barnard, D. R., and Xue, R. De. (2004). Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 726–730. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.726>
- Basheer, I. A., and Hajmeer, M. (2000). Application of artificial neural networks (ANNs) and linear regressions (LR) to predict the deflection of concrete deep beams. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 3–31. <https://doi.org/10.12989/cac.2013.11.3.237>
- Bass, C., Williamson, M. S., and Field, L. M. (2008). Development of a multiplex real-time PCR assay for identification of members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Acta Tropica*, 107, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.009>
- Bass, C., Williamson, M. S., Wilding, C. S., Donnelly, M. J., and Field, L. M. (2007). Identification of the main malaria vectors in the *Anopheles gambiae* species complex using a TaqMan real-time PCR assay. *Malaria Journal*, 6(155), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-155>
- Batovska, J., Blacket, M. J., Brown, K., and Lynch, S. E. (2016). Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*, 6(9), 3001–3011. <https://doi.org/10.1002/ece3.2095>
- Becker, P. T., De Bel, A., Martiny, D., Ranque, S., Piarroux, R., Cassagne, C., Detandt, M., and Hendrickx, M. (2014). Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: Clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Medical Mycology*, 52, 826–834. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu064>

- Beebe, N. W., and Cooper, R. D. (2000). Systematics of malaria vectors with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group. *International Journal for Parasitology*, 30, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00171-X)
- Beebe, Nigel W., Cooper, R. D., Foley, D. H., and Ellis, J. T. (2000). Populations of the south-west Pacific malaria vector *Anopheles farauti* s.s. revealed by ribosomal DNA transcribed spacer polymorphisms. *Heredity*, 84(2), 244–253. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00665.x>
- Beebe, Nigel W., Russell, T. L., Burkot, T. R., Lobo, N. F., and Cooper, R. D. (2013). *The Systematics and Bionomics of Malaria Vectors in the Southwest Pacific*. <https://doi.org/10.5772/55999>
- Beebe, Nigel W., Whelan, P. I., Van Den Hurk, A. F., Ritchie, S. A., Corcoran, S., and Cooper, R. D. (2007). A polymerase chain reaction-based diagnostic to identify larvae and eggs of container mosquito species from the Australian region. *Journal of Medical Entomology*, 44(2), 376–380. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.2.376>
- Behbahani, A., Dutton, T. J., Davies, N., Townson, H., and Sinkins, S. P. (2005). Population differentiation and *Wolbachia* phylogeny in mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. *Medical and Veterinary Entomology*, 19, 66–71.
- Belkin, J. N. (1962). *The mosquitoes of the south pacific (Diptera, Culicidae)* (Vol. 1). University of California Press.
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., and Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian Urban Areas. *Journal of Medical Entomology*, 50(2), 317–325. <https://doi.org/10.1603/ME12048>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, W. G. R., Simon, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., and Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.
- Biswal, S., Reynales, H., Saez-Llorens, X., Lopez, P., Borja-Tabora, C., Kosalaraksa, P., Sirivichayakul, C., Watanaveeradej, V., Rivera, L., Espinoza, F., Fernando, L., Dietze, R., Luz, K., Venâncio da Cunha, R., Jimeno, J., López-Medina, E., Borkowski, A., Brose, M., Rauscher, M., ... Wallace, D. (2019). Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. *New England Journal of Medicine*, 381(21), 2009–2019. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1903869>
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., and Prod'hom, G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1549–1554. <https://doi.org/10.1128/JCM.01794-09>

- Blagrove, M. S. C., Arias-Goeta, C., Di Genua, C., Failloux, A. B., and Sinkins, S. P. (2013). A *Wolbachia* wMel Transinfection in *Aedes albopictus* Is Not Detrimental to Host Fitness and Inhibits Chikungunya Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002152>
- Blagrove, M. S. C., Arias-Goeta, C., Failloux, A. B., and Sinkins, S. P. (2012). *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), 255–260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112021108>
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., and Calo-Mata, P. (2012). SpectraBank: An open access tool for rapid microbial identification by MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, 33, 2138–2142. <https://doi.org/10.1002/elps.201200074>
- Bonizzoni, M., Gasperi, G., and Anthony A., J. (2014). The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and Future Perspectives. *Trends in Parasitology*, 29(9), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
- Bonneau, M., Landmann, F., Labbé, P., Justy, F., Weill, M., and Sicard, M. (2018). The cellular phenotype of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* in the light of cidB diversity. *PLoS Pathogens*, 14(10), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007364>
- Börstler, J., Lühken, R., Rudolf, M., Steinke, S., Melaun, C., Becker, S., Garms, R., and Krüger, A. (2014). The use of morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 204–212. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12088.x>
- Bourtzis, K., Braig, H. R., and Karr, T. L. (2003). Cytoplasmic incompatibility. In *Insect Symbiosis* (pp. 217–246). <https://doi.org/10.1201/9780203009918>
- Briolant, S., Costa, M. M., Nguyen, C., Dusfour, I., de Santi, V. P., Girod, R., and Almeras, L. (2020). Identification of French Guiana anopheline mosquitoes by MALDI-TOF MS profiling using protein signatures from two body parts. *PLoS ONE*, 15(8), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098>
- Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A., and Powell, J. R. (2014). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, 68(2), 514–525. <https://doi.org/10.1111/evo.12281>
- Burkot, T. R., Handzel, T., Schmaedick, M. A., Tufa, J., Roberts, J. M., and Graves, P. M. (2007). Productivity of natural and artificial containers for *Aedes polynesiensis* and *Aedes aegypti* in four American Samoan villages. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 22–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2007.00667.x>

C

- Calvez, E., Guillaumot, L., Girault, D., Richard, V., O'Connor, O., Paoaafaite, T., Teurlai, M., Pocquet, N., Cao-Lormeau, V. M., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2017). Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasites & Vectors*, 10(381), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2319-x>
- Calvez, E., Guillaumot, L., Millet, L., Marie, J., Bossin, H., Rama, V., Faamoe, A., Kilama, S., Teurlai, M., Mathieu-Daudé, F., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2016). Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004374>
- Calvez, E., Mousson, L., Vazeille, M., O'Connor, O., Cao-Lormeau, V.-M., Mathieu-Daudé, F., Pocquet, N., Failloux, A.-B., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2018). Zika virus outbreak in the Pacific: Vector competence of regional vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006637>
- Calvez, E., Pocquet, N., Malau, A., Kilama, S., Taugamoa, A., Labrousse, D., Boussès, P., Failloux, A. B., Dupont-Rouzeyrol, M., and Mathieu-Daudéid, F. (2020). Assessing entomological risk factors for arboviral disease transmission in the French Territory of the Wallis and Futuna Islands. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008250>
- Caminade, C., Medlock, J. M., Ducheyne, E., McIntyre, K. M., Leach, S., Baylis, M., and Morse, A. P. (2012). Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: Recent trends and future scenarios. *Journal of the Royal Society Interface*, 9, 2708–2717. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0138>
- Cao-Lormeau, V.-M., and Musso, D. (2014). Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*, 384, 1571–1572. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61977-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61977-2)
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Musso, D., Mallet, H. P., Dalipanda, T., Dofai, A., Nogareda, F., Nilles, E. J., and Aaskov, J. (2014). Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), 1034–1036. <https://doi.org/10.3201/eid2006.131413>
- Carbonnelle, E., Grohs, P., Jacquier, H., Day, N., Tenza, S., Dewailly, A., Vissouarn, O., Rottman, M., Herrmann, J. L., Podglajen, I., and Raskine, L. (2012). Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *Journal of Microbiological Methods*, 89, 133–136. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.003>
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., Ferroni, A., Gutmann, L., and Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>
- Carbonnelle, É., and Nassif, X. (2011). Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Medecine/Sciences*, 27, 882–888. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112710017>

