

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Microbiologie/Parasitologie

*Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences,
Environnement*

par

Nicolas PONÇON

Etude des risques de ré-émergence du paludisme en Camargue

Soutenue publiquement le 28 janvier 2008 devant le jury composé de,

Rapporteurs :

M. V ROBERT, Directeur de recherche, Muséum National d'Histoire Naturelle

M. DJ ROGERS, Professeur, Université d'Oxford

Examineurs :

M. E CAMUS, Directeur de recherche, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

M. S MORAND, Directeur de recherche, Centre national de la recherche scientifique

M. S de La ROCQUE, Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

Directeur de thèse :

M. D FONTENILLE, Directeur de recherche, Institut de recherche pour le développement

Remerciements

Les travaux présentés dans ce document ont été menés au laboratoire de Lutte contre les insectes nuisibles (LIN) de l'Institut de recherche pour le développement (IRD) au sein de l'UR016. Ils ont été soutenus financièrement par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche et par le projet de recherche européen EDEN (GOCE-2003-010284 EDEN).

Cette thèse a été encadrée par Didier Fontenille, directeur de l'UR016, que je remercie sincèrement pour m'avoir offert des conditions de travail idéales, tant sur le plan matériel et logistique que managérial. De plus, sa disponibilité, son enthousiasme et sa curiosité scientifique sans limite ont beaucoup contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie Céline Toty pour son implication dans ce travail. Son intérêt et sa disponibilité ont permis de mener à bien cette étude.

Je remercie également Grégory l'Ambert et Jean Baptiste Ferré pour leur contribution et leur motivation sans faille sur le terrain.

Je souhaite ensuite remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail : les rapporteurs Vincent Robert et David J. Rogers ; les examinateurs Emmanuel Camus, Serge Morand et Stéphane de La Rocque.

Je remercie enfin toutes les personnes qui ont contribué et participé à la réalisation de ce travail :

les membres de l'UR016 de l'IRD et plus particulièrement Diego Ayala, Mathieu Boulesteix, Cécile Brengues, Anna Cohuet, Valérie Delplanque, Stéphane Duchon, Luc Finot, Peter Kengne, Gilbert Le Goff, Isabelle Morlais, Marie Claude Naudy-Sanchez, Nil Rahola, Frédéric Simard, Annie Walter, et Parfait Awono-Ambene de l'OCEAC,

les personnes de l'EID-Méditerranée et plus particulièrement Michel Babinot, Olivier Bardin, Nathalie Barras, Didier Caire, Alexandre Carron, Claire Duchet, Dominique Gindre, Cécile Ivanès, Charles Jeannin, Christophe Lagneau, Francis Schaffner (à l'université de Zurich depuis), Nicolas Sidos ; Rémi Foussadier et Delphine Rey de l'EID-AIRS, Thomas Krebs du service départemental de démoustication du Haut Rhin,

l'équipe du DESMID et plus particulièrement Daniel Bley, Alain Dervieux, Marc Eric Gruenais, Katrin Langewiesche et Nathalie Torres, Nicole Vernazza ; Patrick Baudot, Vincent Bertemes, Céline Miglietti, Joanne Michelutti, Murielle Radix et Lucie Supiot de l'IUP ENTES

Thomas Balenghien, Fabienne Biteau-Coroller, Hélène Guis et Annelise Tran du Cirad

l'équipe des Marais du Vigueirat et plus particulièrement Mathieu Chambouleyron, Nathalie Hecker, Jean Laurent Lucchesi, Grégoire Massez, Jean Baptiste Nogues ; Robert Meffre et Jean Marie Egidio de Mas Thibert

Jérémy Petit du Syndicat mixte pour la protection et la gestion de la Camargue gardoise

les partenaires du projet EDEN et plus particulièrement Bulent Alten, Daniela Boccolini, Zoubir Harrat, Saïd Boubidi, Chafika Faraj, Catherine Linard, Adrian Luty, Eric Lambin, David Rogers, Roberto Romi, Carla Sousa, Geer Jan Van Gemert ; Carles Aranda du Consell Comarcal del Baix Llobregat et Bouchra Trari du CHU de Rabat

Cyrille Thomas du Centre français du Riz,

Fabrice Legros du Centre national de référence de l'épidémiologie du paludisme d'importation et autochtone

Didier Basset du CHU de Montpellier, Muriel Roumier de l'hôpital d'Arles, Laurence Lachaud de l'hôpital de Nîmes, Philippe Parola et Marie Pierre Ranjeva du CHU de Marseille, Mme Derré de l'hôpital d'Avignon, Anzime Al Mohamed et Marjorie Bredy

Florence Fouque et Jennifer Pradel du laboratoire TIMC-EPSP/ENVL

Hélène Barré et François Xavier Pernice de la Direction de la solidarité et de la santé de Corse et de Corse du Sud

Véronique Bellemain et Bruno Hachler de l'ENSV

Table des matières

Introduction	1
Première partie.	
Le contexte du paludisme en Europe, en France et en Camargue	5
Chapitre 1. Situation globale du paludisme et de ses vecteurs en Europe	6
1. Des situations historiques diverses	6
2. La ré-émergence récente de la problématique du paludisme en Europe	7
Chapitre 2. Situation globale du paludisme et de ses vecteurs en France	8
1. De l'endémie à l'extinction	8
2. La situation des trente dernières années	11
3. <i>Anopheles atroparvus</i> et <i>An. labranchiae</i> : les deux vecteurs majeurs historiques	12
Chapitre 3. Le paludisme en Camargue	12
1. Du Moyen Age à l'après guerre	12
2. <i>Anopheles atroparvus</i> : le vecteur historique majeur	14
3. Bilan actuel	14
Chapitre 4. Méthodologie interdisciplinaire – Article 1	15
Deuxième partie.	
Identification des vecteurs potentiels de paludisme en Camargue	19
Introduction	20
Chapitre 1 : Identification, dynamique et biologie des <i>Anopheles</i> en Camargue	23
1. Systématique des espèces du groupe Hyrcanus en Camargue – Article 2	23
2. Dynamique et biologie des populations d' <i>Anopheles</i> – Article 3	35

3. Résultats complémentaires	45
3.1. Validation des données locales : analyse de données complémentaires	45
3.2. <i>Anopheles atroparvus</i> en Camargue	48
3.3. <i>Anopheles plumbeus</i> en Camargue	50
3.4. Cycle nyctéméral d'agressivité et d'activité : détail	54
3.5. Etude des gîtes larvaires des espèces <i>Anopheles</i> et spatialisation de la présence et de la densité d' <i>An. hyrcanus</i> – Article 4	58
3.6. Suspicion de transmission autochtone de paludisme – Article 5	59
3.7. Inventaire des espèces du complexe Maculipennis dans d'autres régions de France	59
3.8. Dynamique des quatre espèces principales de <i>Culicidae</i> en Camargue – Article 6	59
4. Synthèse	60
Chapitre 2. Compétence vectorielle des <i>Anopheles</i> de Camargue	61
1. Introduction et synthèse bibliographique	61
2. Tests de la compétence vectorielle vis-à-vis de <i>P. falciparum</i> de culture	67
3. Tests de la compétence vectorielle vis-à-vis de <i>P. falciparum</i> sauvages	70
4. Discussion	73
Synthèse partie 2 : détermination des vecteurs potentiels	77
Troisième partie.	
Le risque de transmission/ré-émergence du paludisme en Camargue	79
Chapitre 1. Approche rétrospective du risque de transmission du paludisme	80
1. Evolution des populations d'<i>An. hyrcanus</i> en Camargue – Article 7	80
2. Evolution des populations d'<i>An. atroparvus</i> en Camargue	89
2.1. L'abondance d' <i>An. atroparvus</i>	89
2.2. La régression d' <i>An. atroparvus</i>	90
3. Synthèse : impacts sanitaires potentiels des changements anthropiques	92
Chapitre 2 : Approche prospective et analytique du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue – Article 8	93

Conclusion générale	117
1. Synthèse	118
2. Perspectives	121
2.1. Le risque de transmission du paludisme en Camargue dans un contexte de changement global : un futur à explorer	121
2.2. Intégration du facteur humain	125
Bibliographie	131
Annexes	139
Annexe 1 : Liste des publications	140
Annexe 2 : Distribution des <i>Anopheles</i> identifiés en France (bibliographie)	141
Annexe 3 : Article 1 « Méthodologie interdisciplinaire »	143
Annexe 4 : Article 4 « Spatialisation de la densité d' <i>An. hyrcanus</i> »	157
Annexe 5 : Article 5 « Suspicion de transmission autochtone à Marseille »	181
Annexe 6 : Identification des espèces du complexe Maculipennis : spécimens capturés dans l'Ain	185
Annexe 7 : Identification des espèces du complexe Maculipennis : larves collectées en Alsace	187
Annexe 8 : Identification des espèces du complexe Maculipennis : spécimens récoltés par F. Schaffner	188
Annexe 9 : Article 6 « Dynamique des <i>Culicidae</i> en Camargue »	189

Table des figures

Figure 1 : Le paludisme en France au 19 ^{ième} siècle, (Bourré 1981)	8
Figure 2 : L'interdisciplinarité au cœur de ce travail	16
Figure 3 : Dynamique d' <i>An. hyrcanus</i> dans la zone d'action de l'EID-Méditerranée	46
Figure 4 : Localisation des points de capture des données complémentaires	47
Figure 5 : Prospections d' <i>An. atroparvus</i> en novembre 2006	49
Figure 6 : Prospections larvaires ciblant les trous d'arbres	52
Figure 7 : Résultats des prospections larvaires et d'adultes ciblant les trous d'arbres	53
Figure 8 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle	123
Figure 9 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle de <i>P. falciparum</i>	123
Figure 10 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle de <i>P. falciparum</i>	124
Figure 11 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle de <i>P. falciparum</i>	124
Figure 12 : Cartographie de la présence humaine en Camargue	126
Figure 13 : Densité de la présence humaine en Camargue	126
Figure 14 : Exposition des résidents aux piqûres d' <i>Anopheles</i>	127
Figure 15 : Identification des « hot spots » à risque de transmission	128
Figure 16 : Impact potentiel du risque de transmission du paludisme dans l'hypothèse d'une reprise de la transmission	129

Table des tableaux

Tableau 1 : <i>Anopheles</i> capturés en 2005 par G. L'Ambert, F. Schaffner et A. Carron	46
Tableau 2 : <i>An. atroparvus</i> capturés en gîtes de faune résiduelle	50
Tableau 3 : Cycle d'agressivité d' <i>Anopheles hyrcanus</i> , mesuré par captures sur hommes	55
Tableau 4 : Cycle d'activité d' <i>An. hyrcanus</i> mesuré par pièges lumineux+CO ₂	56
Tableau 5 : Cycle d'activité d' <i>An. melanoon</i> mesuré par pièges lumineux+CO ₂	57
Tableau 6 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des <i>Anopheles</i> européens et <i>P. falciparum</i>	63
Tableau 7 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des <i>Anopheles</i> européens et <i>P. vivax</i>	65
Tableau 8 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des <i>Anopheles</i> européens et <i>P. malariae</i>	66
Tableau 9 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des <i>Anopheles</i> européens et <i>P. ovale</i>	66
Tableau 10 : Espèces et nombre d' <i>Anopheles</i> envoyés à l'université de Nijmegen (Pays Bas)	68
Tableau 11 : Résultats des expériences de transmission expérimentale	69
Tableau 12 : Espèces et nombre d' <i>Anopheles</i> envoyés à l'OCEAC à Youndé, Cameroun	70
Tableau 13 : Résultats des expériences de transmission expérimentale	72
Tableau 14 : Résultats globaux des expériences de transmission expérimentale	74
Tableau 15 : Scénarios d'évolution plausible de la Camargue	122

Liste des publications

Article 1 : Ponçon N, Toty C, Langewiesche K, Dervieux A, Fontenille D, 2008. Étude du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue: nécessité de l'interdisciplinarité. In: Bley D, Gruénais ME, Vernazza-Licht N (eds), *Milieux de vie et santé. Quelles pratiques interdisciplinaires*. EDISUD (coll. Ecologie Humaine). In press.

Article 2 : Ponçon N, Toty C, Kengne P, Alten B, Fontenille D, 2007. Molecular evidence for similarity between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae), sympatric potential vectors of malaria in France. *Journal of Medical entomology* (accepted).

Article 3 : Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D, 2007. Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malaria Journal* 6: 18.

Article 4 : Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré JB, Lo Seen D, Roger F, de la Rocque S, Fontenille D, Baldet T, 2007. Use of remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles* species in Southern France. *International Journal of Health Geographics* (accepted).

Article 5 : Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer WM, Fontenille D, Rogier C, Parola P, 2007. Autochthonous malaria from Marseilles to Minneapolis? *Emerging Infectious Diseases* 13: 1236-1238.

Article 6 : Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D. Population dynamics of pest mosquitoes and malaria and West Nile virus potential vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue – France. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 350-357.

Article 7 : Ponçon N, Balenghien T, Toty C, Ferré JB, Thomas C, Dervieux A, L'Ambert A, Schaffner F, Bardin O, Fontenille D, 2007. Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerging Infectious Diseases* 13: 1810-1815.

Article 8 : Ponçon N, Tran A, Toty C, Luty A, Fontenille D. A quantitative risk assessment approach for mosquito borne diseases: malaria re-emergence in South East France (en préparation).

Introduction

Un siècle après la découverte du rôle vecteur des moustiques dans la transmission des *Plasmodium*, le paludisme demeure la plus grande endémie parasitaire mondiale, avec une incidence annuelle estimée à 500 millions de cas cliniques. Le nombre de victimes directes est évalué à 1 million par an, essentiellement comptées parmi les enfants de moins de 5 ans (Greenwood et al. 2005).

Les 4 espèces du genre *Plasmodium* responsables des paludismes humains sont transmises exclusivement par des moustiques du genre *Anopheles*. Ce genre comprend environ 500 espèces réparties sur l'ensemble de la planète à l'exception du continent Antarctique, de la Polynésie centrale et orientale et de certaines îles dont le Groenland, l'Islande et quelques terres isolées (Harbach 2004, Mouchet et al. 2004). Seules soixante dix à quatre vingt espèces sont considérées comme vectrices pour les *Plasmodium* humains, avec des implications variées (Mouchet et al. 2004).

La lutte contre le paludisme repose à la fois sur la stérilisation du réservoir humain, par mesures préventives et chimiothérapeutiques, et sur la lutte antivectorielle (diminution des populations de vecteurs, essentiellement par l'utilisation d'insecticides). Cependant, l'apparition et l'extension rapide de résistances aux antipaludéens dans les zones endémiques et les échecs des programmes de lutte antivectorielle contribuent à la résurgence actuelle observée en zone tropicale (Greenwood & Mutabingwa 2002, Castro & Millet 2005). La stratégie actuelle de lutte dans ces zones s'attache plutôt à limiter l'accès du vecteur à l'hôte par utilisation de moustiquaires imprégnées (Greenwood 1997).

En Europe, et notamment en France, le recours systématique à la quinine a fortement contribué à la régression du paludisme au début du 20^{ème} siècle. De vastes programmes de lutte antivectorielle ont été couronnés de succès, comme la disparition du paludisme en Europe de l'Est après la seconde guerre mondiale, ou la quasi élimination du vecteur endémique de Sardaigne, *Anopheles labranchiae* Falleroni.

Si le réchauffement climatique est fréquemment incriminé, les changements d'origine anthropique sont souvent les principaux facteurs responsables de résurgences de maladies vectorielles et notamment du paludisme (Rogers & Randolph 2000, Reiter 2001, Reiter et al. 2004). L'urbanisation, les déplacements et migrations de populations, les modifications des paysages, la généralisation des échanges, la dégradation des systèmes de santé, l'arrêt des programmes de luttés, ... constituent autant de bouleversements, souvent très marqués dans les pays en voies de développement, qui favorisent la recrudescence du paludisme (Rodhain 2003). Le continent européen et les pays frontaliers sont également affectés par ces changements dont les effets sont les mêmes que dans les zones endémiques : des résurgences

du paludisme ont été observées depuis une vingtaine d'années dans les pays bordant l'Europe (Sabatinelli et al. 2001). Même si la France n'a plus connu de transmission autochtone depuis une cinquantaine d'année, à l'exception de trois cas suspectés autochtones (Armengaud et al. 2006, Doudier et al. 2007), elle subit des changements importants à l'instar du reste de l'Europe : ce travail vise donc à étudier les risques de ré-émergence du paludisme en France. Les études ont été focalisées sur une zone modèle, la Camargue (ancienne zone endémique), qui couvre le delta du Rhône du Grand Plan du Bourg à l'est au canal du Rhône à Sète à l'ouest.

Ce document comprend trois parties et est basé sur les publications relatives à ce travail (dont la liste est présentée en annexe 1). La première partie replace le paludisme et ses vecteurs dans les contextes successifs européens, nationaux et camarguais. A l'issue de cette présentation, la problématique est précisée et la méthodologie appliquée sur ce sujet est exposée.

Dans un deuxième temps, nous nous focalisons sur les vecteurs potentiels en Camargue pour identifier les espèces susceptibles de jouer un rôle dans la transmission :

- en précisant leur statut systématique et en explorant l'abondance, la dynamique et la biologie de leurs populations – facteurs qui déterminent la capacité vectorielle,
- en testant leur compétence vectorielle vis-à-vis de *P. falciparum* tropicaux.

Enfin, la troisième partie aborde le risque de ré-émergence du paludisme en Camargue en se focalisant sur les espèces susceptibles de jouer un rôle dans la transmission :

- tout d'abord sous l'angle rétrospectif et descriptif en se concentrant plus particulièrement sur un couple *Anopheles*/biotope,
- puis sous l'angle prospectif et analytique, en compilant des données entomologiques, humaines et parasitaires.

Un résumé global et synthétique de ce travail est présenté en conclusion.

Première partie.

**Le contexte du paludisme en Europe, en
France et en Camargue**

Chapitre 1. Situation globale du paludisme et de ses vecteurs en Europe

1. Des situations historiques diverses

Les signes cliniques symptomatiques du paludisme ont été décrits dès la fin de l'Antiquité (5^{ème} siècle avant JC) en Grèce, puis cette maladie se propagea à travers l'Europe pour devenir endémique des zones méditerranéennes jusqu'au nord de l'Europe, avec des situations diverses, jusqu'au début du 20^{ème} siècle (Sallares et al. 2004). Mouchet estime à 10 millions le nombre de cas par an à la fin du 19^{ème} siècle en Europe, et cette maladie disparut au milieu du 20^{ème} siècle (Mouchet et al. 2004).

Anopheles atroparvus Van Thiel était l'espèce vectrice majeure en Europe occidentale, y compris dans les zones méditerranéennes françaises (à l'exception de la Corse) et en Espagne. *P. vivax* représentait l'espèce dominante. Cette zone est caractérisée par un recul et une disparition spontanée de cette endémie, en lien avec l'amélioration des conditions d'habitat et de vie (notamment l'accès à la quinine). Des aspersions intra-domiciliaires d'insecticides ont quand même été menées très ponctuellement dans des zones limitées aux Pays-Bas, au Portugal et en Hongrie (Bruce-Chwatt & De Zulueta 1980, Mouchet et al. 2004).

Le bassin méditerranéen était le siège d'une transmission impliquant deux vecteurs très efficaces, *An. labranchiae* essentiellement en Italie et *An. sacharovi* Favre, plus à l'Est. De plus, outre *P. vivax*, la prévalence de *P. falciparum* était très élevée et pouvait atteindre plus de 50%. Il s'agissait de *P. falciparum* européens, disparus aujourd'hui, dont la transmission était associée aux aires de distribution de *An. labranchiae* et *An. sacharovi*. La lutte antivectorielle fut le facteur majeur de la régression puis de l'éradication du paludisme dans ces zones (Mouchet et al. 2004).

En Europe de l'Est, *Anopheles sacharovi* intervint dans la partie méridionale, tandis qu'il semble que *An. messeae* ait joué un rôle dans la transmission plus au nord. *Plasmodium vivax* était également décrit comme l'espèce dominante, avec des variations selon les zones car *P. falciparum* pouvait être important à certains endroits (Mouchet et al. 2004).

2. La ré-émergence récente de la problématique du paludisme en Europe

Après plus de 20 années sans paludisme autochtone, des cas de transmission autochtone, le plus souvent isolés, ont été observés en Europe : un en Espagne impliquant *P. ovale* en 2001 (Cuadros et al. 2002), un en Italie en 1997 impliquant *P. vivax* (Baldari et al. 1998), deux en Allemagne à *P. falciparum* (Krüger et al. 2001), trois en France en 2006 à *P. vivax* et *P. falciparum* (Armengaud et al. 2006, Doudier et al. 2007), plusieurs en Grèce de 1994 à 2000 à *P. falciparum*, *vivax* et *malariae* (Kampen et al. 2003), deux en Moldavie en 1996, 18 cas en Bulgarie en 1995-1996 (WHO-CISID 2007), et un cas suspecté autochtone à *P. malariae* en Roumanie en 2002 (Nicolescu, Stefanoiu & Steriu, données non publiées). Sans pouvoir parler de résurgence du paludisme, ces cas ont attiré l'attention sur cette maladie oubliée alors en Europe, et ont poussé les scientifiques à s'interroger sur les risques de ré-émergence du paludisme en Europe (Jetten et al. 1996, Marchant et al. 1998, Rogers & Randolph 2000, Snow 2000, Lindsay & Thomas 2001).

La situation fut plus alarmante aux frontières sud est de l'Europe, dans les républiques du Caucase et d'Asie centrale, où des épidémies importantes ont eu lieu après une quasi disparition du paludisme à la suite des campagnes d'éradication menées par l'OMS à la fin des années 1950 (Sabatinelli et al. 2001) : de 1990 à 1999, 34226 cas ont été enregistrés en Azerbaïdjan, 89205 en Tadjikistan et 406532 en Turquie par exemple (WHO-CISID 2007). Ces résurgences sont à rattacher essentiellement à la dégradation des structures sociales, sanitaires et économiques suite notamment à l'effondrement du bloc soviétique qui a entraîné une désorganisation des services de santé, des mouvements importants de population et l'arrêt des opérations de lutte antivectorielle (Sabatinelli et al. 2001). Ces dernières années ont vu une amélioration de la situation avec une nette diminution du nombre de cas et une régression de ces épidémies (WHO-CISID 2007).

En Europe de l'Ouest, le paludisme importé est devenu une problématique médicale importante depuis une trentaine d'années, tant par le nombre de cas que par la gravité de la maladie si elle n'est pas diagnostiquée rapidement. Le nombre de cas est passé d'environ 1500 en 1972 à 13000 en 1999 pour la zone Europe de l'OMS (c'est-à-dire l'Europe plus le Caucase, la Turquie, et l'Asie centrale), la majorité de ces cas étant recensés en Europe occidentale. Cette même année, la France, le Royaume Uni, l'Allemagne et l'Italie ont représenté près de 75 % des cas de paludisme importé, la France étant largement majoritaire avec plus de 7000 cas (Sabatinelli et al. 2001).

Alors que *P. falciparum* ne représentait que 30 % des cas de paludisme importés dans les années 1970, il est impliqué dans près de 70 % des cas pour la zone Europe de l’OMS. Cette proportion élevée est en relation avec les zones de contamination : 80% des cas de paludisme importés ont été contractés en Afrique, surtout Afrique occidentale et centrale où *P. falciparum* est l’espèce dominante (Sabatinelli et al. 2001).

Chapitre 2. Situation globale du paludisme et de ses vecteurs en France

1. De l’endémie à l’extinction

Le paludisme sévissait à l’état endémique autrefois dans toutes les régions marécageuses de France jusqu’au début du 20^{ème} siècle. Des foyers importants étaient notamment signalés en Camargue, dans le bas Languedoc, en Roussillon, dans les Landes, en Vendée, en Sologne, dans la Brenne, en Bretagne, en région parisienne, en Alsace, en Dombes, en Corse...

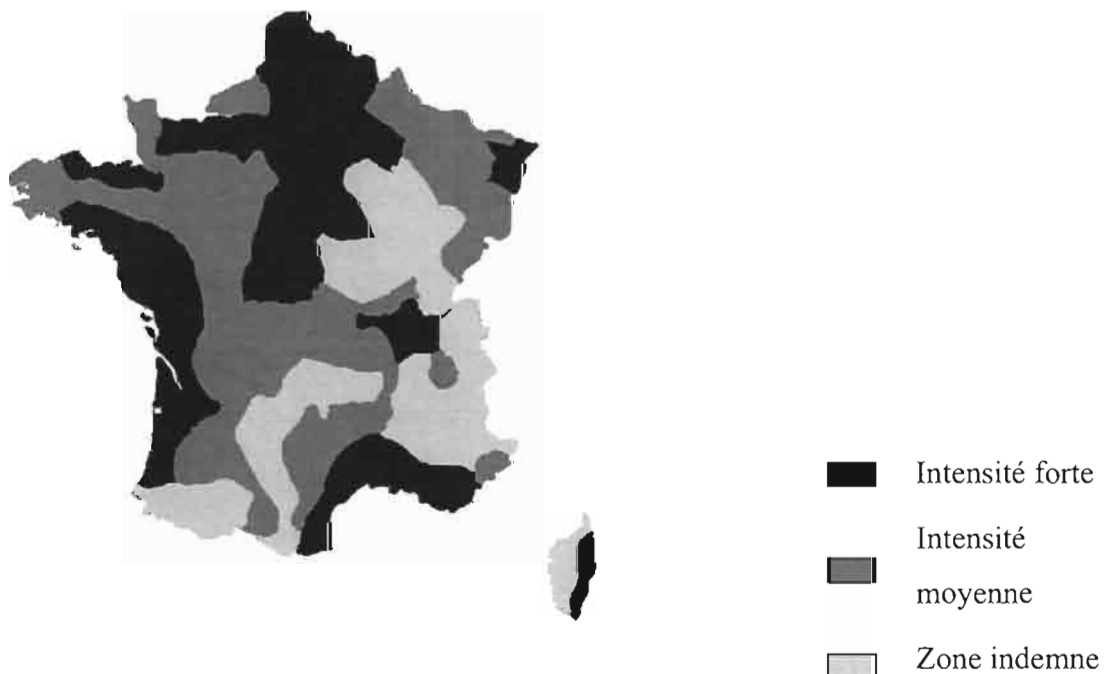


Figure 1 : Le paludisme en France au 19^{ème} siècle, (Bourré 1981)

Plasmodium vivax et *P. malariae* étaient les 2 espèces principalement impliquées en France continentale bien que la mortalité très importante rapportée par les écrits au 17, 18 et 19^{ème}

siècle laisse planer le doute sur la présence de *P. falciparum* (en Corse, les cas de paludisme à *P. falciparum* excédait 50% des cas au milieu du 20^{ème} siècle) (Guilbert 1868, Mandoul 1907, Niclot 1910, Villon 1921, Payré 1922, Atger 1931, Sautet 1943, 1953, Fourier et al. 1976, Sautet 1978, Sarrant 1979, Buffard & Duong 1980, Bourée 1981, Schaffner 1991, Doby 1992, Mouchet et al. 2004). Cette affection régressa fortement, selon les régions, de la fin du 19^{ème} siècle au début du 20^{ème} siècle sous l'action conjuguée de plusieurs facteurs : l'amélioration des conditions de vie, le recours systématique à la quinine, l'assèchement des marais et l'augmentation du bétail (Sautet 1948, Jarry 1953, Laigret 1953, Rodhain & Charmot 1982). Les deux premiers facteurs ont été les plus importants si bien qu'on parle, en France continentale, de régression spontanée du paludisme c'est-à-dire sans avoir recours à des campagnes de lutte anti-vectorielle comme cela fut le cas dans d'autres pays européens (Europe de l'Est, Italie,...) ou en Corse pendant l'après guerre. Les propos de Laveran en 1907 à ce sujet détaillent l'importance de l'amélioration des conditions de vie :

« On comprend que certaines régions s'assainissent malgré la persistance des *Anopheles* ; lorsqu'une population est pauvre et vit dans de mauvaises conditions d'hygiène en pays palustre, les malades sont nombreux, ils se soignent mal et les *Anopheles* s'infectent facilement ; si les conditions d'existence s'améliorent, l'hygiène générale s'améliore aussi, le nombre de malade diminue d'année en année ; le médecin consulté dès qu'un cas de fièvre se produit, la quinine est distribuée largement et les *Anopheles* ne peuvent plus s'infecter en piquant l'homme. »

D'autres anecdotes relevées soulignent l'ampleur du recours à la quinine au 19^{ème} et 20^{ème} siècle :

- « la consommation de quinine dépassait 50g/habitant/an en Bretagne dans des villages en bordure de marais » (Doby 1992),
- « il n'est pas rare de trouver encore, sur le manteau de la cheminée des mas de Camargue, des pôts renfermant de la quinine et où l'on puise dès que l'on ressent les premières atteintes des fièvres » (Miara 1938),
- « les contrats stipulent que le patron prend en charge la quinine pour ses employés dans le Roussillon ; il existe même une indemnité de quinine pour certains fonctionnaires » (Bredy 2002)

Des résurgences de paludisme furent observées pendant la première guerre mondiale, des Flandres à l'Alsace, sur le front mais également parmi la population locale (quelques cas également dans le Roussillon). Ces cas, assez restreints, furent observés suite à l'introduction de porteurs de gamétocytes en provenance d'outre mer dans ces régions où le paludisme avait déjà disparu (Buffard & Duong 1980, Rodhain & Charmot 1982, Schaffner 1991). Les déclarations officielles rapportèrent 298 cas pour la zone des armées. Ce nombre est certainement supérieur si on prend en compte les cas survenus dans les zones non touchées par la guerre (Atger 1931, Buffard & Duong 1980).

A la veille de la seconde guerre mondiale, quelques foyers en France continentale subsistaient, où sévissait un paludisme larvé endémique (les foyers de Camargue, sud de Paris, Charente, Gironde, Landes sont notamment reportés) (Villon 1921, Robert 1940, Sautet 1944, Leproux 1952, Sansarricq 1954, Gayte & Nicoli 1969, Gentilini et al. 1978) tandis que la Corse connaissait une situation de transmission plus intense (Bredy 2002).

La période de la seconde guerre mondiale fut marquée par des reprises plus actives de la transmission dans d'anciennes zones impaludées, selon le même mécanisme que pendant la première guerre mondiale. En février 1939, 214 000 soldats réfugiés espagnols furent regroupés dans des camps dans le Roussillon. En mai, plus de 300 cas de paludisme imputés à des reviviscences de *P. vivax* furent observés parmi les réfugiés. En septembre 1939, la maladie toucha la population locale avec environ 50 cas autochtones reportés parmi les habitants vivant non loin des camps. La situation resta stable en 1940, mais la transmission augmenta en 1941 avec environ 300 cas diagnostiqués parmi la population locale alors que les camps de réfugiés avaient été en partie supprimés. L'épidémie déclina en 1942 et s'éteignit finalement en 1943-1945 sans qu'aucune mesure vraiment importante n'ait été prise (Sautet 1943).

Une situation identique, quoique de moindre ampleur, fut observée à Antony, au sud de Paris, où des milliers de prisonniers sénégalais, nord africains et malgaches furent regroupés dans le stade du Métropolitain en juin 1940. En juillet, des reviviscences furent rapportées parmi les prisonniers. De fin juillet à fin octobre, 18 cas de paludisme furent diagnostiqués dans la population locale vivant autour du stade. Quatorze furent attribués à *P. vivax* et 2 à *P. falciparum* (Harvier & Claisse 1940, Rathery et al. 1940).

A l'automne 1943, 177 cas de paludisme (Sautet estima que le nombre total atteignit le double) à *P. vivax* furent répertoriés en Camargue, qui présentait une situation faiblement endémique depuis une dizaine d'années avec une vingtaine de cas par an. Cette épidémie fut

attribuée à un afflux de population non autochtone, et donc immunologiquement naïve, sur cette zone (jeunes des Chantiers pour les vendanges, ...)(Villon 1921, Sautet 1944). Un cas isolé de transmission autochtone fut également diagnostiqué à Fréjus en 1939, suite à l'installation de troupes coloniales (Crosnier et al. 1948, Gentilini et al. 1978).

Enfin, les derniers foyers de paludisme (Landes, Charente, Gironde, Camargue) s'éteignirent dans les années cinquante en France continentale (Crosnier et al. 1948, Leproux 1952, Harant & Rioux 1953, Sansarricq 1954).

En Corse, 38 cas de paludisme autochtone à *P. vivax* furent observés de 1965 à 1972, suite à l'arrivée d'immigrés en provenance de zones impaludées du Maghreb. Aucun cas n'avait été signalé dans cette île depuis les campagnes d'éradication d'après guerre (Sautet & Quilici 1971, Sautet 1978, Barré 2007).

Depuis ces dernières résurgences, quelques cas isolés ont été rapportés. Ils ont été attribués à une transmission autochtone (c'est-à-dire par un moustique local) bien que cette origine soit incertaine (Pasticier et al. 1974, Cristau et al. 1978, Chavanne et al. 1979, Cassaigne et al. 1980, Guillausseau et al. 1980, Morin et al. 1980, Gentilini & Danis 1981, Marty et al. 1992).

2. La situation des trente dernières années

Depuis une trentaine d'années, le paludisme n'est plus que importé en France métropolitaine, à l'exception des cas de paludisme d'aéroport (Giacomini et al. 1995, Danis et al. 1996), de quelques cas particuliers et de 3 cas très récents de transmission suspectée autochtone.

Les cas importés ont augmenté depuis les années 1980 parallèlement à l'augmentation du trafic aérien et du tourisme de masse à destination des zones endémiques. Le nombre estimé de cas (basé sur le nombre notifié) est passé de 3000 en 1986 à 8056 en 2000. Il diminue depuis 2000 et était de 6109 en 2004. Pour les années 2001-2004, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. malariae* ont été incriminés dans 83.5%, 6.5%, 4.5% et 1.6% des cas respectivement (les 3.9% restant étant attribués à des infections mixtes ou pour lesquelles l'espèce plasmodiale n'a pas été déterminée). La majorité de ces cas ont été contractés en Afrique tropicale (près de 90% en 2004) et plus particulièrement en Afrique de l'Ouest (53% en 2004) (Legros et al. 2006a, Legros et al. 2006b).

Depuis 1977, 28 cas de paludisme d'aéroport ont été répertoriés en France métropolitaine et quelques cas particuliers ont été signalés (transfusion sanguine ou exposition accidentelle au sang, greffe d'organes, paludisme congénital,...)(Mouchet 2000, Legros et al. 2006a). En

2006, trois cas de paludisme (deux dans le sud est de la France et un en Corse) ont été rapportés à des transmissions autochtones bien que cette hypothèse n'ait pas pu être confirmée (Armengaud et al. 2006, Doudier et al. 2007).

3. *Anopheles atroparvus* et *An. labranchiae* : les deux vecteurs majeurs historiques

Parmi les 13 espèces d'*Anopheles* décrites en France métropolitaine (Annexe 2), seules deux ont joué un rôle majeur dans la transmission en raison de leur abondance et de leur anthropophilie : *An. labranchiae* en Corse et *An. atroparvus* en France continentale (Jetten & Takken 1994, Mouchet et al. 2004). Suite à la régression spontanée du paludisme en France continentale, qui a eu lieu sans campagne de lutte antivectorielle, les *Anopheles* sont toujours présents, et parfois en populations importantes, si bien que l'expression « anophélisme sans paludisme » est utilisée pour caractériser cette situation (Roman 1963, Rageau & Mouchet 1967, Roman 1971, Cousserans et al. 1974, Salieres et al. 1978, Pichot & Deruaz 1981, Zahar 1990, Jetten & Takken 1994, Guillet 1996, Schaffner et al. 2000, Schaffner et al. 2001, Balenghien et al. 2006, Ponçon et al. 2007).

Chapitre 3. Le paludisme en Camargue

1. Du Moyen Age à l'après guerre

L'arrivée du paludisme en Camargue et plus généralement sur le littoral du Languedoc-Roussillon est souvent associée aux invasions sarrasines du 8^{ème} siècle. Des épidémies nombreuses et meurtrières ont été reportées à partir du 11^{ème} siècle et jusqu'au début du 19^{ème} siècle. Certains auteurs rapportèrent une trentaine d'épidémies de 1398 à 1792, dont certaines ont duré de 5 à 7 ans (Carrère 1918, Bredy 2002). De plus, le déclin des villes et de l'économie de la côte fut associé en partie à cette maladie. Décrit comme très prospère pendant la période romaine, le littoral du Languedoc Roussillon devint misérable et inhabité : les villes se vidèrent et la population fut durement frappée par le paludisme. Aigues mortes passa de 15 000 habitants au 13^{ème} siècle à 1500 habitants en 1714, et on y rapporta de 5 à 6 victimes par jour lors d'une épidémie en 1744 (Gayte & Nicoli 1969, Bredy 2002). Méliet (Carrère 1918) rapporta que la mortalité était tellement élevée dans l'Hérault que les hommes

ne parvenaient pas à l'âge du recrutement. De plus, certains villages comme Candillargues étaient surnommés « le pays des veuves » (Carrère 1918).

Bien entendu, il est nécessaire de considérer ces informations sous un aspect critique car les données historiques sont toujours délicates à analyser, d'autant plus à des époques où l'agent pathogène du paludisme n'était pas connu. D'autres causes de mortalité et de morbidité ont sûrement contribué à cette situation, mais des tableaux symptomatiques précis permettent d'incriminer le paludisme de façon assez fiable (fièvres intermittentes pernicieuses,...)(Gayte & Nicoli 1969). De plus, il semble que l'extension et les ravages du paludisme en Languedoc Roussillon, et notamment en Camargue, soient liés à l'expansion et à la transformation du littoral au début du Moyen Age. Les dépôts d'alluvions du Rhône comblèrent progressivement les lagunes et étangs pré-existants et les isolèrent des apports d'eau salée (ils étaient alors toujours soumis aux apports d'eau douce par les crues du Rhône). Les faciès ont ainsi évolué vers des marais saumâtres favorables au développement des *Anopheles* (Villon 1921, Gayte & Nicoli 1969, Sallares 2006). Parallèlement au développement du paludisme, l'évolution des faciès a aussi entraîné une diminution des possibilités de commerce fluvial, dégradant ainsi l'économie des villes côtières durant le Moyen Age (Harant & Rioux 1953, Bredy 2002). Des scénarios semblables ont également été décrits dans d'autres zones d'Europe (et notamment en Italie dans la plaine de Grosseto, la zone d'Ostie), où l'expansion du paludisme a souvent été associée à la transformation progressive d'étangs et lagunes en marais saumâtres par dépôts d'alluvions et recul de la mer (Sallares 2006).

A partir du 19^{ème} siècle, la mortalité liée à cette maladie diminua mais la morbidité demeurait élevée. La construction du canal d'Arles à Port de Bouc de 1802 à 1834 entraîna une recrudescence de cette affection qui présenta ensuite régulièrement des poussées épidémiques plus ou moins intenses jusqu'au début du 20^{ème} siècle. Puis le paludisme déclina pour atteindre une situation endémique larvée troublée par deux épidémies : la première dans les années 1915-1920 et l'épisode de 1943 décrit précédemment (Villon 1921, Miara 1938, Sautet 1944). Pendant la période 1915-1920, plus d'une centaine de cas furent diagnostiqués suite à l'afflux de Macédoniens dans le Languedoc Roussillon (Astros 1919, Sautet 1947, Harant & Rioux 1953, Sautet 1953). Finalement, le paludisme en Camargue s'éteignit après la seconde guerre mondiale et une enquête menée en 1953 auprès des médecins locaux conclut à la disparition de cette maladie (Harant & Rioux 1953).

Comme pour le reste de la France, des cas de paludisme importé sont régulièrement diagnostiqués en Camargue et plus largement dans le sud-est de la France. La situation actuelle est présentée dans la troisième partie.

2. *Anopheles atroparvus* : le vecteur historique majeur

Comme pour le reste de la France et de l'Europe Occidentale, *An. atroparvus* était le vecteur principal en raison de son abondance et de son anthropophilie. Pringault constata que 97% des *Anopheles* capturés dans les Bouches du Rhône appartiennent à « l'espèce maculipennis » en 1918 (Pringault 1918, 1921)(avant la classification en complexe d'espèce proposée en 1934 par Hackett (Hackett 1934)) et Sautet confirma cette abondance en affirmant que, entre août et novembre, ce complexe d'espèce représente 100% des *Anopheles* en Petite Camargue (Sautet 1944). Bien entendu, plusieurs espèces du complexe pouvaient se rapporter à ces observations. Etant donné l'abondance d'*An. atroparvus*, décrite spécifiquement dans les années 1940 (Sautet 1944), il est raisonnable de supposer que cette espèce était majoritaire au sein du complexe dans le passé. De plus, cette espèce tolère des salinités assez élevées (Jetten & Takken 1994) ce qui correspond à la situation globale de la Camargue à cette époque (Cousserans & Salieres 1976). Au cours de l'épisode épidémique de 1943, Sautet constate l'abondance d'*An. atroparvus* (Sautet 1944). Après la seconde guerre mondiale, Rioux rapporte que cette espèce est très largement répandue sur le littoral méditerranéen, depuis la côte jusqu'à l'étage subalpin, dans des gîtes larvaires très variés, allant des roselières saumâtres et trous de rochers de la côte aux mares froides d'altitude (Rioux 1958). Suite à l'arrêt de la transmission autochtone après la seconde guerre mondiale, la Camargue se retrouva dans la même situation que le reste de la France continentale : une situation d'« anophélisme sans paludisme » confirmée par différents auteurs ensuite (Harant & Rioux 1964, Sautet 1972, Gentilini & Danis 1981).

3. Bilan actuel

La France (métropolitaine), et notamment la Camargue, se caractérise donc par la présence conjointe de vecteurs potentiels de *Plasmodium*, associés à des *Plasmodium* importés par divers flux de populations (touristes, travailleurs saisonniers, immigrants, ...). La présence de cette maladie dans d'autres régions favorise une introduction constante de *Plasmodium* en métropole. Les trois cas récents de transmission suspectée autochtone poussent à s'interroger sur le potentiel paludogène actuel de la France (Armengaud et al. 2006, Doudier et al. 2007),

d'autant plus que les cas autochtones décrits en Europe soulignent que ce potentiel paludogène ne semble pas nul en Europe (Baldari et al. 1998, Krüger et al. 2001, Cuadros et al. 2002, Kampen et al. 2003). Enfin, les épidémies majeures ayant eu lieu aux frontières de l'Europe dans les années 1990 illustrent l'impact de certains changements globaux (économiques et sociaux) sur la diffusion du paludisme. D'autres modifications importantes comme le réchauffement climatique, l'urbanisation, la pollution, sont actuellement en cours et auront nécessairement un impact sur la transmission potentielle de cette maladie. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude qui vise à étudier les risques de ré-émergence du paludisme en Camargue.