- Carrington, L. B., Tran, B. C. N., Le, N. T. H., Luong, T. T. H., Nguyen, T. T., Nguyen, P. T., Nguyen, C. V. V., Nguyen, H. T. C., Vu, T. T., Vo, L. T., Le, D. T., Vu, N. T., Nguyen, G. T., Luu, H. Q., Dang, A. D., Hurst, T. P., O'Neill, S. L., Tran, V. T., Kien, D. T. H., ... Simmons, C. P. (2017). Field- and clinically derived estimates of *Wolbachia*-mediated blocking of dengue virus transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), 361–366. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715788115>
- Chang, C., Ortiz, K., Ansari, A., and Gershwin, M. E. (2016). The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*, 68, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>
- Chatpiyaphat, K., Sumruayphol, S., Dujardin, J. P., Samung, Y., Phayakkaphon, A., Cui, L., Ruangsittichai, J., Sungvornyothisin, S., Sattabongkot, J., and Sriwichai, P. (2020). Geometric morphometrics to distinguish the cryptic species *Anopheles minimus* and *An. harrisoni* in malaria hot spot villages, western Thailand. *Medical and Veterinary Entomology*. <https://doi.org/10.1111/mve.12493>
- Chepkorir, E., Lutomiah, J., Mutisya, J., Mulwa, F., Limbaso, K., Orindi, B., Ng'Ang'a, Z., and Sang, R. (2014). Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Kilifi and Nairobi for dengue 2 virus and the influence of temperature. *Parasites and Vectors*, 7(435), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-435>
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., Dupont-Rouzeyrol, M., Lourenço-de-Oliveira, R., and Failloux, A. B. (2016). Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004543>
- Cooper, R. D., Waterson, D. G. E., Kupo, M., and Sweeney, A. W. (1994). *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in the Western Province of Papua New Guinea and the Threat of its Introduction to Australia. *Australian Journal of Entomology*, 33, 115–116. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1994.tb00933.x>
- Crossay, T., Antheaume, C., Redecker, D., Bon, L., Chedri, N., Richert, C., Guentas, L., Cavaloc, Y., and Amir, H. (2017). New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. *Scientific Reports*, 7(14306), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14487-6>
- Croxatto, A., Prod'hom, G., and Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- Cuervo-Parra, J. A., Cortés, T. R., and Ramirez-Lepe, M. (2016). Mosquito-Borne Diseases, Pesticides Used for Mosquito Control, and Development of Resistance to Insecticides. In *Insecticides Resistance* (pp. 111–134). <https://doi.org/10.5772/61510>
- Curtis, C. (2005). Insecticide-treated nets against malaria vectors and polystyrene beads against *Culex* larvae. *Trends in Parasitology*, 21(11), 504–507. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.025>

D

- da Silva, A. F., Machado, L. C., de Paula, M. B., da Silva Pessoa Vieira, C. J., de Moraes Bronzoni, R. V., de Melo Santos, M. A. V., and Wallau, G. L. (2019). Time and mode of *Culicidae* evolutionary history. *BioRxiv*, 1–47. <https://doi.org/10.1101/871145>
- Darriet, F. (2007). *Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides* (IRD Edition).
- De Oliveira, C. D., Gonçalves, D. S., Baton, L. A., Shimabukuro, P. H. F., Carvalho, F. D., and Moreira, L. A. (2015). Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential human disease vectors. *Bulletin of Entomological Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000085>
- Desena, M. L., Clark, J. M., Edman, J. D., Symington, S. B., Scott, T. W., Clark, G. G., and Peters, T. M. (1999). Potential for aging female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by gas chromatographic analysis of cuticular hydrocarbons, including a field evaluation. *Journal of Medical Entomology*, 36(6), 811–823. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.6.811>
- Diallo, M., Ba, Y., Faye, O., Soumare, M. L., Dia, I., and Sall, A. A. (2008). Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.010>
- Diarra, A. Z., Laroche, M., Berger, F., and Parola, P. (2019). Use of MALDI-TOF MS for the identification of Chad mosquitoes and the origin of their blood meal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(1), 47–53. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0657>
- Dieme, C., Yssouf, A., Vega-Rúa, A., Berenger, J. M., Failloux, A. B., Raoult, D., Parola, P., and Almeras, L. (2014). Accurate identification of *Culicidae* at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0544-0>
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., and Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0805715>
- Dupont-Rouzeyrol, M., Aubry, M., O'Connor, O., Roche, C., Gourinat, A. C., Guigon, A., Pyke, A., Grangeon, J. P., Nilles, E., Chanteau, S., Aaskov, J., and Cao-Lormeau, V. M. (2014). Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001–2013. *Virology Journal*, 11(61), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-61>
- Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thibierge, J.-M., Baroux, N., Gourinat, A.-C., Grandadam, M., and Failloux, A.-B. (2012). Chikungunya Virus and the Mosquito Vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(12), 1036–1041. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0937>

Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daures, M., John, M., Grangeon, J. P., and Gourinat, A.-C. (2015). Co-infection with zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 381–382. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141553>

Dutra, H. L. C., Rocha, M. N., Dias, F. B. S., Mansur, S. B., Caragata, E. P., and Moreira, L. A. (2016). *Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian Aedes aegypti Mosquitoes. Cell Host and Microbe*, 19(6), 771–774. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.021>

Duvallet, G., Fontenille, D., and Robert, V. (2017). *Entomologie médicale et vétérinaire* (IRD Edition).

Dyck, V. A., Hendrichs, J., and Robinson, A. S. (2005). Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management. In *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (Springer). <https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2>

Dye, C. (1992). *The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects*. 37, 1–19.