Chapitre 4. Méthodologie interdisciplinaire – Article 1

L'évaluation du risque implique l'étude du système vectoriel potentiel. La compréhension de celui-ci nécessite une approche globale s'intéressant à l'homme, hôte unique et réservoir de *Plasmodium*, et aux espèces d'*Anopheles*, moustiques vecteurs potentiels – l'homme et les anophèles évoluant dans un environnement complexe en Camargue. Les interrelations entre ces domaines permettent d'évaluer le risque d'émergence du paludisme.

Il est donc nécessaire de s'intéresser à chaque item du cycle (*Anopheles*, hommes, *Plasmodium* et milieu) et de les caractériser pour prendre en compte leur hétérogénéité spatio-temporelle. Le croisement de ces données, formalisées en couches d'informations au sein d'un système d'informations géographiques, permet d'identifier des zones potentielles de ré-émergence du paludisme. Cette démarche peut être résumée par le graphique ci-dessous, illustrant la nécessité de l'interdisciplinarité.

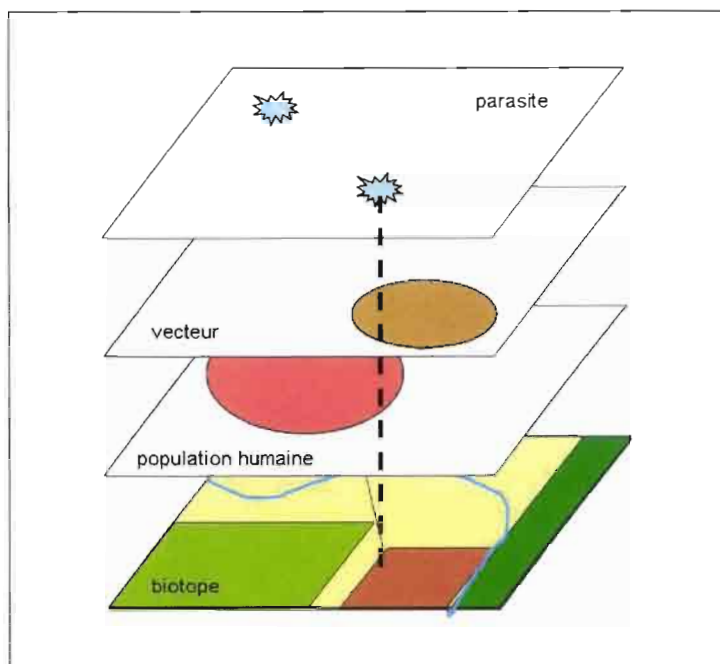


Figure 2 : L'interdisciplinarité au cœur de ce travail

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous focaliserons sur l'étude de l'environnement, des vecteurs et des parasites. L'intégration de la composante humaine est abordée en perspective.

L'évaluation de la transmission des *Plasmodium* fait l'objet d'une formalisation mathématique (R_0) depuis plus de 50 ans (Macdonald 1957), qui se base essentiellement sur des paramètres entomologiques. Ces paramètres sont étudiés en vue de déterminer la capacité et la compétence vectorielles (Garrett-Jones & Shidrawi 1969) (l'association de ces 2 facteurs et d'un facteur humain représente R_0), dont l'étude est rapportée dans la deuxième partie de travail.

Les études concernant le milieu et les *Plasmodium* ont été réalisées en collaboration avec des équipes de géographie et des acteurs de santé publique.

L'étape finale de synthèse de l'ensemble des résultats (*Anopheles*, milieu et *Plasmodium*) au cours d'une analyse spatiale s'appuie sur les résultats acquis directement ou produits dans le cadre de collaborations avec d'autres équipes et est présenté en troisième partie (l'intégration de la composante humaine étant abordée en perspective).

Cette méthodologie interdisciplinaire a fait l'objet d'une publication dans un ouvrage de

sciences sociales (présenté en annexe 3) :

Article 1 : Ponçon N, Toty C, Langewiesche K, Dervieux A, Fontenille D. Etude du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue : nécessité de l'interdisciplinarité. In: Bley D, Gruénais ME, Vernazza-Licht N (eds), *Milieus de vie et santé. Quelles pratiques interdisciplinaires*. EDISUD (coll. Ecologie Humaine). In press.

Résumé : dans le cadre de l'étude du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue, une méthodologie interdisciplinaire a été mise en place et s'appuie sur trois étapes :

- Existe-t-il des moustiques capables de transmettre des *Plasmodium* en Camargue ?
- Ces moustiques piquent-ils l'homme ?
- Ces moustiques rencontrent-ils des *Plasmodium* en Camargue ?

Différentes disciplines doivent être mobilisées pour répondre à ces trois questions : la biologie étudie les *Anopheles* et leur compétence vectorielle, l'anthropologie caractérise la population humaine au niveau local et les flux de populations humaines vers la Camargue, l'épidémiologie fournit des données concernant le paludisme importé en France et l'écologie permet d'aborder les questions relatives aux habitats des vecteurs. La synthèse des résultats produits par ces disciplines permet, *in fine*, de répondre à l'objectif initial.

Remarque : cette publication présente l'ensemble de la démarche et de la méthodologie applicables pour l'étude des risques de ré-émergence du paludisme en Camargue. Le travail présenté ci-dessous se focalise sur les aspects vecteurs, parasites et environnement.

Deuxième partie.

**Identification des vecteurs potentiels de
paludisme en Camargue**

Introduction

La formalisation mathématique de la transmission des *Plasmodium* repose sur le modèle R0 (taux de reproduction du parasite) élaboré par Macdonald en 1957, et qui correspond au nombre total d'inoculations attendues à partir d'un sujet infectant. Si R0 est supérieur à 1 le paludisme est en expansion ; si R0 est inférieur à 1 la maladie est en régression.

$$R_0 = \frac{ma^2 \cdot p^n}{-\ln(p)} * \frac{1}{r} * b$$

où

m = densité relative de vecteurs (nombre d'*Anopheles* par homme et par jour)

a = fréquence de piqûres sur homme par femelle *Anopheles* et par jour

p = taux de survie journalier des femelles *Anopheles*

n = durée du cycle sporogonique des *Plasmodium* chez les femelles *Anopheles*

b = compétence vectorielle de la population *Anopheles* considérée

1/r = période infectieuse de l'homme

Ce modèle néglige le développement d'une certaine immunité chez l'homme, la mortalité des hommes et des vecteurs dues aux parasites, et la période d'incubation chez l'homme (Anderson & May 1991).

Le terme ma^2 peut se décomposer en « $ma \cdot a$ », ce qui correspond plus clairement aux paramètres estimés en pratique. « ma » représente alors le nombre de piqûres par jour et par homme.

Face à la difficulté à estimer certains paramètres (1/r et b), cette formule a évolué vers la notion de capacité vectorielle (Garrett-Jones & Shidrawi 1969) qui correspond au nombre quotidien de piqûres potentiellement infectantes attendues à partir d'un cas humain infectant. La capacité vectorielle est un indice strictement entomologique.

$$CV = \frac{ma^2.p^n}{-\ln(p)}$$

Ces deux formules sont applicables à une situation précise et à une espèce donnée pour laquelle les différents paramètres entomologiques doivent être déterminés localement. Si plusieurs espèces d'*Anopheles* sont présentes dans une même zone, il est écessaire d'additionner les capacités vectorielles respectives pour obtenir une capacité vectorielle globale de la zone.

Ces modèles, élaborés initialement dans le cadre des méthodes de lutte, étaient utilisés de manière comparative, spatialement ou temporellement, pour comparer le risque de transmission du paludisme entre deux zones ou juger de l'efficacité de méthodes de lutte. Néanmoins, ils correspondent à notre problématique en permettant d'identifier les zones et les périodes les plus à risque de ré-émergence de paludisme en Camargue.

Ces modèles renvoient également aux trois notions utilisées pour estimer le risque de reprise de la transmission du paludisme dans une zone (le potentiel paludogène) (WHO 1966, Romi et al. 2001, Tüll 2004) :

- la réceptivité, estimée par la capacité vectorielle,
- l'infectivité, estimée par la compétence vectorielle,
- la vulnérabilité, définie pour une zone donnée, correspond au nombre de porteurs de gamétocytes présents dans la zone pendant la période potentielle de transmission.

L'estimation du risque de ré-émergence du paludisme au niveau géographique se base donc, en partie, sur des facteurs entomologiques (capacité et compétence vectorielles) propres à chaque espèce *Anopheles*. La somme des contributions de chaque espèce *Anopheles* de Camargue au risque de ré-émergence du paludisme sur la zone est présentée en troisième partie, de même que l'articulation de la réceptivité, infectivité et vulnérabilité (pour éviter tout risque de confusion, notons que ces définitions ne correspondent pas à une autre méthode générale d'évaluation du risque dans laquelle risque = aléas * vulnérabilité).

Dans un premier temps, nous considérons les paramètres entomologiques qu'il est nécessaire d'étudier pour estimer la capacité et la compétence vectorielles des différentes espèces (ce qui

permettra de définir la réceptivité et l'infectivité de la zone étudiée). Ce travail fait l'objet de cette deuxième partie.

Le paramètre a (fréquence de piqûres sur homme par femelle et par jour) correspond à l'anthropophilie de la population *Anopheles* divisée par la durée du cycle trophogonique. Le nombre de piqûres par homme et par jour (ma) dépend, outre la fréquence des piqûres sur homme et par jour, de l'abondance des femelles *Anopheles*. Or cette dernière varie temporellement en fonction de la dynamique des populations. De plus, les *Anopheles* présentent une heure préférentielle à laquelle ils piquent (la nuit en général). Ce cycle d'agressivité nycthéral influe aussi les possibilités de piqûres. Le taux de survie journalier est estimé à partir du taux de parturité de la population (cf. partie 3).

Enfin, la durée de la phase extrinsèque dépend de l'espèce plasmodiale impliquée (Macdonald 1957) et ne sera donc pas abordée ici (cf. partie 3)

Il est donc nécessaire d'estimer les paramètres biologiques suivants pour déterminer la capacité vectorielle :

- dynamique des populations
- cycle nycthéral d'agressivité
- préférences trophiques
- durée du cycle trophogonique
- taux de parturité

et également d'estimer la compétence vectorielle, paramètre dépendant notamment des caractéristiques génétiques des populations d'*Anopheles*. Ces paramètres doivent être estimés pour chaque espèce et population *Anopheles* (dans la mesure où la capacité vectorielle totale d'une zone est la somme des capacités vectorielles se rapportant à chaque espèce vectrice).

La caractérisation de ces paramètres permettra d'identifier le ou les vecteurs potentiels susceptibles de jouer un rôle dans la transmission du paludisme, ce qui est présenté au chapitre 1 pour les données biologiques et de dynamique, et au chapitre 2 pour la compétence vectorielle.

Dans un premier temps, il est nécessaire de pouvoir identifier précisément les espèces *Anopheles* de Camargue, dans la mesure où la biologie, la dynamique et la compétence vectorielles sont des paramètres spécifiques susceptibles de varier en fonction des espèces.

Parmi les 8 espèces *Anopheles* décrites sur le littoral méditerranéen (Sinègre et al. 1979), *An. hyrcanus*, appartenant au groupe Hyrcanus, présente un statut systématique variable depuis la description de l'espèce jumelle *An. pseudopictus* (Grassi et al. 1899). Contrairement aux espèces du complexe *Maculipennis*, décrites en 1934 par Hackett (Hackett 1934), dont le statut est bien établi en Europe occidentale, le statut d'*An. hyrcanus* et *An. pseudopictus* n'est pas tranché.

Le premier paragraphe de ce chapitre est donc consacré à la clarification du statut systématique des espèces du groupe Hyrcanus en Camargue.

Chapitre 1 : Identification, dynamique et biologie des *Anopheles* en Camargue

1. Systématique des espèces du groupe Hyrcanus en Camargue – Article 2

Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans *Journal of Medical Entomology* et présentée ci-dessous.

Article 2 : Ponçon N, Toty C, Kengne P, Alten B, Fontenille D, 2007. Molecular evidence for similarity between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae), sympatric potential vectors of malaria in France. *Journal of Medical Entomology* (accepted).

Résumé : le statut systématique du groupe Hyrcanus est variable dans la Région paléarctique occidentale (à l'ouest de la Chine). Parmi les trois espèces décrites, *An. hyrcanus* (Pallas), *An. pseudopictus* Grassi et *An. chodukini* Martini, *An. pseudopictus* a été alternativement considérée comme une espèce synonyme de *An. hyrcanus* (ne formant de ce fait plus qu'une espèce) ou une espèce à part entière. L'étude de marqueurs génétiques ribosomiaux (ITS1, ITS2) et mitochondriaux (COI, COII), réalisée sur des spécimens des populations *An. hyrcanus* et *An. pseudopictus* sympatriques en Camargue, a permis de conclure que ces deux formes morphologiques partagent le même fond génétique et correspondent donc à la même espèce en Camargue.

Molecular Evidence for Similarity Between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae), Sympatric Potential Vectors of Malaria in France

N. Ponçon,¹ C. Toty,¹ P. Kengne,¹ B. Alten,² D. Fontenille¹

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

² Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, Ecology Section, 06532, Beytepe Ankara, Turkey

Abstract

Malaria was a former public health problem in the Camargue, south-east France, where members of the Hyrcanus group were recently described as the main malaria potential vectors. However, the systematic status in this group, which includes at least two sympatric sibling species, *An. hyrcanus* (Pallas), *An. pseudopictus* Grassi as well as a morphologically intermediate form in the Camargue, is unclear. Indeed, both species have been alternatively considered as separated or synonymous species. We examined sequence variation of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) and domain-3 (D3) of 28S ribosomal DNA and the cytochrome oxidase subunit I and II (COI & COII) genes of mitochondrial DNA of the Hyrcanus group mosquitoes from the Camargue and Turkey to infer the taxonomic status of the members of this group. DNA sequence analysis of ITS2 and D3 showed no difference between either species or geographical origin (mean pairwise genetic distances $d = 0.000 - 0.003$). The COI and COII sequences between French specimens were also nearly identical ($d = 0.001 - 0.002$), whereas French and Turkey *Anopheles* were genetically distinct ($d = 0.009 - 0.014$). The distinction between populations of the two areas, supported respectively by four and five fixed mutations, attested the differentiation by the distance. Finally, the high degree of genetic similarity, despite morphological differences between *An. hyrcanus*, *An. pseudopictus* and an intermediate form, suggests that these three taxa may belong to a single species in the Camargue.

Key words: *Anopheles hyrcanus*, *Anopheles pseudopictus*, malaria, France, rDNA, mtDNA

Introduction

Within the frame of global change including socio-demographic changes, anthropogenic environmental modifications and climate change, scientists evaluate its impact on human health and especially its links with the spreading or the resurgence of vector-borne diseases, such as malaria (Sutherst 2004). The issue of this main vector-borne disease, largely studied in tropical endemic areas, has been examined for several years also in Europe, a former endemic area, where epidemiological and entomological researches were conducted. Recently, members of the Hyrcanus group were described as the main potential malaria vectors in the Camargue, south-east France, based on their abundance and anthropophilic feeding behaviour (Ponçon et al. 2007).

The Hyrcanus group is comprised of 27 species, of which 24 are confined to the Oriental and the Eastern Palaearctic Region and three to the Western Palaearctic Region (west of China and south of 50°N). The systematic status of the three Western Palaearctic species, *An. hyrcanus* (Pallas), *An. pseudopictus* Grassi and *An. chodukini* Martini, is unclear. Indeed, *An. hyrcanus* presents a dark hind tarsomere 4 (TIII-4), while *An. pseudopictus* has its hind tarsomere 4 (TIII-4) all white (Fig. 1). *Anopheles chodukini* was described from a unique very pale female specimen, collected in Uzbekistan in 1929 (Ramsdale and Lodge 2001, Harbach 2004). *Anopheles pseudopictus* was originally described in Italy in 1899 (Grassi et al. 1899). Afterward, several taxons, of which *An. pseudopictus*, were consigned to synonymy with *An. hyrcanus* species due to individual morphological variation within each taxon precluding reliable separation (Bates et al. 1949, Knight and Stone 1977). *Anopheles pseudopictus* was elevated again to species status based on morphological differences and the apparent absence of hybridization with *An. hyrcanus* in any part of its distribution (Glick 1992). Hence, it has been maintained in this taxonomic status until now (Harbach 2004).

In the Western Palaearctic Region, specimens of the *Anopheles hyrcanus* group have been involved in malaria transmission, particularly in Central Asia where *An. hyrcanus* and *An. pseudopictus* were reported (Onori et al. 1975, Ramsdale and Lodge 2001, Faulde et al. 2007). *Anopheles pseudopictus* has been recorded in France (Camargue, Corsica), Italy (Sicily and Sardinia), Spain, Romania, Balkans, Turkey, Caucasus, South of Russia, Iran and Afghanistan (Dow 1953, Senevet and Andarelli 1956, Rioux 1958, Ponçon et al. 2007), while *An. hyrcanus* has been recorded in almost all of the Middle East countries from Lebanon to Iran, Turkey and Afghanistan (Glick 1992). In the Camargue, besides *An. pseudopictus*, which has been nearly the only one described since 1920, some specimens presenting an intermediate hind tarsomere 4 pattern, were reported only in 1976. The hind tarsomeres 4 (TIII-4) of these specimens carried pale basal and apical white bands separated by a black median area (Fig. 1) (Ramsdale and Lodge 2001).

The dichotomy between *An. hyrcanus* and *An. pseudopictus* is based only on minor morphological differences that are difficult and painful to observe, hence, an easier technique is needed to facilitate the study of these species. Recent developments in insect genomics provided easy access to the *Anopheles* genome, including nuclear and non-nuclear markers used to infer systematic status and phylogenetic relationships. Ribosomal DNA (rDNA) is often used to differentiate cryptic species, based on markers, such as the internal transcribed spacers (ITS1 & 2) and the D3 domain of 28S (Collins and Paskewitz 1996). On the other hand, mitochondrial

DNA (mtDNA) is considered to be a highly sensitive genetic marker for systematic and phylogenetic relationships because of its haploid nature and maternal inheritance (Avisé 1994).

In this study, we used nuclear rDNA marker (ITS2 and D3) and mtDNA gene (COI and COII) variation to investigate the systematic status of *An. hyrcanus* and *An. pseudopictus* that are found sympatrically in the Camargue.

Material and Methods

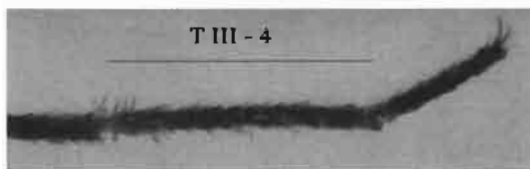
Female mosquitoes were collected in the Camargue using CDC-light traps baited with carbon dioxide dry ice. Some females captured with CDC-light traps in Kars province in Turkey were also used. Specimens were morphologically identified according to Glick (1992) and Harbach *et al.* (2004) and classified as follows: *An. pseudopictus*, *An. hyrcanus* with dark hind tarsomere 4 and intermediate forms carrying white basal and apical bands separated by a black median area (Fig. 1).

Figure 1: Hind tarsomere 4 of morphologically identified *An. pseudopictus* (A), *An. hyrcanus* (B) and intermediate form (C) from the Camargue (France).

A



B



C



Genomic DNA of five *An. pseudopictus* specimens, six *An. hyrcanus* and four of the intermediate form from the Camargue and four *An. hyrcanus* from Turkey was extracted following a slightly modified version of the protocol of Edwards (Edwards 1998). The ITS2, D3, COI and COII regions were amplified in 25 µl reaction mixtures containing 2.5 µl of 10X reaction buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France), 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate (Eurogentec, France), 0.5 units of Taq DNA polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France) and 10 pmol each of the forward and reverse primers. The primers used for PCR are listed below: ITS2 (Collins and Paskewitz 1996) forward 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' and reverse 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3'; D3 (Sharpe et al. 1999) forward 5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3' and reverse 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'; COI (Simon et al. 1994) forward 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3' and reverse 5'-GCTAATCATCTAAAAATTTAATTCC-3' and COII (Beard et al. 1993) forward 5'-TCTAATATGGGAGATTAGTGC-3' and reverse 5'-ACTTGCTTTCAGTCATCTAATG-3'.

The PCR conditions included an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 45 s, with a final extension step at 72°C for 10 min. After DNA analysis by electrophoresis, PCR products were purified and used for sequencing in both directions with the previous primers, on an ABI 3130XL apparatus (Applied Biosystems, France).

Sequences were inspected and corrected when necessary using Seqscape software program (Applied Biosystems, France). Multiple sequence alignments of each gene were performed using the CLUSTAL X software (Thompson et al. 1997). The Molecular Evolutionary Genetics Analysis V3.0 program was used for statistical analysis of sequences and for measuring sequence divergence from pairwise matrices (Kumar et al. 2004).

Results

Specimens morphologically identified as *An. hyrcanus*, *An. pseudopictus* or the intermediate form were collected in sympatry (same place and same period) in the Camargue. In total, nineteen sequences were generated for ITS2 and D3 and eighteen for COI and COII, which were 521 bp, 364 bp, 691 bp and 731 bp, respectively, excluding primer sequences. Sequences related to *An. hyrcanus* and *An. pseudopictus* from France and *An. hyrcanus* from Turkey are available for each gene under the EMBL accession numbers AM773808 to AM773819. Pairwise genetic distances between morphological types are summarized in Table 1.

Table 1. Pairwise genetic distances between consensus haplotypes of the ITS2 and D3 (A) and COI and COII (B) markers from French *An. hyrcanus*, *An. pseudopictus* and intermediate forms and Turkish *An. hyrcanus*.

A

		D3 (364 bp)				
		French specimens				Turkish specimens
		<i>An. hyrcanus</i>	<i>An. pseudopictus</i>	<i>An. hyrcanus</i> intermediate form	<i>An. hyrcanus</i>	
ITS2 (521 bp)	French specimens	<i>An. hyrcanus</i>	-	0.001	0.003	0.001
		<i>An. pseudopictus</i>	0.000	-	0.003	0.001
		<i>An. hyrcanus</i> intermediate form	0.000	0.000	-	0.002
	Turkish specimens	<i>An. hyrcanus</i>	0.002	0.002	0.002	-

B

		COI (691 bp)				
		French specimens				Turkish specimens
		<i>An. hyrcanus</i>	<i>An. pseudopictus</i>	<i>An. hyrcanus</i> intermediate form	<i>An. hyrcanus</i>	
COII (731 bp)	French specimens	<i>An. hyrcanus</i>	-	0.001	0.002	0.009
		<i>An. pseudopictus</i>	0.001	-	0.001	0.009
		<i>An. hyrcanus</i> intermediate form	0.001	0.001	-	0.010
	Turkish specimens	<i>An. hyrcanus</i>	0.013	0.013	0.014	-

Of the 521 bp of ITS2, no variable sites were found within the three morphological types collected in the Camargue, while only three variable non-fixed sites were identified within specimens collected in Kars. Subsequently, pairwise sequence comparison between morphological types from the two areas had revealed very low genetic distances (Table 1A). Globally, ITS2 sequence analysis showed that the three morphological types (*An. pseudopictus*, *An. hyrcanus* and *An. hyrcanus* intermediate form) were genetically identical.

For the D3 domain, five non-fixed variable nucleotide sites were found among the French specimens, whereas the four Turkish specimens presented no differences. As shown with the ITS2 sequence analysis, the three morphological types were genetically identical.

For COI, only three variable non-fixed sites were observed among the French specimens, suggesting high similarity among the three morphological types from the Camargue. Sequence comparison revealed surprisingly two distinct patterns of sequence variation, supported by 4 fixed polymorphic sites and corresponding to French and Turkish *Anopheles* (Fig. 2).

For COII, there were six variable non-fixed sites when the French specimens were compared, confirming the data of the other three genes. As observed for COI, sequence comparison revealed two distinct patterns of sequence variation supported by five fixed polymorphic sites and corresponding to French and Turkish *Anopheles* (Fig. 2). For COII, sequence variations resulted in only one amino acid change (isoleucine for Turkish specimens to methionine for French individuals). Pairwise genetic distances obtained from the COI and COII sequences between France and Turkey ranged from 0.009 to 0.014, which were higher than those observed for ITS2 and D3 (Table 1A and 1B).

Figure 2: Fixed polymorphic sites between Turkish and French *Anopheles* Hyrcanus group mosquitoes for COI (A) and COII (B) sequences.

A

Species	Origin	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4	5
Species	Origin	6	9	5	4	2	3	2	1	4	0	6
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	C	C	T	A	A	C	T	A	C	C	G
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	.	T	.	G	.	.	C	.	T	.	.
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	.	.	.	G	.	.	C
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	.	T	.	G	.	.	C	.	T	.	.
<i>An. hyrcanus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. hyrcanus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. hyrcanus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. hyrcanus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. hyrcanus</i>	France	C	A	C	G	.	T	A
<i>An. pseudopictus</i>	France	T	.	.	.	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. pseudopictus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. pseudopictus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. pseudopictus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
<i>An. pseudopictus</i>	France	C	A	C	.	.	T	A
Intermediate form	France	C	A	C	.	.	T	A
Intermediate form	France	T	.	.	.	C	A	C	.	.	T	A
Intermediate form	France	T	.	.	.	C	A	C	.	.	T	A
Intermediate form	France	.	.	C	.	C	A	C	.	.	T	A

B

Species	Origin	1	2	2	2	3	3	3	3	4	5	6	6	6
		4	3	1	5	7	9	0	3	4	4	3	5	0
		0	0	4	6	1	6	1	5	0	6	9	9	4
		3	9	7										
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	T	C	G	G	C	T	T	C	G	C	C	G	C
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	.	T	A	.	.	C	.	A	.	A	.	C	.
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	.	T	.	.	.	C	.	A	.	.	.	C	.
<i>An. hyrcanus</i>	Turkey	.	T	A	.	.	C	.	A	.	A	.	C	.
<i>An. hyrcanus</i>	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
<i>An. hyrcanus</i>	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
<i>An. hyrcanus</i>	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
<i>An. hyrcanus</i>	France	.	T	.	A	T	C	.	.	.	T	A	T	.G.
<i>An. hyrcanus</i>	France	.	T	.	T	C	.	.	A	.	T	.	T	.GG
<i>An. pseudopictus</i>	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
<i>An. pseudopictus</i>	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
<i>An. pseudopictus</i>	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
<i>An. pseudopictus</i>	France	.	T	.	T	C	.	T	.	.	T	.	T	.GG
<i>An. pseudopictus</i>	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
Intermediate form	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
Intermediate form	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
Intermediate form	France	.	T	.	T	C	T	.	T	.GG
Intermediate form	France	A	T	.	T	C	T	.	T	.GG

Discussion

The low level of differentiation in four genetic markers (ITS2, D3, COI and COII) between morphologically identified *An. hyrcanus* and *An. pseudopictus* from the Camargue (France) compared to that within the same species was unexpected. These regions of the rDNA and mtDNA have been used successfully in the past to differentiate members of the *Anopheles* complex that cannot all be distinguished morphologically (Paskewitz et al. 1993, Collins and Paskewitz 1996, Hackett et al. 2000, Wilkerson et al. 2004, Kengne et al. 2007) and recently within the Hyrcanus group in the Eastern Palaearctic and Oriental Regions (Hwang 2007). Our study combined nuclear and mitochondrial DNA sequence analyses, as in the recent studies, to increase confidence in the genetic differences observed. Taxonomic reviews of Anophelines belonging to the Hyrcanus group in the Western Palaearctic Region have highlighted many problems in the morphological distinction of specimens within the group. Characteristics, such as the basal and apical white or black band in the hind tarsomere 4 (TIII-4), have a range of variation, confusing the identification of the species in this group. Although the sample size was limited, mosquito sequencing results gave strong indications to support the hypothesis of a high degree of genetic similarity within sympatric *An. hyrcanus* and *An. pseudopictus* specimens, presenting morphological differences. The same situation was previously observed with others malaria vectors: *An. moucheti* Evans in the Cameroon (Antonio-Nkondjio et al. 2002, Kengne et al. 2007), *An. pullus* Yamada and *An. yatsushiroensis* Miyazaki in Korea (Hwang et al. 2004), *An. lesteri* Baisas and Hu and *An. anthropophagus* Xu and Feng (Hwang et al. 2006) and *An. melanoon* Hackett and *An. subalpinus* Hackett and Lewis (Boccolini et al. 2003). These examples highlight the need for complementary morphological and molecular studies when assessing mosquito systematic status. Particularly important, it would be interesting to establish if a female of a morphological form can generate F1 progeny of the three forms, as realised in Asia concerning *An. pullus* and *An. yatsushiroensis*, which also belong to the Hyrcanus group in the Eastern Palaearctic Region (Hwang et al. 2004). Nevertheless in current study, rearing of F1 was not possible with specimens collected in the Camargue.

Within the context of global change and malaria risk re-emergence, this conclusion is of special interest in France as members of the Hyrcanus group were described as the most abundant *Anopheles* (Ponçon et al. 2007). With a more extensive sample size confirming these results, past and future biological data relative to *An. hyrcanus* or *An. pseudopictus* could be linked to a single species in France. Systematic clarification is necessary as critical parameters for malaria risk are relative to specific biology and susceptibility and may vary a lot between different species (such as feeding behaviour for example).

Comparison between French and Turkish specimens showed some polymorphic fixed sites in the mitochondrial regions. This result can be explained by the geographical separation of these two populations (Hwang et al. 2004). At the phylogeographical level, data obtained in this study suggested an apparent discrepancy between mtDNA and nuclear rDNA as mentioned in other studied cases (Krzywinski and Besansky 2003). Such observations are due to different evolutionary processes that result in different mutation rates for each marker. Although the mtDNA markers had been described as tools of choice for resolving intraspecific phylogeography, Shaw et al. (2002) underlined that the speciation histories based on mtDNA alone can be extensively misleading (Shaw 2002).

Finally, these first findings should be completed by further studies involving more populations of mosquitoes from other European countries and from Central Asia in order to better clarify the systematic status of *An. hyrcanus* and *An. pseudopictus* throughout the Western Palaearctic Region.

Acknowledgements

We thank Cécile Brengues and Anna Cohuet from IRD for their precious advice in the molecular studies and Nil Rahola for the pictures of *Anopheles* legs. We thank Grégory L'Ambert and Francis Schaffner from EID-Méditerranée and University of Zuerich for providing some specimens. We thank Jérémie Petit from the « syndicat mixte pour la protection et la gestion de la Camargue gardoise » and the staff from the Marais du Vigueirat association for their hospitality and information.

This work was partially funded by the French Ministry of Agriculture and EU grant GOCE-2003-010284 EDEN. The paper is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0077 (<http://www.eden-fp6project.net/>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and can in no way be taken to reflect the views of the European Union.

References Cited

- Antonio-Nkondjio, C., F. Simard, A. Cohuet, and D. Fontenille. 2002.** Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles moucheti*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric south Cameroon populations. *Infect. Genet. Evol.* 2: 69-72.

- Avise, J. C. 1994.** Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, USA.
- Bates, M., W. N. Beklemishev, and L. La Face. 1949.** Anophelines of the Palaearctic Region., pp. 419-442. In M. Boyd (ed.), Malariology. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London, USA and United Kingdom.
- Beard, C. B., D. M. Hamm, and F. H. Collins. 1993.** The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect. Mol. Biol.* 2: 103-24.
- Boccolini, D., M. di Luca, M. Marinucci, and R. Romi. 2003.** Further molecular and morphological support for the formal synonymy of *Anopheles subalpinus* Hackett and Lewis with *An. melanoon* Hackett. *European Mosquito Bulletin* 16: 1-5.
- Collins, F. H., and S. M. Paskewitz. 1996.** A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect. Mol. Biol.* 5: 1-9.
- Dow, R. P. 1953.** Notes on Iranian mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2: 683-95.
- Edwards, J. K. 1998.** Miniprep procedures for the isolation of plant DNA, pp. 22-24. In A. Karp, P. G. Issac and D. S. Ingram (eds.), *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Faulde, M. K., R. Hoffmann, K. M. Fazilat, and A. Hoerauft. 2007.** Malaria reemergence in Northern Afghanistan. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1402-1404.
- Glick, J. 1992.** Illustrated key to the female *Anopheles* of southwestern Asia and Egypt (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics* 24: 125-153.
- Grassi, B., A. Bignami, and G. Bastianelli. 1899.** Resoconto degli studi fatti sulla malaria durante il mese di gennaio. *R. C. Accad. Lincei* 8: 100-104.
- Hackett, B. J., J. Gimnig, W. Guelbeogo, C. Costantini, L. L. Koekemoer, M. Coetzee, F. H. Collins, and N. J. Besansky. 2000.** Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect. Mol. Biol.* 9: 369-74.
- Harbach, R. E. 2004.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* 94: 537-53.
- Hwang, U. W. 2007.** Revisited ITS2 phylogeny of *Anopheles* (*Anopheles*) Hyrcanus group mosquitoes: reexamination of unidentified and misidentified ITS2 sequences. *Parasitol. Res.* 101: 885-894.
- Hwang, U. W., T. S. Yong, and H. I. Ree. 2004.** Molecular evidence for synonymy of *Anopheles yatsushiroensis* and *An. pullus*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 20: 99-104.
- Hwang, U. W., L. H. Tang, M. Kobayashi, T. S. Yong, and H. I. Ree. 2006.** Molecular evidence supports that *Anopheles anthropophagus* from China and *Anopheles lesteri* from Japan are the same species. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 22: 324-6.
- Kengne, P., C. Antonio-Nkondjio, H. P. Awono-Ambene, F. Simard, T. S. Awolola, and D. Fontenille. 2007.** Molecular differentiation of three closely related members of the mosquito species complex, *Anopheles moucheti*, by mitochondrial and ribosomal DNA polymorphism. *Med. Vet. Entomol.* 21: 177-82.
- Knight, K. L., and A. Stone. 1977.** A catalog of the mosquitoes of the world. Entomological society of America, Baltimore, USA.
- Krzywinski, J., and N. J. Besansky. 2003.** Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 111-139.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004.** MEGA 3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.

- Onori, E., M. K. Nushin, J. E. Cullen, G. H. Yakubi, K. Mohammed, and F. A. Christal. 1975.** An epidemiological assessment of the residual effect of DDT on *Anopheles hyrcanus sl* and *An. pulcherrimus* (Theobald) in the North Eastern region of Afghanistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69: 236-42.
- Paskewitz, S. M., D. M. Wesson, and F. H. Collins. 1993.** The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect. Mol. Biol.* 2: 247-257.
- Ponçon, N., C. Toty, G. L'Ambert, G. Le Goff, C. Brengues, F. Schaffner, and D. Fontenille. 2007.** Biology and dynamics of potential malaria vectors in southern France. *Malar. J.* 6: 18.
- Ramsdale, C. D., and V. Lodge. 2001.** Internal taxonomy of the Hyrcanus group of *Anopheles* (Diptera, Culicidae) and its bearing on the incrimination of vectors of continuing or resurgent malaria in the West of the Palaearctic region. *European Mosquito Bulletin* 10: 1-8.
- Rioux, J. A. 1958.** Les Culicidés du "Midi" méditerranéen. Editions Paul Lechevalier, Paris, France.
- Senevet, G., and L. Andarelli. 1956.** Les anophèles de l'Afrique du Nord et du bassin méditerranéen. Editions Paul Lechevalier, Paris, France.
- Sharpe, R. G., M. M. Hims, R. E. Harbach, and R. K. Butlin. 1999.** PCR-based methods for identification of species of the *Anopheles minimus* group: allele-specific amplification and single-strand conformation polymorphism. *Med. Vet. Entomol.* 13: 265-73.
- Shaw, K. L. 2002.** Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16122-7.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994.** Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-701.
- Sutherst, R. W. 2004.** Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 136-73.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 4876-4882.
- Wilkerson, R. C., J. F. Reinert, and C. Li. 2004.** Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 41: 392-401.

2. Dynamique et biologie des populations d'*Anopheles* – Article 3

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Malaria Journal* et présentée ci dessous :

Article 3 : Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D, 2007. Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malaria Journal* 6: 18

Résumé : un suivi longitudinal des populations de *Culicidae* a été mené dans deux zones de Camargue de mars à décembre 2005, en utilisant principalement des pièges lumineux+CO₂, mais également des captures sur hommes et des pièges à appât cheval. Un total de 131 050 *Anopheles* a été capturé correspondant à quatre espèces (*An. hyrcanus*, *An. melanoon*, *An. atroparvus* et *An. algeriensis*) parmi lesquelles *An. hyrcanus* semble être le seul *Culicidae* pouvant jouer un rôle dans la transmission des *Plasmodium* en Camargue, en raison de son abondance et de son anthropophilie marquée.

Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France

Nicolas Ponçon*¹, Céline Toty¹, Grégory L'Ambert², Gilbert Le Goff¹,
Cécile Brengues¹, Francis Schaffner^{2,3} and Didier Fontenille¹

Address: ¹Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France, ²Entente Interdépartementale pour la Démoustication (EID) Méditerranée, 165 avenue Paul-Rimbaud, 34184 Montpellier cedex 4, France and ³University of Zuerich, Institute of Parasitology, Winterthurerstrasse 266a, CH-8057 Zuerich, Switzerland

Email: Nicolas Ponçon* - poncon@mpl.ird.fr; Céline Toty - toty@mpl.ird.fr; Grégory L'Ambert - glambert@eid-med.org; Gilbert Le Goff - Gilbert.Legoff@ird.fr; Cécile Brengues - brengue@mpl.ird.fr; Francis Schaffner - francis.schaffner@access.uzh.ch; Didier Fontenille - fontenil@mpl.ird.fr

* Corresponding author

Published: 21 February 2007

Received: 2 November 2006

Malaria Journal 2007, 6:18 doi:10.1186/1475-2875-6-18

Accepted: 21 February 2007

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/6/1/18>

© 2007 Ponçon et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Malaria is a former endemic problem in the Camargue, South East France, an area from where very few recent data concerning *Anopheles* are available. A study was undertaken in 2005 to establish potential malaria vector biology and dynamics and evaluate the risk of malaria re-emergence.

Methods: Mosquitoes were collected in two study areas, from March to October 2005, one week every two weeks, using light traps+CO₂, horse bait traps, human bait catch, and by collecting females in resting sites.

Results: *Anopheles hyrcanus* was the most abundant *Anopheles* species. *Anopheles melanoon* was less abundant, and *Anopheles atroparvus* and *Anopheles algeriensis* were rare. *Anopheles hyrcanus* and *An. melanoon* were present in summer, whereas *An. atroparvus* was present in autumn and winter. A large number of *An. hyrcanus* females was collected on humans, whereas almost exclusively animals attracted *An. melanoon*. Based on an enzyme-linked immunosorbent assay, almost 90% of *An. melanoon* blood meals analysed had been taken on horse or bovine. *Anopheles hyrcanus* and *An. melanoon* parity rates showed huge variations according to the date and the trapping method.

Conclusion: *Anopheles hyrcanus* seems to be the only *Culicidae* likely to play a role in malaria transmission in the Camargue, as it is abundant and anthropophilic.

Background

In recent years, several vector-borne diseases have re-emerged and spread in Europe with major health, ecological, socio-economical and political consequences. Most of these outbreaks are linked to global and local changes resulting from climate change, human induced landscape

changes or human population activities. Malaria, a former European endemic disease recently struck European boundaries in countries such as Azerbaijan, Georgia and Turkey where it had been eradicated after World War II [1]. Only a few autochthonous cases have been reported recently in Europe, but these events indicate that the

malaria situation needs to be re-examined in Europe [1-5].

In metropolitan France, malaria was endemic until the beginning of the 20th century in marshy areas such as the Landes, the Dombes, Brittany, Alsace, the Rhone delta, Roussillon and Corsica [6]. Then, it decreased drastically due to the drying of marshes, growth of livestock, improvement of housing and life conditions and the use of quinine. The last outbreak was observed in Corsica from 1966 to 1972, with about 30 *Plasmodium vivax* cases [7,8]. Malaria disappeared from the Camargue after World War II [9].

Nowadays, all the malaria cases reported in France are only imported cases [10], excepted for three suspected, but not-confirmed, autochthonous cases in 2006 [11](Doudier, unpublished data). In 2004, the total number of imported cases was 6,109 with a predominance of *Plasmodium falciparum* [12]. Between 1977 and 2000, 28 airport malaria cases following infected mosquito importation were recorded [13] and very few cases have been notified as congenital malaria or accidental blood exposure [10].

Thirteen *Anopheles* species have been reported in metropolitan France [14]. Among them, two species were considered to be primary vectors because of their abundance and their potential anthropophily: *Anopheles atroparvus* in continental France and *Anopheles labranchiae* in Corsica.

Despite drying of some marshes and consecutive reducing of mosquito populations during the 20th century, *Anopheles* mosquitoes are still present in France and could be very abundant in some places generating an "anophelism without malaria" situation. However, global and local changes may modify *Anopheles* biological parameters linked to malaria transmission (vector density, contact between humans and vectors, longevity, species). Only few data on anopheline potential vectors have been collected in France since the seventies [15].

An in-depth longitudinal survey was conducted in the Camargue, to assess vector species and distribution and evaluate mosquito vectorial capacity related to human malaria transmission risk. Dynamics, feeding preferences, parity rates and nightly activity were studied for different *Anopheles* species.

Methods

Study area

The study was carried out in the Camargue, a large wet area in the South East of France (Figure 1). The main part of the Camargue is located inside the Rhone river delta and it also includes small belts at the east and west sides

of the delta. This area has a Mediterranean climate characterized by warm, dry summers and mild, wet winters. Total annual rainfall usually ranges between 500 and 700 mm, with a maximum during October. The annual mean temperature is 14°C. Mean daily minimum and maximum temperatures range from 0°C to 10°C in winter and from 15°C to 30°C in summer (data from "Météo France").

Water pools and marshes cover a large part of its surface. Water is provided either by rains or by a very tight canal network diverted from the Rhone River and used to irrigate paddies or to fill marshes. Management of water is realized individually by field owners depending on use: grazing for horses, cows or sheep, exploitation of reeds or rice and hunting reserves for waterfowl.

As this area is near the sea, it is characterized by a low deep water table presenting a high salinity. Salinity of breeding site water depends on location and artificial or natural submersion frequency. Marsh flora is very dependant on salinity and xerophily. Different vegetation patches are observed in relation to different biotopes and constitute different types of marshes. Moreover, there are various forms of agriculture (including vineyard, paddies, market gardening, fruit growing) and the cultivation of rice is particularly developed and covers more than 18,000 hectares in the Camargue. Livestock includes horses, cows and sheep.

Two study areas were chosen in the Camargue. They are about 45 kilometres apart. The first one, named "Marais du Vigueirat" (4°46'E; 43°30'N) is a natural reserve, where human activity and impact are very limited. Limited visits, reserve maintenance and fauna and flora surveillance are the only human activities. Some horses and cows graze this area. It presents a large variety of biotopes and different types of marshes. The west side is dominated by a large surface of paddy and on its east side by a particular biotope constituted from a resurgence of the water table. Very few people are resident in this area, but a small town named Mas Thibert is located approximately three kilometres away.

The second study area, named "Carbonnière" (4°13'E; 43°35'N), presents the same variety of biotopes and marshes, including paddy. Human presence and activities are more developed: residents, a large number of tourists, camping and hotels, exploitation of wine and reed beds, breeding of horses and cows, and hunting. Moreover, Carbonnière is located in an area of pest control for mosquitoes and in particular against *Aedes (Ochlerotatus) caspius*.

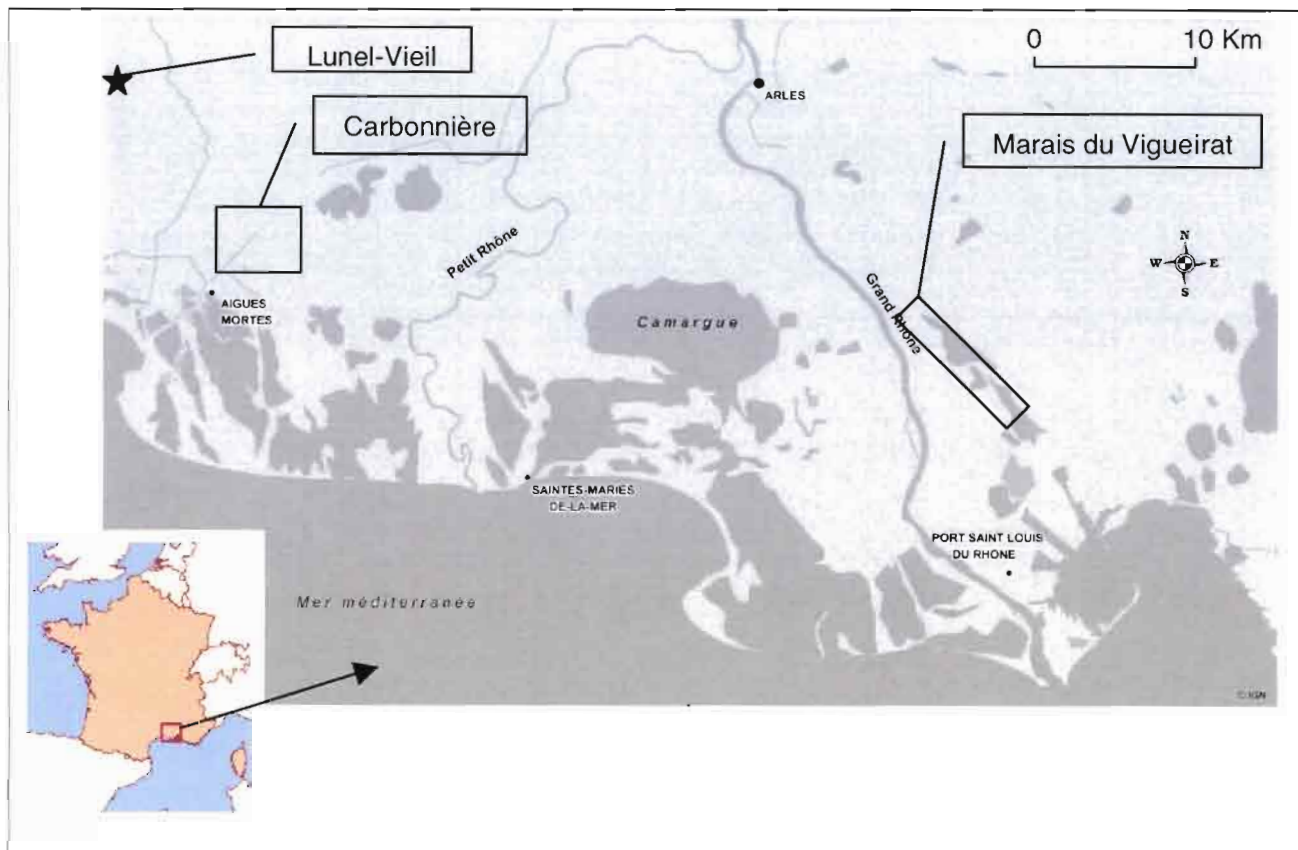


Figure 1
Location of the Camargue and field study areas.

Mosquito collections

Adult mosquitoes were captured from March to October 2005, one week out of two, in each study area. Specific trapping sessions were conducted until December. The following collection techniques were used:

- Eight CDC-light traps associated with carbon dioxide dry ice were hung in eight locations in each area from 19:00 to 10:00 hours, two consecutive nights, one week in two from March to October. The mean number of mosquitoes collected in each area from eight traps each night was calculated using the results of the two consecutive nights.

- Mosquito activity was recorded by collecting two CDC-light traps+CO₂ every 2 hours from 20:00 to 08:00 once in August and once in September in each area.

- Hourly human bait collection were made on three adults belonging to the research team from 20:00 to 00:00 and from 02:00 to 04:00, once in August and once in September

in each area and from 19:00 to 23:00 in May and from 18:00 to 22:00 in October.

- Three horse bait traps were used at Marais du Vigueirat from 20:00 to 08:00 in May, August and September 2005. The net was hung in a horse shelter near a large opening in the wall. Three other horses were present in the shelter.

- Potential adult resting places were explored regularly from March to December 2005: shelters (with or without animals), bird observatory, medieval tower, water pipe and natural shelters. *Anopheles* females were collected using mouth aspirators. Depending on the observed number of *Anopheles*, the totality or only a fraction was captured. Moreover, collection of mosquitoes in vegetation was realised at the beginning of May using a backpack aspirator.

Field processing of mosquitoes

Anopheles individuals were removed from the rest of the collected mosquitoes. They were identified using mor-

phological characteristics and identification key [16]. Ovaries from a portion of female anophelines captured by light traps were dissected regularly to determine parity [17]. When the number of females caught by light traps was not large enough, females collected in resting sites were also dissected. All mosquitoes from the *Anopheles maculipennis* complex, dissected or not, were stored individually in a numbered tube with desiccant for laboratory processing in Montpellier. Blood meals of blood-fed females were extracted and preserved on filter papers.

Laboratory processing of anophelines

Females belonging to the *An. maculipennis* complex were identified to species using the PCR technique described by Proft et al. [18]. A leg or a wing was placed directly into the reaction mixture containing the species-specific primers, dNTPs, buffer and polymerase. The length of amplified sequences was 410 nucleotides for *Anopheles maculipennis* s.s., 224 for *Anopheles melanoon* and 114 for *An. atroparvus*. When more than 30 females were collected during two consecutive nights at the same site by the same method, a random sample was selected. The probable number of specimens per species was extrapolated.

Blood meal sources of fed females collected by light traps and in resting places were identified by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [19]. The technique identified human, bovine, sheep or goat, horse or donkey, chicken, pig, rat, dog, guinea pig and rabbit. When too many females were collected in the same resting site for one day, a random sample was processed.

Results

Species

From March to October 2005, 131,050 *Anopheles* belonging to *An. maculipennis* complex, *Anopheles hyrcanus* and *Anopheles algeriensis* were collected in both areas. The number of *Anopheles* captured by each method, per study area and per month is reported in Table 1. Of the 5,031 *An. maculipennis* complex specimens, 1,830 were identified by PCR. Two sibling species were reported: *An. melanoon* and *An. atroparvus*.

Population dynamics

Dynamics of *An. hyrcanus*, *An. melanoon* and *An. algeriensis* based on light traps are presented in Figures 2 and 3, for each study area. Results show the mean number of mosquitoes collected in the area from the eight traps per night. The number of *An. atroparvus* collected by light traps or in resting sites was low and mosquitoes were mainly captured between August and November.

Activity and aggressiveness

Anopheles hyrcanus was active at the beginning of the night and presented a very marked peak of biting just after the

sunset while *An. melanoon* appeared as active in the second part of the night.

Resting fauna

Number of mosquitoes collected in resting sites is shown in Table 1. Because sampling effort varied along the season, results do not necessarily reflect dynamics. For both study areas, the maximum *An. melanoon* captured was in August 2005. They were found only in anthropic, dark, calm areas without any signs of draught and with or without animals. They were never captured in vegetation or in natural shelters. During the rest of the season, it was only found in resting sites directly related to animals. *Anopheles atroparvus* was essentially found in horse shelters.

Feeding preferences

A total of 267 bloodmeals were tested by ELISA. Blood-fed females were captured in resting sites and light traps. Results per species are presented in Table 2.

Parity rates

Parity rates varied during the season for each species and between species. Results are presented in Table 3. During summer period (June, July and September), parity rates were 0,48 (0,41–0,54) and 0,46 (0,27–0,66) for *An. hyrcanus* and *An. melanoon* respectively at Carbonnière and 0,32 (0,27–0,38) and 0,54 (0,43–0,65) for *An. hyrcanus* and *An. melanoon* respectively at Marais du Vigueirat.

Discussion

Anopheles hyrcanus was the most collected species in both areas and particularly at Marais du Vigueirat where thousands of specimens were captured per night during the peak. Rice fields constitute prolific larval sites for this species and large populations are frequently associated with some rice growing areas as described in Turkey or Greece [20]. Although it was much less abundant than *An. hyrcanus*, *An. melanoon* was predominant within the *Maculipennis* complex in the two study areas. Rioux noticed this abundance by the years 1950: *An. melanoon* was very abundant in the coastal area and paddies constituted its favourite breeding site [21]. Salières confirmed these observations 20 years later [15]. Data presented here show that *An. melanoon* abundance has not diminished in the Camargue from the years 1950. *Anopheles atroparvus* was very rare in 2005, although it had been described as the major vector in the past. It was very abundant and present in several environmental patterns of South East France by the 1940's and 1950's [9,21], whereas Salières captured it only five times during a 4-year survey 20 years later [15]. Observations reported here confirmed that this species remained very rare.

Breeding sites of *An. algeriensis* are constituted by resurgence of water tables [21]. This kind of biotope is located

Table 1: Total number of *Anopheles* caught in 2005 by methods and months in the Camargue

Study area	Capture method	Species	Mar.	April	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Total	
Carbonnière	Light trap	<i>An. melanoon</i>	0	0	10	39	45	122	18	0	-	-	234	
		<i>An. atroparvus</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	0	-	-	4
		<i>An. hyrcanus</i>	0	0	16	673	374	3,257	1,228	3	-	-	-	5,551
	Resting fauna	<i>An. melanoon</i>	0	1	3	114	-	182	76	10	2	0	0	388
		<i>An. atroparvus</i>	0	0	0	7	-	14	8	82	59	4	0	174
		<i>An. hyrcanus</i>	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
	Human landing	<i>An. melanoon</i>	-	-	0	-	-	0	0	-	-	-	-	0
		<i>An. atroparvus</i>	-	-	0	-	-	0	0	-	-	-	-	0
		<i>An. hyrcanus</i>	-	-	0	-	-	398	35	-	-	-	-	433
	Total	<i>An. melanoon</i>	0	1	13	153	45	304	94	10	2	0	0	622
		<i>An. atroparvus</i>	0	0	0	8	1	15	9	82	59	4	0	178
		<i>An. hyrcanus</i>	0	0	16	673	374	3,655	1,263	3	0	0	0	5,984
Marais du Vigueirat	Light trap	<i>An. melanoon</i>	0	6	27	134	464	1,073	105	2	-	-	1,811	
		<i>An. atroparvus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0
		<i>An. hyrcanus</i>	5	7	296	6,737	17,739	61,315	25,708	124	-	-	-	111,931
	Resting fauna	<i>An. algeriensis</i>	0	43	50	72	2	0	1	2	-	-	-	170
		<i>An. melanoon</i>	0	0	146	292	-	361	128	5	0	-	-	932
		<i>An. atroparvus</i>	0	0	5	6	-	6	20	9	6	-	-	52
		<i>An. hyrcanus</i>	10	0	3	0	-	2	0	0	0	-	-	15
	Horse bait	<i>An. algeriensis</i>	-	0	-	0	-	0	0	0	0	-	-	0
		<i>An. melanoon</i>	-	-	1	-	-	1,393	17	-	-	-	-	1,411
		<i>An. atroparvus</i>	-	-	0	-	-	15	0	-	-	-	-	15
		<i>An. hyrcanus</i>	-	-	0	-	-	768	88	-	-	-	-	856
	Human landing	<i>An. algeriensis</i>	-	-	0	-	-	0	0	-	-	-	-	0
		<i>An. melanoon</i>	-	-	0	-	-	10	0	0	-	-	-	10
		<i>An. atroparvus</i>	-	-	0	-	-	0	0	0	-	-	-	0
		<i>An. hyrcanus</i>	-	-	0	-	-	7,034	14	14	-	-	-	7,062
	Total	<i>An. algeriensis</i>	-	-	1	-	-	0	0	0	-	-	-	1
		<i>An. melanoon</i>	0	6	174	426	464	2,837	250	7	0	-	-	4,164
		<i>An. atroparvus</i>	0	0	5	6	0	21	20	9	6	-	-	67
<i>An. hyrcanus</i>		15	7	299	6,737	17,739	69,119	25,810	138	0	-	-	119,864	
<i>An. algeriensis</i>		0	43	51	72	2	0	1	2	0	-	-	171	

-: Not done

on the east side of the Marais du Vigueirat where the "Crau" water table appears. This is why this species was captured only at Marais du Vigueirat and particularly in spring. The absence of *An. algeriensis* in summer could be explained by resurgences being dry during summer due to drought in the South of France.

Anopheles maculipennis s.s. was reported several times in France, but it is associated with fresh water [22]. It was reported only twice near the south coast of France and in fresh water biotopes [15,21]. Moreover, 16 *An. maculipennis* complex specimens were collected in a horse bait trap in 2004 at Lunel-Viel [23]. Six out of 11 specimens processed by PCR were identified as *An. maculipennis* s.s. Lunel-Viel is located at the outer limits of the Camargue, in a dry area without any marshes, paddies or pools submitted to salt water table resurgence. The absence of *An. maculipennis* s.s. in results presented here is in accordance to these environmental differences.

Anopheles claviger s.s., *Anopheles petragrani* and *Anopheles plumbeus* have been reported several times in south-east France. They were not captured during the survey conducted in 2005 because their ecological niches were rare or absent of the two sites and this study did not focus on their breeding sites (which correspond to tree holes for *An. plumbeus*, rivers stream and small, cold and fresh water collection for the others) [14,21,24,25]. However, *An. plumbeus* and *An. claviger*, which were considered as secondary vectors, could be more abundant in some others places, and particularly places close to humans.

Anopheles labranchiae has not been recorded in the Camargue and continental France so far, while it is abundant in Corsica, where it is reported in breeding sites such as small pools with fresh water and marshes [14,26,27]. It is also abundant in Italy, particularly in paddies and in rivers and streams [28]. In the context of global warming, distribution of this species has not yet expanded to the

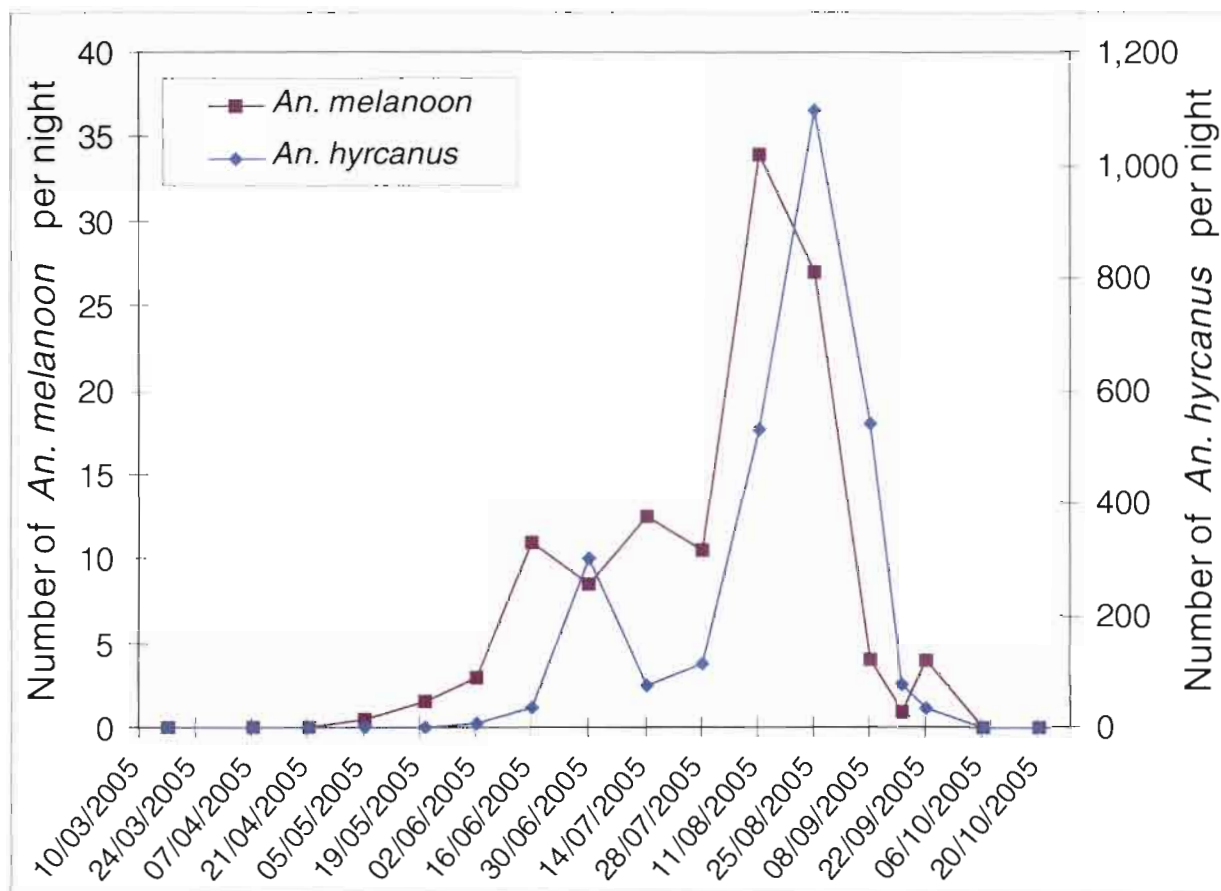


Figure 2
Seasonal dynamics of *Anopheles melanoon* and *Anopheles hyrcanus* at Carbonnière in 2005 (eight traps).

Camargue despite abundance of potential breeding sites, such as paddies.

Anopheles hyrcanus and *An. melanoon* presented similar dynamics in the two areas in 2005, although total mosquito numbers were very different. Their populations began increasing in the middle of June, reaching a peak near the middle of August and decreasing drastically in the middle of September (although *An. melanoon* decreased earlier). Dynamics of these species collapsed brutally at the end of July in the two areas without any identified cause (such as wind, temperature, treatment by mosquito pesticide, hygrometry, water supplying of breeding sites, significant modification of *Anopheles* breeding sites or moon cycle).

Populations of resting *An. atroparvus* remained very low until September or October and then presented a peak in October and November although the number of collected

specimens remained small. During this period, more *An. atroparvus* were captured at Carbonnière and particularly in one horse shelter. In 1943, Sautet had observed that this species was very abundant in September suggesting a near disappearance of this species since the 1950's [9].

Anopheles hyrcanus presented a huge anthropophily in both areas with spectacular aggressiveness on humans: during this study scientists underwent massive attacks from females of this species. Results from others authors confirm the high level of anthropophily in France in the past or in South Eastern Europe and South Western Asia [20,21,27,29]. It was reported as one of the principal mosquito pests in Northern Greece in 2001 [29]. Unfortunately, only nine *An. hyrcanus* bloodmeals were processed because very few blood-fed *An. hyrcanus* females were captured in light traps. None of these nine blood meals were human demonstrating an opportunistic trophic behaviour of this species.

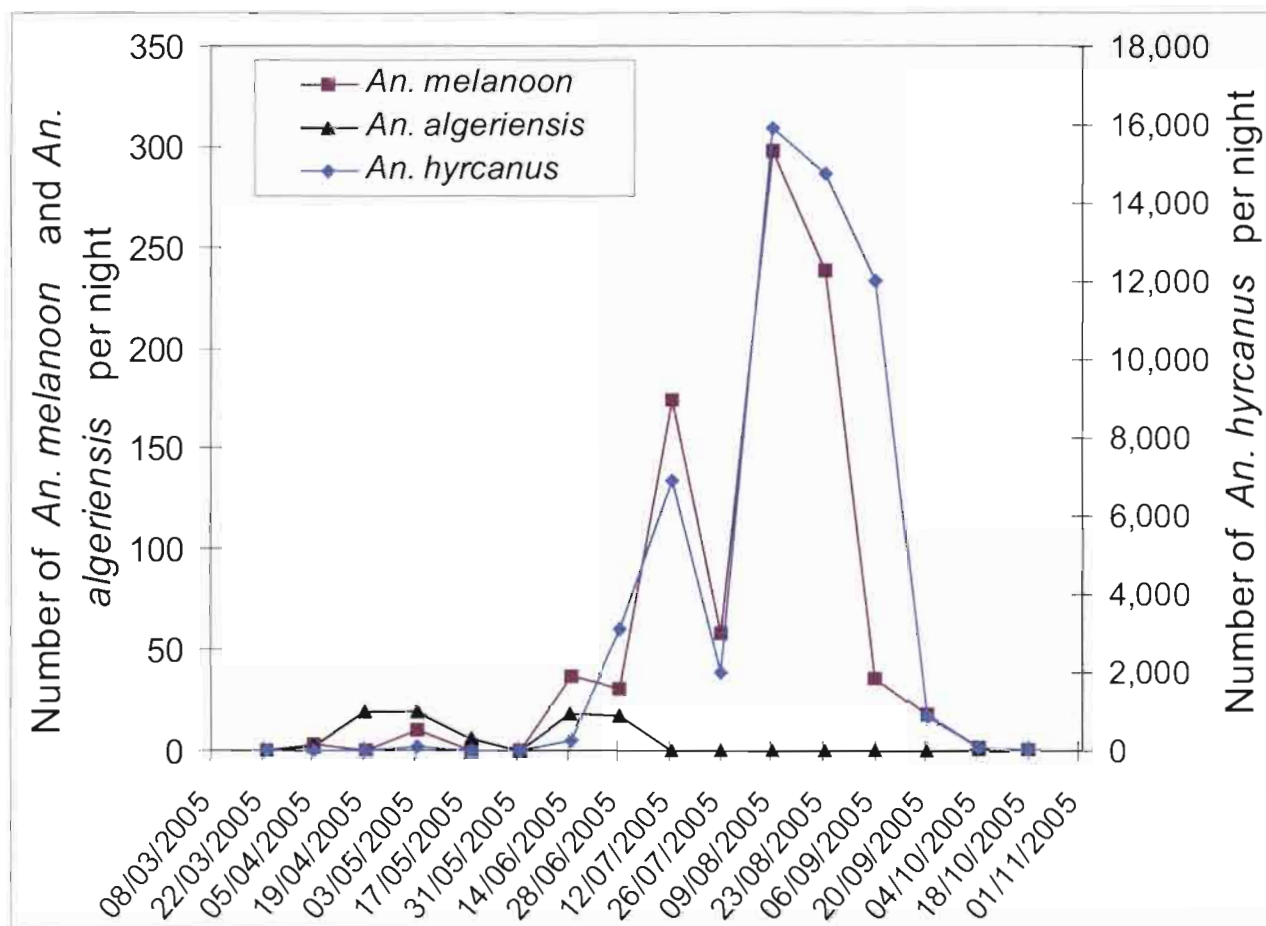


Figure 3

Seasonal dynamics of *Anopheles melanoon*, *Anopheles hyrcanus* and *Anopheles algeriensis* at Marais du Vigueirat in 2005 (eight traps).

In contrast to *An. hyrcanus*, *An. melanoon* only exceptionally bite humans. This is confirmed by blood meal analyses: *An. melanoon* bite animals, especially big mammals (horses and cows). The high degree of zoophily had already been reported [15,22,27,30].

Parity rates were difficult to assess because sampling methods did not always provide enough mosquitoes suitable for dissection (too few or too dry mosquitoes). When it was possible to determine parity rates based on a robust number of specimens and using the same sampling method (light traps), parity rates were reported as inversely connected to population dynamics. This situation was observed at Marais du Vigueirat for *An. hyrcanus* (June, July and September), *An. melanoon* (July and September) and at Carbonnière for *An. hyrcanus* (July and September). Low parity rates, related to young populations, reflect the growth of populations during summer to

reach a peak in August, while higher parity rates in September were related to older and decreasing populations.

Conclusion

In the Camargue, a former malaria-endemic area, *An. hyrcanus* seems to be the only *Culicidae* likely to play a role in malaria transmission in view of its abundance and anthropophily. However, the experimental susceptibility of *An. hyrcanus* to infection with *P. vivax* and *P. falciparum* strains should be tested for assessing risks for potential transmission of this anthropophilic species. Finally, the «anophelism without malaria» situation is still going on in metropolitan France since malaria elimination, although there is a possibility for local transmission.

Authors' contributions

NP designed the study, carried out field work, analysed data and drafted the manuscript. CT participated to field

Table 2: Blood meal analysis of fed mosquitoes

Mosquito species	Study area	No of mosquitoes	No of mosquito fed on each vertebrate host					
			Horse	Bovine	Boar	Mixed	Dog	Other hosts
<i>An. melanoon</i>	Carbonnière	142	95	41	0	2 ^a	0	4
	Marais du Vigueirat	84	67	1	8	0	1	7
<i>An. atroparvus</i>	Carbonnière	12	10	2	0	0	0	0
	Marais du Vigueirat	3	3	0	0	0	0	0
<i>An. maculipennis</i> complex	Carbonnière	11	9	2	0	0	0	0
	Marais du Vigueirat	6	2	1	2	1 ^b	0	0
<i>An. hyrcanus</i>	Carbonnière	1	1	0	0	0	0	0
	Marais du Vigueirat	8	7	0	1	0	0	0
Total		267	194	47	11	3	1	11

^a: horse/bovine and horse/boar

^b: horse/sheep

Table 3: Parity rates of *Anopheles* captured in 2005

	Carbonnière									Marais du Vigueirat					
	<i>An. melanoon</i>			<i>An. atroparvus</i>			<i>An. hyrcanus</i>			<i>An. melanoon</i>			<i>An. hyrcanus</i>		
	Capture	P	No	Capture	P	No	Capture	P	No	Capture	P	No	Capture	P	No
Mar.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LT+RF	0.71	7
April	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LT	0.75	4	LT+human	0.80	10
June	LT	0.40	5	-	-	-	LT	0.14	7	RF	0.07	30	LT	0.68	25
July	LT	0.50	14	-	-	-	LT	0.22	87	LT	0.29	48	LT	0.24	118
Sept.	LT	0.44	9	LT	0.00	1	LT	0.67	132	LT	0.91	33	LT	0.33	118
	RF	0.50	32	RF	1.00	4	-	-	-	RF	0.26	19	-	-	-
Oct.	RF	0.14	7	RF	0.00	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dec.	-	-	-	RF	0.00	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P: Percentage of parous females

No: Number of dissected females

LT: Light trap

RF: Resting fauna

-: Not done

work and carried out molecular studies. GLA participated to field work. GLG participated to the design of the study and to the field work. CB participated to molecular studies. FS participated to the conception and to the design of this study. DF conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Michel Babinot and Didier Caire from the Mosquito Control Department of EID for their precious information and support, Nicolas Sidos at the geographic information department of EID for the map, Jérémie Petit from the «syndicat mixte pour la protection et la gestion de la Camargue gardoise» and staff from the Marais du Vigueirat association for their hospitality and information, Thomas Balenghien from the EPSP-TIMC/ENVL, Florence Fouque from the Pasteur Institute for her information on *An. maculipennis* s.s., Cyrille Thomas from the French Rice Centre for information on paddies, Alain Dervieux for his knowledge of the Camargue and Fabrice Legros for informations concerning imported malaria in France. This work was supported by IRD and was partially funded by the French Ministry of Agriculture and EU grant GOCE-2003-010284 EDEN (the paper is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0038 [31]). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and can in no way be taken to reflect the views of the European Union.

References

1. WHO – CISID-malaria [<http://data.euro.who.int/cisid/>]
2. Cuadros J, Calvente MJ, Benito A, Arevalo J, Calero MA, Segura J, Rubio JM: **Plasmodium ovale malaria acquired in central Spain.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**:1506-1508.
3. Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna G, Fiorilli G, Allegri MP, Buriani C, Toti M: **Malaria in Maremma, Italy.** *Lancet* 1998, **351**:1246-1247.
4. Kampen H, Proft J, Etti S, Maltezos E, Pagonaki M, Maier WA, Seitz HM: **Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: entomological aspects.** *Parasitol Res* 2003, **89**:252-258.
5. Krüger A, Rech A, Su X-Z, Tannich E: **Two cases of autochthonous Plasmodium falciparum malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous Anopheles plumbeus.** *Tropical Medicine and International Health* 2001, **6**:983.
6. Rodhain F, Charmot G: **Evaluation des risques de reprise de transmission du paludisme en France.** *Médecine et Maladies Infectieuses* 1982, **12**:231-236.
7. Sautet J: **Indice de régression et éradication du paludisme.** *Bull Acad Natl Med* 1978, **162**:839-842.
8. Sautet J, Quilici M: **A propos de quelques cas de paludisme autochtone contractés en France pendant l'été.** *La presse médicale* 1971, **79**:524.
9. Sautet J: **A propos d'une épidémie de paludisme en Camargue.** *Marseille-Médical* 1944, **2**:53-64.
10. Danis M, Legros F, Thellier M, Caumes E: **Données actuelles sur le paludisme en France métropolitaine.** *Med Trop (Mars)* 2002, **62**:214-218.
11. Armengaud A, Legros F, Quatresous I, Barre H, Valayer P, Fanton Y, D'Ortenzio E, Schaffner F: **A case of autochthonous Plasmodium vivax malaria, Corsica, August 2006.** *Euro Surveill* 2006, **11**:E061116-061113.
12. Legros F, Arnaud A, El Minouni B, Danis M: **Paludisme d'importation en France métropolitaine : données épidémiologiques 2001-2004.** *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 2006, **32**:235-236.
13. Mouchet J: **Airport malaria : a rare disease still poorly understood.** *Euro Surveill* 2000, **5**:75-76.
14. Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, Hervy J-P, Rhaeim A, Brunhes J: **The mosquitoes of Europe.** Paris: IRD éditions and EID Méditerranée; 2001.
15. Salieres A, Guy A, Suzzoni Blatger J, Cousserans J, Blatger J, Suzzoni : **Synopsis of four years of research on the 'maculipennis complex' (Diptera – Culicidae – Anophelinae).** *Ann Parasitol Hum Comp* 1978, **53**:751-756.
16. Sinegre G, Rioux JA, Salgado J: **Fascicule de détermination des principales espèces de moustiques du littoral méditerranéen français.** Montpellier, France: Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen 1979.
17. Detinova TS: **Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria.** *Monogr Ser World Health Organ* 1962, **47**:13-191.
18. Proft J, Maier WA, Kampen H: **Identification of six sibling species of the Anopheles maculipennis complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay.** *Parasitol Res* 1999, **85**:837-843.
19. Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan TP 2nd, Koech DK: **Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on Anopheles (Diptera: Culicidae) in Kenya.** *J Med Entomol* 1988, **25**:9-16.
20. Ramsdale CD, Lodge V: **Internal taxonomy of the Hyrcanus group of Anopheles (Diptera, Culicidae) and its bearing on the incrimination of vectors of continuing or resurgent malaria in the West of the Palaearctic region.** *European Mosquito Bulletin* 2001, **10**:1-8.
21. Rioux JA: **Les Culicidés du "Midi" méditerranéen.** Volume 35. Paris, France: Editions Paul Lechevalier; 1958.
22. Jetten TH, Takken W: **Anophelism without malaria in Europe. A review of the ecology and distribution of the genus Anopheles in Europe.** Wageningen, Netherlands: Landbouwniversiteit Wageningen (Wageningen Agricultural University); 1994.
23. Balenghien T, Fouque F, Sabatier P, Bicoût DJ: **Horse, bird and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of Southern France.** *Journal of Medical Entomology* 2006, **43**:936-946.
24. Kampen H, Sternberg A, Proft J, Bastian S, Schaffner F, Maier WA, Seitz HM: **Polymerase chain reaction-based differentiation of the mosquito sibling species Anopheles claviger s.s. and Anopheles petragani (Diptera: Culicidae).** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **69**:195-199.
25. Ramsdale CD, Snow K: **Distribution of the genus Anopheles in Europe.** *European Mosquito Bulletin* 2000, **7**:1-28.
26. Aitken THG: **The Culicidae of Sardinia and Corsica (Diptera).** *Bull Entomol Res* 1954, **45**:437-494.
27. Senevet G, Andarelli L: **Les Anophèles de l'Afrique du Nord et du bassin méditerranéen.** Volume 33. Paris, France: Editions Paul Lechevalier; 1956.
28. Romi R, Pierdominici G, Severini C, Tamburro A, Cocchi M, Menichetti D, Pili E, Marchi A: **Status of malaria vectors in Italy.** *J Med Entomol* 1997, **34**:263-271.
29. Kaiser A, Jerrentrup H, Samanidou Voyadjoglou A, Becker N: **Contribution to the distribution of European mosquitoes (Diptera : Culicidae) : four new country records from northern Greece.** *European Mosquito Bulletin* 2001, **10**:9-12.
30. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J: **Biodiversité du paludisme dans le monde.** Montrouge, France: John Libbey Eurotext; 2004.
31. **Emerging diseases in a changing European environment (EDEN)** [<http://www.eden-fp6project.net/>]

Publish with **Bio Med Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Quelques expériences ont été mise en place pour tenter d'évaluer la durée du cycle trophogonique des *Anopheles* en Camargue, sans succès. L'estimation de cette durée est présentée dans la troisième partie et est basée sur des données bibliographiques.

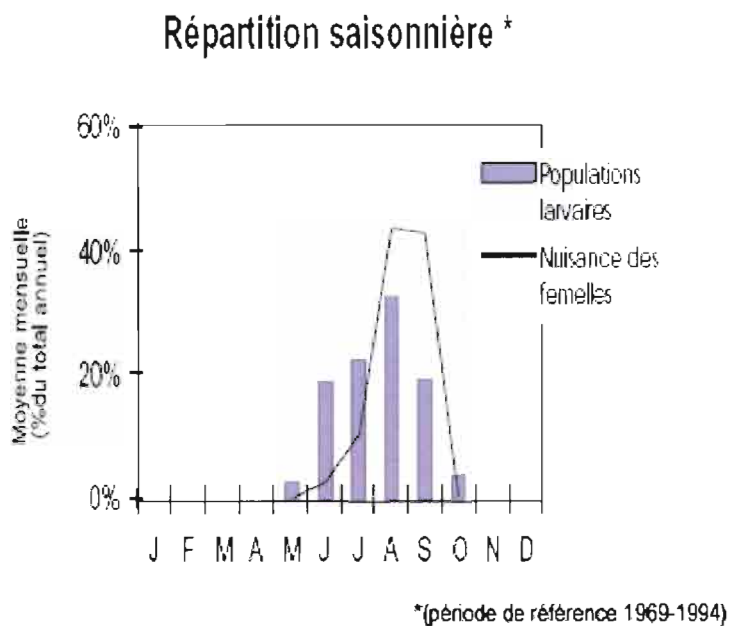
3. Résultats complémentaires

3.1. Validation des données locales : analyse de données complémentaires

Afin de valider la représentativité de nos données (collectées localement) à l'échelle de la Camargue, les données acquises (localement à d'autres endroits) par d'autres équipes ont été exploitées.

- données de l'EID-Méditerranée : ces données proviennent de la surveillance effectuée par les agents impliqués dans la lutte et se basent sur une période de référence de 1969 à 1994, sur la zone ouest de la Camargue (12 points échantillonnés en capture sur homme, approximativement une fois par semaine de mai à octobre) (Figures 3 et 4).
- données de l'EID-Méditerranée (collecte réalisée par Grégory L'Ambert et Francis Schaffner) : ces données ont été acquises dans le cadre de l'étude des risques d'émergence et de diffusion du virus West Nile en Camargue dans le cadre du programme EDEN (Tableau 1 et Figure 4).
- données de l'EID-Méditerranée (collecte réalisée par Alexandre Carron) : ces données ont été acquises dans le cadre de l'étude des traits de vie d'*Aedes caspius* en Camargue (Tableau 1 et Figure 4)

Figure 3 : Dynamique d'*An. hyrcanus* dans la zone d'action de l'EID-Méditerranée

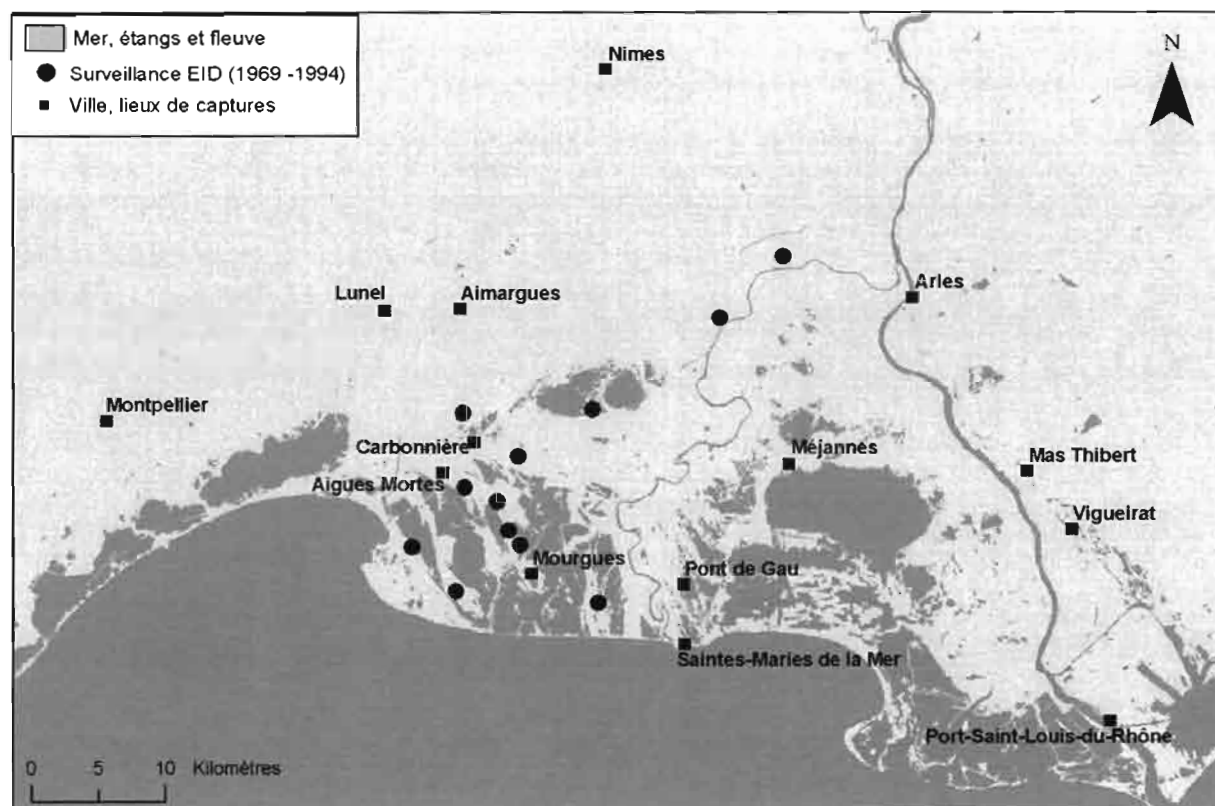


d'après EID-Méditerranée

Tableau 1 : *Anopheles* capturés en 2005 par G. L'Ambert, F. Schaffner et A. Carron

Equipe	Lieu	Capture	Espèce	Date					
				Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre
EID- Méditerranée	Méjannes	Piège CO2	<i>An. hyrcanus</i>	1	27	357	5933	857	0
G. L'Ambert			<i>An. melanoon</i>	0	7	31	82	1	0
F. Schaffner			<i>An. atroparvus</i>	0	1	0	15	0	0
	Aimargues	Piège CO2	<i>An. hyrcanus</i>	0	0	0	102	5	0
			<i>An. melanoon</i>	0	1	0	3	0	0
			<i>An. plumbeus</i>	1	0	0	1	0	6
	Sussargues	Piège CO2	<i>An. hyrcanus</i>	0	0	0	0	1	0
			<i>An. melanoon</i>	0	1	0	0	0	0
			<i>An. maculipennis cx</i>	0	0	1	1	0	0
EID- Méditerranée	Mourgues	Piège CO2	<i>An. hyrcanus</i>	2	18	104	94	32	0
A. Carron			<i>An. melanoon</i>	1	1	0	0	0	0
	Pont de Gau	Piège CO2	<i>An. hyrcanus</i>	2	28	107	730	7	0
			<i>An. melanoon</i>	0	3	25	40	0	0
			<i>An. atroparvus</i>	0	0	2	3	0	0

Figure 4 : Localisation des points de capture des données complémentaires



Les conclusions de ces observations sont les mêmes que celles du paragraphe 2, pour la saison mai-octobre :

- Les espèces *Anopheles* : prédominance d'*An. hyrcanus* de mai à octobre et rareté d'*An. atroparvus* au sein du complexe *Maculipennis*. *An. plumbeus* a été capturé en très faible effectif au nord et à l'est (cf. paragraphe 3.3) de la Camargue, en zone sèche. *An. algeriensis* n'a pas été détecté.
- Les dynamiques : globalement, les dynamiques observées sur les points présentant suffisamment de données sont semblables aux dynamiques décrites au paragraphe 2. Les premières femelles *An. hyrcanus* et *An. melanoon* apparaissent en mai-juin, atteignent un pic d'abondance en juillet-août avant de diminuer en septembre.