E

Elliott, S. A. (1980). *Aedes albopictus* in the Solomon and Santa Cruz islands, South pacific. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(6), 747–748. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(80\)90192-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(80)90192-3)

F

Failloux, A.-B., and Hervé, J.-P. (2003). Bio-écologie et compétence vectorielle d'*Aedes aegypti*. In *La dengue dans les départements français d'Amérique* (IRD Edition, pp. 3–15). <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.2705>

Fanello, C., Santolamazza, F., and Della Torre, A. (2002). Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*, 16, 461–464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2002.00393.x>

Fernandes, R. S., Connor, O. O., Bersot, M. I. L., Girault, D., Dokunengo, M. R., Pocquet, N., Dupont-rouzeyrol, M., and Lourenço-de-oliveira, R. (2020). Vector Competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for Three Zika Virus Lineages. *Pathogens*, 9(575), 1–17.

Ferri, G., Alù, M., Corradini, B., Licata, M., and Beduschi, G. (2009). Species identification through DNA “barcodes”. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(3), 1–6. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2008.0144>

Focks, D. A. (2003). A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors. In *World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.

Freier, J. E., and Rosen, L. (1987). Vertical Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes of the *Aedes scutellaris* Group. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(3), 640–647.

G

Garrett-Jones, C., and Grab, B. (1964). The Assessment of Insecticidal Impact on the Malaria Mosquito's Vectorial Capacity, from Data on the Proportion of Parous Females. *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 71–86.

Gaythorpe, K. A. M., Hamlet, A. T. P., Jean, K., Ramos, D. G., Cibrelus, L., Garske, T., and Ferguson, N. M. (2021). The global burden of yellow fever. *MedRxiv*, 1–22. <https://doi.org/10.1101/2020.10.14.20212472>

Gloria-Soria, A., Chiodo, T. G., and Powell, J. R. (2018). Lack of Evidence for Natural *Wolbachia* Infections in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 55(5), 1354–1356. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy084>

Gonçalves, D. D. S., Hooker, D. J., Dong, Y., Baran, N., Kyrylos, P., Iturbe-Ormaetxe, I., Simmons, C. P., and O'Neill, S. L. (2019). Detecting wMel *Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3666-6>

Gratz, N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 18, 215–227. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x>

Gubler, D. J. (2009). Vector-borne diseases. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 28(2), 583–588. <https://doi.org/10.20506/rst.28.2.1904>

Guillaumot, L. (2005). Arbovirus and their vectors in Pacific-Status report. *Pacific Health Surveillance and Response*, 12(2), 45–52.

Guillaumot, L., Ofanoa, R., Swillen, L., Singh, N., Bossin, H. C., and Schaffner, F. (2012). Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in southwestern Pacific countries, with a first report from the Kingdom of Tonga. *Parasites & Vectors*, 5(247), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-247>

Gunay, F., Picard, M., and Robert, V. (2018). *MosKeyTool, an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean* (Version 2.1). [Accessed 03 Aug 2018]. www.medilabsecure.com/moskeytool

Gutiérrez, M. A. C., Vivero, R. J., Vélez, I. D., Porter, C. H., and Uribe, S. (2014). DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *PLoS ONE*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085496>

H

- Harbach, R. E. (2021). *Mosquito taxonomic inventory*. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/8734> [accessed on 06 December 2020]
- Henchal, E. A., and Putnak, J. R. (1990). The Dengue Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(4), 376–396. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.4.376>
- Hertig, M, and Wolbach, S. B. (1924). Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *The Journal of Medical Research*, 329–374. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19972605> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/abstract.cgi?artid=PMC2041761>
- Hertig, Marshall. (1936). The *Rickettsia, Wolbachia pipiensis* (Gen. Et Sp. N.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, 28(4), 453–486. <https://doi.org/10.1017/S0031182000022666>
- Ho, B. C., Ewert, A., and Chew, L. M. (1989). Interspecific competition among *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Ae. triseriatus* (Diptera: Culicidae): larval development in mixed cultures. *Journal of Medical Entomology*, 26(6), 615–623. <https://doi.org/10.1093/jmedent/26.6.615>
- Howard, A. F. V. (2013). Control with arthropods. In *Biological and Environmental Control of Disease Vectors* (pp. 10–24). <https://doi.org/10.1079/9781845939861.0010>
- Huang, Y., and Hitchcock, J. (1980). A revision of the *Aedes scutellaris* group of Tonga (Diptera : Culicidae). *Contribution of the American Entomological Institute*, 17, 1–107.
- Huang, Y. M., and Hitchcock, J. C. (1980). Medical Entomology studies - XII. A revision of the *Aedes Scutellaris* group of Tonga (Diptera; Culicidae). *Contributions of the American Entomological Institute*, 17(3), 1–107. <https://academic.oup.com/neurosurgery/article-abstract/44/5/925/2812548>
- Huber, K., Loan, L. Le, Hoang, T. H., Tien, T. K., Rodhain, F., and Failloux, A. B. (2003). *Aedes aegypti* in South Vietnam: Ecology, genetic structure, vectorial competence and resistance to insecticides. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34(1), 81–86.
- Hugo, L. E., Quick-Miles, S., Kay, B. H., and Ryan, P. A. (2008). Evaluations of mosquito Age grading techniques based on morphological changes. *Journal of Medical Entomology*, 45(3), 353–369. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[353:EOMAGT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[353:EOMAGT]2.0.CO;2)
- Hugo, Leon E., Cook, P. E., Johnson, P. H., Rapley, L. P., Kay, B. H., Ryan, P. A., Ritchie, S. A., and O'Neill, S. L. (2010). Field validation of a transcriptional assay for the prediction of age of uncaged *Aedes aegypti* mosquitoes in Northern Australia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000608>

- Ibarra, J. E., Del Rincón, M. C., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., De Oliveira, C. M. F., Lanz, H., Rodriguez, M. H., Sánchez, J., Peña, G., and Bravo, A. (2003). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5269–5274. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5269-5274.2003>
- Indriani, C., Tantowijoyo, W., Rancès, E., Andari, B., Prabowo, E., Yusdi, D., Ansari, M. R., Wardhana, D. S., Supriyati, E., Nurhayati, I., Ernesia, I., Setyawan, S., Fitriana, I., Arguni, E., Amelia, Y., Ahmad, R. A., Jewell, N. P., Dufault, S. M., Ryan, P. A., ... Utarini, A. (2020). Reduced dengue incidence following deployments of *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* in Yogyakarta, Indonesia: A quasi-experimental trial using controlled interrupted time series analysis. *MedRxiv*, May, 1–16. <https://doi.org/10.1101/2020.03.15.20036566>
- Inizan, C., Connor, O. O., Worwor, G., Cabemaiwai, T., Grignon, J., Girault, D., Minier, M., Prot, M., Ballan, V., Pakoa, G. J., Grangeon, J., Guyant, P., Lepers, C., Faktaufon, D., Sahukhan, A., and Merilles, O. E. (2020). Molecular Characterization of Dengue Type 2. *Viruses*, 12(1081), 1–8. <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/10/1081>
- Inizan, C., Tarantola, A., O'Connor, O., Mangeas, M., Pocquet, N., Forfait, C., Descloux, E., Gourinat, A. C., Pfannstiel, A., Klement-Frutos, E., Menkes, C., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2019). Dengue in New Caledonia: Knowledge and gaps. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(95), 1–6. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020095>
- IPNC. (2016). *Rapport d'activité - Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie*. 1–24.