Finalement, la convergence des observations nous permet de généraliser à l'échelle régionale nos conclusions élaborées à partir d'études entomologiques à l'échelle locale (paragraphe 2).

3.2. *Anopheles atroparvus* en Camargue

Parallèlement aux prospections entomologiques menées dans les zones de la Carbonnière et des Marais du Vigueirat, des gîtes de repos (pour moustiques endophiles) ont été suivis à Méjannes durant l'hiver 2005-2006 (cf. figure 4 paragraphe 3.1). Des *An. atroparvus* y ont été collectés en nombre relativement important (environ 500 spécimens fin février-début mars 2006) dans des écuries, alors qu'à la même période, les gîtes de repos de la Carbonnière et des Marais du Vigueirat n'abritaient plus aucun *An. atroparvus*. Etant donné l'évolution d'*An atroparvus* et sa rareté dans les 2 zones d'étude prospectées en 2005 (voir paragraphe 2), il était nécessaire d'établir si cette espèce a effectivement diminué régionalement depuis 50 ans, ou s'il subsiste des zones « refuges » où cette espèce présenterait un effectif plus abondant.

En novembre 2006, des prospections d'écuries ont été menées en Camargue avec la participation de JB. Ferré (EID-Méditerranée). Elles ont permis de conclure que, à cette date de prospection, cette espèce était répartie sur l'ensemble de la Camargue, en nombre faible (sauf quelques colonies de plusieurs centaines d'individus), et jusqu'en zone sèche, au Nord de Saint Gilles (l'écurie prospectée était située au milieu des vignes) (Figure 5). Les spécimens d'*An. atroparvus* furent capturés dans les écuries où les chevaux stationnaient en permanence ou régulièrement.

Le très faible nombre de spécimens capturés localement à la Carbonnière ou au Marais du Vigueirat relève sûrement de l'absence d'écuries/étables fréquentées régulièrement par des animaux (ce qui est fréquemment le cas en Camargue, où les bovins et les chevaux passent la totalité de l'année dans les pâturages. Quelques chevaux peuvent être maintenus dans des écuries, notamment ceux utilisés pour le travail). L'élément déterminant la présence de cette espèce en Camargue en hiver semble donc être la présence de gîtes de repos adéquats (sombres, abrités, relativement doux) offrant la possibilité de prendre des repas de sang (donc abritant des animaux). Cependant, la population globale au niveau régional reste très faible par rapport aux autres espèces principales (*An. hyrcanus* et *An. melanoon* présentes en été).

La carte ci-dessous présente les lieux où des *An. atroparvus* ont été capturés.

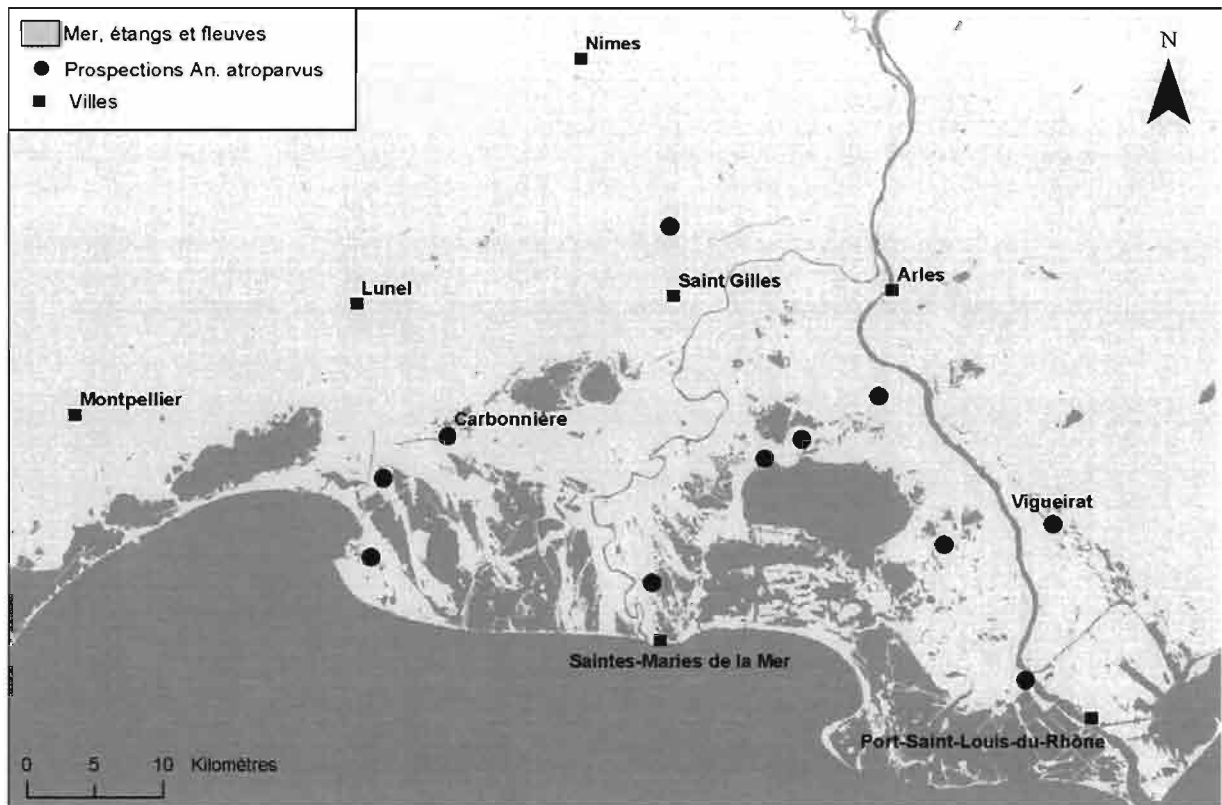


Figure 5 : Prospections d'*An. atroparvus* en novembre 2006

L'ensemble des points prospectés a été positif avec des différences d'abondance.

Cette espèce *Anopheles* (la seule capturée dans ces gîtes de repos à cette période) continue à effectuer des repas de sang durant l'hiver, mais ne développe pas d'œufs : elle est en état de dissociation trophogonique. Les femelles reprennent des cycles gonotrophiques à la fin de l'hiver. De plus, ce sont des femelles nullipares qui passent l'hiver (voir tableau ci-dessous).

Tableau 2 : *An. atroparvus* capturés en gîtes de repos

Date	Lieu	Taux de parturité	
		(nb disséqué)	Etat
08/09/2005	Carbonnière	1 (4)	
20/10/2005	Carbonnière	0 (48)	
15/12/2005	Carbonnière	0 (3)	
28/02/2006-02/03/2006	Méjannes		cycle gonotrophique actif
04/10/2006	Méjannes		cycle gonotrophique actif
16/11/2006-21/11/2006	Méjannes	0 (85)	discordance trophogonique
21/11/2006	Camargue (12 points)	0.005 (194)	discordance trophogonique
06/03/2007	Méjannes		cycle gonotrophique actif

Ne figurent dans ce tableau que les spécimens pour lesquels la parturité ou l'état physiologique a été relevé.

3.3. *Anopheles plumbeus* en Camargue

L'aire de répartition d'*An. plumbeus* couvre toute l'Europe. En France, il a été décrit dans le Sud Est, notamment dans les Bouches du Rhône et dans l'Hérault (Ramsdale & Snow 2000). Rioux décrivit sa présence au niveau des forêts-galeries des fleuves côtiers de l'Hérault (Rioux 1958). Sa biologie particulière (les larves se développent essentiellement dans les trous d'arbres) limite la taille des populations de cette espèce car ses gîtes sont naturellement de faible contenance (Schaffner et al. 2001). Bien qu'anthropophile, il ne semble donc pas avoir joué un rôle dans la transmission des *Plasmodium* autrefois. Néanmoins, son implication suspectée dans deux cas de transmission autochtone en Allemagne en 2001 a soulevé la question de l'importance épidémiologique de cette espèce de nos jours (Krüger et al. 2001). De plus, Eling démontra expérimentalement la compétence vectorielle de cette espèce vis-à-vis de *P. falciparum* tropicaux (Blacklock & Carter 1920a, Marchant et al. 1998, Eling et al. 2003), relançant ainsi l'intérêt pour cette espèce, d'autant plus que sa présence a été notée dans des gîtes larvaires domestiques, rapprochant ainsi des hommes les adultes de cette espèce initialement forestière par définition. Des larves ont été identifiées dans des récipients, des vases de cimetières (Logan 1953, Senevet et al. 1955), et des proliférations entraînant des nuisances ont été reportées dans des vieux pneus dans des décharges, et dans des fosses à purin abandonnées (Karch 1996, Schaffner et al. 2001). Cette adaptation aux gîtes

domestiques augmente les probabilités de contact homme-vecteur et donc les risques de piqûres sur homme dans des zones où la densité humaine peut être élevée.

Parallèlement au système vectoriel historique en Camargue (transmission de *Plasmodium* par des populations d'*Anopheles* abondantes issues de marais) et à dominante rurale, il est pertinent d'envisager un système vectoriel potentiel urbain, dans lequel des vecteurs peu abondants bénéficient de possibilités de contacts plus fréquents avec l'homme dues à leur proximité géographique et à la présence de gîtes probables dans des zones densément peuplées.

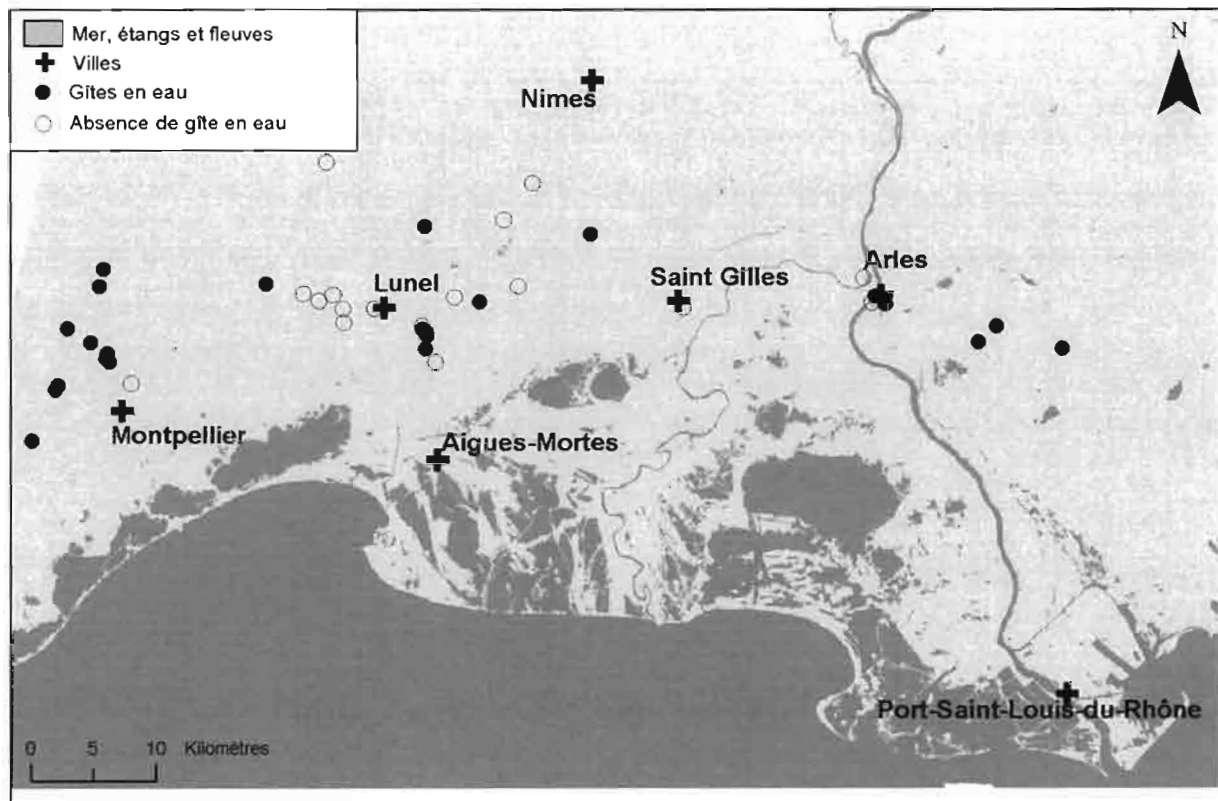
Les prospections menées en 2005 (cf. paragraphe 2 et 3.1) n'ont collecté que très peu d'*An. plumbeus*. Cependant, elles n'ont pas spécifiquement ciblé les gîtes et biotopes favorables à *An. plumbeus*.

Dans le cadre de l'étude des risques de ré-émergence du paludisme en Camargue, il est donc nécessaire de caractériser le risque relatif à cette espèce en s'intéressant à l'aspect entomologique. Afin d'approfondir les données entomologiques relatives à cette espèce, des prospections ciblées ont été réalisées.

Des prospections larvaires ont été menées au printemps et à l'automne 2006, et au printemps 2007 (quelques prospections limitées en été 2007) avec la participation de C. Toty (IRD, UR016) et JB. Ferré (EID-Méditerranée). Les saisons printemps/automne ciblent les périodes de remplissage probable des gîtes potentiels par les pluies (trous d'arbres ou gîtes domestiques). Dans le sud est de la France, les trous d'arbres sont rencontrés essentiellement sur les platanes bordant les routes ou dans les villages (les trous apparaissent dans les troncs au niveau des tailles). De telles situations ont été essentiellement rencontrées sur le pourtour de la Camargue, en zone sèche (il y a très peu de platanes en Camargue, et les arbres les plus fréquents, les tamarissiers, présentent des troncs de faible diamètre). De plus, des galeries-forêts bordant les rivières ou fleuves ont été également prospectées sur certains tronçons accessibles.

Les résultats des prospections sont présentés ci-dessous.

Figure 6 : Prospections larvaires ciblant les trous d'arbres



Chaque point correspond à une zone où des arbres ont été inspectés. Parmi ces gîtes figurent également quelques gîtes anthropiques (bidons, pneus, ...). De plus, cinq zones situées plus au nord ont également été prospectées (autour d'Anduze et près de Saint-Jean-du-Gard).

Au total, environ 2600 arbres*jours de prospections ont été réalisés, répartis sur 47 points/zones différents (les prospections ayant été menées en automne et au printemps 2006 et 2007, certaines zones ont été prospectées plusieurs fois).

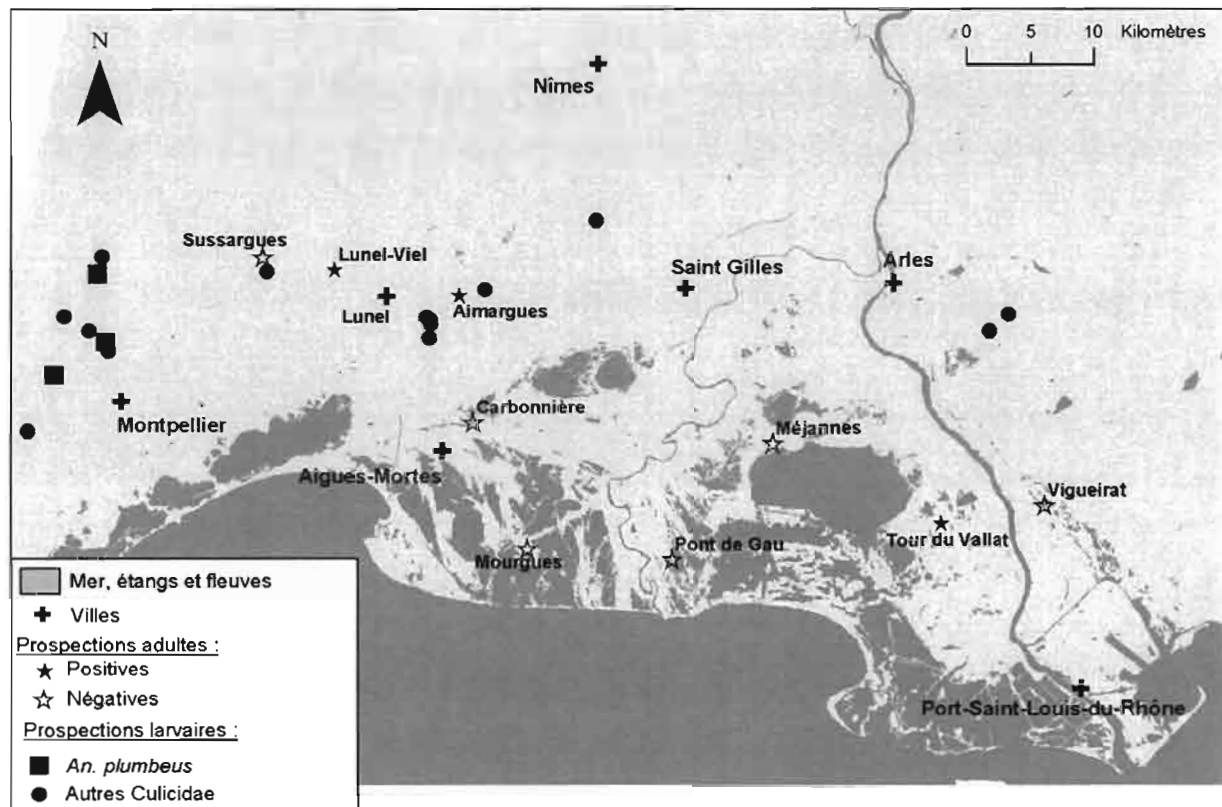
Peu de gîtes en eau ont été trouvés malgré des prospections ciblées en fonction de la pluviométrie (seulement 90 gîtes*jours). Sur la carte, un point noir signifie au moins un trou en eau sur la zone.

Parmi les 47 points ou zones prospectés, seuls 24 ont présenté au moins une fois des *Culicidae*. Les espèces suivantes ont été relevées : *Ochlerotatus berlandi*, *Oc. genicultus*, *Oc. pulcritarsis*, *Orthopodomyia pulcripalpis*, *Culex pipiens*, *Cx. hortensis*, *Culiseta longiareolata*, *Cs. annulata* et *An. plumbeus*. (Figure 7)

Au final, seules quatre zones ont permis de collecter des *An. plumbeus* en creux d'arbres (Figure 7) : la Mosson à Montpellier (« galerie forestière » autour de la Mosson), Nord de Montpellier (proche du rond point Agropolis, alignement de platanes sur le bord d'une route dans un environnement péri-urbain), Prades-le-Lez (arbres en bord d'un cours

d'eau proche d'une galerie forestière) et un bord de route proche d'Anduze (milieu péri-urbain, et plus largement milieu forestier). Les collectes les plus abondantes ont été réalisées en juillet 2007.

Figure 7 : Résultats des prospections larvaires et d'adultes ciblant les trous d'arbres



En bilan, aucune larve n'a été collectée en Camargue ou en bordure immédiate de la Camargue.

De plus, aucun adulte n'avait été collecté au cours des captures utilisant des pièges lumineux, sur homme ou cheval réalisées en 2005 à la Carbonnière et au Vigueirat (cf. paragraphe 2 de ce chapitre). Seuls huit adultes avaient été capturés à Aimargues en 2005 par Grégory L'Ambert (données EID-Méditerranée) au cours de captures réalisées de mai à novembre sur trois sites différents : Sussargues, Aimargues et Méjannes et aucun adulte n'avait été capturé en 2005 à Mourgues et Pont de Gau par A. Carron (données EID-Méditerranée) (cf. paragraphe 3.1 de ce chapitre). De mai à octobre 2004, 24 spécimens avaient été collectés en capture sur hommes et à l'aide d'un piège à appât cheval à la Tour du Valat, et 8 à Lunel Viel à l'aide d'un piège à appât cheval (Balenghien et al. 2006).

Ces informations correspondent aux observations précédentes : *An. plumbeus* colonise surtout les trous de platanes des bords de routes ou des villages situés dans des massifs forestiers étendus (notamment dans l'arrière pays), ou des galeries forestières bordant les rivières en zones non boisées (Rioux 1958)(Rioux, communication personnelle).

Globalement, l'ensemble de ces données permet de conclure à la quasi absence de cette espèce en Camargue et en zone sèche autour de la Camargue. Il n'est pas possible d'exclure de potentielles proliférations ponctuelles dans des gîtes particuliers (anthropiques), comme cela a été observé en Alsace par exemple, mais dans ce cas, leur impact épidémiologique ne serait que ponctuel également.

3.4. Cycle nyctéméral d'agressivité et d'activité : détail

Les cycles d'agressivité et d'activité ont été mesurés selon la procédure développée dans le paragraphe 2. Les résultats de 2005 ont été inclus dans l'article du paragraphe 2. Les données de 2006 confirment les résultats présentés au deuxième paragraphe : *An. hyrcanus* présente un pic d'agressivité juste après le coucher du soleil. Une dizaine d'*An. melanoon* seulement ont été capturés sur homme en 2005 et 2006. Les séances de capture ont été réalisées avec la participation de C. Toty (IRD, UR016) en 2005 et 2006 et de G. L'Ambert (EID-Méditerranée) en 2005.

Les heures de coucher et lever du soleil indiquées ci-dessous ne sont pas les heures légales, mais les heures locales, calculées pour le centre du soleil et correspondent à une hauteur sous l'horizon égale à la réfraction horizontale normale (36'.6) corrigée de la parallaxe horizontale du corps (angle sous lequel le rayon de la Terre est vu depuis le corps céleste). Le rayon apparent des astres et l'altitude de l'observateur ne sont pas pris en compte (d'après l'Institut de mécanique céleste et de calcul des éphémérides : <http://www.imcce.fr/>).

Tableau 3 : Cycle d'agressivité d'*Anopheles hyrcanus*, mesuré par captures sur hommes

Date	11/07/06	08/08/05	08/08/05	10/08/05	23/08/06	23/08/06	23/08/06	05/09/06	19/09/05	21/09/05	04/10/05	
Zone	Vigueirat	Vigueirat	Vigueirat	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Vigueirat	Vigueirat	Carbonnière	Vigueirat	
Coordonnées	Latitude	43.50556	43.5192	43.53733	43.59321	43.59321	43.60103	43.60668	43.5055	43.5366	43.59321	43.51921
	Longitude	4.79135	4.76919	4.75544	4.23925	4.23925	4.22430	4.23101	4.79135	4.75207	4.23925	4.76919
Données		EID-Méditerranée ^{1,2}	IRD	IRD	IRD	IRD	IRD	EID-Méditerranée ¹	IRD	IRD	IRD	
Soleil	Coucher	21h23	20h55	20h55	20h55	20h33	20h33	20h33	20h10	19h44	19h44	19h17
	Lever	6h13	6h41	6h41	6h41	6h57	6h57	6h57	7h12	7h28	7h28	7h45
Heures	18-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	19-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
	20-21	-	0	0	0	22	2	6	21	9	25	0
	21-22	27	6312	26	304	134	14	33	46	0	3	0
	22-23	88	100	7	41	8	1	10	7	1	3	-
	23-24	23	56	3	40	4	0	4	8	0	0	-
	0-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2-3	-	320	1	-	-	-	-	-	-	0	-
	3-4	-	206	0	9	-	-	-	-	-	1	-
	4-5	-	-	-	-	1	0	0	2	-	-	-
	5-6	-	-	-	-	1	0	1	3	-	-	-
	6-7	-	-	-	-	6	1	0	38	-	-	-

Notes :

¹ captures réalisées par G. L'Ambert, JB. Ferré, C. Yzoard et C. Duchet (EID-Méditerranée)

² capture réalisée par deux personnes (somme des deux personnes)

- signifie capture non réalisée

Tableau 4 : Cycle d'activité d'*An. hyrcanus* mesuré par pièges lumineux+CO₂

Date		08/08/2005	08/08/2005	10/08/2005	10/08/2005	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	05/09/2006	19/09/2005	21/09/2005
Zone		Vigueirat	Vigueirat	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Vigueirat	Vigueirat	Carbonnière
Pièges lumineux		3	2	2	5	2	Musette	6	≈ 6	5	2
Coordonnées	Latitude	43.51938	43.53660	43.59030	43.59953	43.59030	43.60103	43.60668	43.50595	43.50450	43.59030
	Longitude	4.76890	4.75323	4.23781	4.21116	4.23781	4.22430	4.23101	4.79155	4.78948	4.23781
Données		IRD	IRD	IRD	IRD	IRD	IRD	EID-Méditerranée ¹		IRD	IRD
Soleil	Coucher	20h55	20h55	20h55	20h55	20h33	20h33	20h33	20h10	19h44	19h44
	Lever	6h41	6h41	6h41	6h41	6h57	6h57	6h57	7h12	7h28	7h28
Heures	20-22	1112	15	74	83	95	17	69	1726	19	9
	22-24	960	24	15	190	6	9	2	461	15	1
	0-2	710	30	1	8	0	1	2	89	11	0
	2-4	216	1	12	4	0	1	1	85	9	0
	4-6	493	0	0	3	0	0	1	16	4	0
	6-8	55	0	0	0	0	0	0	3	23	5

Note :

¹ captures réalisées avec deux pièges, à CO₂ uniquement (pas de lumière) par G. L'Ambert et JB. Ferré (EID-Méditerranée)

Tableau 5 : Cycle d'activité d'*An. melanoon* mesuré par pièges lumineux+CO₂

Date		08/08/2005	08/08/2005	10/08/2005	10/08/2005	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	05/09/2006	19/09/2005	21/09/2005
Zone		Vigueirat	Vigueirat	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Carbonnière	Vigueirat	Vigueirat	Carbonnière
Pièges lumineux		3	2	2	5	2	Musette	6	≈ 6	5	2
Coordonnées	Latitude	43.51938	43.53660	43.59030	43.59953	43.59030	43.60103	43.60668	43.50595	43.50450	43.59030
	Longitude	4.76890	4.75323	4.23781	4.21116	4.23781	4.22430	4.23101	4.79155	4.78948	4.23781
Données		IRD	IRD	IRD	IRD	IRD	IRD	EID-méditerranée ¹	IRD	IRD	IRD
Soleil	Coucher	20h55	20h55	20h55	20h55	20h33	20h33	20h33	20h10	19h44	19h44
	Lever	6h41	6h41	6h41	6h41	6h57	6h57	6h57	7h12	7h28	7h28
Heures	20-22	21	4	0	2	0	5	0	3	0	0
	22-24	18	0	0	17	0	0	0	1	0	3
	0-2	6	0	0	34	0	0	0	0	0	0
	2-4	0	3	1	2	0	2	0	0	1	0
	4-6	100	2	0	1	0	0	0	1	0	0
	6-8	19	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Note :

¹ captures réalisées avec deux pièges, à CO₂ uniquement (pas de lumière) par JB. Ferré (EID-Méditerranée)

3.5. Etude des gîtes larvaires des espèces *Anopheles* et spatialisation de la présence et de la densité d'*An. hyrcanus* – Article 4

L'inventaire des espèces *Anopheles* présentes et l'étude de leur dynamique et biologie présentés précédemment fournissent les données nécessaires à l'évaluation de la capacité vectorielle des vecteurs potentiels. L'objectif de ce travail de thèse étant d'étudier le risque de ré-émergence du paludisme et de le caractériser spatialement, il est nécessaire d'étudier la répartition géographique des espèces *Anopheles* en Camargue afin d'en apprécier la distribution spatiale. L'approche larvaire a été utilisée sur ce thème, afin de définir les gîtes larvaires spécifiques et d'en extrapoler la distribution spatiale des adultes à partir d'images satellites.

Un suivi longitudinal des différents biotopes de Camargue a été mené en 2006 avec la participation de C. Toty (IRD, UR016) et JB. Ferré (EID-Méditerranée), et l'analyse spatiale des données a été réalisée par A. Tran (Cirad, UR16). Ce travail s'est focalisé sur *An. hyrcanus* (jeu de données trop limité pour les autres espèces) et a donné lieu à une publication acceptée dans la revue *International Journal of Health Geographics*, dont le résumé est présenté en annexe 4 :

Article 4 : Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré JB, Lo Seen D, Roger F, de la Rocque S, Fontenille D, Baldet T, 2007. Use of remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles* species in Southern France. *International Journal of Health Geographics* (accepted)

Résumé : l'analyse des liens entre les données entomologiques larvaires et des indices environnementaux, dérivés d'images satellites à haute définition, a permis de construire un indice larvaire renvoyant à la probabilité d'observer des larves *An. hyrcanus* dans un gîte donné. Dans un deuxième temps, un indice d'abondance adulte a été dérivé de l'indice larvaire, et une corrélation a été observée avec les résultats des captures d'*An. hyrcanus* adultes, permettant d'établir des cartes prédictives de la présence d'*An. hyrcanus* larvaire et adulte en Camargue à partir d'indices environnementaux générés par des images satellites.

Remarque : le manuscrit entier de la publication n'a pas pu être présenté ici. Néanmoins, il met en évidence l'importance des rizières dans le calcul des indices environnementaux utilisés pour générer les cartes de présence d'*An. hyrcanus* (larves et adultes).

3.6. Suspicion de transmission autochtone de paludisme – Article 5

Dans le cadre d'une suspicion de transmission autochtone de paludisme à *P. falciparum* à Marseille en juin 2006, des prospections entomologiques ont été menées sur le lieu de résidence de la patiente (avec la participation de C. Toty (IRD, UR016)).

Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée en annexe 5.

Article 5 : Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer WM, Fontenille D, Rogier C, Parola P, 2007. Autochthonous malaria from Marseilles to Minneapolis? *Emerging Infectious diseases*, 13, 1236-1238.

Résumé : deux cas de paludisme à *P. falciparum* ont été diagnostiqués chez une habitante de Marseille et un touriste américain ayant visité le sud est de la France, les deux patients n'ayant pas mentionné de voyage récent en zones endémiques. Les enquêtes épidémiologiques, cliniques et génétiques ont permis d'émettre l'hypothèse d'une transmission autochtone par des *Anopheles* locaux, bien que les prospections entomologiques n'aient pas permis de capturer d'*Anopheles*.

3.7. Inventaire des espèces du complexe Maculipennis dans d'autres régions de France

Ce travail a également été l'occasion de mettre à jour l'inventaire des espèces du complexe Maculipennis dans d'autres régions de France où d'autres équipes, impliquées sur l'étude des vecteurs et dans la lutte contre les moustiques nuisants, prospectent régulièrement leur zone d'activité. Des spécimens *Anopheles maculipennis* complex d'Alsace, de l'Ain et d'autres zones ont ainsi été analysés pour déterminer leur espèce. Les résultats sont présentés en annexes 6, 7 et 8.

3.8. Dynamique des quatre espèces principales de Culicidae en Camargue – Article 6

L'enquête entomologique développée au chapitre 2 a été l'occasion de collecter un grand nombre de *Culicidae* de différents genres et espèces - l'objectif principal étant de s'intéresser aux *Anopheles*. Néanmoins, les spécimens des autres genres ont également été déterminés par sous échantillonnage, et leur dynamique a ainsi été analysée et comparée à celle d'*An. hyrcanus* en lien avec les caractéristiques biologiques spécifiques, les facteurs climatiques (températures et pluviométrie) et les facteurs anthropiques (utilisation du sol, gestion de l'eau et lutte contre les moustiques nuisants).

Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée en annexe 9.

Article 6 : Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D. Population dynamics of pest mosquitoes and malaria and West Nile virus potential vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue – France. *Medical and Veterinary Entomology* 21 : 350-357.

Résumé : dans le cadre des études menées sur les *Anopheles* (chapitre 1, paragraphe 2), un suivi longitudinal des populations de *Culicidae* en Camargue a été réalisé à l'aide de piégeages (pièges lumineux+CO₂) bi-mensuels, de mars à octobre 2005. Seize espèces de *Culicidae* ont été capturées, parmi lesquelles *Ochlerotatus caspius*, *Culex modestus*, *Cx. pipiens* et *An. hyrcanus* furent les plus abondantes (98.7% des captures). Les dynamiques de ces quatre espèces ont été très différentes, en lien avec leur biologie, les conditions climatiques, la gestion de l'eau, l'utilisation du sol et la démoustication.

4. Synthèse

Face à la quasi disparition d'*An. atroparvus* (discuté en partie 3), le comportement trophique zoophilique d'*An. melanoon*, et la rareté des autres espèces (sauf proliférations potentielles ponctuelles), *An. hyrcanus*, dont le statut systématique est maintenant défini en Camargue, semble être le seul *Anopheles* capable de jouer un rôle dans la transmission des *Plasmodium*. La quantification des capacités vectorielles spécifiques et leur articulation pour déterminer la réceptivité de la Camargue sont présentées en partie 3.

La compétence vectorielle des espèces *Anopheles*, c'est-à-dire le degré de compatibilité entre le vecteur et le pathogène, doit également être étudiée car, par sa multiplication avec la capacité vectorielle, elle module l'importance d'un vecteur potentiel.

Chapitre 2. Compétence vectorielle des *Anopheles* de Camargue

1. Introduction et synthèse bibliographique

La compétence vectorielle peut être définie par l'aptitude d'un insecte à s'infecter, amplifier et transmettre un pathogène en conditions de laboratoire, c'est-à-dire sans considérer les caractéristiques biologiques (préférence d'hôte, fréquence des repas, longévité, ...) ayant une influence sur la transmission de ce pathogène (Rodhain 1985, Woodring et al. 1996). Cette aptitude est gouvernée par de nombreux mécanismes et interactions moléculaires entre le vecteur et le pathogène. Le système immunitaire du vecteur, plus ou moins « permissif », intervient de façon prépondérante dans ces mécanismes (Beerntsen et al. 2000, Sinden 2002, Baton & Ranford-Cartwright 2005).

Les expériences de compétence vectorielle, menées en laboratoire, reproduisent artificiellement la phase d'infection du moustique ou phase extrinsèque (aussi appelée « cycle sporogonique »). Les *Anopheles* femelles se gorgent sur des cellules de gorgement artificiel dans lesquelles circule du sang contenant des gamétocytes (gorgement directement sur hommes dans le passé). Après gorgement, les femelles sont maintenues en cage, durant une période pendant laquelle s'effectue la phase extrinsèque (cf. paragraphe 4).

Au cours des expériences de transmission expérimentale, les femelles sont disséquées après une vingtaine de jours pour rechercher des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Afin de raccourcir les délais (ceci permet de s'affranchir des risques de mortalité) et de quantifier facilement l'infestation, la plupart des expérimentations pratiquent des dissections à 7 jours, soit la durée nécessaire pour observer la formation des oocystes si le moustique est compétent. On estime qu'un moustique présentant des oocystes contenant des sporozoïtes est compétent (la phase présentant le plus de mortalité pour les parasites étant le passage de gamétocytes à oocystes). Des expériences ont montré que la densité de sporozoïtes dans les glandes salivaires était corrélée au nombre d'oocystes, suggérant que presque toute infection par des oocystes aboutissait à une infection par des sporozoïtes au niveau des glandes salivaires (pour des infections réalisées en laboratoire) (Vaughan et al. 1992, Robert & Boudin 2003, Vaughan 2007). De plus, s'il a été possible de sélectionner une souche d'*Anopheles gambiae* réfractaire à l'installation des oocystes de quasi tous les *Plasmodium*,

une souche réfractaire à l'installation des sporozoïtes dans les glandes salivaires à partir d'oocystes installés n'a pas pu être sélectionnée (Collins et al. 1986)).

Depuis 70 ans, des tests de compétence sont menés sur les *Anopheles* européens vis-à-vis des *Plasmodium* tropicaux, surtout pour évaluer les risques de diffusion du paludisme en Europe à partir des zones tropicales endémiques (cf. tableaux ci-dessous). Ces tests ont conclu à la compétence des *Anopheles* européens vis-à-vis des souches tropicales de *P. vivax*, tandis que la majorité de ces expériences a révélé le caractère réfractaire des *Anopheles* européens aux *P. falciparum* tropicaux, à quelques exceptions près : bien que les effectifs disséqués soient faibles, deux tests montrent que *An. plumbeus* semble compétent vis-à-vis des souches tropicales de *P. falciparum*. Trois expériences ont permis d'identifier des sporozoïtes ou des oocystes sur *An. sacharovi* et *An. melanoon*. Néanmoins, pour *An. sacharovi*, les effectifs impliqués étaient très faibles par rapport aux effectifs testés lors des expériences négatives et l'expérience n'a pas été reproduite pour *An. melanoon*. Enfin, sur l'ensemble des spécimens testés pour l'espèce *An. atroparvus*, seul quatre ont été trouvés porteurs de un oocyste chacun. Bien entendu, dans le passé, les espèces européennes étaient compétentes vis-à-vis des *Plasmodium* européens (*vivax* ou *falciparum*) puisqu'elles en assuraient la transmission de façon endémique (Roubaud 1918, Shute 1940).

Peu d'expériences ont concerné *P. ovale* ou *P. malariae*.

Les résultats bibliographiques sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 6 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des *Anopheles* européens et *P. falciparum*

<i>Anopheles</i>		<i>P. falciparum</i>	Méthode de gorgement	Nombre de moustiques positifs (nombre disséqué)		Nombre total de moustiques testés	Sources	
Espèce	Origine	Origine		Oocystes	Sporozoïtes		Auteurs	Références
<i>An. maculipennis cx</i>	France	Europe (Sud Est)	Sur homme	4 (9)	4(4)	13	(Roubaud 1918)	
<i>An. atroparvus</i>	Angleterre	Europe (Sud)	Sur homme	(1)	(1)		(Shute 1940)	
	Angleterre	Inde, Afrique	Sur homme	0 (399)		399	(Shute 1940)	
	Italie	Nigeria	Sur homme	0 (20)		20	(de Zulueta et al. 1975), (Ramsdale & Coluzzi 1975)	
	Italie	Kenya	Sur homme	3 (117) ³	0 (56)	173	(de Zulueta et al. 1975), (Ramsdale & Coluzzi 1975)	
	Ex URSS	Afrique, Asie (Sud)	Sur homme ?	0 (1055)	0 (895)	?	(Daskova & Rasnycyn 1982)	
	Pays Bas	Souche NF-54 ² ?	Artificiel	0 (40)		40	Ponnudurai 1988, unpublished data	(Marchant et al. 1998)
	Portugal	Afrique	Sur homme	0 (48)		48	(Ribeiro et al. 1989)	
	Pays Bas	Souche NF-54 ² ?	Artificiel	0 (11)		11	Van Gemert 1997, unpublished data	(Marchant et al. 1998)
<i>An. melanoon</i>	Pays Bas	Souche NF-54 ²	Artificiel	1 (3) ⁴		3	Marchant 1997, unpublished data	(Marchant et al. 1998)
	Ex URSS	RCA ⁸	Sur homme ?		1 (4)	4	(Daskova & Rasnycyn 1982) (Dzhavadov et al. 1978)	
<i>An. messeae</i>	Ex URSS	Afrique, Asie (Sud)		0 (315)	0 (253)	?	(Daskova & Rasnycyn 1982)	
<i>An. plumbeus</i>	Angleterre	?	Sur homme	(5)			(Blacklock & Carter 1920a)	(Eling et al. 2003)
	Angleterre	Souche NF-54 ²	Artificiel	3 (5) ⁶		5	Marchant 1997, unpublished data	(Marchant et al. 1998)
	Angleterre	Souche NF-54 ²	Artificiel	7 (10) ⁷	6 (10)	10	(Eling et al. 2003)	

<i>Anopheles</i>		<i>P. falciparum</i>	Méthode de gorgement	Nombre de moustiques positifs (nombre disséqué)		Nombre total de moustiques testés	Sources	
Espèce	Origine	Origine		Oocystes	Sporozoïtes		Auteurs	Références
<i>An. claviger sl</i>	Angleterre	Tropicale	Sur homme	Réfractaire	Réfractaire		Shute (1974), private communication	(de Zulueta et al. 1975)
<i>An. labranchiae</i>	Italie	Kénya	Sur homme	0 (17)	0 (14)	31	(de Zulueta et al. 1975, Ramsdale & Coluzzi 1975)	
<i>An. sacharovi</i>	Ex URSS	Afrique, Asie (Sud)	Sur homme ?	0 (186)	0 (143)	?	(Daskova & Rasnycyn 1982) (Dzhavadov et al. 1978)	
	Ex URSS	RCA ⁸	Sur homme ?		6 (30)		30	(Daskova & Rasnycyn 1982) (Dzhavadov et al. 1978)
	Ex URSS	Libéria	Sur homme ?	3 (5)		5	(Daskova & Rasnycyn 1982) (Dzhavadov et al. 1978)	

Notes :

¹ : d'après Shute, they «readily became infected»

² : la souche NF-54 a été isolée à partir d'un cas de paludisme d'aéroport à Amsterdam en 1979. Elle serait originaire d'Afrique de l'Ouest (Ponnudurai et al. 1982b)

³ : chaque spécimen présentait 1 oocyste

⁴ : un oocyste observé

⁵ : un spécimen présentant des oocystes

⁶ : vingt quatre oocystes ont été dénombrés chez le spécimen le plus infesté

⁷ : de 1 à 27 oocystes remplis de sporozoïtes ont été observés selon les moustiques

⁸ : République Centrafricaine

Tableau 7 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des *Anopheles* européens et *P. vivax*

<i>Anopheles</i>		<i>P. vivax</i>	Méthode de gorgement	Nombre de moustiques positifs (nombre disséqué)		Nombre total de moustiques testés	Sources	
Espèce	Origine	Origine		oocystes	sporozoïtes		Auteurs	Références
<i>An. maculipennis cx</i>	France	Europe (Sud Est)	Sur homme	5 (18)	4 (5)	23	(Roubaud 1918)	
<i>An. atroparvus</i>	Angleterre	Zones tempérées et tropicales	Sur homme	(1)	(1)		(Shute 1940)	
	URSS	Asie du sud est	Sur homme	compétent	compétent		Tiburskaja(1962)	(Daskova & Rasnycyn 1982)
	URSS	Afrique, Asie, Brésil	Sur homme ?	144 (697)	73 (546)	?	(Bibikova et al. 1977, Daskova & Rasnycyn 1982)	
<i>An. messeae</i>	URSS	Laos	Sur homme ?	34 (67)	7 (28)	?	(Daskova & Rasnycyn 1982)	
<i>An. plumbeus</i>	Angleterre	?	Sur homme		(2)		(Blacklock & Carter 1920b)	(Eling et al. 2003)
<i>An. claviger sl</i>	Angleterre	?	Sur homme	(3)			(Blacklock & Carter 1920b)	(Snow 1999)
<i>An. sacharovi</i>	URSS	Laos	Sur homme ?	29 (41)	17 (23)	?	(Daskova & Rasnycyn 1982)	
	Turquie	Turquie	Sur homme	66%	65.1%	600-700	(Kasap 1990)	
<i>An. superpictus</i>	Turquie	Turquie	Sur homme	59%	53.8%	600-700	(Kasap 1990)	

Notes :

¹ : d'après l'auteur, « no difficulty was experienced in infecting this [...] anopheline»

² : des sporozoïtes ont été observés

³ : des oocystes ont été observés

Tableau 8 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des *Anopheles* européens et *P. malariae*

<i>Anopheles</i>		<i>P. malariae</i>	Méthode de gorgement	Nombre de moustiques positifs (nombre disséqué)		Nombre total de moustiques testés	Sources	
Espèce	Origine	Origine		oocystes	sporozoïtes		Auteur	Références
<i>An. atroparvus</i>	URSS	Afrique	Sur homme ?	0 (10)	0 (21)	?	(Daskova & Rasnycyn 1982)	
	Roumanie	Nigeria	Sur homme ?	29 (238)		238	(Coatney et al. 1971)	(Molineaux 1988)
	Royaume Uni	Nigeria	Sur homme ?	5 (72)	18 (45)	?	(Shute & Maryon 1955)	(Molineaux 1988)

Tableau 9 : Expériences de transmission expérimentale impliquant des *Anopheles* européens et *P. ovale*

<i>Anopheles</i>		<i>P. ovale</i>	Méthode de gorgement	Nombre de moustiques positifs (nombre disséqué)		Nombre total de moustiques testés	Sources	
Espèce	Origine	Origine		oocystes	sporozoïtes		Auteur	Références
<i>An. atroparvus</i>	Angleterre	Afrique		(¹)	(¹)	?	(Shute 1940)	
	URSS	Afrique		0 (196)	0 (149)	?	(Daskova & Rasnycyn 1982)	

Note :

¹ : d'après l'auteur, cette espèce « is a very efficient carrier of *P. ovale* »

Le dogme habituellement accepté considérant que les *Anopheles* européens sont compétents pour les souches tropicales de *P. vivax*, mais réfractaires aux souches tropicales de *P. falciparum* ne semble donc pas absolu (de Zulueta et al. 1975, Gilles & Warrell 1993). Au vu des résultats présentés ci-dessus, il y a effectivement une nette différence de compétence vis-à-vis de *P. vivax* et *P. falciparum* (la compétence vis-à-vis des autres espèces ayant été peu étudiée).

Dans le cadre de l'étude des risques de ré-émergence du paludisme, il est donc primordial de s'intéresser à la compétence vectorielle, pour préciser, confirmer ou infirmer les résultats obtenus précédemment.

Ce travail s'est focalisé sur la compétence des espèces de Camargue vis-à-vis de *P. falciparum* pour trois raisons : i) *P. falciparum* est actuellement à l'origine de la majorité des cas de paludisme importés (plus de 80% des cas totaux), et représente donc l'espèce majoritaire en métropole, indépendamment du stade du parasite (l'importance épidémiologique des autres espèces demeure moindre malgré une persistance de parasite plus longue chez l'homme), ii) les résultats vis-à-vis de *P. vivax* sont robustes et n'ont donc pas besoin d'être confirmés, iii) les contraintes expérimentales de nos partenaires réalisant ces expériences ne permettent de tester que *P. falciparum*.

Ces travaux ont été menés en collaboration avec deux équipes différentes dont les résultats, présentés ci-dessous, sont complémentaires.

2. Tests de la compétence vectorielle vis-à-vis de *P. falciparum* de culture

Ces expériences ont été réalisées par une équipe de l'université de Nijmegen (Pays-Bas), et ont impliqué plus particulièrement deux personnes de cette équipe : A. Luty et GJ. van Gemert.

Face à la difficulté de maintenir une colonie sauvage dans des conditions d'insectarium, nous avons opté pour l'envoi d'*Anopheles* sauvages, directement après leur capture sur le terrain. Les méthodes de capture ont été adaptées à la biologie de chaque espèce et les effectifs envoyés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Espèces et nombre d'*Anopheles* envoyés à l'université de Nijmegen (Pays-Bas)

Espèce	Date	Méthode de capture	Nombre d'envois	Nombre total approximatif de moustiques envoyés
<i>An. melanoon</i>	Août 2006 et 2007	Moustiques endophiles au repos	3	665
<i>An. atroparvus</i>	Mars 2007	Moustiques endophiles au repos	1	140
<i>An. hyrcanus</i>	Août et septembre 2006, septembre 2007	Piège à appât humain	4	2850

L'université de Nijmegen réalise ces tests en utilisant différentes souches de *P. falciparum* conservées en culture, selon une technique utilisée et améliorée depuis 25 ans (Ponnudurai et al. 1982a, Ponnudurai et al. 1988). La souche NF-54, isolée à partir d'un cas de paludisme d'aéroport à Amsterdam en 1979 et probablement originaire d'Afrique de l'Ouest, a été utilisée pour ces tests (Ponnudurai et al. 1982b)

Tableau 11 : Résultats des expériences de transmission expérimentale

Nijmegen, Pays-Bas (*P. falciparum* : souche NF-54)

Espèce	Date	Nb de moustiques gorgés (nombre total ¹)	Recherche d'oocystes, dissection à 6-7 jours		
			Nb de moustiques positifs (nb disséqué)	Nb d'oocystes	Nb moyen d'oocystes
<i>An. hyrcanus</i>	22/08/2006	39 (nd ²)	0 (36)	0	0
Témoin ³	22/08/2006	nd	15 (20)		3.5
<i>An. hyrcanus</i>	31/08/2006	91 (341)	0 (58)	0	0
Témoin ³	31/08/2006	nd	20 (20)		41.2
<i>An. hyrcanus</i>	14/09/2006	14 (nd)	0 (10)	0	0
Témoin ³	14/09/2006	nd	5 (5)		0.6
<i>An. hyrcanus</i>	03/08/2007	31 (nd)	0 (26)	0	0
Témoin ³	03/08/2007	nd	15 (20)	[0-2]	1.1
<i>An. hyrcanus</i>	09/08/2007	91 (nd)	0 (68)	0	0
Témoin ³	09/08/2007	nd	20 (20)	[34-148]	80.1
<i>An. hyrcanus</i>	10/08/2007	11 (nd)	0 (8)	0	0
Témoin ³	10/08/2007	nd	20 (20)	[5-57]	25.5
<i>An. hyrcanus</i>	17/08/2007	177 (nd)	0 (144)	0	0
Témoin ³	17/08/2007	nd	20 (20)	[5-76]	40.2
<i>An. melanoon</i>	22/08/2006	11 (nd)	1 (17)	1	0.06
Témoin ³	22/08/2006	nd	15 (20)		3.5
<i>An. melanoon</i>	31/08/2006	14 (143)	2 (9) ⁴	1;5	0.67
Témoin ³	31/08/2006	nd	20 (20)		41.2
<i>An. melanoon</i>	03/08/2007	2 (nd)	0 (1)	0	0
Témoin ³	03/08/2007	nd	15(20)	[0-2]	1.1
<i>An. melanoon</i>	09/08/2007	15 (nd)	1 (4) ⁵	1	0.25
Témoin ³	09/08/2007	nd	20 (20)	[34-148]	80.1
<i>An. melanoon</i>	10/08/2007	7 (nd)	0 (5)	0	0
Témoin ³	10/08/2007	nd	20 (20)	[5-57]	25.5
<i>An. melanoon</i>	17/08/2007	53 (nd)	2 (37) ⁶	1 ; 1	0.05
Témoin ³	17/08/2007	nd	20 (20)	[5-76]	40.2
<i>An. atroparvus</i>	22/03/2007	8/93	0 (8) ⁷	0	0
Témoin ³	22/03/2007	nd	12 (30)		1.1
<i>An. atroparvus</i>	29/03/2007	12 (59)	1 (4) ⁷	1	0.25
Témoin ³	29/03/2007	nd	9 (10)		23
<i>An. atroparvus</i>	09/08/2007	2 (nd)	0 (2) ⁸	0	0
Témoin ³	09/08/2007	nd	20 (20)	[34-148]	80.1
<i>An. atroparvus</i>	17/08/2007	5 (nd)	0 (5)	0	0
Témoin ³	17/08/2007	nd	20 (20)	[5-76]	40.2

Notes :

¹ : Nombre de moustiques ayant eu la possibilité d'effectuer un repas de sang

² : Non déterminé

³ : Colonie d'*An. stephensi*, vecteur asiatique

⁴ : Ces moustiques ont été disséqués à 21 jours. Aucun n'a présenté de sporozoïte dans les glandes salivaires ni d'oocyste au niveau de l'intestin

⁵ : deux de ces moustiques ont été disséqués à j16 pour la recherche de sporozoïtes dans les glandes salivaires : résultats négatifs en sporozoïtes et en oocystes

⁶ : 13 de ces moustiques ont été disséqués à j18 pour la recherche de sporozoïtes dans les glandes salivaires : résultats négatifs en sporozoïtes et en oocystes

⁷ : Ces spécimens ont été conservés 2 heures à 26°C après le gorgement, puis 19 heures à 21°C et ensuite à 26°C jusqu'à leur dissection

⁸ : un de ces moustiques a été disséqué à j16 pour la recherche de sporozoïtes dans les glandes salivaires : résultats négatifs en sporozoïtes et en oocystes

En résumé :

- aucun *An. hyrcanus* n'a présenté d'oocyste sur les 350 disséqués,
- six *An. melanoon* ont présenté des oocystes sur 73 spécimens disséqués (un oocyste respectivement sauf pour un *Anopheles* en ayant présenté 5),
- un *An. atroparvus* a présenté un oocyste sur 19 spécimens disséqués.

3. Tests de la compétence vectorielle vis-à-vis de *P. falciparum* sauvages

Ces expériences ont été réalisées par une équipe de l'UR016 basée à l'Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale à Yaoundé, Cameroun et ont impliqué plus particulièrement : I. Morlais, A. Cohuet, P. Awono et F. Simard.

De même que pour les envois à l'université de Nijmegen, des moustiques sauvages, capturés sur le terrain ont été envoyés directement à Yaoundé, selon le planning ci-dessous :

Tableau 12 : Espèces et nombre d'*Anopheles* envoyés à l'OCEAC à Youndé, Cameroun

Espèce	Date	Méthode de capture	Nombre d'envois	Nombre total approximatif de moustiques envoyés
<i>An. melanoon</i>	Avril et mai 2006	Moustiques endophiles au repos	2	180
<i>An. atroparvus</i>	Novembre 2005 Mars, octobre et novembre 2006	Moustiques endophiles au repos	7	1580

Les gamétocytes proviennent de porteurs de gamétocytes auxquels 5 à 10 mL de sang sont prélevés et injectés directement dans les cellules de gorgement sur lesquelles les moustiques se gorgent. La détection des porteurs de gamétocytes et leur prise en charge en vue du prélèvement de sang sont réalisées selon un protocole ayant bénéficié d'une autorisation éthique accordée par le comité national d'éthique du Cameroun (Cohuet et al. 2006).

**Tableau 13 : Résultats des expériences de transmission expérimentale
UR016-OCEAC, Yaoundé, Cameroun**

Espèce	Date	Infection (souche sauvage)	Dissection à	Recherche d'oocystes		
				Nb de moustiques positifs (nb disséqué)	Nb d'oocystes	Nb moyen d'oocystes
<i>An. atroparvus</i>	25/11/2006	Ngombi O	7 j	2 (9)	1;2	0.33
Témoin ²	25/11/2006	Ngombi O	7 j	1		
<i>An. atroparvus</i>	17/10/2006	Messo C	8 j	1 (25)	1	0.04
Témoin ²	17/10/2006	Messo C	8 j	13 (30)		2.36
<i>An. atroparvus</i>	18/10/2006	Noah S	8 j	0 (13)	0	0
Témoin ²	18/10/2006	Noah S	8 j	18 (35)		4.71
<i>An. atroparvus</i>	20/10/2006	Mbarga B	10 j	0 (3)	0	0
Témoin ²	20/10/2006	Mbarga B	10 j	36 (37)		68.65
<i>An. atroparvus</i>	26/10/2006	Essana	7 j	0 (1)	0	0
Témoin ²	26/10/2006	Essana	7 j	8 (34)		1.65
<i>An. atroparvus</i>	02/11/2006	Rachelle	8 j	0 (2)	0	0
Témoin ²	02/11/2006	Rachelle	8 j	7 (22)		3.82
<i>An. atroparvus</i>	03/11/2006	Marlène	7 j	0 (2)	0	0
Témoin ²	03/11/2006	Marlène	7 j	14 (28)		4.54
<i>An. atroparvus</i>	24/11/2006	Marcel N	7 j	1 (3)	1	0.33
Témoin ²	24/11/2006	Marcel N	7 j	34 (45)		22.69
<i>An. atroparvus</i>	24/11/2006	Guillaume A	7 j	1 (7)	1	0.14
Témoin ²	24/11/2006	Guillaume A	7 j	39 (44)		23.34
<i>An. atroparvus</i>	30/11/2006	Régine	8 j	2 (7)	1;2	0.43
Témoin ²	30/11/2006	Régine	8 j	23 (37)		5.54
<i>An. atroparvus</i>	01/12/2006	Mani R	11 j	1 (3)	3	1
Témoin ²	01/12/2006	Mani R	11 j	12 (23)		3.13
<i>An. melanoon</i>	26/05/2006	Marie A	7 j	1 (5)	1	0.2
Témoin ³	26/05/2006	Marie A	7 j	167 (249)		18.5

Notes :

¹ : d'après l'expérimentateur, les résultats étaient ceux d'une bonne infection, soit plus de 50% de moustiques positifs

² : *An. gambiae*, souche Yaoundé

³ : *An. gambiae*, souche Ngouso

En résumé :

- huit *An. atroparvus* ont présenté de un à trois oocystes sur 75 spécimens disséqués,
- un *An. melanoon* a présenté un oocyste sur cinq spécimens disséqués.

4. Discussion

La première limite de ces expériences est la difficulté à obtenir un nombre suffisant de données (ie de moustiques à disséquer). Cette difficulté est liée à l'utilisation de moustiques sauvages, et non d'élevage, non « acclimatés » aux conditions des expériences. La survie des moustiques et l'utilisation de cellules de gorgement pour proposer le repas de sang à des moustiques sauvages ont constitué les principaux facteurs limitants, surtout pour *An. atroparvus* et *An. melanoon* qui ont présenté des taux de gorgement (nombre de moustiques gorgés) faibles.

Malgré ces limites, le nombre de moustiques utilisés et la répétition des expériences ont permis d'obtenir des résultats robustes pour *An. hyrcanus* et *An. melanoon* testés aux Pays-Bas et *An. atroparvus* au Cameroun. Il serait pertinent de pouvoir tester *An. hyrcanus* et des effectifs plus importants de *An. melanoon* au Cameroun (ce qui n'a pas été possible pour des raisons de temporalité : *An. hyrcanus* et *An. melanoon* étant abondants en France à des périodes non propices aux expériences d'infection expérimentale au Cameroun).

Afin de vérifier le caractère infectant de la souche *P. falciparum* NF-54, en culture depuis 1979, vis-à-vis d'*Anopheles* tropicaux autres que la souche *An. stephensi* (témoin utilisé pour ces expériences depuis de nombreuses années), des expériences de transmission ont été menées par l'équipe de Nijmegen, en utilisant notamment cette souche et des *An. gambiae*, de la souche Yaoundé (souche d'élevage récente, originaire du Cameroun). Les résultats ont confirmé que la souche NF-54 a conservé son caractère infectant vis-à-vis d'*Anopheles* tropicaux compétents, et ont écarté d'éventuels doutes quand à un « comportement » différent de la souche NF-54 par rapport à des *P. falciparum* sauvages lors de la phase extrinsèque (A. Luty, unpublished data).

De plus, pour éviter toute interprétation artéfactuelle, il aurait été plus rigoureux de confirmer les moustiques présentant un seul oocyste, identifié visuellement, par une identification moléculaire de la présence de *P. falciparum* (PCR diagnostique sur l'estomac en vue d'identifier des fragments d'ADN spécifiques de *P. falciparum*). Néanmoins, l'expérience des

expérimentateurs ainsi que la répétition de ces observations permettent d'écartier d'éventuels doutes concernant ces oocystes uniques.

Les résultats de ces expériences montrent une compétence vectorielle non nulle, bien que faible, pour *An. atroparvus* et *An. melanoon* vis-à-vis des souches tropicales de *P. falciparum*, et étayent les premiers résultats, très ponctuels, publiés précédemment (cf. paragraphe 1 de ce chapitre). Sur l'ensemble des expériences, *An. atroparvus* et *An. melanoon* ont présenté des indices oocystes (% de moustiques présentant des oocystes par rapport à l'ensemble des moustiques testés) et des nombres moyens d'oocystes par moustique très bas par rapport aux témoins.

Tableau 14 : Résultats globaux des expériences de transmission expérimentale (expériences réalisées aux Pays-Bas et au Cameroun)

Espèce	Indice oocyste (%)	Nb de moustiques disséqués	Nb moyen d'oocystes
<i>An. hyrcanus</i>	0	350	0
Témoin	92	125	27.50
<i>An. atroparvus</i>	9.57	94	0.15
Témoin	64	375	20.35
<i>An. melanoon</i>	8.97	78	0.17
Témoin	75	369	30.01

Quelques faits ponctuels confirment que si la compétence vectorielle des vecteurs européens est très faible, elle n'en est pas pour autant nulle vis-à-vis des souches tropicales de *P. falciparum*. Parmi les 18 cas autochtones diagnostiqués à Anthony lors de la résurgence de 1940, deux furent attribués à *P. falciparum*, sûrement d'origine tropicale puisque le réservoir de gamétocytes était constitué de prisonniers Sénégalais, Malgaches et Nord-Africains. De plus, Doby rapporte des petites épidémies concernant au total une cinquantaine de cas autochtones à *P. falciparum* à Saint Nazaire en 1922 et 1926, alors que les espèces endémiques étaient *P. vivax* et *P. malariae* à cette époque. L'auteur conclut que ces résurgences sont peut-être secondaires à des cas importés, d'origine tropicale, dans les zones portuaires.

La notion de co-évolution entre les *Plasmodium* et les vecteurs est avancée pour expliquer à la fois la transmission efficace des souches tropicales de *P. falciparum* par leurs vecteurs, et le caractère quasi réfractaire des *Anopheles* européens vis-à-vis des *P. falciparum* tropicaux. Un

rappel sur le déroulement de la phase extrinsèque permet de préciser cette notion. La phase extrinsèque des *Plasmodium* peut être divisée en trois étapes consécutives (Vaughan 2007) :

- la première, qui débute dès l'ingestion du sang par le moustique et qui est relativement brève. Cette phase inclut la gamétogénèse, fécondation, formation de l'ookinète, migration de ce dernier à travers l'épithélium intestinal et enkystement entre l'épithélium intestinal et la lame basale.
- la seconde, qui n'intervient que chez les spécimens compétents. Les parasites (sous forme de sporozoïtes) se multiplient au sein des oocystes qui grossissent.
- la phase finale, pendant laquelle les sporozoïtes sont relargués dans la cavité générale du moustique et colonisent les glandes salivaires à partir desquelles ils pourront être transmis à un hôte vertébré au cours d'une piqûre.

La phase extrinsèque implique de nombreux mécanismes et interactions moléculaires qui sont gouvernés par des facteurs génétiques du parasite et du moustique (Sinden 2002). Le parasite est soumis à différentes réactions immunitaires du moustique, auxquelles il se soustrait par des mécanismes d'échappement (Beerntsen et al. 2000, Baton & Ranford-Cartwright 2005). L'ensemble de ces interactions, gouvernées par des facteurs génétiques, détermine la compétence vectorielle des *Anopheles* (Woodring et al. 1996).

En terme d'évolution, les *Plasmodium* qui disposent d'un génome ouvrant le filtre de compatibilité avec les *Anopheles* présentent une fitness supérieure aux *Plasmodium* dont la phase extrinsèque est bloquée par la réaction immunitaire du moustique (Combes 1995). Le filtre de compatibilité favorise donc, parmi la variabilité génétique présente dans l'espèce, la sélection des génomes des *Plasmodium* les plus aptes à assurer leur transmission par une population anophélienne donnée. Parallèlement, le filtre de compatibilité sélectionne les génomes des *Anopheles* qui luttent efficacement contre ces parasites (Combes 1995) (l'évolution des parasites étant sûrement beaucoup plus rapide que celle des *Anopheles*), jusqu'à atteindre un phénomène d'équilibre actif (théorie de la reine rouge de L. Van Valen).

Le « dogme » de l'incompatibilité des *P. falciparum* tropicaux avec les *Anopheles* européens repose donc sur cette notion de co-évolution : l'absence de rencontre entre ces entités n'ayant pas permis aux *Plasmodium* de sélectionner les génomes favorables à l'achèvement total de la phase extrinsèque. Nos résultats montrent que ce caractère réfractaire n'est pas absolu, même en l'absence de co-évolution récente. L'utilisation d'*An. stephensi* comme témoin lors des expériences menées à Nijmegen souligne également ce point. *Anopheles stephensi* est vecteur en Asie, alors que NF-54 est probablement originaire de l'Afrique de l'Ouest. Sachant que les

parasites ne sont pas sélectionnés lors de ces expériences (les moustiques infectés ne retransmettent pas leurs parasites), il n'y a pas eu adaptation de la souche NF-54, en culture depuis 1979, à *An. stephensi*. Or, ces moustiques, utilisés comme témoins, sont massivement infestés lors de tests (cependant, il est probable que cette souche ait été retenue comme souche de laboratoire en 1979 pour sa capacité à infester *An. stephensi*). De plus, l'exemple de *P. vivax* souligne aussi que l'absence de co-évolution récente ne semble pas être un frein à la transmission de souches tropicales par les *Anopheles* européens. De nombreux marqueurs génétiques polymorphes ont été identifiés chez *P. vivax* (C. Severini, communication personnelle), illustrant ainsi la variabilité génétique de cette espèce. Or, puisque cette variabilité existe, la co-évolution entre ce parasite et ses vecteurs a sûrement eu lieu localement, comme cela a été le cas pour *P. falciparum*. Or, les *Anopheles* européens sont capables de transmettre les souches tropicales de *P. vivax* (cf. paragraphe 1 de ce chapitre). Enfin, l'histoire du paludisme illustre encore ce fait : au gré des différentes migrations humaines, les *P. falciparum* ont été exportés de leur berceau d'origine dans d'autres zones du globe (Mouchet et al. 2004). A chaque nouvelle introduction, ce parasite a rencontré, dans la zone d'importation, des nouveaux vecteurs présents antérieurement dans la zone. L'introduction de *P. falciparum* en Amérique représente le meilleur exemple. Cette espèce y a été introduite par des esclaves africains au 16^{ième} siècle. La « capture » de *P. falciparum* par les *Anopheles* locaux a été très rapide puisque, moins d'un siècle après la conquête espagnole, le paludisme posait de sérieux problèmes sur le continent américain (Mouchet et al. 2004).

Puisque l'absence de co-évolution récente entre *Plasmodium* et *Anopheles* n'est pas un obstacle à la transmission, il est possible d'évoquer le rôle d'une co-évolution très ancienne entre *Plasmodium* et *Anopheles*. Il semble acquis que les ancêtres des plasmodies humaines actuelles ont précédé ou sont contemporaines de l'apparition des insectes. Des fossiles de Culicidés ont été datés de 38 millions d'années, tandis que le groupe des fièvres quartes (contenant *P. malariae*) apparaît vers 55 millions d'année, celui des fièvres tierces (renfermant notamment *P. vivax* et *P. ovale*) vers 35 millions d'années et le sous genre *Laverania* (renfermant *P. falciparum*) vers 5-7 millions d'années (Garnham 1966, Mouchet et al. 2004). Sur ces bases, une co-évolution ancienne et longue entre ancêtres des *Plasmodium* et des *Anopheles* aurait alors déterminé un premier niveau de compatibilité : la compatibilité globale *Anopheles* – *Plasmodium* d'humains, conservée jusqu'à nos jours.

Ces résultats et cette discussion nous orientent vers l'hypothèse suivante : les *Anopheles* et les *Plasmodium* humains présentent 2 niveaux de compatibilité successifs :

- une compatibilité globale (toutes les souches de *Plasmodium* humains peuvent être transmises par toutes les populations d'*Anopheles*, à des degrés variés), résultat d'une co-évolution ancienne entre ancêtres des *Plasmodium* et des *Anopheles*
- une compatibilité spécifique (des souches de *Plasmodium* sont transmises très efficacement par des populations/espèces d'*Anopheles*), résultat d'une co-évolution récente

Pour ces raisons et malgré les résultats négatifs d'*An. hyrcanus* aux tests de transmission expérimentale, la compétence vectorielle d'*An. hyrcanus* n'est vraisemblablement pas nulle vis-à-vis des *P. falciparum* tropicaux (mais certainement très faible).

Ces résultats concernant la compétence vectorielle doivent bien entendu être replacés dans leur contexte épidémiologique. Ils doivent être confrontés à la capacité vectorielle spécifique de chaque espèce pour, *in fine*, identifier les espèces susceptibles de jouer un rôle dans la transmission potentielle de paludisme en Camargue.

Synthèse partie 2 : détermination des vecteurs potentiels

L'ensemble des données entomologiques collectées au cours de ces travaux permet d'esquisser des conclusions quant au rôle vecteur potentiel des différentes espèces recensées en Camargue, essentiellement vis-à-vis du risque de transmission de *P. falciparum* tropicaux car ils représentent l'espèce majoritairement importée. Nous utilisons ici une approche qualitative de la capacité vectorielle, essentiellement basée sur l'abondance de l'espèce et son anthropophilie (l'estimation quantitative est développée dans la partie 3) :

- Bien qu'ayant une compétence vectorielle très faible, la capacité vectorielle élevée d'*An. hyrcanus* le désigne comme le vecteur potentiel principal actuellement en Camargue, dans le contexte de riziculture développée. Les études passées n'accordent aucun rôle à cette espèce en raison de sa très faible abondance, dans un contexte de riziculture quasi inexistante. Cette variation du rôle potentiel de cette espèce, en lien avec les variations de la riziculture est discutée dans la partie suivante.

- Bien que présentant une compétence vectorielle non négligeable, *An. atroparvus* ne semble plus être de nos jours le vecteur principal potentiel en Camargue, en raison de sa faible densité (et donc une capacité vectorielle faible). Les raisons de ce changement sont discutées dans la partie suivante.
- Le comportement trophique d'*An. melanoon* permet d'écarter cette espèce d'une implication potentielle dans la transmission, même si sa compétence vectorielle a été démontrée (sa capacité vectorielle est quasi nulle).
- La quasi absence d'*An. plumbeus* en Camargue et dans ses environs limite son rôle vecteur potentiel aux très rares endroits où il peut être présent (car sa compétence vectorielle est élevée).
- Enfin, *An. algeriensis* est très localisé en Camargue et limité à certains biotopes très spécifiques. Très peu de données ont été obtenues sur cette espèce, qui de toute manière, ne pourrait jouer un rôle vecteur que très localement.

Le rôle vecteur potentiel des espèces de Camargue peut également être examiné vis-à-vis des risques de transmission de *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*, bien que ces espèces sont minoritaires dans les cas de paludisme importé. Vis-à-vis du risque de transmission de *P. vivax*, la hiérarchisation de l'importance des vecteurs potentiels reste globalement la même que vis-à-vis de *P. falciparum*, avec quelques nuances : *An. hyrcanus* dont le rôle est renforcé par rapport aux autres espèces (les *Anopheles* européens sont considérés compétents vis-à-vis des souches tropicales de *P. vivax*). En ce qui concerne *P. ovale*, le faible nombre de données concernant la compétence vectorielle (semblant indiquer la compétence des espèces européennes pour les souches tropicales) nous pousse à ne considérer que la capacité vectorielle. Enfin, le pourcentage faible de *P. malariae* dans les cas importés en France et le faible nombre de données concernant la compétence vis-à-vis de cette espèce limite l'intérêt de ce *Plasmodium* pour cette étude.

En termes de risques de ré-émergence du paludisme, cette deuxième partie a fourni des éléments d'estimation de la capacité et de la compétence vectorielle de chaque espèce. La quantification de ces deux facteurs et le passage à la réceptivité et l'infectivité de la Camargue (et donc d'une zone géographique) sont présentés dans la troisième partie, sur un mode analytique et prospectif. Avant d'entamer cette démarche, l'évaluation rétrospective et descriptive du risque de transmission est présentée.

Troisième partie.

Le risque de transmission/ré-émergence du paludisme en Camargue

Chapitre 1. Approche rétrospective du risque de transmission du paludisme

Le risque de transmission des *Plasmodium* en Camargue dépend donc essentiellement de deux espèces pour la période passée et actuelle : *An. atroparvus* dans le passé et *An. hyrcanus* actuellement. Leurs évolutions rétrospectives sont analysées, en s'appuyant sur les changements globaux qui ont affecté la Camargue. Ce chapitre s'intéresse à l'abondance de ces espèces – facteur déterminant dans le risque de transmission si les autres paramètres biologiques restent stables. Une espèce considérée comme bon vecteur ne le sera plus si son abondance diminue (si les autres paramètres biologiques n'évoluent pas, sa capacité vectorielle diminue alors). A l'inverse, une espèce présentant des caractéristiques biologiques favorisant une capacité vectorielle élevée (anthropophilie marquée, cycle gonotrophique court, longévité importante) jouera un rôle vecteur potentiel important si elle devient abondante.

1. Evolution des populations d'*An. hyrcanus* en Camargue – Article 7

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise au journal *Emerging Infectious Diseases* et présentée ci-dessous.

Article 7 : Ponçon N, Balenghien T, Toty C, Ferré JB, Thomas C, Dervieux A, L'Ambert G, Schaffner F, Bardin O, Fontenille D, 2007. Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile Virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerging infectious diseases* 13 : 1810-1815.

Résumé : en se basant sur des données rétrospectives, l'évolution des populations d'*An. hyrcanus*, vecteur potentiel de paludisme en Camargue, et de *Cx. modestus*, vecteur de West Nile, a été étudiée en lien avec l'évolution de la riziculture en Camargue, elle-même dépendante du contexte historique et politique, des contraintes environnementales, du progrès

technique et des facteurs sociaux (les rizières constituent le biotope larvaire principal de ces deux espèces). Cet article met en évidence l'impact rapide et puissant de ces facteurs sur les populations de vecteurs et souligne l'importance des changements d'origine anthropique dans le contexte actuel de resurgence des maladies vectorielles.

Effects of Local Anthropogenic Changes on Potential Malaria Vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile Virus Vector *Culex modestus*, Camargue, France

Nicolas Ponçon,* Thomas Balenghien,†‡ Céline Toty,* Jean Baptiste Ferré,§ Cyrille Thomas,¶ Alain Dervieux,# Grégory L'Ambert,§ Francis Schaffner,§** Olivier Bardin,§ and Didier Fontenille*

Using historical data, we highlight the consequences of anthropogenic ecosystem modifications on the abundance of mosquitoes implicated as the current most important potential malaria vector, *Anopheles hyrcanus*, and the most important West Nile virus (WNV) vector, *Culex modestus*, in the Camargue region, France. From World War II to 1971, populations of these species increased as rice cultivation expanded in the region in a political context that supported agriculture. They then fell, likely because of decreased cultivation and increased pesticide use to control a rice pest. The species increased again after 2000 with the advent of more targeted pest-management strategies, mainly the results of European regulations decisions. An intertwined influence of political context, environmental constraints, technical improvements, and social factors led to changes in mosquito abundance that had potential consequences on malaria and WNV transmission. These findings suggest that anthropogenic changes should not be underestimated in vectorborne disease recrudescence.

During the past 25 years, there has been a dramatic emergence and resurgence of epidemic vectorborne diseases affecting both humans and domestic animals (1). In most cases, sociodemographic changes, drug resistance, and anthropogenic environmental modifications appear

*Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; †École Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Étoile, France; ‡Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France; §Entente Interdépartementale pour la Démoustication Méditerranée, Montpellier, France; ¶Centre Français du Riz, Arles, France; #Centre National de la Recherche Scientifique, Arles, France; and **University of Zürich, Zürich, Switzerland

to be the main factors responsible (1–4). The Camargue, the Rhone River Delta region in southeastern France, is an area relevant to the study of the influence of environmental changes on vector populations because 1) it has witnessed important anthropogenic ecosystem modifications in the past 60 years, 2) it contains a great abundance and diversity of mosquito-breeding sites and thus hosts large mosquito populations, and 3) it is a former zone of endemic malaria and a region of current and regular transmission of West Nile fever.

Until the beginning of the 20th century, malaria, mainly transmitted by *Anopheles* (*Anopheles*) *atroparvus* Van Thiel, was endemic in the Camargue and constituted a major health issue there (5,6). The last *Plasmodium vivax* malaria epidemic occurred in 1943, with ≈400 cases (7). Malaria disappeared from this area after World War II because of improved housing and living conditions and the extensive use of quinine. Among 8 anopheline species recorded in the Camargue, *An. atroparvus* was recently found to be rare and *An. (Anopheles) hyrcanus* (Pallas) very abundant with a high human-biting rate (8), findings that suggest that *An. hyrcanus* is currently the only *Culicidae* sp. likely to play a role in malaria transmission in the Camargue (8). Moreover, autochthonous transmission was recently suspected on the French Mediterranean Coast in 2006 (9), which also supports the idea that southern France remains suitable for malaria transmission.

The first description of West Nile virus (WNV) in France was in the 1960s, with human and equine outbreaks in the Camargue (10). After these episodes, the disease seemed to disappear from this region. However, WNV transmission apparently continued thereafter and

was confirmed by serologic studies in the 1970s and 1980s (11,12). Since 2000, WNV-related disease has reappeared in southern France, causing equine outbreaks in 2000 (76 confirmed cases) and 2004 (32 confirmed cases) in the Camargue (hosting 7,000 equids) and sporadic human and/or equine cases in 2003 and 2006 elsewhere along the Mediterranean Coast (13–16). Among 7 *Culex* species recorded in the Camargue (17), *Culex (Barraudius) modestus* Ficalbi is considered the main WNV vector, based on abundance, feeding behavior, previous WNV isolations, and recent experimental transmission (18–20).

The aim of this article is to describe the history of the region and to examine the impact of the various anthropogenic environmental changes that have occurred in the Camargue over the past 60 years on 2 mosquito species, *An. hyrcanus* and *Cx. modestus*. Because rice fields are the quasi-exclusive breeding sites for *An. hyrcanus* and the most prolific sites for *Cx. modestus* (5), we focus on changes in rice cultivation, i.e., cultivated surfaces and agronomic practices, including insecticide spraying, related to socioeconomic and agronomic factors.

Context

The Study Area

The Camargue is the main wetland area in the south-east of France and covers the Rhone River Delta (Figure 1). This area has a Mediterranean climate characterized by warm, dry summers and mild, wet winters. Total annual rainfall is typically 500–700 mm and occurs mainly in autumn; the annual mean temperature is 14°C.

Landscapes in the Camargue are strongly affected by the duration of submersion and the salinity of the soils. The landscapes are organized roughly in a south-to-north gradient of salinity, with agricultural land and reed marshes in the north and natural salty ponds and salt marshes in the south. Most agricultural land belongs to a few large farms, which are able to rapidly change their production system (i.e., crop type), depending on the economic context (21,22). Rice is currently the main cultivated crop in the Camargue, which is almost the only French region that produces rice. Paddies are filled in April and May with ≈ 7 cm of water. From the end of June until the end of August, a depth of ≈ 20 cm of water is maintained in the paddies, and the rice plants cover their surfaces. The water is then drained and the rice harvested. Data on rice cultivation used in this article were provided by the French National Rice Center.

The Mosquito Species

A. hyrcanus is a Palearctic mosquito species belonging to the Hyrcanus group. It is distributed from Spain to People's Republic of China, covering the southern half of Europe, the Mediterranean area, and central Asia. Large

populations are found in irrigated rice-growing areas in Turkey, Greece, and France (23,24), and this species was involved in malaria transmission in the north of Afghanistan (25).

Cx. modestus is also a Palearctic species, widely distributed from Europe to India, especially in delta areas, where its larvae can be found in semipermanent reed marshes, irrigation canals, and rice fields (5). The involvement of *Cx. modestus* in WNV transmission was established in the Camargue (20,26), the delta areas of the Caspian and Azov Seas (27,28), and the Volga region of Russia (29) and was suspected in the Danube Delta (30).

For our study, changes in *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* abundance were assessed by using 1) literature data, 2) detailed annual activity reports that describe nuisance caused by mosquito pests and published from 1962 to 1996, and 3) data from regular human mosquito-landing collections conducted since 1969 in 12 sites in the western Camargue (for 15 minutes at sunrise, approximately once a week from June to October). These sites were sampled by using the same methods, thus allowing us to describe changes in *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* abundance over a 38-year period. Collection sites were distributed in the western Camargue, which allowed a sampling of all ecosystems from the north to the south, reflecting mosquito abundance in the entire region (Figure 1). This human mosquito-landing survey did not focus specifically on *An. hyrcanus* and *Cx. modestus*. Thus, some sites were located some distance from the indicated area under cultivation (even if these areas have changed during the past 60 years) and were probably always negative for *An. hyrcanus* and *Cx. modestus*. Unfortunately, results of human mosquito-landing collections were not available per sample site. Thus, to avoid overrepresentation of uninformative and consistently negative sites, quantitative abundance of *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* was assessed by the annual mean number of

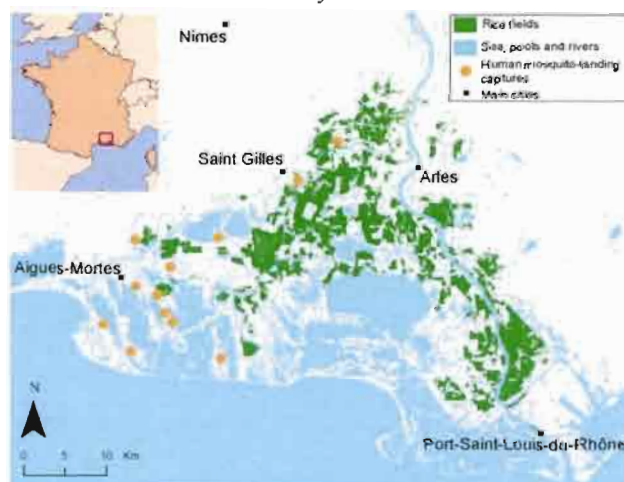


Figure 1. Map of the Camargue, France, indicating areas of rice cultivation as well as mosquito sampling sites, 2001.

mosquitoes caught by positive collection. Changes in rice cultivation and mosquito populations, shown in the online Appendix Figure (available from www.cdc.gov/EID/content/13/12/1810-appG.htm), were analyzed for 3 periods, described below.

Changes in Mosquito Populations and Rice Cultivation since the 1920s

1920s to 1960s: Proliferation of *An. hyrcanus* and *Cx. modestus*

In the Camargue, rice cultivation was rare before World War II, and both *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* were only rarely reported after their first description in the 1920s until World War II (5,31–36). The development of rice cultivation started with the rice shortage caused by World War II and was supported by a guaranteed price and funds from the Marshall Plan in 1947 and by the agricultural equipment cooperative established in 1948. Rice cultivation was then mechanized and hugely increased to cover ≈30,000 ha during the 1960s (online Appendix Figure). In the 1950s and the 1960s, *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* populations were described as widely distributed and very abundant in the entire Camargue, and these 2 species were included in the group of the 3 most abundant nuisance biters (5). *An. hyrcanus* was considered a major pest in the western Camargue in 1969 and 1970, and *Cx. modestus* attacks reached 300 bites per person per hour in reed marshes (26). From 1942 to the 1960s, the increase in *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* populations seemed to follow changes in paddy surface area (online Appendix Figure), itself a product of the political consequences of World War II (e.g., agricultural support, mechanization).

1960s to 1999: Near Disappearance of Mosquito Populations

Decrease of Area under Rice Cultivation

In 1963, the enforcement of the Common Agricultural Policy of the European Community caused unfavorable conditions for French rice cultivation, which was confronted by the more competitive Italian rice cultivation. This situation depressed both prices and incomes for French producers, who abandoned rice cultivation and developed alternatives such as hard wheat. The area under rice cultivation started to decrease slowly after 1965 (online Appendix Figure).

Insecticide Implementation

In 1970, the striped rice borer, *Chilo suppressalis* (Walker), a pest insect that damages rice plants, was introduced into France on young rice plants imported from Spain (37). From 1972, rice producers implemented insecticide

spraying with fenitrothion, trichlorfon, and chlorphenamide, which were conducted at the end of July each year, to control this pest (Table). The striped rice borer invasion reduced French rice competitiveness and consequently accelerated the decline in rice cultivation to 4,400 ha by 1981.

Human mosquito-landing collections showed a drastic drop in *An. hyrcanus* and a progressive decrease in *Cx. modestus* populations in 1972 and 1973, after the insecticide sprayings were initiated (online Appendix Figure). At the end of July, insecticide, also efficient against mosquito larvae, was sprayed by fixed-wing airplane that used low-volume applications (15 L/hectare); the insecticide reached the water even when rice plants covered the paddy surfaces. At this time of year, *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* larvae usually massively colonize rice fields, which in summer are nearly the only available breeding sites for these species (N. Ponçon, unpub. data) (26). These sprayings likely reduced *An. hyrcanus* populations considerably, with the removal of water from paddies at the end of August limiting posttreatment population recovery. In September, flooding of reed marshes, which are natural breeding sites for *Cx. modestus*, allows only a limited maintenance of populations and probably explains the slower decrease of this species than of *An. hyrcanus*. Indeed, reed marshes cannot maintain important populations, as illustrated by the rareness of *Cx. modestus* before World War II.