J

- Johnson, B. J., Hugo, L. E., Churcher, T. S., Ong, O. T. W., and Devine, G. J. (2019). Mosquito Age Grading and Vector-Control Programmes. *Trends in Parasitology*, 36(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.011>
- Jourdain, F., Picard, M., Sulesco, T., Haddad, N., Harrat, Z., Sawalha, S. S., Günay, F., Kanani, K., Shaibi, T., Akhramenko, D., Sarih, M., Velo, E., Paronyan, L., Pajovic, I., Faraj, C., Sikharulidze, I., Putkaradze, D., Maric, J., Bosevska, G., ... Robert, V. (2018). Identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae): an external quality assessment of medical entomology laboratories in the MediLabSecure Network. *Parasites and Vectors*, 11(553), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3127-7>

K

- Kamber, T., Koekemoer, L. L., and Mathis, A. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for *Anopheles funestus* group and *Anopheles gambiae* complex species. *Medical and Veterinary Entomology*, 34, 295–301. <https://doi.org/10.1111/mve.12437>

Kamgang, B., Vazeille, M., Tedjou, A. N., Wilson-Bahun, T. A., Yougang, A. P., Mousson, L., Wondji, C. S., and Failloux, A. B. (2019). Risk of dengue in central africa: Vector competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) populations and dengue 2 virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007985>

Kent, R. J., Deus, S., Williams, M., and Savage, H. M. (2010). Development of a Multiplexed Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay to Identify Common Members of the Subgenera *Culex* (*Culex*) and *Culex* (*Phenacomyia*) in Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 285–291. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0077>

Kittayapong, P., Baimai, V., and O'Neill, S. L. (2002). Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(1), 108–111. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.108>

Kostrzewska, M., and Maier, T. (2016). Criteria for Development of MALDI-TOF Mass Spectral Database. In *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology* (pp. 39–54). <https://doi.org/10.1002/9781118960226.ch2>

Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H. J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*, 4, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>

Kucharski, A. J., Kama, M., Watson, C. H., Aubry, M., Funk, S., Henderson, A. D., Brady, O. J., Vanhomwegen, J., Manuguerra, J. C., Lau, C. L., Edmunds, W. J., Aaskov, J., Nilles, E. J., Cao-Lormeau, V. M., Hue, S., and Hibberd, M. (2018). Using paired serology and surveillance data to quantify dengue transmission and control during a large outbreak in Fiji. *BioRxiv*, 1–26. <https://doi.org/10.1101/246116>

Kuclu, O., Aldemir, A., and Demirci, B. (2011). Altitudinal variation in the morphometric characteristics of *Aedes vexans* Meigen from northeastern Turkey. *Journal of Vector Ecology*, 36(1), 30–41. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00138.x>

L

Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., and Castillo, C. (2016). Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 2015–2017.

Laroche, M., Almeras, L., Pecchi, E., Bechah, Y., Raoult, D., Viola, A., and Parola, P. (2017). MALDI-TOF MS as an innovative tool for detection of *Plasmodium* parasites in *Anopheles* mosquitoes. *Malaria Journal*, 16(5), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1657-z>

Lawrence, A. L., Batovska, J., Webb, C. E., Lynch, S. E., Blacket, M. J., Jan, Š., Parola, P., and Laroche, M. (2018). Accurate identification of Australian mosquitoes using protein profiling. *Parasitology*, 1–10.

- Ledermann, J. P., Guillaumot, L., Yug, L., Saweyog, S. C., Tided, M., Machieng, P., Pretrick, M., Marfel, M., Griggs, A., Bel, M., Duffy, M. R., Hancock, W. T., Ho-Chen, T., and Powers, A. M. (2014). *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003188>
- Lee, D. J., Hicks, M. M., Griffiths, M., Debenham, M. L., Bryan, J. H., Russel, R. C., Geary, M., and Marks, E. . (1987). *The Culicidae of Australian region. Volume 4* (Australian).
- Lee, H. L., and Rohani, A. (2005). Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. *Dengue Bulletin*, 29, 106–111.
- Lee, S. F., White, V. L., Weeks, A. R., Hoffmann, A. A., and Endersby, N. M. (2012). High-throughput PCR assays to monitor *Wolbachia* infection in the dengue mosquito (*Aedes aegypti*) and *Drosophila simulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), 4740–4743. <https://doi.org/10.1128/AEM.00069-12>
- Levine, R. S., Peterson, A. T., and Benedict, M. Q. (2004). Geographic and ecologic distributions of the *Anopheles gambiae* complex predicted using a genetic algorithm. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2), 105–109. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.105>
- Li, Y., Kamara, F., Zhou, G., Puthiyakunnon, S., Li, C., Liu, Y., Zhou, Y., Yao, L., Yan, G., and Chen, X. G. (2014). Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003301>
- Liu, Z., and Schey, K. L. (2005). Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.12.018>
- Lobo, N. F., St. Laurent, B., Sikaala, C. H., Hamainza, B., Chanda, J., Chinula, D., Krishnankutty, S. M., Mueller, J. D., Deason, N. A., Hoang, Q. T., Boldt, H. L., Thumloup, J., Stevenson, J., Seyoum, A., and Collins, F. H. (2015). Unexpected diversity of *Anopheles* species in Eastern Zambia: Implications for evaluating vector behavior and interventions using molecular tools. *Scientific Reports*, 5(17952), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep17952>
- Lorenz, C., Almeida, F., Almeida-Lopes, F., Louise, C., Pereira, S. N., Petersen, V., Vidal, P. O., Virginio, F., and Suesdek, L. (2017). Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.029>
- Lorenz, C., Ferrando, A. S., and Suesdek, L. (2015). Artificial Neural Network applied as a methodology of mosquito species identification. *Acta Tropica*, 152, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.011>

Lorenz, C., and Suesdek, L. (2013). Short report: Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5), 928–931. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0359>

Lühken, R., Czajka, C., Steinke, S., Jöst, H., Schmidt-Chanasit, J., Pfitzner, W., Becker, N., Kiel, E., Krüger, A., and Tannich, E. (2016). Distribution of individual members of the mosquito *Anopheles maculipennis* complex in Germany identified by newly developed real-time PCR assays. *Medical and Veterinary Entomology*, 30, 144–154. <https://doi.org/10.1111/mve.12161>

Lwande, O. W., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J., and Bucht, G. (2020). Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(2), 71–81. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2486>

M

Mackerras, I. M. (1946). Transmission of dengue fever by *Aedes (Stegomyia) scutellaris* Walk. in New Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(3), 295–312.

Mains, J. W., Kelly, P. H., Dobson, K. L., Petrie, W. D., and Dobson, S. L. (2019). Localized Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Miami, FL, via Inundative Releases of *Wolbachia*-Infected Male Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 56(5), 1296–1303. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz051>

Marchi, S., Viviani, S., Montomoli, E., Tang, Y., Boccuto, A., Vicenti, I., Zazzi, M., Sow, S., Diallo, A., Idoko, O. T., Bhat, N., and Trombetta, C. M. (2020). Zika virus in west africa: A seroepidemiological study between 2007 and 2012. *Viruses*, 12(641), 1–10. <https://doi.org/10.3390/v12060641>

Marks, E. . (1954). A review of the *Aedes scutellaris* subgroup with a study of variation in *Aedes pseudoscutellaris* (Theobald) (Diptera : Culicidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, 3(10), 349–414.

Martina, B. E. E., Koraka, P., and Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–581. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>

Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., Donnio, P. Y., Février, F., Le Coustoumier, A., and Bifani, P. (2007). La PCR en temps réel: Principe et application en infectiologie. *Antibiotiques*, 9, 205–211. [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(07\)91380-1](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(07)91380-1)

McBride, C. S., Baier, F., Omondi, A. B., Spitzer, S. A., Lutomiah, J., Sang, R., Ignell, R., and Vosshall, L. B. (2014). Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature*, 515(7526), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature13964>

- Mewara, A., Sharma, M., Kaura, T., Zaman, K., Yadav, R., and Sehgal, R. (2018). Rapid identification of medically important mosquitoes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2854-0>
- Monath, T. P. (2005). Yellow fever vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 4(4), 553–574. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.4.553>
- Moore, P. R., Johnson, P. H., Smith, G. A., Ritchie, S. A., and Van Den Hurk, A. F. (2007). Infection and dissemination of dengue virus type 2 in *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes scutellaris* from the Torres Strait, Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(4), 383–388. <https://doi.org/10.2987/5598.1>
- Morales Vargas, R. E., Ya-umphan, P., Phumala-Morales, N., Komalamisra, N., and Dujardin, J. P. (2010). Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.01.004>
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D., and Sircoulon, J. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde* (J. Libbey).
- Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J. P., and Weetman, D. (2017). Correction to: Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009084>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Müller, P., Pflüger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., and Lengeler, C. (2013). Identification of Cryptic *Anopheles* Mosquito Species by Molecular Protein Profiling. *PLoS ONE*, 8(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057486>
- Müller, R., Reuss, F., Kendrovski, V., and Montag, D. (2019). Vector Borne diseases. In *Biodiversity and Health in the Face of Climate Change* (Springer O, pp. 159–173). https://doi.org/10.1007/978-3-030-02318-8_8
- Murray, J. V., Jansen, C. C., and De Barro, P. (2016). Risk Associated with the Release of *Wolbachia*-Infected *Aedes aegypti* Mosquitoes into the Environment in an Effort to Control Dengue. *Frontiers in Public Health*, 4(43), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00043>
- Musso, D., Nilles, E. J., and Cao-Lormeau, V. M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), 595–596. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>
- Musso, Didier, and Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487–524. <https://doi.org/10.5206/uwomj.v85i2.4143>

Mutebi, J. P., and Barrett, A. D. T. (2002). The epidemiology of yellow fever in Africa. *Microbes and Infection*, 4(2002), 1459–1468. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)00028-X)

N

- Nabet, C., Chaline, A., Franetich, J. F., Brossas, J. Y., Shahmirian, N., Silvie, O., Tannier, X., and Piarroux, R. (2020). Prediction of malaria transmission drivers in *Anopheles* mosquitoes using artificial intelligence coupled to MALDI-TOF mass spectrometry. *Scientific Reports*, 10(11379), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68272-z>
- Nabet, C., Kone, A. K., Dia, A. K., Sylla, M., Gautier, M., Yattara, M., Thera, M. A., Faye, O., Braack, L., Manguin, S., Beavogui, A. H., Doumbo, O., Gay, F., and Piarroux, R. (2021). New assessment of *Anopheles* vector species identification using MALDI - TOF MS. *Malaria Journal*, 20(33), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03557-2>
- Nebbak, A., and Almeras, L. (2020). Identification of *Aedes* mosquitoes by MALDI-TOF MS biotyping using protein signatures from larval and pupal exuviae. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04029-x>
- Nebbak, A., Koumare, S., Willcox, A. C., Berenger, J. M., Raoult, D., Almeras, L., and Parola, P. (2017). Field application of MALDI-TOF MS on mosquito larvae identification. *Parasitology*, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001354>
- Nebbak, A., Willcox, A. C., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P., and Almeras, L. (2016). Standardization of sample homogenization for mosquito identification using an innovative proteomic tool based on protein profiling. *Proteomics*, 1–34. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600287>. This
- Nebbak, A., Willcox, A. C., Koumare, S., Berenger, J.-M., Raoult, D., Parola, P., Fontaine, A., Briolant, S., and Almeras, L. (2018). Longitudinal monitoring of environmental factors at *Culicidae* larval habitats in urban areas and their association with various mosquito species using an innovative strategy. *Pest Management Science*, 33(0). <https://doi.org/10.1002/ps.5196>
- Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti*: biology and ecology. In *Pan American Health Organization* (pp. 1–50). http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/28514/PNSP8664_eng.pdf?sequence=1
- Nhan, T.-X., Claverie, A., Roche, C., Teissier, A., Colleuil, M., Cao-Lormeau, V.-M., and Musso, D. (2014). Chikungunya Virus Imported into French Polynesia , Find emerging infectious disease information on. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1773–1774.
- Nhan, T. X., and Musso, D. (2015). The burden of chikungunya in the Pacific. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(6), e47–e48. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.018>
- Niare, S., Berenger, J. M., Dieme, C., Doumbo, O., Raoult, D., Parola, P., and Almeras, L. (2016). Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. *Malaria Journal*, 15(87), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1152-6>

Noda, S., Yamamoto, S., Toma, T., and Taulung, L. (2013). Distribution of mosquito larvae on Kosrae Island, Kosrae State, the Federated States of Micronesia. *Tropical Medicine and Health*, 41(4), 157–161. <https://doi.org/10.2149/tmh.2013-08>

O

O'connor, O., Calvez, E., Inizan, C., Pocquet, N., Richard, V., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2020). Vector competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008303>