Increase of Area under Rice Cultivation and of Insecticide Sprayings

In 1981 a French support plan was implemented that led to an increase in rice cultivation, which covered >20,000 ha by the early 1990s. In 1994 the General Agreement on Tariffs and Trade limited subsidies, and French rice cultivation, still fairly uncompetitive, experienced difficulties once again. These problems were accentuated by a new demand for perfumed rice varieties that are not produced in the Camargue. Some producers thus replaced rice with hard wheat, which explains the decrease in rice cultivation areas since 1994 (online Appendix Figure).

In 1988 a new rice variety, *Ariete*, was introduced into the Camargue and, from 1991 to 2000, it quickly became the most cultivated rice. This variety of rice is very susceptible to the striped rice borer. Consequently, producers sprayed large areas to avoid losses and to ensure high productivity. Sprayings were conducted by using the same methods as before except that alphamethrin, also efficient against mosquito larvae, replaced the former insecticides.

The intensive insecticide sprayings against the striped rice borer likely account for the low populations of *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* over this period, despite the increase in the area of rice cultivation. Human mosquito-landing data showed a slight population peak in both

Table. Sprayed rice surfaces (hectares) to control striped rice borer in the Camargue

Years of insecticide spraying	Insecticides effective against mosquitoes		Lepidopteron-specific insecticides	
	Fenitrothion, trichlorfon, and chlorphenamide	Alphamethrin	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	Tebufenozide
1972	10,000	0	0	0
1973	6,500	0	0	0
1974	9,000	0	0	0
1975–1989	Very limited	0	0	0
1990–1996	0	Intensive, ≈2/3 of rice surfaces	0	0
1996–1999	0		Permitted but not often used	0
2000	0	11,500	500	0
2001	0	11,500	500	200
2002	0	10,000	2,000	300
2003	0	10,000	2,000	400
2004	0	4,500	1,000	500
2005	0	0	800	2,300
2006	0	0	Very limited	≈3,000

species in 1994, when rice cultivation covered a maximum of 24,500 ha (online Appendix Figure).

From 2000: Increase in Mosquito Populations

More recently still, rice producers have developed other cultivations in rotation with rice and have added new activities, such as hunting marshes and tourism, with the aim of diminishing their dependence on rice economics (22). Since 2000, the area under rice cultivation has remained stable at ≈18,000–20,000 ha.

Since 2000 the *Ariete* variety of rice has been progressively replaced by varieties less susceptible to the striped rice borer. Consequently, spraying was conducted over smaller percentages of the rice-cultivated areas: 61% in 2000 to 51% in 2003. Nevertheless, spraying was maintained to ensure the high productivity on which subsidies were based at that time. Since 2004, the terms of rice subsidies have changed yet again, leading to the disinterest in high productivity and to the high decrease in sprayed surfaces in 2004. Finally, controls on insecticide use were strengthened in 2005 (departmental order, Mar 5, 2004) to limit the impact on wild fauna; the use of alphamethrin by airplane was abandoned, and the emphasis now is on lepidopteron-specific insecticides (tebufenozide, *Bacillus thuringiensis kurstaki* 3a/3b). In parallel with the progressive abandon of insecticide, *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* populations have increased continuously from 2000 to the present.

Untangling the Components of Anthropogenic Change

Before the 1970s, and in the absence of insecticide spraying, *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* abundance followed the increase in the area under rice cultivation. After 1970, insecticide spraying, which was aimed at controlling the striped rice borer, likely influenced the size of the mosquito populations. From 1972 to 1974 and from 2000 to

2006 (surfaces sprayed were precisely known only during these years), the abundance of both mosquito species (human mosquito-landing data) was negatively correlated with the percentage of the rice areas sprayed with mosquito-efficient insecticides (Pearson coefficient $r = -0.84$, $p < 0.001$ for *An. hyrcanus* and $r = -0.64$, $p < 0.05$ for *Cx. modestus*).

This story highlights the intertwined importance of historical, political, environmental, technical, and social factors in explaining agricultural changes in the Camargue that could have directly contributed to variation in the abundance of both *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* populations, with possible consequences for vectorborne diseases (Figure 2). *An. hyrcanus* is currently considered the main potential malaria vector in the Camargue, whereas the past periods of high *Cx. modestus* abundance, i.e., the 1960s and the 2000s, were associated with WNV outbreaks in the Camargue.

The amount of rice cultivation in this area was determined by national or European decisions, which were influenced by the global historical and political context. Favorable economic conditions for rice cultivation (Marshall Plan, guaranteed prices, and subsidies) were the results of the World War II and the developing Cold War; later economic globalization forced a decrease in this support. The close relationship between political decisions and variations in rice surface area in the Camargue is due to the organization of farming into large units, itself a product of past massive funding investments and environmental constraints; this system allowed a rapid response to the changing economic climate. Currently, rice producers in the Camargue are adding tertiary activities to their historical role as food providers, in response to new social demands concerning leisure such as hunting and nature tourism. The extent and amount of spray applied depends on the presence of rice pests, permissiveness of the rice variety; and the insecticide cost in regard to production costs, sale price, and subsidies (indexed or not on productivity). The choice of rice variety

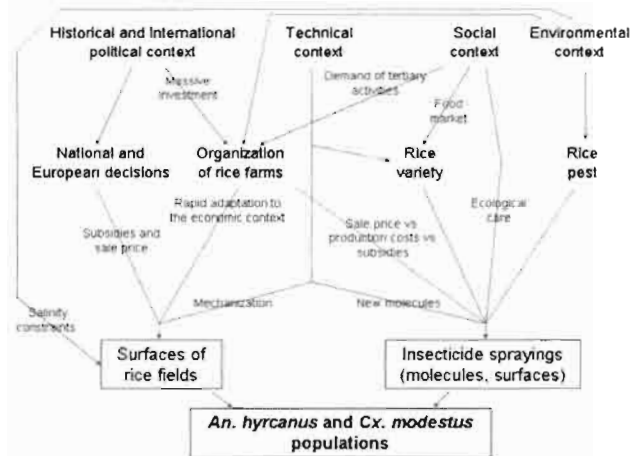


Figure 2. Impact of history, politics, technology, society, and environment on malaria and West Nile fever in the Camargue, France.

is determined by its adequacy within the food market and its agronomic performance in the production area.

What does the future hold for these mosquito populations in the Camargue? On the one hand, the Common Agricultural Policy will face another round of debates about subsidies in 2013. If subsidies are reduced, rice cultivation is expected to decrease; *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* will therefore also likely decrease in abundance and may even become as rare as they were before World War II. Conversely, because rice cultivators are important actors in maintaining the ecosystems of the Camargue, the French government may decide to continue to support rice cultivation there. Without any other disturbance of this ecosystem, *An. hyrcanus* and *Cx. modestus* populations might then continue to increase.

Climate change is considered by some authors as being responsible for the vectorborne disease recrudescence (38,39). However, as our data indicate, environmental modifications and changes in the economic, social, and cultural environments can have strong and rapid effects on mosquito populations.

Acknowledgments

We thank the 2 anonymous reviewers for their relevant comments, David Rogers for greatly improving the quality of this article, Annelise Tran for providing the map, Hélène Guis for critical reading, Michel Babinot and Christophe Lagneau for information and data concerning mosquitoes and insecticides, and Alexandre Carron for his advice on statistical analyses.

This study was partially funded by EU grant GOCE-2003-010284 EDEN (catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0056 [www.eden-fp6project.net]). N.P.'s salary was paid by the French Ministry of Agriculture. T.B. received a grant from the ACCIES project (Analyse du Changement Climatique et de

ses Impacts sur l'Eau et la Santé) and from the Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONC 2002/07/6171).

Dr Ponçon is a veterinarian from the French Ministry of Agriculture pursuing a PhD degree at the Institut de Recherche pour le Développement. His main research interests are disease vectors and, in particular, the risk of malaria resurgence in France.

References

- Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002;33:330–42.
- Martens P, Hall L. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. *Emerg Infect Dis.* 2000;6:103–9.
- Rogers DJ, Randolph SE. The global spread of malaria in a future, warmer world. *Science.* 2000;289:1763–6.
- Reiter P. Climate change and mosquito-borne disease. *Environ Health Perspect.* 2001;109(Suppl 1):141–61.
- Rioux JA. Les culicidés du midi Méditerranéen. Paris: Editions Paul Lechevalier; 1958.
- Rodhain F, Charmot G. Risks of reintroduction of malaria in France [in French]. *Med Mal Infect.* 1982;12:231–6.
- Sautet J. A propos d'une épidémie de paludisme en Camargue. *Mars Med.* 1944;2:53–64.
- Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, et al. Biology and dynamics of potential malaria vectors in southern France. *Malar J.* 2007;6:18.
- Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer W, Fontenille D, et al. Possible autochthonous malaria from Marseille to Minnesota. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1236–8.
- Panthier R. Epidémiologie du virus West Nile:   tude d'un foyer en Camargue. I. Introduction. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1968;114:518–20.
- Rollin PE, Rollin D, Martin P, Baylet R, Rodhain F, Hannoun C. Results of recent arbovirus serosurveys in the Camargue: human, horse, bovine and bird populations [in French]. *Med Mal Infect.* 1982;12:77–80.
- Le Lay-Rogues G, Arthur CP, Vanderwalle P, Hardy E, Chastel C. Lapin de Garenne, *Oryctolagus cuniculus* L. et arbovirus dans le sud-est de la France. Résultats de deux enquêtes sérologiques. *Bull Soc Pathol Exot.* 1990;83:446–57.
- Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:692–6.
- Mailles A, Dellamonica P, Zeller H, Durand JP, Zientara S, Goffette R, et al. Human and equine West Nile virus infections in France, August–September 2003. *European Communicable Disease Bulletin.* 2003;7(43).
- Zeller H, Zientara S, Hars J, Languille J, Mailles A, Tolou H, et al. West Nile outbreak in horses in Southern France: September 2004. *European Communicable Disease Bulletin.* 2004;8(41).
- Eloit M. West Nile Virus, horses—France: OIE. ProMed [cited 2006 Oct 10]. Available from <http://www.promedmail.org>, archive no. 20061010.2903.
- Rageau J, Mouchet J. Les arthropodes hématophages de Camargue. *Cah ORSTOM, s  r Entomol méd et Parasitol.* 1967;5(4):263–81.
- Hannoun C, Panthier R, Mouchet J, Eouzan JP. Isolement en France du virus West-Nile à partir de malades et du vecteur *Culex modestus* Ficalbi. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences Série D. Sciences Naturelles.* 1964;259:4170–2.
- Balenghien T, Fouque F, Sabatier P, Bicout DJ. Horse, bird, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *J Med Entomol.* 2006;43:936–46.

20. Balenghien T, Vazeille M, Reiter P, Schaffner F, Zeller H, Bicout DJ. Evidence of the laboratory vector competence of *Culex modestus* for West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23:233–6.
21. Dervieux A, Allard P, Naizot T, Auda Y. La Camargue est-elle un polder? Changement et stabilité dans le delta du Rhône depuis le début du XIX^{ème} siècle. In: Richard H, Vignot A, editors. *Equilibre et ruptures dans les écosystèmes durant les 20 derniers millénaires en Europe de l'Ouest*, Actes du colloque international de Besançon, 2000. Besançon, France: Presses Universitaires Franc-Comtoises; 2002. p. 315–29.
22. Mathevet R, Mouret JC, Mesléard F. Du mondial au local: originalité et dépendances de la riziculture camarguaise. *Faire savoirs.* 2002;2:49–56.
23. Ramsdale CD, Lodge V. Internal taxonomy of the *Hyrceanus* group of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and its bearing on the incrimination of vectors of continuing or resurgent malaria in the west of the Palaearctic region. *European Mosquito Bulletin.* 2001;10:1–8.
24. Kaiser A, Jerrentrup H, Samanidou Voyadjoglou A, Becker N. Contribution to the distribution of European mosquitoes (Diptera: Culicidae): four new country records from northern Greece. *Eur Mosq Bull.* 2001;10:9–12.
25. Onori E, Nushin MK, Cullen JE, Yakubi GH, Mohammed K, Christal FA. An epidemiological assessment of the residual effect of DDT on *Anopheles hyrcanus sl* and *An. pulcherrimus* (Theobald) in the North eastern region of Afghanistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1975;69:236–42.
26. Mouchet J, Rageau J, Laumond C, Hannoun C, Beytout D, Oudar J, et al. Epidemiology of West Nile virus: study of a focus in Camargue. V. The vector: *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae [in French]. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1970;118:839–55.
27. Berezin VV. Investigation of the ecology of arboviruses in river deltas of the Caspian and Azov Sea basins [in Russian]. *Moska (SSRR): Inst Polio Virus Entsef Akad Nauk;* 1971.
28. Detinova TS, Smelova VA. The medical importance of mosquitoes of the fauna of the Soviet Union [in Russian]. *Med Parazitol (Mosk).* 1973;42:455–71.
29. Fyodorova MV, Savage HM, Lopatina JV, Bulgakova TA, Ivanitsky AV, Platonova OV, et al. Evaluation of potential West Nile virus vectors in Volgograd region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes. *J Med Entomol.* 2006;43:552–63.
30. Savage HM, Ceianu C, Nicolescu G, Karabatsos N, Lanciotti R, Vladimirescu A, et al. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:600–11.
31. Leger L. Moustiques de Camargue. Un anopheliné nouveau pour la faune française, le *Myzorrhynchus sinensis* Wied. *Comptes rendus de la Société de Biologie.* 1920;83:1609–10.
32. Séguy ME. Notes sur les moustiques de l'Afrique mineure, de l'Égypte et de la Syrie. I. *Encyclopédie entomologique – Série B mémoires et notes 2 Diptera.* 1925;2(1):13–21.
33. Roman E. Sur quelques arthropodes vulnérants récoltés en Camargue. *Bulletin de la Société Entomologique de France.* 1937;9:131–6.
34. Treillard M. Anophèles de la Camargue. *Bull Soc Pathol Exot.* 1937;30:136–9.
35. Sautet J. Contribution à l'étude des culicidés de la région marseillaise et de la Camargue. *Mars Med.* 1938;75:75–84.
36. Treillard M. *Anopheles hyrcanus* en Provence; morphologie et biologie; gîtes et refuges. *Bull Soc Pathol Exot.* 1942;35:14–8.
37. Feron M. Apparition de la pyrale du riz (*Chilo suppressalis*) en Camargue. *Bulletin d'information des riziculteurs de France.* 1973;145:13–5.
38. Haines A, Epstein PR, McMichael AJ. Global health watch: monitoring impacts of environmental change. *Lancet.* 1993;342:1464–9.
39. Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM. Global climate change and emerging infectious diseases. *JAMA.* 1996;275:217–23.

Address for correspondence: Didier Fontenille, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier CEDEX 5, France; email: fontenil@mpl.ird.fr

EMERGING INFECTIOUS DISEASES

Full text free online at
www.cdc.gov/eid

The print journal is available at no charge to public health professionals

YES, I would like to receive Emerging Infectious Diseases.

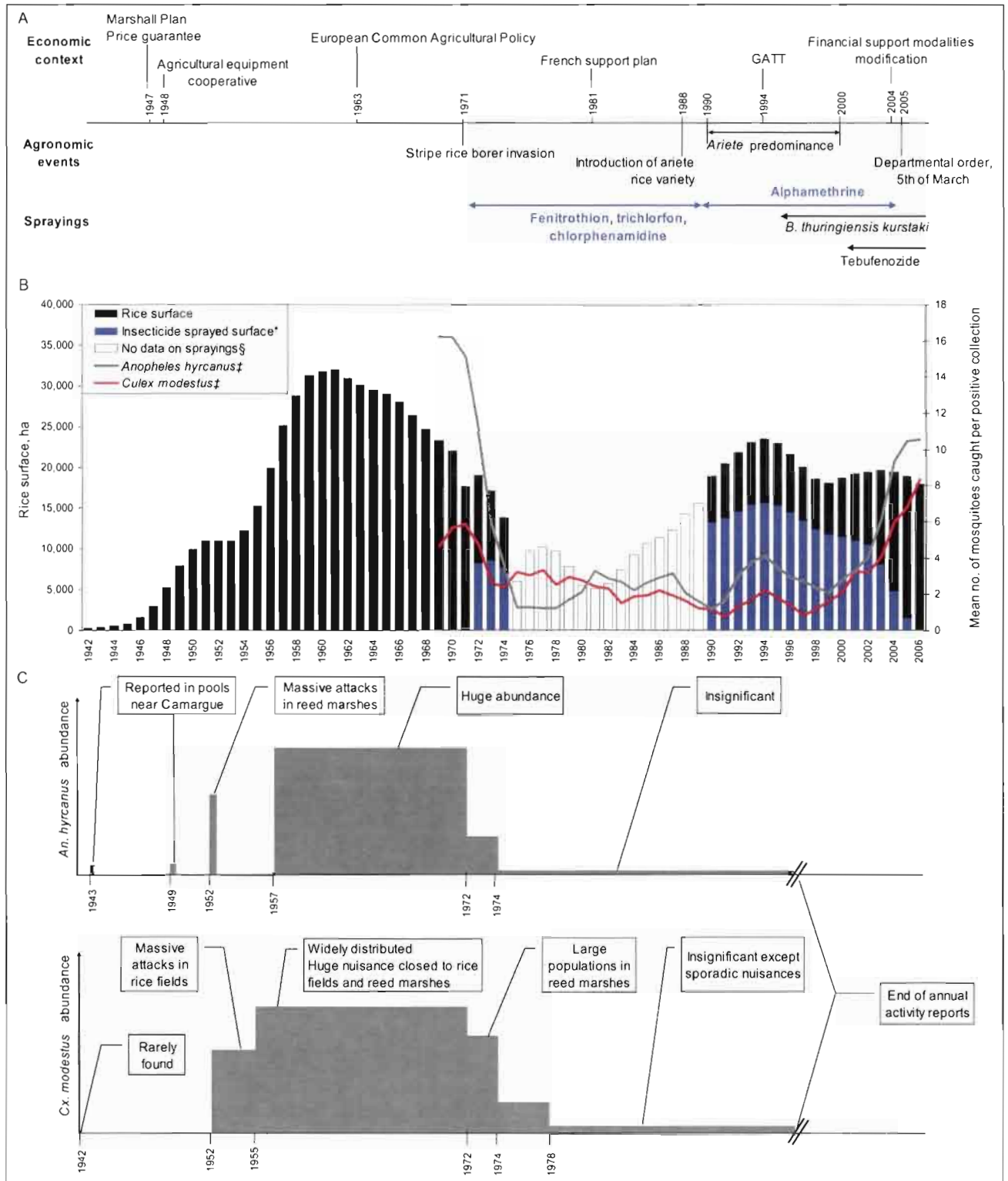
Please print your name and business address in the box and return by fax to 404-639-1954 or mail to

EID Editor
CDC/NCID/MS D61
1600 Clifton Road, NE
Atlanta, GA 30333

Moving? Please give us your new address (in the box) and print the number of your old mailing label here _____

EID
Online
www.cdc.gov/eid

Appendix Figure. Changes in vector abundance and rice cultivation related to economic and agronomic contexts in the Camargue, France. Ha, hectares. Rice surface, insecticide-sprayed surface, and human mosquito-landing collection data were smoothed with a centered moving average (running mean) of 3 years to filter short-term variations. *Insecticide sprayed surface, only insecticides having an effect on mosquito larvae (i.e., fenitrothion, trichlorfon, chlorphenamidine, and alphamethrin) were included; surfaces sprayed with lepidopteron-specific insecticide (i.e., tebufenozide and *Bacillus thuringiensis kurstaki*) were not included. Sprayed surfaces were precisely known from 1972 to 1974 and from 2000 to 2006 and were estimated from 1990 to 1999. †*Anopheles hyrcanus* is the main potential malaria vector, and *Culex modestus* is the main West Nile virus vector in the Camargue. §No data on sprayings, years 1975–1989, for which no quantitative data on sprayed surfaces were available.



2. Evolution des populations d'*An. atroparvus* en Camargue

Les études entomologiques passées révèlent :

- l'abondance de cette espèce, largement répandue sur le littoral méditerranéen (cf. partie 1, chapitre 3) dans les années 1940-1950 et son implication en tant que vecteur principal,
- puis sa régression très importante dans les années 1970 (cf. partie 2, chapitre 2, paragraphe 2).

Presque 30 ans après, nos études ont confirmé ces dernières observations et, de fait, *An. atroparvus* ne semble plus jouer un rôle potentiel important en raison de sa faible abondance. Si le lien entre la riziculture et les populations d'*An. hyrcanus* est direct, la régression d'*An. atroparvus* est plus difficile à expliquer.

2.1. L'abondance d'*An. atroparvus*

L'abondance de cette espèce dans les années 1940 est à mettre en relation avec le fonctionnement passé de la Camargue et son évolution depuis le milieu du 19^{ème} siècle. Avant cette date, la Camargue était soumise à un rythme régulier de submersions dues aux crues du Rhône ou aux remontées de la mer. Cette influence de l'action de l'eau (douce ou salée selon la nature des crues) associée à la nature des sols a permis de diviser la Camargue en 3 zones : haute et moyenne Camargue, essentiellement dulçaquicole et régulièrement dessalée par les crues du Rhône et la basse Camargue, halophile et influencée par la mer. La Camargue présentait alors un rythme naturel d'inondation hivernale et d'assèchement estival.

Pour protéger les populations humaines du delta, la digue à la mer et l'endiguement du Rhône furent achevés au milieu du 19^{ème} siècle, privant ainsi la Camargue des rythmes réguliers de submersion et exondation, et donc d'apport d'eau douce en haute et moyenne Camargue. La Camargue connaissant une situation de déficit hydrique, cet endiguement entraîna un assèchement progressif des sols, et une augmentation de leur salinité (Cousserans & Salieres 1976, Franchesquin & Dervieux 2004).

Dans ces conditions, l'abondance d'*An. atroparvus* n'est pas étonnante dans la mesure où il tolère des eaux saumâtres, à l'inverse des autres espèces du complexe *Maculipennis* (*An.*

maculipennis s.s., *An. melanoon* et *An. messeae*) décrites en France métropolitaine – espèces par rapport auxquelles *An. atroparvus* bénéficie d'un avantage sélectif en milieu saumâtre (Jetten & Takken 1994). L'association *An. atroparvus* et milieux côtiers saumâtres a également été décrite dans d'autres pays (aux Pays Bas par exemple) (Takken et al. 2002b).

2.2. La régression d'*An. atroparvus*

Le développement de la riziculture à partir des années 1940 a modifié les rythmes naturels de la Camargue et la tendance en place depuis le milieu du 19^{ème} siècle. Le développement du réseau hydrologique pour la riziculture a permis d'introduire d'énormes quantités d'eau douce en Camargue, eau puisée dans le Rhône et le Petit Rhône et utilisée dans les rizières (Franchesquin & Dervieux 2004) (on estime à 27 000 m³/ha/an la quantité d'eau douce nécessaire pour la riziculture (Gindre et al. 1999)). Avant la poldérisation des différents bassins et l'obligation du rejet des eaux des rizières vers le Rhône ou la mer, les eaux étaient rejetées dans les grands étangs, entraînant ainsi un adoucissement général de la Camargue parallèle au développement de la riziculture. Depuis 1955, la poldérisation des bassins versants a été mise en œuvre, et le rejet des volumes d'eau introduits pour la riziculture doit être effectué vers le Rhône (ou la mer)(Gindre et al. 1999). Cependant, deux bassins ne sont pas poldérisés en Grande Camargue, et un écoulement par drainage vers les étangs centraux persiste. La salinité du Vaccarès a d'ailleurs fluctué au cours des 30 dernières années, au gré du développement et du recul de la riziculture, variant de 5g/L à la fin des années 1960 à 30g/L à la fin des années 1970 lors de la crise rizicole et du recul des surfaces cultivées. De plus, la disponibilité en eau grâce au réseau hydrologique mis en place pour la riziculture, offre l'opportunité aux exploitants et propriétaires d'utiliser cette eau douce devenue facilement accessible. Le rythme naturel d'inondation hivernale et d'assèchement estival des zones humides peut dès lors être modifié en fonction des besoins et de l'utilisation du sol (terrain de chasse, conservation de la faune, pâturage, ...). L'ensemble de ces événements se traduit par un adoucissement général de la Camargue qui devient de plus en plus humide, avec de moins en moins de périodes d'assèchement en été (Franchesquin & Dervieux 2004). La riziculture a donc des effets importants sur la Camargue en modifiant globalement le milieu qui passe de sec et salé à humide et doux (Dervieux et al. 2002).

Cependant, si l'impact de la riziculture sur le milieu est évident, le lien entre l'évolution du milieu et la régression d'*An. atroparvus* n'est pas direct. *An. atroparvus* tolère des salinités élevées (jusqu'à 8g/L), mais la littérature ne mentionne pas son faible développement dans les eaux douces (Jetten & Takken 1994, Takken et al. 2002a). La compétition entre espèces peut

être évoquée : le milieu, devenu plus doux et plus humide permet le développement d'autres espèces (*An. hyrcanus* en rizières et *An. melanoon* en rizières et marais) plus compétitives dans ces nouveaux milieux, et qui auraient supplanté *An. atroparvus*, moins compétitif dans les milieux doux. Des phénomènes analogues de compétition ont été reportés précédemment entre les espèces halophiles (*An. atroparvus*, *An. sacharovi* et *An. labranchiae*) et les espèces associées à l'eau douce du complexe Maculipennis (*An. melanoon*, *An. messeae* et *An. maculipennis s.s.*) : compétition *An. atroparvus*/*An. messeae* aux Pays-Bas et probablement en Roumanie (G. Nicolescu, communication personnelle), compétition *An. sacharovi*/*An. maculipennis s.s.* et *An. melanoon* en Turquie, *An. sacharovi*/*An. messeae* en Grèce, compétition *An. labranchiae*/*An. atroparvus*-*An. melanoon*-*An. messeae* en Italie (Horsfall 1955, Jetten & Takken 1994). Cette notion de compétition est confirmée par Horsfall qui n'a observé que très rarement deux (ou plus) espèces du complexe Maculipennis dans le même gîte larvaire. Lorsqu'une telle situation se produisait, une des espèces dominait largement l'autre (Horsfall 1955). Il faut noter aussi que *An. atroparvus*, implanté majoritairement en Camargue dans les années 1940-1950, n'a pas colonisé les rizières au fur et à mesure de leur développement, alors que cette espèce est associée aux rizières dans le delta de l'Ebre en Espagne (MD. Bargues, communication personnelle). Cependant, aucune autre espèce du complexe Maculipennis n'a été identifiée dans cette zone (MD. Bargues, communication personnelle).

Ce même phénomène de disparition d'*An. atroparvus* au profit d'*An. messeae* a été décrit récemment aux Pays-Bas (Takken et al. 2002a, Takken 2003). Bien que la zone considérée ait également connu un adoucissement du milieu, l'auteur relie plutôt la régression de cette espèce à la modification et la modernisation des bâtiments des fermes de la zone, entraînant une disparition des gîtes de repos des adultes endophiles en hiver. En effet, *An. atroparvus* reste actif en hiver et trouve refuge dans des abris animaux où il peut continuer à s'alimenter (*An. messeae* entrant en diapause complète en hiver). Les prospections entomologiques ont montré que les gîtes de repos jouaient un rôle majeur sur la distribution de cette espèce en hiver en Camargue (cf. deuxième partie, chapitre 1, paragraphe 3.2). Néanmoins, en Camargue, le système d'élevage bovin est basé complètement sur l'extérieur (autrefois comme aujourd'hui) et très peu de chevaux sont maintenus en écuries (de plus, il y a probablement plus de chevaux en écuries de nos jours que dans le passé, suite à l'évolution de la société) (A. Dervieux, communication personnelle). Par contre, l'élevage ovin, très développé au 19^{ème} siècle (75000 moutons en 1830) (Camargue 2001), et encore important

après guerre (A. Dervieux, communication personnelle) a très fortement diminué. Les ovins passaient l'hiver en bergeries en Camargue et partaient en estive en été (Camargue 2001). La régression de l'élevage ovin est donc le seul élément se rapportant à une diminution importante des gîtes de repos potentiels pour les *An. atroparvus* adultes en hiver (dans la mesure où ceux-ci sont attirés par les ovins). L'impact potentiel de ce facteur n'a pas été investigué afin d'en vérifier la validité.

L'amélioration de l'habitat humain en Camargue pourrait également être citée comme hypothèse entraînant la diminution des gîtes de repos des *An. atroparvus* pendant l'hiver (il est pertinent de rappeler que le paludisme disparut en France sous l'effet de deux facteurs principaux : recours systématique à la quinine et amélioration des conditions de vie dont l'amélioration des conditions d'habitat qui supprimèrent le contact homme-*Anopheles*). Néanmoins, nous ne disposons pas d'informations suffisantes sur l'évolution des conditions d'habitat en Camargue après la seconde guerre mondiale pour étayer cette hypothèse.

En résumé, si les modifications globales du milieu camarguais sont évidentes, le lien avec la régression d'*An. atroparvus* l'est moins. La compétition avec d'autres espèces du complexe semble être le facteur principal de cette régression, la disparition des gîtes de repos paraissant plus marginale. Cependant, les mécanismes impliqués dans les phénomènes de compétition restent à déterminer.

3. Synthèse : impacts sanitaires potentiels des changements anthropiques

L'impact du développement de la riziculture intervient à deux niveaux en Camargue : d'abord directement en influençant le développement des populations d'*An. hyrcanus*, puis indirectement en modifiant globalement l'écosystème camarguais, ce qui peut être responsable du développement d'*An. melanoon* au profit d'*An. atroparvus* dans les marais. L'implication de ces deux espèces dans le risque de transmission du paludisme a donc beaucoup varié en 60 ans, *An. atroparvus* passant du statut de vecteur majeur en Camargue à celui, probable, de vecteur potentiel mineur car ses populations ont largement régressées ; *An. hyrcanus*, presque inexistant à l'époque endémique du paludisme en Camargue, devenant le vecteur potentiel majeur, en raison de son anthropophilie marquée et de son abondance. Le

risque de transmission du paludisme a donc évolué depuis 60 ans suite au remplacement d'un vecteur efficace par un autre potentiel.

Le premier paragraphe de ce chapitre souligne l'influence du contexte historique et politique national, européen et mondial, des contraintes environnementales, des progrès techniques et du contexte social sur le risque de transmission du paludisme, par le biais de la riziculture. Les changements globaux mis en évidence ici sont donc majoritairement d'origine anthropique, et leurs effets sont bien plus rapides, directs et puissants que le réchauffement climatique (en partie d'origine anthropique également), souvent incriminé en premier lieu. Enfin, la dernière étape de cette étude vise à analyser, sous un l'angle actuel et prospectif, le risque de ré-émergence du paludisme.

Chapitre 2 : Approche prospective et analytique du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue – Article 8

Ce travail a fait l'objet d'une publication en cours de préparation, et dont le manuscrit est présenté ci-dessous.

Article 8 : Ponçon N, Tran A, Toty C, Luty A, Fontenille D. A quantitative risk assessment approach for mosquito borne diseases: malaria re-emergence in South East France (en préparation).

Résumé : L'approche analytique du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue est basée sur les facteurs entomologiques (capacité et compétence vectorielles) et épidémiologiques (les porteurs de *Plasmodium*) et vise à calculer un risque entomologique, en utilisant à la fois la spatialisation et une méthode probabiliste d'évaluation du risque. Les données entomologiques ont permis d'identifier et de hiérarchiser des zones de transmission potentielle, et les données épidémiologiques ont permis d'estimer le risque d'introduction des parasites dans les zones de transmission potentielle. Le croisement de ces deux « couches de données » a permis de conclure à un risque négligeable de ré-émergence du paludisme, en partie suite au très faible nombre de *Plasmodium* importés dans les zones de transmission potentielle.

A quantitative risk assessment approach for mosquito-borne diseases: malaria re-emergence in Southern France.

Nicolas Ponçon¹, Annelise Tran^{2,3}, Céline Toty¹, Adrian JF Luty⁴, Didier Fontenille^{1§}

¹ Institut de recherche pour le développement, UR016, 911 avenue Agropolis, BP64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

² Centre de coopération internationale de la recherche agronomique pour le développement, UPR22, campus de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France.

³ UMR TETIS, Maison de la Télédétection, 500 rue JF Breton, 34093 Montpellier cedex 5, France

⁴ Medical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

§ Corresponding author

Abstract

Background

The Camargue region is a former malaria endemic area where potential *Anopheles* vectors are still abundant. Considering the importation of *Plasmodium* due to the high number of imported malaria cases in France, the aim of this article was to infer the risk of malaria re-emergence in the Camargue.

Methods

Receptivity (vectorial capacity) and infectivity (vector susceptibility) were inferred using an innovative probabilistic approach and considering the *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* species. Each parameter of receptivity (human biting rate, anthropophily, length of trophogonic cycle, survival rate, length of sporogonic cycle) and infectivity were estimated based on field survey, bibliographic data and expert knowledge and fitted with probability distributions taking into account the variability and the uncertainty of the estimation. Spatial and temporal variations of the parameters were determined using environmental factors derived from satellite imagery, meteorological data and entomological field data. The entomological risk (receptivity*infectivity) was calculated using 10,000 different randomly selected sets of values extracted from the probability distributions. The result was mapped in the Camargue area. Finally, vulnerability (number of malaria imported cases) was inferred using data collected in regional hospitals.

Results

The entomological risk presented large spatial, temporal and *Plasmodium* species-dependent variations. The sensitivity analysis showed that susceptibility, survival rate and human biting rate were the three most influential parameters for entomological risk. Assessment of vulnerability showed that among the imported cases in the region, only very few were imported in at-risk areas.

Conclusions

The current risk of malaria re-emergence seems negligible due to the very low number of imported *Plasmodium*. This model demonstrated its efficiency for mosquito-borne diseases risk assessment.

Box 1: Risk of malaria re-emergence

- **receptivity** is expressed by the vectorial capacity index and is calculated following the mathematical formula: $ma^2p^n / \ln p$ (m , a , p , n are described in the Box 2). It refers to the expected quantum of new inoculations of man per infective malaria case per day that the mosquito population would distribute to man considering that all vector females biting the malaria case become infected and transmit [1-3].
- **infectivity (b)** is the degree of susceptibility of an *Anopheles* species (or population) to different *Plasmodium* species (or strains) [4].
- **vulnerability** is the number of malaria cases or, more precisely, gametocyte carriers, imported in the area [3, 4].
- **entomological risk** is defined, in this article, as the product of receptivity and infectivity (receptivity*infectivity). Hence, it refers to the expected quantum of new inoculations of man per infective malaria case per day that the mosquito population would distribute to man.
- **malariogenic potential** is the risk estimate of malaria re-emergence and is determined by three factors: receptivity, infectivity and vulnerability [3, 4]. It is usually assessed in a semi-qualitative and relative way.
- **R0 (basic reproductive rate)** is the total number of malaria cases derived from one infective case that the mosquito population would distribute to man in the absence of immunity. It is the product of the vectorial capacity, the susceptibility and the human recovery rate ($1/r$), and is calculated with the following mathematical formula: $(ma^2p^n / \ln p) * b * 1/r$, where $1/r$ is the length in days during which humans are infectious. R0 must equal at least 1 for disease persistence and increase. For values less than 1, the disease is supposed to decrease [5].

Box 2: Entomological factors

- **m** is the vector-host ratio, i.e., the anopheline density in relation to man.
- **a** is the vector biting rate and is calculated as follows: $a = h/u$. It refers to the average number of people bitten by one mosquito in one day.
- **ma** is the human biting rate, i.e., the number of bites per human per day.
- **h** is the proportion of blood meals taken from people (as opposed to other animals that are not infected with human malaria). It is also named anthropophily.
- **u** is the length in days of the trophogonic cycle, considering the approximation that *An. hyrcanus* takes only one blood meal per cycle. The trophogonic cycle is the period delimited by two consecutive blood meals, and comprised of the time necessary for blood digestion, to find a pool to lay eggs in, and to find a host for the next blood meal.
- **p** is the daily survival rate, i.e., the probability of a mosquito surviving through one whole day.
- **n** is the length in days of the sporogonic development, i.e. the time necessary for parasites to fulfil a complete development from ingested gametocytes during the blood meal to sporozoites in the salivary glands (the stage at which the parasite is transmissible to humans).
- **b** is the susceptibility of mosquitoes to *Plasmodium* species, i.e. their intrinsic ability to replicate and transmit *Plasmodium*. It expresses the proportion of female mosquitoes developing parasites after an infective blood meal.

Box 3: probability distributions

Beta distribution: describes the true probability of an event occurring, given x trials and s successes. It is expressed as follows: probability (event) = Beta (α_1, α_2), where $\alpha_1 = s + 1$ and $\alpha_2 = x - s + 1$ [6]. We used this when the process of biological data collection or biological experiment could be assimilated as a number of s successes among x trials, which was the case for the parity rate estimate (s parous females among x dissected females) and susceptibility estimate (s positive mosquitoes among x tested).

Pert distribution: is generated from the Beta distribution, and requires three parameters: the minimum value (v), the most likely value (w) and the maximum value (z) [7]. Pert (v, w, z) means that v is the minimum value of the distribution, z the maximum, and w the most likely. It is used to model expert knowledge in the absence of an extended dataset allowing one to determine the distribution of biological parameters. In this case, experts are asked to provide v, w and z .

Background

In the past, malaria was endemic and constituted a major health issue in France in marshy areas, particularly the Camargue which was an active focus in France until the beginning of the 20th century. Malaria decreased drastically due to the draining of marshes, rearing of livestock, improvement of housing and living conditions and the use of quinine [8]. Malaria disappeared from the Camargue after World War II: the last *Plasmodium vivax* malaria epidemic occurred in 1943, with about 400 estimated cases [9]. Recent entomological surveys reported huge *Anopheles* populations in this area [10-12], and considered *Anopheles (Anopheles) hyrcanus* (Pallas) as being the main potential malarial vector based on its anthropophilic feeding behaviour and abundance [11, 13]. Thus, the Camargue is currently facing an “anophelism without malaria” situation. Moreover, autochthonous transmission was recently suspected in the French Mediterranean coast in 2006 [14], supporting the idea that southern France remains suitable for malaria transmission. The number of imported malaria cases have increased dramatically since the 1970s, in parallel with increased international travels, with an average of about 6400 cases per year for the last ten years in France, leading to a massive *Plasmodium* introduction from endemic countries into France [15, 16]. These observations suggest that the malaria situation needs to be re-examined, and the aim of this paper is to infer current risk of malaria re-emergence, to identify hot spots for malaria re-emergence in the Camargue and to develop a generic model for mosquito transmitted diseases.

The risk of malaria re-emergence in an area (ie, the recurrence of malaria transmission in an area) may be estimated by three factors: receptivity, infectivity and vulnerability [3, 4], usually assessed at the regional scale in a semi-qualitative way (Box 1) [17]. In this article, we calculate a quantitative entomological risk, which is the product of receptivity and infectivity, and we discuss the impact of vulnerability. The main objective of this work was to estimate the risk of malaria re-emergence at the local scale, considering the temporal and spatial local variations of the three components in order to identify hot spots for malaria resurgence in the Camargue.

The main difficulty that occurs when modeling is the quantification of biological parameters, especially for entomological data, as the field and laboratory studies are very painstaking, time-consuming and only rarely permit conclusions on a precise value. In this article, a probabilistic approach, taking into account the uncertainties and variability of inputs, was applied to a vector-borne disease, which constitutes an innovative method. Even if the malaria situation needs to be re-examined in the Camargue, this disease does not constitute a major health issue. The aim of this article is not to provide a public health tool that can be used to control malaria in the Camargue, but to present an innovative approach to spatialized quantitative risk assessment applied to a vector-borne disease.

Receptivity and infectivity were estimated for the potential vector *An. hyrcanus* as i) it is now considered as the main potential malaria vector and ii) other *Anopheles* species are rare in the Camargue area. However, our approach is applicable to other mosquito species.

Materials, methods and data processing

Study area

The Camargue is the main wetland area in Southern France and covers the Rhone river delta. This area has a Mediterranean climate characterized by warm, dry summers and mild, wet winters. Total annual rainfall usually ranges between 500 and 700 mm and occurs mainly in autumn, and the annual mean temperature is 14°C.

Water pools and marshes cover a large part of the Camargue. Water is provided either by rains or a very tight canal network diverted from the river Rhone used to irrigate paddies or to fill marshes. Management of water is at the level of individual field owners depending on use: grazing for horses, cows or sheep, exploitation of reeds or rice, hunting reserves for waterfowl and nature preservation. Landscapes in the Camargue are strongly affected by the duration of submersion and the salinity of the soils. They are organized roughly in a south-north gradient of salinity, with agricultural land and reed marshes in the north and natural salty ponds and salt marshes in the south [18].

Moreover, there are various forms of agriculture (including vineyard, paddies, market gardening, fruit growing and exploitation of reeds) and rice, which covers more than 18,000 hectares in the Camargue, is the main cultivation [19]. Livestock includes horses, cows and sheep.

The Camargue hosts nearly 100,000 permanent inhabitants distributed between towns, hamlets and isolated houses. Moreover, the number of people increases in summer due to tourism.

Quantitative risk assessment using a probabilistic approach

Our objective was to organize and analyze scientific information in order to infer the risk of malaria re-emergence taking into account the variability and uncertainty of the input components and the final risk estimate. Such analysis, using reiterated simulations, have been performed for a decade for risk assessment in food microbiology, for example [6, 20]. Information and data for the development of the entomological risk model were obtained

from field surveys, literature, unpublished data and expert opinion. Biological parameters were estimated by probability distributions in a plausible way that is coherent and conceivable and they were fitted with Pert or beta distribution [6, 7]. An amount of 10,000 reiterated simulations generated by the Latin Hypercube method associated with the probability distributions was used to describe both variability and uncertainty within the input parameters and the model [21, 22]. The outcome is a statistical distribution of risk, as well as a mean value of the risk estimate. Sensitivity analysis was performed to point out factors responsible for the main impact on the risk estimate. The @risk® (Palisade Corporation) software version 4,5,3 was used.

Meteorological data

We used daily temperatures (2005) and mean monthly temperatures (from 2002 to 2006) recorded by MeteoFrance at Aigues-Mortes (western Camargue) and at Tour du Vallat (southeastern Camargue). Daily temperatures were smoothed with a moving average (running mean) of three days to filter daily variations. For both types of data (daily and monthly), we calculated the average temperature for the Camargue based on the two stations. Humidity was recorded in 2005 at Marais du Vigueirat. These meteorological data were used to estimate some of the biological parameters of *An. hyrcanus*.