O'Neill, S. L., Ryan, P. A., Turley, A. P., Wilson, G., Hurst, T. P., Retzki, K., Brown-Kenyon, J., Hodgson, L., Kenny, N., Cook, H., Montgomery, B. L., Paton, C. J., Ritchie, S. A., Hoffmann, A. A., Jewell, N. P., Tanamas, S. K., Anders, K. L., and Simmons, C. P. (2020). Establishment of wMel *Wolbachia* in *Aedes aegypti* mosquitoes and reduction of local dengue transmission in Cairns and surrounding locations in northern Queensland, Australia. *Gates Open Research*, 3(1547), 1–32. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.13061.1>

O'Neill, S. L., Ryan, P. A., Turley, A. P., Wilson, G., Retzki, K., Iturbe-Ormaetxe, I., Dong, Y., Kenny, N., Paton, C. J., Ritchie, S. A., Brown-Kenyon, J., Stanford, D., Wittmeier, N., Anders, K. L., and Simmons, C. P. (2019). Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from *Aedes* transmitted arboviruses. *Gates Open Research*, 2(36), 1–27. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12844.1>

O'Shea, K., and Nash, R. (2015). *An Introduction to Convolutional Neural Networks*. 1–11. <http://arxiv.org/abs/1511.08458>

Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H. P., Musso, D., and Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-barré syndrome -case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, 1–3. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720>

Oliva, C. F., Jacquet, M., Gilles, J., Lemperiere, G., Maquart, P. O., Quilici, S., Schooneman, F., Vreyzen, M. J. B., and Boyer, S. (2012). The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating Vigour of Sterilized Males. *PLoS ONE*, 7(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049414>

OMS. (2009). *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. <https://doi.org/10.1176/pn.41.1.0029b>

OMS. (2015). Vector control and personal protection of migrant and mobile populations in the GMS: A matrix guidance on the best options and methodologies. In *Regional Office of South-East Asia*. <http://www.who.int/iris/handle/10665/204341>

OMS. (2016). Vector Surveillance and Control at Ports, Airports, and Ground Crossings. *International Health Regulations*, 1–84. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204660/1/9789241549592_eng.pdf

- OMS. (2017a). *Global Vector Control Response 2017 - 2030*.
- OMS. (2017b). *Guide pour la prise en charge*. <http://www.who.int>.
- OMS. (2019a). *Fièvre jaune*.
- OMS.(2019b). World malaria report 2019. In *WHO Regional Office for Africa*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- OMS. (2020a). *Chikungunya*. [Accessed 21 Apr 2021] <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chikunguny>.
- OMS. (2020b). *Dengue and severe dengue*. [Accessed 21 Apr 2021] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- OMS. (2020c). Fièvre Jaune. *Normes de Surveillance Des Maladies Évitables Par La Vaccination*, 1–18.
- OMS. (2020d). *Maladies à transmission vectorielle*. [Accessed 21 Apr 2021] <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- OMS. (2020e). *Thirteenth meeting of the WHO Vector Control Advisory Group*.
- OMS.(2021). *Stratégie de lutte anti-vectorielle*. [Accessed 21 Apr 2021] https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/fr/
- Ong, O. T. W., Kho, E. A., Esperança, P. M., Freebairn, C., Dowell, F. E., Devine, G. J., and Churcher, T. S. (2020). Ability of near-infrared spectroscopy and chemometrics to predict the age of mosquitoes reared under different conditions. *Parasites and Vectors*, 13(160), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04031-3>

P

- Park, J., Kim, D. I., Choi, B., Kang, W., and Kwon, H. W. (2020). Classification and Morphological Analysis of Vector Mosquitoes using Deep Convolutional Neural Networks. *Scientific Reports*, 10(1012), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57875-1>
- Pasternak, J. (2012). New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein (São Paulo, Brazil)*, 10(1), 118–119. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000100026>
- Pates, H., and Curtis, C. (2005). Mosquito behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*, 50, 53–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130439>
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., and Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, 11, 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- Perry, W. J. (1950a). Biological and Crossbreeding Studies on *Aedes hebrideus* and *Aedes pernotatus* (Diptera, Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 43, 123–136. <https://doi.org/10.1093/aesa/43.1.123>

- Perry, W. J. (1950b). The mosquitoes and mosquito-borne diseases on New Caledonia, an historic account; 1885-1946. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30, 103–114.
- Phadungsombat, J., Lin, M. Y. C., Srimark, N., Yamanaka, A., Nakayama, E. E., Moolasart, V., Suttha, P., Shioda, T., and Uttayamakul, S. (2018). Emergence of genotype cosmopolitan of dengue virus type 2 and genotype III of dengue virus type 3 in Thailand. *PLoS ONE*, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207220>
- Pol, M., Kilama, S., Duperier, S., Soupé-Gilbert, M. E., Calvez, E., and Pocquet, N. (2018). Introduction of the *Anopheles bancroftii* mosquito, a malaria vector, into New Caledonia. *Emerging Infectious Diseases*, 24(3), 604–605. <https://doi.org/10.3201/eid2403.171689>
- Powell, J. R., Gloria-Soria, A., and Kotsakiozi, P. (2018). Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. *BioScience*, 68(11), 854–860. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy119>
- Powell, J. R., and Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*: A review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(Suppl.1), 11–17. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>
- Pozza, G. D., and Majori, G. (1992). First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of American Mosquito Control Association*, 8(3), 318–320.
- Pramual, P., and Adler, P. H. (2014). DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: *Simuliidae*) of Thailand. *Molecular Ecology Resources*, 14, 262–271. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12174>
- Prentis, P. J., Wilson, J. R. U., Dormontt, E. E., Richardson, D. M., and Lowe, A. J. (2008). Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, 13(6), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.03.004>

R

- Raharimalala, F. N., Andrianinarivomanana, T. M., Rakotondrasoa, A., Collard, J. M., and Boyer, S. (2017). Usefulness and accuracy of MALDI-TOF mass spectrometry as a supplementary tool to identify mosquito vector species and to invest in development of international database. *Medical and Veterinary Entomology*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/mve.12230>
- Rakotonirina, A., Pol, M., Kainiu, M., Barsac, E., Tutagata, J., Kilama, S., O'Connor, O., Tarantola, A., Colot, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Richard, V., and Pocquet, N. (2020). MALDI-TOF MS: Optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasites and Vectors*, 13(359), 1–12.
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Cosme, R. T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., and Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561>

- Reich, N. G., Shrestha, S., King, A. A., Rohani, P., Lessler, J., Kalayanarooj, S., Yoon, I. K., Gibbons, R. V., Burke, D. S., and Cummings, D. A. T. (2013). Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(86). <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0414>
- Reiter, P. (1998). *Aedes albopictus* and the world trade in used tired, 1988 - 1995: the shape of things to come? *Journal of American Mosquito Control Association*, 14(1), 83–94. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25237-3_12
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M., Majori, G., and Cassone, A. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, 370, 1840–1846. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6)
- Richard, V., and Cao-Lormeau, V. M. (2019). Mosquito vectors of arboviruses in French Polynesia. *New Microbes and New Infections*, 31(100569), 1–5. https://doi.org/10.1016/j_nmni.2019.100569
- Richards, S. L., Anderson, S. L., and Lord, C. C. (2014). Vector competence of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) for West Nile virus isolates from Florida. *Tropical Medicine and International Health*, 19(5), 610–617. <https://doi.org/10.1111/tmi.12277>
- Roa, M. (2016). Zika virus outbreak: Reproductive health and rights in Latin America. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00331-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00331-7)
- Romiti, F., Ermenegildi, A., Magliano, A., Rombolà, P., Varrenti, D., Giamattei, R., Gasbarra, S., Ursino, S., Casagni, L., Scriboni, A., Puro, V., Ruta, A., Brignola, L., Fantasia, O., Corpobongo, D., Di Luzio, G., and De Liberato, C. (2021). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Monitoring in the Lazio Region (Central Italy). *Journal of Medical Entomology*, 58(2), 847–856. <https://doi.org/10.1093/jme/tja222>
- Rosen, L., Rozeboom, L., Reeves, W., Saugrain, J., and Gubler, D. (1975). A field trial of competitive displacement of *Aedes polynesiensis* by *Aedes albopictus* on a Pacific atoll. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25, 906–913.
- Ross, P. A., Axford, J. K., Yang, Q., Staunton, K. M., Ritchie, S. A., Richardson, K. M., and Hoffmann, A. A. (2020). Heatwaves cause fluctuations in wMel *Wolbachia* densities and frequencies in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(1), e0007958. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007958>
- Ross, P. A., and Hoffmann, A. A. (2018). Continued susceptibility of the wMel *Wolbachia* infection in *Aedes aegypti* to heat stress following field deployment and selection. *Insects*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/insects9030078>
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., Guillaumot, L., and Souarès, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012 – 2014. *Rapid Communication*, 1–8.

Roth, A., Hoy, D., Horwood, P. F., Ropa, B., Thane, H., Guillaumot, L., Rickart, K., Frison, P., Pavlin, B., and Souares, Y. (2014). Preparedness for Threat of Chikungunya in the Pacific. *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1–21.

Rozeboom, L. E., and Gilford, B. N. (1954). The genetic relationships of *Aedes pseudoscutellaris theobald* and *Aedes polynesiensis* marks (Diptera: Culicidae). *American Journal of Hygiene*, 60, 117–134.

Rozendaal, J. A. (1997). Vector Control Methods for use by individuals and communities. *WHO, Geneva*, 1–412.

Rueda, L. M. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*, 589, 1–60.

S

Sauer, F. G., Jaworski, L., Erdbeer, L., Heitmann, A., Schmidt-Chanasit, J., Kiel, E., and Lühken, R. (2020). Geometric morphometric wing analysis represents a robust tool to identify female mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Germany. *Scientific Reports*, 10(17613), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72873-z>

Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M., and Geider, K. (2008). Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE*, 3(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002843>

Savage, H. M., Fritz, C. L., Rutstein, D., Yolwa, A., Vorndam, V., and Gubler, D. J. (1998). Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), 519–524. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.519>

Savage, Harry M., Ledermann, J. P., Yug, L., Burkhalter, K. L., Marfel, M., and Hancock, W. T. (2015). Incrimination of *Aedes (Stegomyia) hensilli* Farner as an epidemic vector of chikungunya virus on Yap Island, Federated States of Micronesia, 2013. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(2), 429–436. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0374>

Schaffner, F., Kaufmann, C., Pflüger, V., and Mathis, A. (2014). Rapid protein profiling facilitates surveillance of invasive mosquito species. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-142>

Schaffner, F., and Mathieu, B. (2020). Identifier un moustique : morphologie classique et nouvelles techniques moléculaires associées pour une taxonomie intégrée. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 524, 24–33. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(20\)30228-8](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(20)30228-8)

Schenkel, C. D., Kamber, T., Schaffner, F., Mathis, A., and Silaghi, C. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the identification of invasive *Aedes* mosquito species. *Medical and Veterinary Entomology*, 33, 345–351. <https://doi.org/10.1111/mve.12366>

- Scholte, E. J., den Hartog, W., Dik, M., Schoelitz, B., Brooks, M., Schaffner, F., Foussadier, R., Braks, M., and Beeuwkes, J. (2010). Introduction and control of three invasive mosquito species in the Netherlands, July–October 2010. *Eurosurveillance*, 15(45), 1–4. <https://doi.org/10.5167/uzh-39852>
- Scholte, E. J., and Schaffner, F. (2007). Waiting for the tiger: Establishment and spread of the Asian tiger mosquito in Europe. *Emerging Pests and Vector-Borne Diseases in Europe*, 241–261.
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J. M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M. P., Bréhin, A. C., Cubito, N., Després, P., ... Brisson, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Medicine*, 3(7), 1058–1070. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>
- Scott, T. W., and Morrison, A. C. (2010). Vector Dynamics and Transmission of Dengue Virus: Implications for Dengue Surveillance and Prevention Strategies. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 338, 115–128. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02215-9>
- Seng, P., Rolain, J.-M., Fournier, P. E., La Scola, B., Drancourt, M., and Raoult, D. (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology*, 5(11), 1733–1754. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2014.08.001>
- Sevestre, J., Diarra, A. Z., Laroche, M., Almeras, L., and Parola, P. (2021). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: an emerging tool for studying the vectors of human infectious diseases. *Future Microbiology*, 16, 323–340. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0145>
- Shiu, S., Mercer, D. R., Martin, P. M. V., Rodhain, F., Raymond, M., and Failloux, A. (1997). *Aedes polynesiensis* in the Society Islands: environmental correlates of isoenzyme differentiation *Aedes polynesiensis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 11, 349–354.
- Sota, T., and Mogi, M. (2006). Origin of Pitcher Plant Mosquitoes in *Aedes (Stegomyia)*: A Molecular Phylogenetic Analysis Using Mitochondrial and Nuclear Gene Sequences. *Journal of Medical Entomology*, 43(5), 795–800. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017211>
- Suman, D. S., Wang, Y., Bilgrami, A. L., and Gaugler, R. (2013). Ovicultural activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Acta Tropica*, 128(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.025>

T

- Tabachnick, W. J. (1991). Evolutionary Genetics and Arthropod-borne Disease: The Yellow Fever Mosquito. *American Entomologist*, 37(1), 14–26. <https://doi.org/10.1093/ae/37.1.14>
- Tahir, D., Almeras, L., Varloud, M., Raoult, D., Davoust, B., and Parola, P. (2017). Assessment of MALDI-TOF mass spectrometry for filariae detection in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006093>