Entomological data: receptivity

In order to assess receptivity, we had to evaluate the human biting rate (ma), the vector biting rate (a), the survival rate (p) and the sporogonic cycle (n) and their spatial and temporal variations (Box 2).

Space and time-dependency. Although we sampled a huge amount of *An. hyrcanus* (125,848 specimens captured, 504 females dissected), it has not been possible to estimate precisely potential spatial variations of some biological parameters. Thus and due to the small size of the Camargue, we considered that the biology of *An. hyrcanus* was homogeneous in the whole area, which means that the vector biting rate (a), survival rate (p) and sporogonic cycle (n) (Box 2) did not vary spatially. On the contrary, as *An. hyrcanus* presence and density depend on the biotopes and the season [11, 12], the vector-host ratio m (and hence the human biting rate (ma)) (Box 2) presents a strong spatial heterogeneity (Table 1). Spatial variations were assessed based on a Geographic Information System (GIS) computing data for each 30 meter-wide pixel in the Camargue [23].

All parameters were considered time-dependent, except the *Anopheles* anthropophily (h) and, as a practical approximation, the survival rate (p) (Table 1). Time-variations, which are detailed below, were described at a monthly time step.

Table 1: Space, time and *Plasmodium* species-dependent variations in receptivity, infectivity and vulnerability.

Components		Variation		
		Space dependent	Time dependent	<i>Plasmodium</i> -species dependent
Receptivity	m (vector-host ratio)	YES	YES	NO
	a (vector-biting rate)	NO	YES	NO
	h (anthropophily)	NO	NO	NO
	u (length of the trophogonic cycle)	NO	YES	NO
	p (survival rate)	NO	NO	NO
	n (sporogonic cycle)	NO	YES	YES
Infectivity	b (susceptibility)	NO	NO	YES
Vulnerability		YES	YES	YES

Human biting rate (*ma*). The presence and density of *An. hyrcanus* were inferred using remote sensing, entomological adults and larvae collections [23]. Analysis of larval data led to the definition of a larval index that was calculated for each pixel in the Camargue based on environmental key factors. An adult abundance index was generated from the larval index and was also calculated for each pixel in the study area. Comparison of the adult abundance index and the maximum number of *An. hyrcanus* captured in the same pixel with CDC-light traps+CO₂ showed a highly significant linear regression, allowing us to infer, using key environmental factors, the maximum number of *An. hyrcanus* captured during the year with CDC-light traps+CO₂ for each pixel in the Camargue [23].

The mean annual dynamics of *An. hyrcanus* in the Camargue was inferred from the results of several capture campaigns conducted during several years, in several places, using several capture methods (Table 2). Specimens of this species were collected from March to October, and presented huge abundance variation (none of them were collected during winter). In each capture month, the mean percentage of collected mosquitoes (among the total number of mosquitoes captured during the year) were 0, 0, 0, 4 [1; 7], 12[2; 21], 66 [51; 80], 18 [9; 27], 0 from March to October, respectively (with the associated confidence interval in brackets), and the maximum number of *An. hyrcanus* captured during the year refers to the month of August. Hence, the spatial distribution of the annual maximum number of *An. hyrcanus* was combined with the mean annual dynamics in order to determine, for each pixel and for each month in the Camargue, the number of *An. hyrcanus* captured with CDC-light traps+CO₂.

Table 2: Total number of *An. hyrcanus* collected per month and associated percentages (bracket)

	Capture places							
	Méjannes	Aimargues	Mourgues	Pont de gau	Carbonnière	Vigueirat	Western Camargue ¹	Tour du Vallat
Year	2005	2005	2005	2005	2005	2005	1969-1994	2004
Capture method	CO2 traps	CO2 traps	CO2 traps	CO2 traps	CDC-LT + CO2	CDC-LT + CO2	Human landing catch	Horse bait trap
Reference	G. L'Ambert, unpublished data	G. L'Ambert, unpublished data	A. Carron, unpublished data	A. Carron, unpublished data	[11]	[11]	EID-Méditerranée, unpublished data ²	[10]
March	-	-	-	-	0 (0)	5 (0)	(0)	-
April	-	-	-	-	0 (0)	7 (0)	(0)	-
May	1 (0)	0 (0)	2 (1)	2 (0)	16 (0)	296 (0)	(0)	0 (0)
June	27 (0)	0 (0)	18 (7)	28 (3)	673 (12)	6737 (6)	(4)	3 (0)
July	357 (5)	0 (0)	104 (42)	107 (12)	374 (7)	17739 (16)	(11)	38 (1)
August	5933 (83)	102 (95)	94 (38)	730 (84)	3257 (59)	61315 (55)	(43)	4101 (71)
September	857 (12)	5 (5)	32 (13)	7 (1)	1228 (22)	25708 (23)	(42)	1640 (28)
October	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0)	124 (0)	(0)	4 (0)
Total	7175	107	250	874	5551	111919		5786

Note:

¹ approximatively 12 points

² mean percentage

From this, the human biting rate (*ma*) was inferred from a comparison between mean CDC-light trap captures and mean human landing captures. We compared captures conducted the same night, in the same area (Carbonnière vs Marais du Vigueirat), and in pixels of the same adult abundance index class (the following adult abundance thresholds were chosen in order to determine the classes: 10; 100; 500; 1000; 2000; 5000. Table 3). For example, human landing captures carried out on the 10th of August in Carbonnière in pixel Hu5 and Hu6 were compared to light trap captures carried out on the same date and in the same area, in pixel LT1, LT4 and LT5 (all of these pixels have an adult abundance index between 100 and 500). Comparison showed a highly significant linear relationship between CDC-light traps and human captures ($r^2=0.66$, $p<0.01$). Indeed, human biting rate (*ma*) was extrapolated from the following formula: $ma = (0.39 \text{ LT} + 0.049) * 1.25$. As human landing captures refer to the hour following sunset, a correction factor of 1.25 was associated with the estimation of *ma* in order to obtain *ma* for the entire night (Table 3).

Table 3: Number of *An. hyrcanus* captured during human landing catches (A) or light trap (B) sessions

Adult abundance index relative to the pixel where the capture was conducted is indicated. Human landing results are relative to the hour following sunset (which represent the *An. hyrcanus* aggressiveness peak [11] and approximately 80% of the total number of *An. hyrcanus* captured during the entire night (Ponçon, unpublished data)), whereas light trap captures are relative to the entire night. Each line corresponds to a human landing catch session carried out by one volunteer belonging to the research team (two people were present at Hu6 and Hu7).

A.

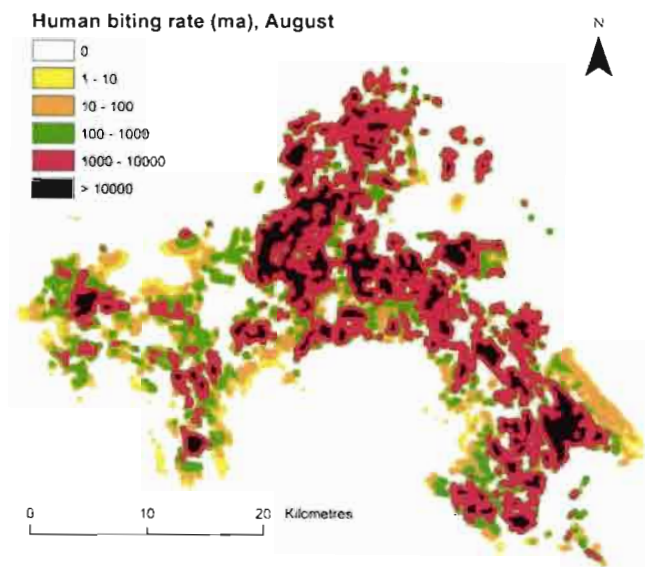
Area	Pixel	Adult abundance index	08/08/2005	10/08/2005	19/09/2005	21/09/2005	04/10/2005	23/08/2006	05/09/2006
Vigueirat	Hu1	8676	6312	-	0	-	14	-	-
Vigueirat	Hu2	122	26	-	0	-	0	-	-
Vigueirat	Hu3	308	2	-	9	-	0	-	-
Vigueirat	Hu4	2430	-	-	-	-	-	-	67
Carbonnière	Hu5	242	-	304	-	25	-	-	-
Carbonnière	Hu6	155	-	2	-	1	-	-	-
Carbonnière	Hu6	155	-	0	-	0	-	-	-
Carbonnière	Hu8	687	-	-	-	-	-	39	-
Carbonnière	Hu5	242	-	-	-	-	-	156	-
Carbonnière	Hu7	5348	-	-	-	-	-	16	-
Carbonnière	Hu7	5348	-	-	-	-	-	4	-

B.

Area	Pixel	Adult abundance index	08/08/2005	10/08/2005	19/09/2005	04/10/2005	23/08/2006	05/09/2006	21/09/2005
Vigueirat	LT1	346	218	-	346	6	-	-	-
Vigueirat	LT2	208	70	-	208	1	-	-	-
Vigueirat	LT3	6594	3546	-	6594	20	-	-	-
Vigueirat	LT4	10920	15971	-	10920	15	-	-	-
Vigueirat	LT5	4898	2016	-	4898	32	-	-	-
Vigueirat	LT6	1769	180	-	1769	3	-	1200	-
Vigueirat	LT7	3732	3645	-	3732	4	-	-	-
Vigueirat	LT8	2681	1006	-	2681	24	-	-	-
Carbonnière	LT1	492	-	254	-	-	-	-	8
Carbonnière	LT2	1299	-	102	-	-	101	-	10
Carbonnière	LT3	1250	-	39	-	-	-	-	0
Carbonnière	LT4	433	-	20	-	-	-	-	3
Carbonnière	LT5	176	-	288	-	-	-	-	3
Carbonnière	LT6	705	-	30	-	-	78	-	19
Carbonnière	LT7	721	-	17	-	-	-	-	15
Carbonnière	LT8	0	-	1	-	-	-	-	0
Carbonnière	LT9	5348	-	-	-	-	28	-	-

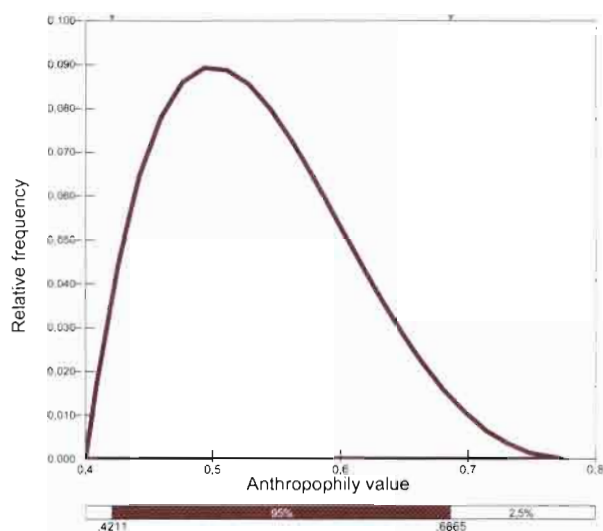
The result is the spatio-temporal distribution of *ma* in the Camargue, i.e., an estimation of the human biting rate for each 30 m x 30 m pixel and each month. The human biting rate was figured for the month of August in order to illustrate this paragraph (Figure 1). Variability and uncertainty were taken into account for each step leading to the assessment of variability and uncertainty of *ma* for each pixel.

Figure 1: Spatial distribution of the human biting rate in the Camargue in August.
Classes were arbitrary chosen with a logarithmic scale



Anopheles hyrcanus anthropophily (h) (Box 2) was estimated from the comparison between human landing, light traps and horse bait trap results for *An. hyrcanus* and other *Anopheles* species [11], and was fitted as follows: Pert distribution (0.4; 0.5; 0.8)(Figure 2). We assumed that h did not vary throughout the year.

Figure 2: Distribution of *An. hyrcanus* anthropophily



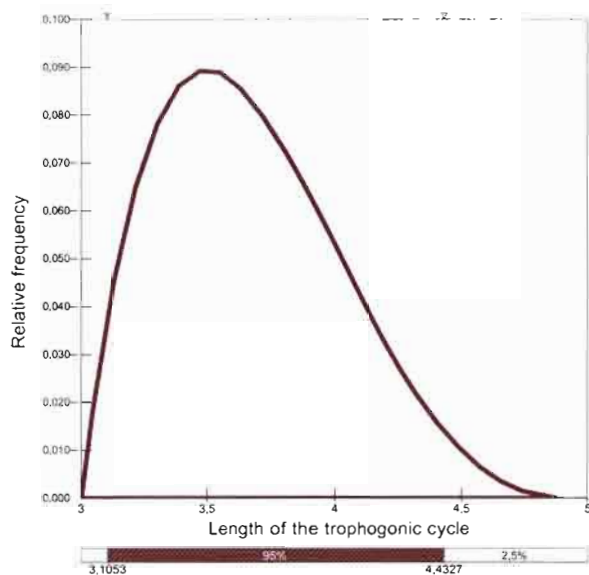
The length of the trophogonic cycle (u) (Box 2) was calculated using the following formula, which estimates the length of time of blood digestion: $u=f_l/(T-g_l)$ where f_l and g_l are factors depending on humidity and T is the temperature. f_l and g_l were experimentally determined and evaluated at 36.5 °C-days and 9.9°C, respectively, when the humidity reached 70-80% (from June to September 2005, mean monthly humidity varied from 63 to 90% in the Camargue) [24]. Moreover, Detinova assumed that it was reliable to add 24 hours to take into account the time necessary to find a host and the time necessary to find a pool to lay eggs in, in order to fulfil a complete gonotrophic cycle [24]. Considering expert knowledge and bibliographical data [25], a two day range of values was fixed for each month in the Camargue, and the length of the trophogonic cycle was fitted as indicated in Table 4.

In order to illustrate this, we determined the distribution of the length of the trophogonic cycle for August (Figure 3)

Table 4: Length of the trophogonic cycle

Month	Mean temperature (2002-2006)	Length of trophogonic cycle (from Shlenova and Detinova)	Pert distribution
March	10.9	38.4	
April	14	9.9	(9; 10; 11)
May	17.8	5.6	(4.5; 5.5; 6.5)
June	23	3.8	(3; 4; 5)
July	24.8	3.4	(3; 3.5; 5)
August	24	3.6	(3; 3.5; 5)
September	20.3	4.5	(3.5; 4.5; 5.5)
October	17.1	6.1	(5; 6; 7)

Figure 3: Distribution of the length, in days, of the trophogonic cycle in August



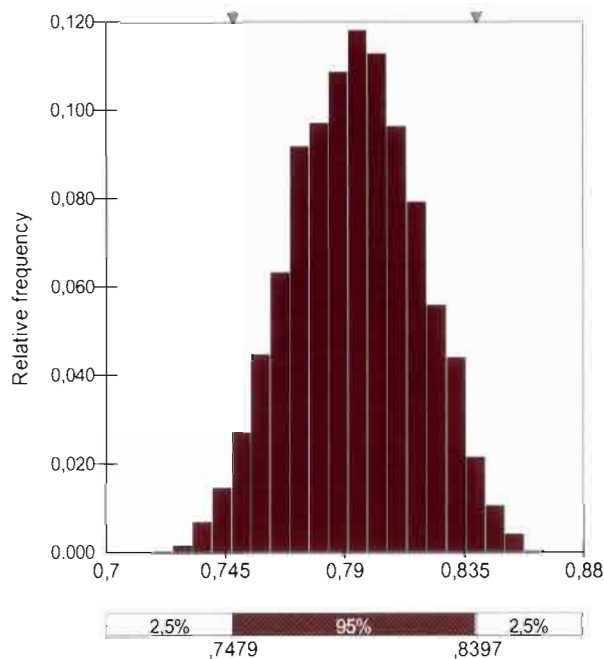
The daily survival rate (p) (Box 2) was estimated from parity rates (P) using the following formula: $p=P^{1/u}$ [26] which is relevant in the case of stable populations. Considering that the *An. hyrcanus* population increases and decreases progressively according to the *Anopheles* biology, we assumed the approximation that populations were stable during the summer [12]. We used parity rates observed in June, July and September 2005 in Carbonnière and Marais du Vigueirat (due to the low number of dissected mosquitoes, the parity rate calculated in June in Carbonnière was not included) [11]. They were fitted as indicated in Table 5, and the mean value was calculated from the 5 probability distributions in order to obtain the mean *An. hyrcanus* parity rate in the Camargue from June to September 2005.

Table 5: Parity rates observed in the Camargue in 2005

	Carbonnière	Marais du Vigueirat
June	-	Beta (18; 9)
July	Beta (20; 69)	Beta (29; 91)
September	Beta (89; 45)	Beta (40; 80)

During the same period (June to September 2005), the daily temperature varied from 18.5°C to 26.4°C, with a mean value of 23.2°C. The length of the trophogonic cycle, calculated using the same method as before, ranged from 3.2 days to 5.2 days, with a mean value of 3.7, and was fitted as follows: Pert distribution (3; 3.5; 5.5). Using the formula $p=P^{1/u}$, we obtained a mean p value of 0.79 (Figure 4). Due to difficulty in obtaining a precise value for parity rates for the entire year, we assumed that p did not vary from March to October in this model.

Figure 4: Distribution of the *An. hyrcanus* daily survival rate



The length of the sporogonic period (n) (Box 2) was calculated as follows: $n = f_2 / (T - g_2)$, where T is temperature and f_2 and g_2 are *Plasmodium* species-dependent factors [27]. f_2 and g_2 were experimentally evaluated at 111°C-days and 16°C, 105°C-days and 14.5°C for *P. falciparum* and *P. vivax*, respectively. However, Grassi and MacDonald estimated threshold temperatures under which the sporogonic development is not completed: 18-19°C for *P. falciparum*, 15-17°C for *P. vivax* [5, 25].

Entomological data: infectivity

Anopheles hyrcanus susceptibility was estimated based on data derived from experimental membrane-feeding experiments conducted with cultured *P. falciparum* in the laboratories of Radboud University Nijmegen Medical Centre (The Netherlands) following a routine protocol [28, 29]. Among 350 *An. hyrcanus* tested, none were found able to transmit tropical *P. falciparum* strains (Luty, unpublished data). Hence, *An. hyrcanus* susceptibility to *P. falciparum* was fitted with a beta distribution (1; 351) (Figure 5).

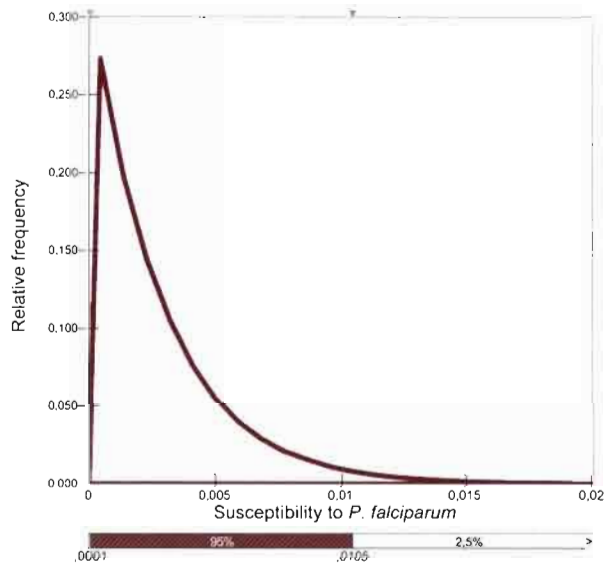
Anopheles hyrcanus susceptibility to *P. vivax* has not yet been tested, but this species has been considered a vector of *P. vivax* in Afghanistan for more than 30 years [30, 31]. Genetic comparison based on ITS2 sequences between French, Afghan, Turkish and Iranian specimens concluded that they were identical (Toty, unpublished data). Hence, we considered that *An. hyrcanus* was susceptible to tropical *P. vivax* strains, and estimation of its susceptibility, based on expert knowledge, was fitted as follows: Pert distribution (0.05; 0.20; 0.70) (Figure 5).

We considered that *An. hyrcanus* susceptibility to either *P. falciparum* or *P. vivax* was homogeneous through time and space (Table 1).

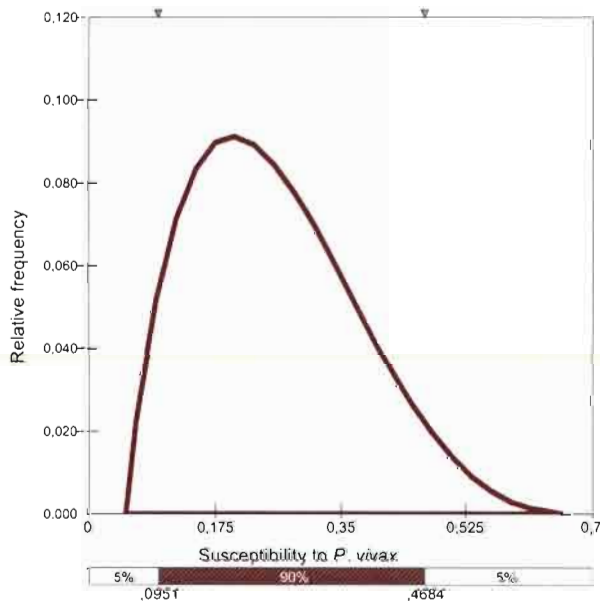
Anopheles hyrcanus susceptibility to *P. ovale* and *P. malariae* was not inferred, as very little is known about European *Anopheles* susceptibility to these two species.

Figure 5: Distribution of *An. hyrcanus* susceptibility to A) *P. falciparum* and B) *P. vivax*

A.



B.



Parasitological data: vulnerability

Vulnerability is related to gametocyte carriers as the gametocyte is the stage transmissible to mosquitoes. Nevertheless, very little is known about gametocyte carriers, and any information must be considered in the context of imported malaria cases, i.e. taking account of the fact that the illness is diagnosed and treated. Since anti malarial-treatment in France is generally conducted with drugs that do not prevent gametocyte emergence [15], we made an

assumption that every patient may develop some gametocytes. Hence, we used imported malaria cases to approach the gametocyte presence in the Camargue.

Data relative to imported malaria cases were obtained from five public hospitals localized in important towns in/around the Camargue (Montpellier, Nîmes, Avignon, Arles and Marseille). These data were analyzed with regard to the date, *Plasmodium* species, patients' residence for the 2004-2005 period and contamination place.

It was estimated that imported malaria case data obtained from public hospitals represented about 50-55% of all imported malaria cases, with other cases being diagnosed by private laboratories [32, 33]. Thus, the total number of imported malaria cases was estimated using a 52.5% correcting factor assuming that epidemiological data provided by public hospitals were representative of the total number of imported malaria cases.

Results

Vulnerability

In 2004 and 2005, 657 imported cases were diagnosed in the region (corresponding to a total of 1251 estimated imported cases), among which *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae* represented 85.5%, 7%, 5.5% and 2%, respectively. Moreover, 35% of these cases occurred between August and September. Among 528 patients for whom the place of residence was known, 75% were living in Montpellier, Nîmes, or Marseille big cities, and only 7 patients were living in areas where *An. hyrcanus* could be present.

Countries in which patients were infected were not known for 2004-2005. For the 2001-2003 period, 96% of imported malaria cases were contracted in Africa, and the Comoros Islands represented the main place of contamination for cases diagnosed in Marseille, Arles and Nîmes. Data collected in Montpellier and Avignon showed that imported cases were mainly contracted in West Africa.

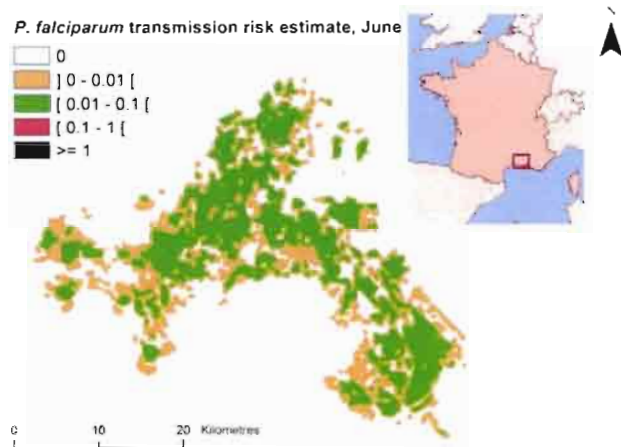
Entomological risk (receptivity*infectivity)

The mean value of the entomological risk was assessed for *P. falciparum* species from June to September, and for *P. vivax* for the month of August for each pixel of the Camargue (Figure 6) (the entomological risk was not assessed for *P. ovale* and *P. malariae* due to the low number of imported cases and the lack of information concerning both species). It was calculated with 10,000 different randomly selected sets of values extracted from input distributions.

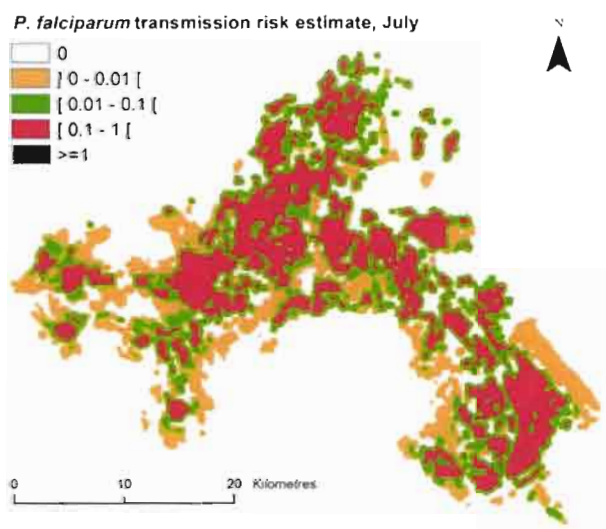
Strong differences were observed in the entomological risk for the two *Plasmodium* species: *P. falciparum* transmission risk estimate ranges from 0 to more than 1 although *P. vivax* transmission risk estimate ranges from 0 to more than 100.

Figure 6: Spatial variations of *P. falciparum* transmission risk estimate (ranging from 0 to more than 1) in (A) June, (B) July, (C) August, (D) September, and (E) of the *P. vivax* transmission risk estimate (ranging from 0 to more than 100) in August in the Camargue (Classes were arbitrary chosen with a logarithmic scale)

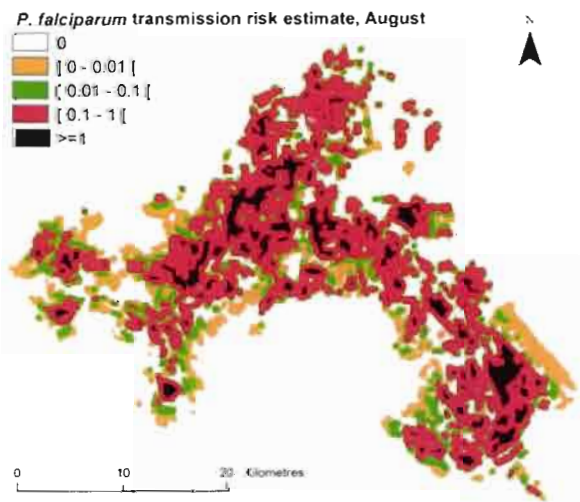
A.



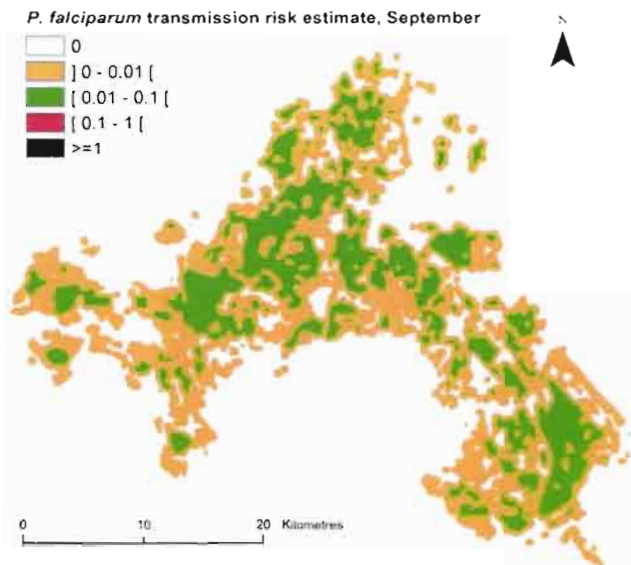
B.



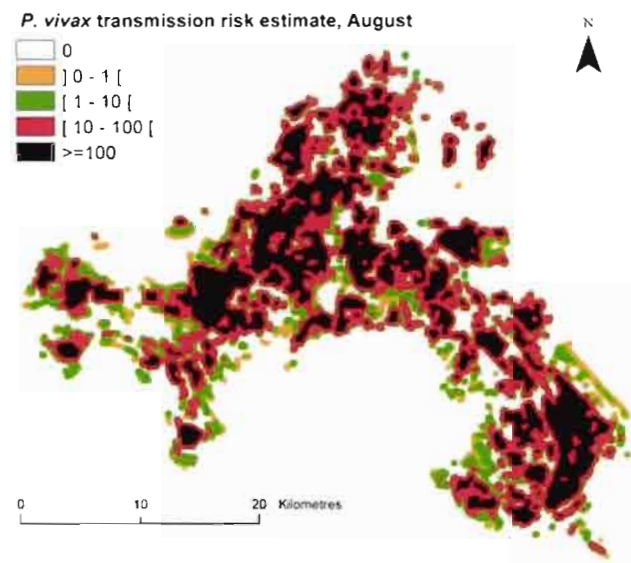
C.



D.



E.



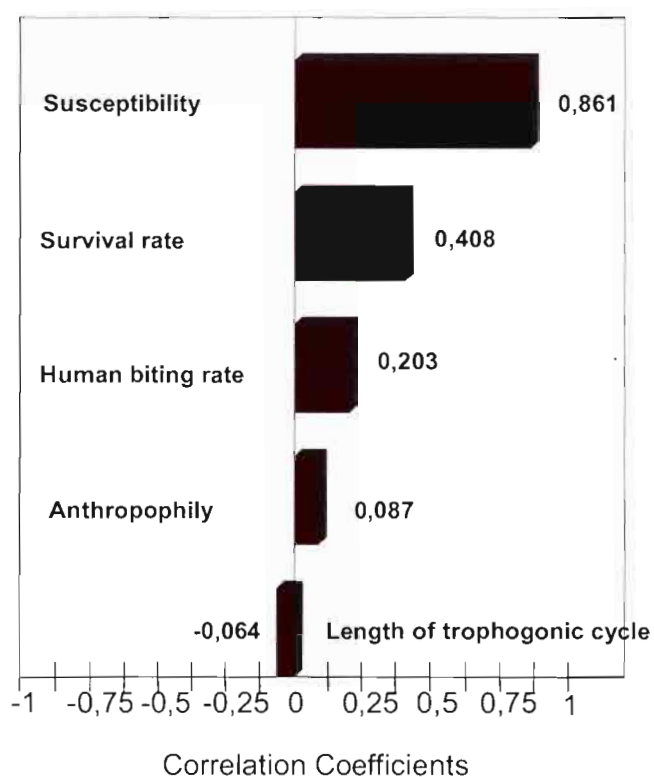
Uncertainties of the risk estimate and sensitivity analysis

For each pixel the outcome of the model is a statistical distribution of the risk estimate, generated by variability and uncertainty within inputs. For example, the entomological risk estimate ranges from about $9 \cdot 10^{-6}$ to 20, with 95% of the values being between 0.016 and 4.7 for pixel having a mean value of about 1.

The sensitivity analysis was conducted for pixels of which the mean entomological risk estimate is about 1. Results of the sensitivity analysis show the correlation coefficients between different varying inputs and the consecutive varying risk estimate (Figure 7).

Sensitivity analysis carried out for pixels presenting a lower risk estimate showed a predominance of susceptibility. However, correlation coefficients of the survival rate and the human biting rate were approximately equal. Sensitivity analysis carried out for the *P. vivax* entomological risk estimate showed the equal importance of the susceptibility, the survival rate and the human biting rate.

Figure 7: sensitivity analysis



Discussion

The entomological risk index used in this article refers to the risk of transmission (Box 1): the risk of transmission being high when the entomological risk is high. Results clearly indicate a maximum risk of *P. falciparum* transmission in August in the Camargue considering the spatial distribution and value of the entomological risk estimate, which results from length of the trophogonic cycle and sporogonic period and the human biting rate. The length of the trophogonic cycle and sporogonic development period are directly influenced by the mean temperature in our model, and the human biting rate depends directly on the *An. hyrcanus* dynamics and density [12]. The human biting rate being the only space-dependant factor in our model, one could be tempted to approach roughly the risk of transmission by the human biting rate. Nevertheless, the entomological risk presents also temporal variations which depend not only on the human biting rate but also on the impact of temperature on the length of the trophogonic and sporogonic cycle. Dynamics of *An. hyrcanus* and mean temperature do not evolve exactly in the same way in the Camargue, which show the necessity of estimating all the parameters of the entomological risk.

The risk of *P. vivax* transmission is more than one hundred times higher than the risk of *P. falciparum* transmission, which is due to infectivity and the length of sporogonic cycle differences.

Nevertheless, the entomological risk calculated herein is a theoretical index as the human biting rate reaches more than 10,000 bites per human per night reflecting the abundance of

An. hyrcanus. Of course, this will never happen as no one can endure such a large number of bites. This suggests that, in the future, it could be necessary to combine the entomological risk with human presence and exposure to mosquito bites in order to evaluate the real human biting rate. Such analyses would require complementary geographical and sociological studies.

Although all of France faces a large number of imported cases [15], particularly in the South East, vulnerability in at risk areas is very low because most imported cases are present in large cities.

The entomological risk, referring to the risk of transmission in this article (Box 1), has to be interpreted in a relative way due to its definition and the estimation of its parameters. Thus, this study underlined space, time and *Plasmodium* species-dependant of the risk of potential transmission. Of course, the risk of potential transmission is connected with the risk of malaria re-emergence when gametocytes carriers are introduced within at risk areas. Considering the entomological risk and the length in days of the infectious period of humans would allow estimation of R_0 and the following absolute risk of malaria re-emergence. Finally, the current risk of malaria re-emergence seems negligible due to the very low number of imported *Plasmodium*.

As stated in the introduction, the aim of this study was not to build a public health tool for controlling malaria in the Camargue. The emphasis was on presenting an innovative approach of spatialized quantitative risk assessment applied to a vector-borne disease, which has not been previously conducted. The main pros of such a probabilistic approach are the possibility of integrating the uncertainty and variability of inputs within a model and to quantify the uncertainty of the final risk estimate. The deterministic approaches used thus far have not taken uncertainty and variability into account [5, 34-36] and have produced precise outcomes, which could lead to misinterpretation as the final risk estimate could vary significantly due to input variability. Integration of uncertainty and variability in deterministic models would rapidly lead to complicated models, requiring laborious mathematical developments [6].

Moreover, the approach applied in this study is based on distributions that are combined, resulting in quite sophisticated analyses that are intuitive and easily understood. The uncertainty within the risk estimate is a crucial point for decision makers which usually apply some rough “safety margin” around a deterministic estimate to express their feeling of uncertainty. The pros of our approach are rightly to quantify this uncertainty.

Such a method could be applied to other areas where malaria is still a threat or to emerging vector-borne diseases such as the dengue or chikungunya viruses. This method could be used in a controlled way, in order to identify areas and time periods that correspond to the highest risk of transmission, and to focus control measures where and when transmission is elevated. It has been shown recently the impact of anthropogenic changes on potential malaria vectors in the Camargue over the last 60 years [37]. This method could be used also to predict the probable impact of future decisions concerning land use for example, and could be a useful tool for decision makers.

The sensitivity analysis underlined factors responsible for entomological risk uncertainty and variation, of which susceptibility, the survival rate and the human biting rate of *An. hyrcanus* have a major impact in our model. Variability in either of these parameters leads to variability and uncertainty in the risk estimate. In contrast to the susceptibility, survival rate and human

biting rate, variability in the anthropophily range and the length of the trophogonic cycle range has only a minor impact on the risk estimate. The sensitivity analysis thus appears to us to be a tool particularly useful for identification of key factors that are most determinant and that therefore need to be assessed during field surveys.

In the context of emerging vector-borne diseases, emphasis is currently on developing and improving such quantitative risk assessment models integrating variability and uncertainty of biological parameters, which are usually difficult to assess, and especially parameters recorded in the field.

Authors' contributions

NP designed the study, analysed the data and drafted the manuscript. AT analysed the data and carried out spatial analysis. CT participated in data collection and analysis. AL managed the susceptibility trials. DF conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved of the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Geert-Jan van Gemert and Marga van de Vegte-Bolmer for technical expertise in conduct of the susceptibility trials. We thank Grégory L'Ambert, Jean Baptiste Ferré, Charles Jeannin, Claire Duchet and Alexandre Carron from EID-Méditerranée for help in human landing captures and data on *An. hyrcanus* dynamics. We thank Philippe Parola and Marie Pierre Ranjeva from the North hospital of Marseille, Didier Basset from the hospital of Montpellier, Laurence Lachaud from the hospital of Nîmes, Muriel Roumier from the hospital of Arles, Martine Derré from the hospital of Avignon, Anzime Ali Mohamed from the "Hôpital d'Instruction des Armées Laveran" and Frabrice Legros from the CNREPIA for providing data on imported malaria cases.

This work was partially funded by the French Ministry of Agriculture and EU grant GOCE-2003-010284 EDEN. The paper is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDENxxxx (<http://www.eden-fp6project.net/>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and can in no way be taken to reflect the views of the European Union.

References

1. Garrett-Jones C: **Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity.** *Nature* 1964, **204**:1173-1175.
2. Garrett-Jones C, Shidrawi GR: **Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology.** *Bull World Health Organ* 1969, **40**(4):531-545.
3. WHO: **Expert Committee on Malaria, Twelfth Report.** In: *Technical Report Series, N°324.* vol. 324; 1966.
4. Ejov M: **Imported malaria and the risk of malaria reintroduction in Europe.** *CD News, Quaterly Communicable Disease Report, WHO Europe* 2004, **34**:3-7.
5. Macdonald G: **The epidemiology and control of malaria.** London: Oxford University Press; 1957.
6. Vose DJ: **The application of quantitative risk assessment to microbial food safety.** *J Food Prot* 1998, **61**(5):640-648.
7. Vose DJ: **Risk analysis. A quantitative guide.** Chichester, England: John Wiley and Sons, LTD; 2000.
8. Rodhain F, Charmot G: **Evaluation des risques de reprise de transmission du paludisme en France.** *Med Mal Infect* 1982, **12**(4):231-236.
9. Sautet J: **A propos d'une épidémie de paludisme en Camargue.** *Mars Med* 1944, **2**(15):53-64.
10. Balenghien T, Fouque F, Sabatier P, Bicout DJ: **Horse, bird, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France.** *J Med Entomol* 2006, **43**(5):936-946.
11. Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D: **Biology and dynamics of potential malaria vectors in southern France.** *Malar J* 2007, **6**(1):18.
12. Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D: **Population dynamics of pest mosquitoes and potential malaria and West Nile virus vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue, France.** *Med Vet Entomol* 2007:In press.
13. Ponçon N, Toty C, Kengne P, Alten B, Fontenille D: **Molecular evidence for similarity between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae), sympatric potential vectors of malaria in France.** *J Med Entomol* 2008:In press.
14. Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer W, Fontenille D, Rogier C, Parola P: **Autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis ?** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(8):1236-1238.
15. Legros F, Arnaud A, El Minouni B, Danis M: **Paludisme d'importation en France métropolitaine : données épidémiologiques 2001-2004.** *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 2006, **32**:235-236.
16. WHO - CISID-malaria [<http://data.euro.who.int/cisid/malaria>]
17. WHO: **Receptivity to malaria and other parasitic diseases.** In: *Euro Reports and Studies, 15.* Copenhagen; 1979: 108.
18. Dervieux A, Allard P, Naizot T, Auda Y: **La Camargue est-elle un polder? Changement et stabilité dans le delta du Rhône depuis le début du XIXème siècle.** In: *Equilibre et ruptures dans les écosystèmes durant les 20 derniers millénaires en Europe de l'Ouest.* Edited by Richard H, Vignot A, vol. 1. Besançon; 2002: 315-329.
19. Mathevet R, Mouret JC, Mesléard F: **Du mondial au local : originalité et dépendances de la riziculture camarguaise.** *Faire savoirs* 2002, **2**:49-56.

20. Pouillot R, Miconnet N, Afchain AL, Delignette-Muller ML, Beaufort A, Rosso L, Denis JB, Cornu M: **Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in French cold-smoked salmon: I. quantitative exposure assessment.** *Risk analysis* 2007, **27**(3):683-700.
21. Anderson EL, Hattis D: **When and how can you specify a probability distribution when you don't know much. Foundations: A. Uncertainty and variability.** *Risk analysis* 1999, **19**:47-49.
22. Cassin MH, Lammerding AM, Todd EC, Ross W, McColl RS: **Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers.** *Int J Food Microbiol* 1998, **41**(1):21-44.
23. Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré J-B, D.L. S, Roger F, de la Rocque S, Fontenille D *et al*: **Using remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) potential malaria vector in Southern France.** *Int J Health Geogr* 2008:In press.
24. Detinova TS: **Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria.** *Monogr Ser World Health Organ* 1962, **47**:13-191.
25. Jetten TH, Takken W: **Anophelism without malaria in Europe. A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe.** Wageningen, The Netherlands: Landbouwniversiteit Wageningen (Wageningen Agricultural University); 1994.
26. Davidson G: **Estimation of the survival rate of anopheline mosquitoes in nature.** *Nature* 1954, **174**(4434):792-793.
27. Moshkovsky S, Rashina M: **Epidémiologie et parasitologie médicale à l'usage des entomologistes.** Moscow; 1951.
28. Ponnudurai T, Verhave JP, Meuwissen JH: **Mosquito transmission of cultured *Plasmodium falciparum*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982, **76**(2):278-279.
29. Ponnudurai T, Billingsley PF, Rudin W: **Differential infectivity of *Plasmodium* for mosquitoes.** *Parasitol Today* 1988, **4**(11):319-321.
30. Onori E, Nushin MK, Cullen JE, Yakubi GH, Mohammed K, Christal FA: **An epidemiological assessment of the residual effect of DDT on *Anopheles hyrcanus sl* and *An. pulcherrimus* (Theobald) in the North Eastern region of Afghanistan.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975, **69**(2):236-242.
31. Faulde MK, Hoffmann R, Fazilat KM, Hoerauft A: **Malaria reemergence in Northern Afghanistan.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(9):1402-1404.
32. Legros F, Fromage M, Ancelle T, Burg E, Janot C, Maisonneuve P, Danis M: **Enquête nationale de recensement des cas de paludisme d'importation en France métropolitaine pour l'année 1997.** *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 1999, **11**:41-42.
33. Danis M, Legros F, Thellier M, Caumes E: **Données actuelles sur le paludisme en France métropolitaine.** *Med Trop (Mars)* 2002, **62**(3):214-218.
34. Koella JC: **On the use of mathematical models of malaria transmission.** *Acta Trop* 1991, **49**(1):1-25.
35. Martens P, Kovats RS, Nijhof S, de Vries P, Livermore MTJ, Bradley DJ, Cox J, McMichael AJ: **Climate change and future populations at risk of malaria.** *Glob Environ Change* 1999, **9**:S89-S107.
36. Lindsay SW, Thomas CJ: **Global warning and risk of *vivax* malaria in Great Britain.** *Global change and human health* 2001, **2**(1):80-84.
37. Ponçon N, Balenghien T, Toty C, Ferré J, Thomas C, Dervieux A, L'Ambert G, Schaffner F, Bardin O, Fontenille D: **Effects of local anthropogenic changes on**

potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1810-1815.