- Tandina, F., Almeras, L., Koné, A. K., Doumbo, O. K., Raoult, D., and Parola, P. (2016). Use of MALDI-TOF MS and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1776-y>
- Tandina, F., Niaré, S., Laroche, M., Koné, A. K., Diarra, A. Z., Ongoiba, A., Berenger, J. M., Doumbo, O. K., Raoult, D., and Parola, P. (2018). Using MALDI-TOF MS to identify mosquitoes collected in Mali and their blood meals. *Parasitology*, 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000070>
- Tantely, M. L., Randrianambintsoa, F. J., Rakotonirina, A., Woog, F., Boyer, S., and Girod, R. (2020). Discrimination of *Uranotaenia* species (Diptera: Culicidae) from Madagascar based on morphology and wing morphometric traits. *Zootaxa*, 4801(1), 171–178. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4801.1.9>
- Tatem, A. J., Hay, S. I., and Rogers, D. J. (2006). Global traffic and disease vector dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6242–6247. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508391103>
- The Pacific Community, and WHO. (2020). *Manual for surveillance and control of Aedes vectors in the Pacific*.
- Thomas, S. J., and Yoon, I. K. (2019). A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 15(10), 2295–2314. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503>
- Tiawsirisup, S., Kinley, J. R., Tucker, B. J., Evans, R. B., Rowley, W. A., and Platt, K. B. (2008). Vector Competence of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus and Potential as an Enzootic Vector. *Journal of Medical Entomology*, 45(3), 452–457. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[452:vcoavd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[452:vcoavd]2.0.co;2)
- Tran, N. K., Howard, T., Walsh, R., Pepper, J., Loegering, J., Phinney, B., Salemi, M. R., and Rashidi, H. H. (2021). Novel application of automated machine learning with MALDI-TOF-MS for rapid high-throughput screening of COVID-19: a proof of concept. *Scientific Reports*, 11(8219), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87463-w>
- Tun-Lin, W., Burkot, T. R., and Kay, B. H. (2000). Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 31–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00207.x>
- Turell, M. J., and Kay, B. H. (1998). Susceptibility of Selected Strains of Australian Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Rift Valley Fever Virus. *Journal of Medical Entomology*, 35(2), 132–135. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.2.132>

V

Van Den Hurk, A. F., Nisbet, D. J., Hall, R. A., Kay, B. H., Mackenzie, J. S., and Ritchie, S. A. (2003). Vector Competence of Australian Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Medical Entomology*, 40(1), 82–90. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.1.82>

Vega-Rúa, A., Pagès, N., Fontaine, A., Nuccio, C., Hery, L., Goindin, D., Gustave, J., and Almeras, L. (2018). Improvement of mosquito identification by MALDI-TOF MS biotyping using protein signatures from two body parts. *Parasites & Vectors*, 11(574), 1–12.

Vega-Rua, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., and Lourenco-de-Oliveira, R. (2014). High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *Journal of Virology*, 88(11), 6294–6306. <https://doi.org/10.1128/jvi.00370-14>

Vidal, P. O., Peruzin, M. C., and Suesdek, L. (2011). Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(1), 134–137. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262011000100022>

Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, A. P., Garcia, T. I., Sall, A. A., Nasar, F., Schuh, A. J., Holmes, E. C., Higgs, S., Maharaj, P. D., Brault, A. C., and Weaver, S. C. (2010). Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *Journal of Virology*, 84(13), 6497–6504. <https://doi.org/10.1128/jvi.01603-09>

W

Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L., and Hoffmann, A. A. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361), 450–455. <https://doi.org/10.1038/nature10355>

Watson, T. M., and Kay, B. H. (1998). Vector Competence of *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) for Ross River Virus in Queensland, Australia. *Journal of Medical Entomology*, 35(2), 104–106. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.2.104>

Welker, M., and Moore, E. R. B. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.013>

Wijayanti, S. P. M., Sunaryo, S., Suprihatin, S., McFarlane, M., Rainey, S. M., Dietrich, I., Schnettler, E., Biek, R., and Kohl, A. (2016). Dengue in Java, Indonesia: Relevance of Mosquito Indices as Risk Predictors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004500>

Wilke, A. B. B., De Oliveira Christe, R., Multini, L. C., Vidal, P. O., Wilk-Da-silva, R., De Carvalho, G. C., and Marrelli, M. T. (2016). Morphometric wing characters as a tool for mosquito identification. *PLoS ONE*, 11(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161643>

WMP. (2021). *The World Mosquito Program*. [Accessed 21 Apr 2018]. <https://www.worldmosquitoprogram.org/>

WRBU. (2021). *The Walter Reed Biosystematics Unit*. [Accessed 21 Apr 2018]. <https://www.wrbu.si.edu/>

Y

Yee, D. A. (2016). Thirty Years of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in America: An Introduction to Current Perspectives and Future Challenges. *Journal of Medical Entomology*, 53(5), 989–991. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw063>

Yssouf, A., Almeras, L., Raoult, D., and Parola, P. (2016). Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiology*, 11, 549–566.

Yssouf, A., Almeras, L., Terras, J., Socolovschi, C., Raoult, D., and Parola, P. (2015). Detection of *Rickettsia* spp in Ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003473>

Yssouf, A., Parola, P., Lindström, A., Lilja, T., L'Ambert, G., Bondesson, U., Berenger, J. M., Raoult, D., and Almeras, L. (2014). Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS. *Parasitology Research*, 113, 2375–2378. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3876-y>

Yssouf, A., Socolovschi, C., Flaudrops, C., Ndiath, M. O., Sougoufara, S., Dehecq, J. S., Lacour, G., Berenger, J. M., Sokhna, C. S., Raoult, D., and Parola, P. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry: An Emerging Tool for the Rapid Identification of Mosquito Vectors. *PLoS ONE*, 8(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072380>

Z

Zhong, D., Hemming-Schroeder, E., Wang, X., Kibret, S., Zhou, G., Atieli, H., Lee, M. C., Afrane, Y. A., Githeko, A. K., and Yan, G. (2020a). Extensive new *Anopheles* cryptic species involved in human malaria transmission in western Kenya. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73073-5>

Zhong, D., Hemming-Schroeder, E., Wang, X., Kibret, S., Zhou, G., Atieli, H., Lee, M. C., Afrane, Y. A., Githeko, A. K., and Yan, G. (2020b). Extensive new *Anopheles* cryptic species involved in human malaria transmission in western Kenya. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73073-5>

Zouré, H. G. M., Wanji, S., Noma, M., Amazigo, U. V., Diggle, P. J., Tekle, A. H., and Remme, J. H. F. (2011). The geographic distribution of *Loa loa* in Africa: Results of large-scale implementation of the rapid assessment procedure for Loiasis (RAPLOA). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001210>