La définition des zones de transmission potentielle présentée ci dessus répond à un des enjeux de ce travail, c'est-à-dire, aboutir à une prédiction du risque en lien avec l'environnement, ce qui est le cas ici dans la mesure où la définition des zones de transmission s'appuie sur des indices environnementaux générés par images satellites. L'utilisation d'images satellites, couplée à des enquêtes entomologiques locales apparaît donc comme un outil privilégié dans l'identification de zones à risque dans l'ensemble d'une région.

Conclusion générale

1. Synthèse des principaux résultats

Plus de cinquante ans après l'extinction de l'endémie palustre en France continentale, le paludisme est réapparu sur la scène sanitaire, à la fois dans le contexte d'une réflexion globale sur l'impact des changements globaux à venir, et suite à 3 cas de transmission suspectée autochtone diagnostiqués récemment (Armengaud et al. 2006, Doudier et al. 2007). L'objectif de ce travail était d'étudier les risques de ré-émergence du paludisme dans le contexte actuel dans une ancienne zone fortement endémique, la Camargue. Face à cet objectif, les enjeux étaient doubles :

- travailler à l'échelle locale, et non régionale, en prenant en compte la variabilité spatiale du risque afin de hiérarchiser des zones plus ou moins à risque
- essayer de lier l'identification de zones à risque de transmission à des facteurs clés environnementaux pour permettre l'extrapolation à l'ensemble de la région.

Pour répondre à ces enjeux, trois composants (vecteur, parasite et environnement) du cycle du paludisme ont été étudiés.

La première étape de l'étude des vecteurs a consisté à clarifier la position systématique de certains *Anopheles* en Camargue. Ce travail a concerné le groupe *Hyrceanus* pour déterminer si les taxons sympatriques *An. hyrcanus* et *An. pseudopictus*, dont le statut systématique est incertain depuis une centaine d'années, renvoient à une ou deux espèces différentes. L'approche génétique a été utilisée pour ce travail. Quatre marqueurs moléculaires ribosomiaux et mitochondriaux (ITS2, d3, CO1, CO2) ont été étudiés sur des spécimens de France et de Turquie appartenant aux 2 taxons, ainsi qu'à des formes morphologiques intermédiaires. Les analyses ont révélé une grande similarité génétique entre les deux taxons, suggérant fortement que *An. hyrcanus* et *An. pseudopictus* renvoient à une seule et même espèce exprimant une variabilité morphologique.

La biologie et la dynamique des *Anopheles* ont ensuite été étudiées en vue d'identifier les espèces susceptibles de jouer un rôle dans la transmission. Des études de terrain, complétées par des analyses de laboratoire ont été menées en Camargue. Plusieurs suivis longitudinaux ont été réalisés, à l'échelle régionale et à l'échelle locale, en utilisant des pièges lumineux+CO₂, des captures sur hommes, des captures de moustiques endophiles au repos, des pièges à appât cheval et des prospections larvaires. Les résultats de ces suivis ont

également été confrontés aux données bibliographiques acquises en Camargue par des équipes collaboratrices. Face à la quasi disparition d'*An. atroparvus*, vecteur historique majeur, au comportement trophique zoophilique d'*An. melanoon*, et à la rareté d'*An. plumbeus* et *An. algeriensis* (sauf proliférations potentielles ponctuelles), *An. hyrcanus* est apparu comme le seul *Culicidae* pouvant jouer un rôle dans la transmission des *Plasmodium* en Camargue, en raison de son abondance et de son anthropophilie marquée. En complément de ces études, l'analyse spatiale des données couplée à l'utilisation d'images satellites ont permis de définir la répartition spatiale d'*An. hyrcanus* en Camargue - répartition déduite d'indicateurs environnementaux liés aux rizières et générés par images satellites.

Parallèlement à ces études destinées à évaluer la capacité vectorielle des vecteurs potentiels, la compétence des *Anopheles* de Camargue a été étudiée en réalisant des expériences d'infections expérimentales. La compétence d'*An. hyrcanus*, *An. atroparvus* et *An. melanoon* a été testée lors de protocoles utilisant des souches de *P. falciparum* en culture ou sauvages (prélevés directement sur des porteurs de gamétocytes). Les résultats ont démontré une compétence vectorielle faible pour *An. atroparvus* et *An. melanoon* tandis qu'aucun *An. hyrcanus* disséqué n'a présenté d'oocystes – la discussion de ces résultats ayant plutôt orienté vers une compétence vectorielle très faible d'*An. hyrcanus* plutôt que nulle.

Au final, bien qu'ayant une compétence vectorielle très faible, la capacité vectorielle élevée d'*An. hyrcanus* le désigne comme le vecteur potentiel principal actuellement en Camargue, tandis que le rôle vecteur potentiel des 4 autres espèces semble mineur.

Cependant, l'étude bibliographique du volet historique n'accorde aucun rôle vecteur à *An. hyrcanus* en Camargue en période endémique. Pour comprendre ce changement, l'analyse rétrospective de l'évolution des populations d'*An. hyrcanus* a été menée en lien avec l'évolution du milieu, en ciblant plus particulièrement la riziculture fortement dépendante du contexte historique et politique, des contraintes environnementales, du progrès technique et des facteurs sociaux. Ce travail a mis en évidence l'impact rapide et puissant de ces facteurs sur l'abondance des populations d'*An. hyrcanus* et souligne l'importance des changements d'origine anthropique dans le contexte actuel de resurgence des maladies vectorielles.

L'étude du deuxième composant du cycle vectoriel (le parasite) s'est appuyée sur l'analyse des cas de paludisme importé. En effet, la transmission endémique s'étant arrêtée dans les années 1950 en Camargue (à l'exception de 2 cas de transmission suspectée autochtone dans le sud est de la France), la présence actuelle des *Plasmodium* est reliée aux cas de paludisme importé dont l'étude a permis d'identifier les caractéristiques. Bien que les stades parasitaires circulant chez l'homme lors du diagnostic du paludisme importé ne correspondent pas, dans la majorité

des cas, aux stades transmissibles aux *Anopheles* (les gamétocytes), les cas de paludisme importés ont été utilisés, en première approximation, comme approche de la présence des gamétocytes. Ce travail a révélé que, bien qu'un nombre important de cas de paludisme importé est diagnostiqué dans les hôpitaux régionaux (Montpellier, Nîmes, Avignon, Arles et Marseille), un nombre très faible concernait des personnes habitant en Camargue (la majorité se rapportent à des habitants vivant à Montpellier, Nîmes ou Marseille).

Enfin, dans un cadre de synthèse des données, le risque de ré-émergence du paludisme en Camargue a été analysé en se basant sur la spatialisation du risque entomologique (combinaison de la capacité et de la compétence vectorielles) estimé à l'aide d'une approche probabiliste – approche innovante dans le domaine des maladies vectorielles. Cette approche est fondée sur l'utilisation de distributions de probabilité pour estimer les inputs et intégrer leur variabilité et leur incertitude. Les distributions ont ensuite été combinées, selon le modèle utilisé (capacité vectorielle*compétence vectorielle), afin de calculer le risque entomologique final et d'estimer sa variabilité. La combinaison de la capacité et de la compétence vectorielle, calculées chacune à l'aide de cette démarche a permis d'identifier et de hiérarchiser des zones de transmission potentielle - l'identification de ces zones étant basée sur l'analyse d'images satellites grâce au lien établi entre la distribution spatiale des *Anopheles* et des indicateurs environnementaux. Néanmoins, le très faible nombre de cas de paludisme importé en Camargue éloigne tout risque de ré-émergence du paludisme.

Ce travail, basé sur une approche multidisciplinaire, a été l'occasion de mobiliser différentes disciplines (la biologie, l'épidémiologie et l'écologie) afin d'acquérir les données nécessaires à l'estimation du risque de transmission et de ré-émergence du paludisme à travers un modèle dont l'originalité repose sur une approche probabilistique, qui n'avait pas encore été appliquée aux maladies vectorielles jusqu'à présent.

Bien que la thématique du paludisme mérite d'être considérée dans le contexte actuel, elle ne constitue cependant pas un problème de santé publique. Ce travail ne constitue donc pas tant un outil de santé publique destiné à gérer le risque palustre qu'un modèle applicable ensuite à d'autres régions, comme la Corse, où les interrogations sur le risque palustre sont plus fortes, ou à d'autres maladies comme la fièvre West Nile, la fièvre de la vallée du Rift ou le chikungunya qui occupe régulièrement l'actualité sanitaire.

2. Perspectives

Ce travail de thèse a souligné le lien entre les zones de transmission potentielle et l'environnement, puisqu'elles sont identifiées à l'aide d'indicateurs environnementaux. Dans ce cadre, le contexte de changement global pousse à s'interroger sur l'évolution de ces zones dans le futur. De plus, ce travail a analysé trois des composants du cycle vectoriel du paludisme (*Anopheles*, *Plasmodium* et environnement) : à l'avenir, il serait pertinent d'intégrer le facteur humain dans cette analyse.

2.1. Le risque de transmission des *Plasmodium* en Camargue dans un contexte de changement global : un futur à explorer

Ce travail de thèse a permis de souligner, au cours d'une étude rétrospective, l'impact des changements environnementaux, d'origine anthropique et s'inscrivant dans un contexte historique, politique, économique, technique et sociologique, sur le risque de transmission des *Plasmodium*, en modifiant l'abondance des populations de vecteurs. Il est fortement probable que le milieu camarguais continue à évoluer sous l'influence des facteurs cités ci-dessus. Dans ce cadre, il est pertinent de s'interroger sur les risques de ré-émergence du paludisme en Camargue dans un contexte de changement global, c'est-à-dire en appréciant l'évolution du risque en fonction de l'évolution plausible de la Camargue.

Trois scénarios d'évolution du milieu camarguais pourraient être envisagés, prenant en compte le réchauffement climatique, l'occupation du sol et le contexte économique lié à la riziculture, et l'impact de ces trois facteurs sur les surfaces rizicoles (qui interviennent dans l'indicateur environnemental lié au risque de transmission du paludisme). La simulation de ces trois scénarios aboutirait à la re-définition des cartes d'occupation du sol en Camargue.

Tableau 15 : Scénarios d'évolution plausible de la Camargue

	Occupation du sol	Climat	Contexte économique de la riziculture	Surfaces rizicoles
25 ans	Globalement conservée à l'exception du développement de l'urbanisation à certains endroits	Augmentation des températures (0,5°C) et du niveau de la mer	Favorable	Disparition dans le sud ouest
50 ans : 1^{er} scénario	Globalement conservée à l'exception du développement de l'urbanisation à certains endroits	Augmentation des températures (1°C) et du niveau de la mer	Favorable	Disparition dans le sud ouest et est, développement dans le nord
50 ans : 2^{ème} scénario	Développement de marais « naturels », de réserves, de zones de chasse ; développement de l'urbanisation à certains endroits	Augmentation des températures (1°C) et du niveau de la mer	Défavorable (contraintes réglementaires environnementales, pression touristique)	Disparition dans le sud ouest et est ; diminution globale des surfaces

Le modèle développé dans cette thèse pour la période actuelle pourrait être appliqué à ces trois scénarios pour évaluer l'évolution des zones de transmission potentielle. La première ébauche de ce travail, présentée ci-dessous, laisse apparaître deux éléments : i) un déplacement des zones de transmission potentielle consécutif aux disparitions/développement des surfaces rizicoles, ii) l'augmentation de l'intensité de la transmission potentielle dans les endroits où les périmètres rizicoles n'évoluent pas. A l'avenir, il serait intéressant d'approfondir ces études et d'évaluer l'impact du déplacement des surfaces rizicoles et du développement de l'urbanisation, notamment dans le cadre du premier scénario à 50 ans qui laisse apparaître une grande zone de transmission potentielle au nord de la Camargue, zone densément peuplée.

Figure 8 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle de *P. falciparum* (août, période actuelle)

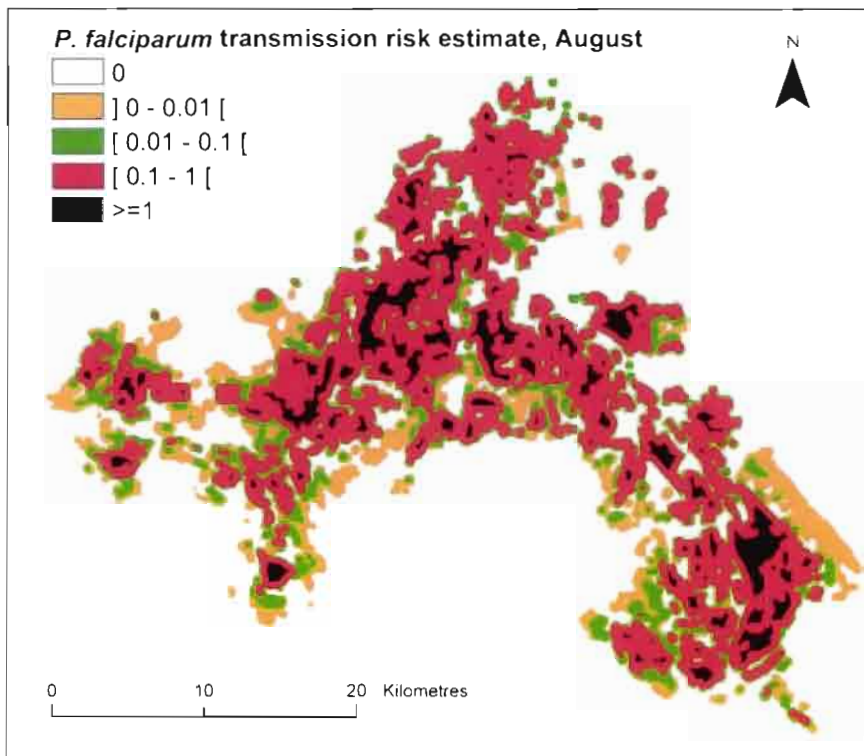


Figure 9 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle de *P. falciparum* (août, scénario à 25 ans)

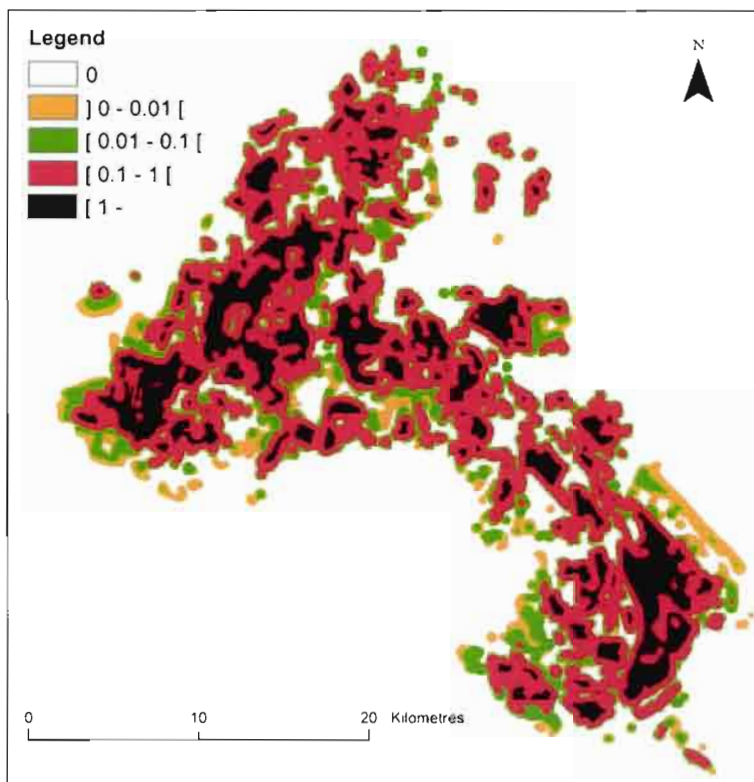


Figure 10 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle de *P. falciparum* (août, scénario 1 à 50 ans)

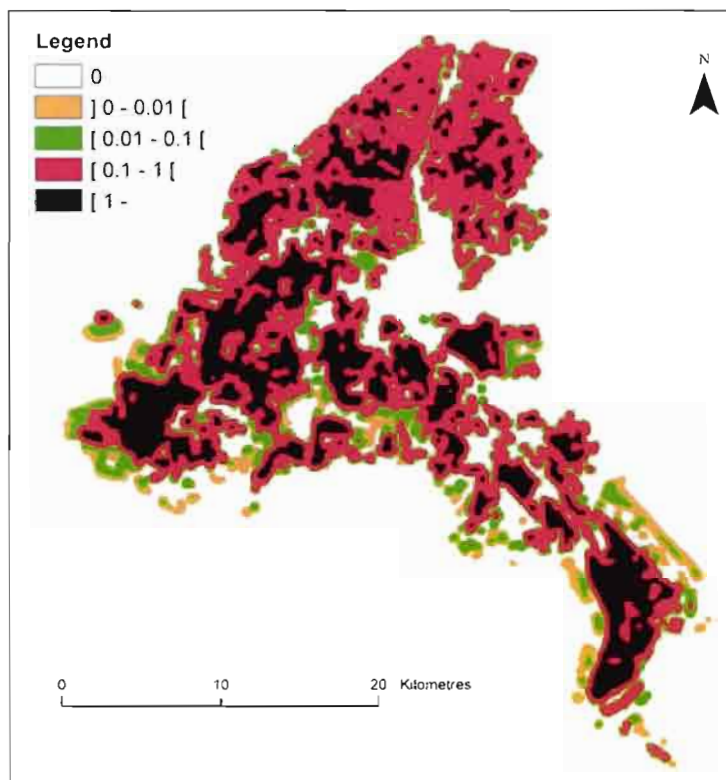
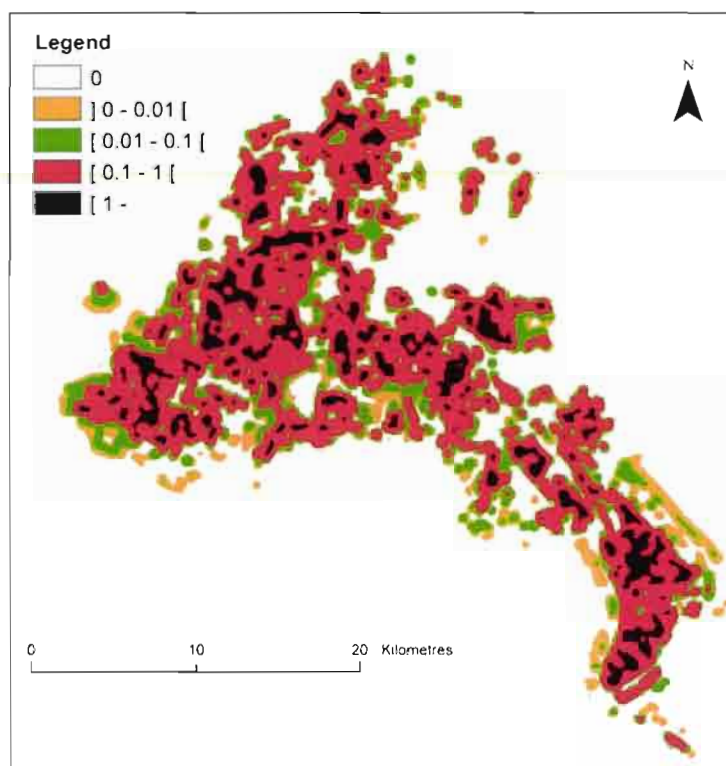


Figure 11 : Distribution spatiale du risque de transmission potentielle de *P. falciparum* (août, scénario 2 à 50 ans)



2.2. Intégration du facteur humain

Le travail présenté dans cette thèse a permis d'identifier des zones à risque de transmission des *Plasmodium* en se basant sur le risque entomologique (capacité et compétence vectorielles). Il n'évalue pas pour autant le risque réel de transmission dans la mesure où il n'intègre pas le facteur humain dans le contact homme-vecteur. Il sera donc nécessaire dans un second temps de confronter le risque entomologique avec le facteur humain, en prenant en compte à la fois la présence humaine et l'exposition aux piqûres d'*Anopheles*, afin d'affiner la définition des zones à risque. En résumé, les zones de transmission potentielle correspondent-elles à des zones habitées ? Dans ces zones, les habitants sont-ils effectivement piqués par les *Anopheles* présents ?

Les données relatives au facteur humain ont déjà été acquises par un travail de collaboration avec des équipes de sciences sociales et de géographie. La caractérisation de la population humaine et de ses activités en Camargue a permis d'identifier trois groupes de personnes potentiellement exposées aux piqûres d'*Anopheles* en Camargue, parmi lesquels les résidents (permanents ou touristiques) sont les plus nombreux et constituent le groupe humain étudié (Langewiesche et al. 2006, rapport disponible sur demande à l'auteur). L'exposition des résidents aux piqûres des *Anopheles* a ensuite été étudiée, laissant apparaître, en première approche, une différence d'exposition entre les résidents permanents et les touristes. Puis, la présence humaine a été cartographiée en Camargue, en caractérisant sa nature et sa densité (cf. carte ci-dessous) (Torres 2007, rapport disponible sur demande à l'auteur).

Figure 12 : Cartographie de la présence humaine en Camargue

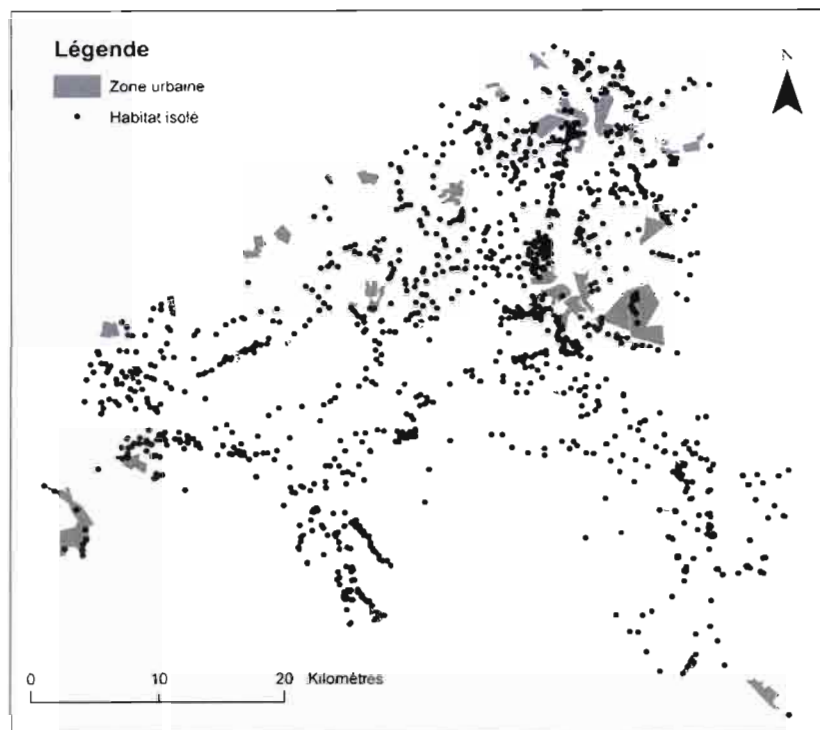
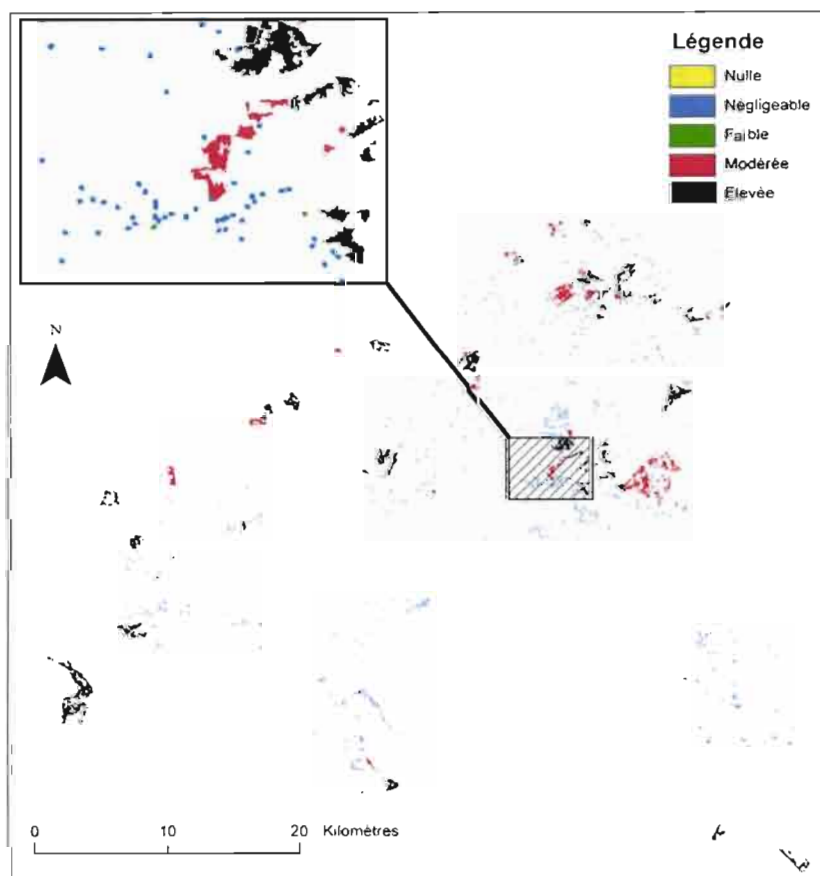


Figure 13 : Densité de la présence humaine en Camargue



Dans une première étape, l'évaluation du risque entomologique pourrait être croisée avec l'exposition des résidents (exposition pouvant être évaluée de façon relative, en considérant que les résidents permanents sont les moins exposés, les touristes logeant en camping les plus exposés et les touristes logeant en hôtel ayant une exposition intermédiaire. cf carte ci dessous).

Figure 14 : Exposition des résidents aux piqûres d'*Anopheles*

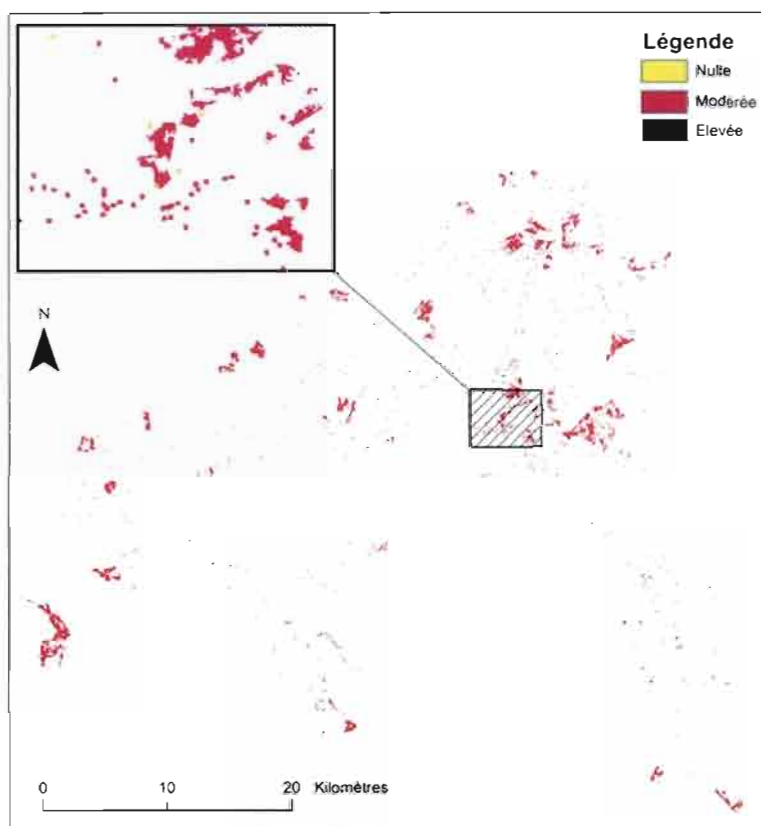
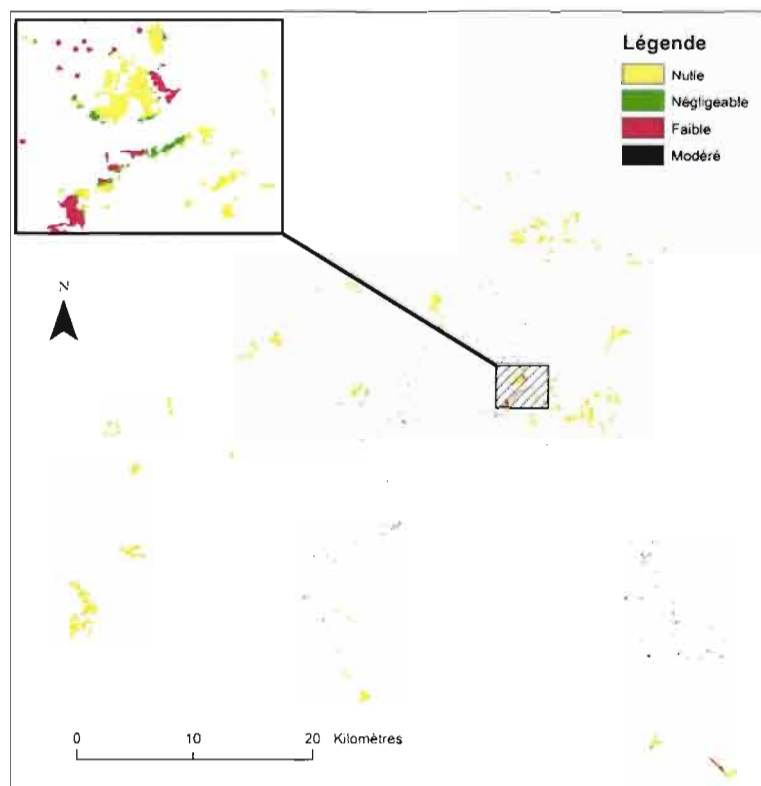


Figure 15 : Identification des « hot spots » à risque de transmission

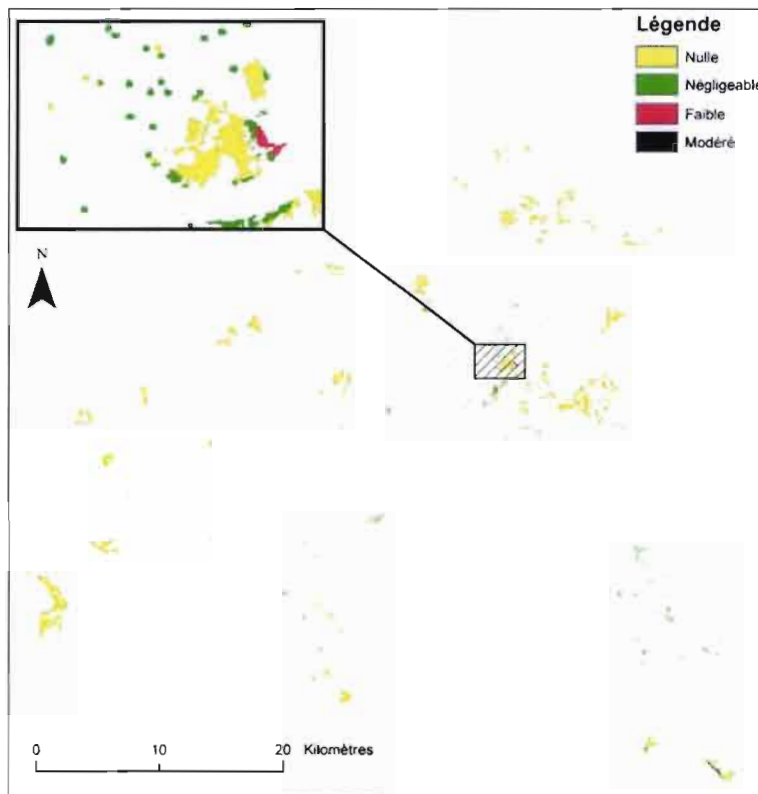


Cette étape permettrait, i) d'une part d'identifier des « hot spots » à risque de transmission en limitant l'identification aux zones présentant effectivement des personnes susceptibles d'être piquées par des *Anopheles* (si ces derniers sont présents), ii) d'autre part de hiérarchiser ces « hot spots » en intégrant des différences d'exposition aux piqûres selon la catégorie de résidents. Une analyse plus complète permettrait d'affiner les facteurs relatifs à l'exposition, en considérant notamment l'impact de la démoustication sur les comportements humains.

Après avoir identifié des « hot spots » en Camargue, il paraîtrait pertinent d'évaluer l'impact potentiel du risque de transmission en s'intéressant au nombre de personnes exposées, et par conséquent au nombre potentiel de personnes infectées dans l'hypothèse (très théorique pour la France) d'une reprise de la transmission des *Plasmodium*. Le nombre de personnes potentiellement infectées en cas de reprise de la transmission dépend du risque entomologique mais également du nombre de personnes présentes. Un risque élevé aura un impact potentiel important si il touche une zone densément peuplée. A l'inverse, l'impact potentiel sera moindre (en terme de nombre de personnes infectées) dans la mesure où ce même risque élevé touche une zone faiblement peuplée. Bien entendu, ce raisonnement n'est que purement théorique car il suppose la reprise de la transmission des *Plasmodium* et l'absence

d'intervention de l'homme (traitement des cas, démostication, ...). Dans cet objectif, les « hot spots » pourraient être croisés avec la cartographie de la densité de la population humaine en Camargue (densité reclassée en indice d'abondance) (cf. carte ci-dessous).

Figure 16 : impact potentiel du risque de transmission dans l'hypothèse d'une reprise de la transmission



Une analyse plus complète permettrait d'aboutir à un travail dont l'originalité résiderait, *in fine*, dans la prise en compte du facteur humain dans l'estimation du risque de transmission des *Plasmodium* et de son impact – tout l'enjeu étant d'intégrer l'étude du facteur humain de manière à identifier, à nouveau, des indicateurs environnementaux, dérivés d'images satellites, pour assurer la généralisation de l'étude à l'ensemble de la région.

Bibliographie

- Anderson, R. M. & R. M. May. 1991.** Infectious diseases of humans. Dynamics and control. Oxford University Press, New York.
- Armengaud, A., F. Legros, I. Quatresous, H. Barre, P. Valayer, Y. Fanton, E. D'Ortenzio & F. Schaffner. 2006.** A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. Euro. Surveill. 11: E061116 3.
- Astros. 1919.** La défense contre le paludisme dans les Bouches-du-Rhône.
- Atger, E. 1931.** Le paludisme dans la région languedocienne autrefois et aujourd'hui, pp. 55. Université de Montpellier, faculté de médecine, Montpellier.
- Baldari, M., A. Tamburro, G. Sabatinelli, R. Romi, C. Severini, G. Cuccagna, G. Fiorilli, M. P. Allegri, C. Buriani & M. Toti. 1998.** Malaria in Maremma, Italy. Lancet 351: 1246-1247.
- Balenghien, T., F. Fouque, P. Sabatier & D. J. Bicout. 2006.** Horse, bird, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. J. Med. Entomol. 43: 936-46.
- Barré, H. 2007.** Etude des risques de réintroduction du paludisme en Corse, pp. 150. Université Pascal Paoli de Corse, Corte.
- Baton, L. A. & L. C. Ranford-Cartwright. 2005.** Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. Trends Parasitol. 21: 573-80.
- Beerntsen, B. T., A. A. James & B. M. Christensen. 2000.** Genetics of mosquito vector competence. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 115-37.
- Bibikova, V. A., N. G. Dashkova, G. D. Sulaimanov, S. P. Rasnitsyn & N. A. Tiburskaia. 1977.** [Transmission of the Brazilian strain of tertian malaria by *Anopheles maculipennis atroparvus* mosquitoes]. Med. Parazitol. 46: 63-7.
- Blacklock, B. & H. F. Carter. 1920a.** Further experiments with *Anopheles plumbeus*, Stephens; its infection with *P. falciparum* in England, also notes on the apparatus and technique employed. Ann. Trop. Med. Parasitol. 14: 275-283.
- Blacklock, B. & H. F. Carter. 1920b.** The experimental infection in England of *Anopheles plumbeus*, Stephens, and *Anopheles bifurcatus* L., with *P. vivax*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 13: 413-420.
- Bourée, P. 1981.** Le paludisme en France hier et aujourd'hui. La Vie Médicale 15: 1053-1062.
- Bredy, M. 2002.** Histoire du paludisme dans la France Méditerranéenne., pp. 134. Université de Montpellier 1. U.F.R. de médecine, Montpellier.
- Bruce-Chwatt, L. J. & J. De Zulueta. 1980.** The rise and fall of malaria in Europe. Oxford University Press, Oxford.
- Buffard, B. & T. H. Duong. 1980.** Le paludisme autochtone : situation actuelle. Revue de Médecine de Tours 14: 1180-1182.
- Camargue, P. N. R. 2001.** La Camargue: le delta du Rhône de ses origines à 1950. Courrier du Parc.
- Carrère, L. 1918.** Etudes sur quelques cas de paludisme autochtone dans la région de Montpellier, pp. 51. Université de Montpellier, Faculté de médecine, Montpellier.
- Cassaigne, R., M. Bruaire & N. Léger. 1980.** Paludisme autochtone - Cent ans après Laveran : le paludisme à Paris. Cah. ORSTOM, sér. Entomol. méd. et Parasitol. 18: 177-180.
- Castro, J. & D. Millet. 2005.** Structural adjustment programs and malaria: any link?, In: Genetically modified mosquitoes for malaria control. Landes Biosciences, Georgetown, TX, USA.
- Chavanne, D., J. P. Renard & P. Groussin. 1979.** Paludisme autochtone. Nouv. Presse Med. 8: 1352.

- Coatney, G. R., W. E. Collins, M. W. Warren & P. G. Contacos. 1971. The primate malaras. US Government Printing Office, Washington.
- Cohuet, A., M. A. Osta, I. Morlais, P. H. Awono-Ambene, K. Michel, F. Simard, G. K. Christophides, D. Fontenille & F. C. Kafatos. 2006. *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. EMBO Rep. 7: 1285-9.
- Collins, F. H., R. K. Sakai, K. D. Vernick, S. Paskewitz, D. C. Seeley, L. H. Miller, W. E. Collins, C. C. Campbell & R. W. Gwadz. 1986. Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. Science 234: 607-10.
- Combes, C. 1995. Interactions durables. Ecologie et évolution du parasitisme. Masson, Paris.
- Cousserans, J. & A. Salieres. 1976. Le moustique indicateur de la pression anthropique, pp. 12, Conseil scientifique et technique. EID méditerranée, Montpellier.
- Cousserans, J., A. Salieres & R. Tesson. 1974. Note sur la présence d'*Anopheles maculipennis*, Hackett et Missiroli, 1935, aux environs de Montpellier. Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie médicale et Parasitologie 12: 49-50.
- Cristau, P., G. Alandry, R. Melin, P. Larroques & J.-L. Lesbordes. 1978. Paludisme à *Plasmodium vivax* : rôle probable d'une contamination intra-hospitalière. Nouv. Presse Med. 7: 3674.
- Crosnier, R., F. Merle & L. Tabusse. 1948. Paludisme autochtone. Bull. Soc. Pathol. Exot. 41: 681-690.
- Cuadros, J., M. J. Calvente, A. Benito, J. Arevalo, M. A. Calero, J. Segura & J. M. Rubio. 2002. *Plasmodium ovale* malaria acquired in central Spain. Emerg. Infect. Dis. 8: 1506-8.
- Danis, M., J. Mouchet, T. Giacomini, P. Guillet, F. Legros & M. Belkaïd. 1996. Paludisme autochtone et introduit en Europe. Med. Mal. Infect. 26: 393-396.
- Daskova, N. G. & S. P. Rasnitsyn. 1982. Review of data on susceptibility of mosquitoes in the USSR to imported strains of malaria parasites. Bull. World Health Organ. 60: 893-897.
- de Zulueta, J., C. D. Ramsdale & M. Coluzzi. 1975. Receptivity to malaria in Europe. Bull. World Health Organ. 52: 109-111.
- Dervieux, A., P. Allard, T. Naizot & Y. Auda. 2002. La Camargue est-elle un polder? Changement et stabilité dans le delta du Rhône depuis le début du XIXème siècle, pp. 315-329. In H. Richard and A. Vignot (eds.), Equilibre et ruptures dans les écosystèmes durant les 20 derniers millénaires en Europe de l'Ouest., Besançon.
- Doby, J. M. 1992. [Autochthonous malaria in Brittany]. Bull. Soc. Pathol. Exot. 85: 76-88.
- Doudier, B., H. Bogreau, A. De Vries, N. Ponçon, W. Stauffer, D. Fontenille, C. Rogier & P. Parola. 2007. Autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis ? Emerg. Infect. Dis. 13: 1236-1238.
- Dzhavadov, R. B., G. K. Trofimov, G. N. Kurochenko, N. G. Dashkova & L. P. Borisova. 1978. [Susceptibility of *Anopheles maculipennis sacharovi* and *Anopheles maculipennis subalpinus* mosquitoes to infection with the causative agents of tropical malaria brought in from Africa]. Med. Parazitol. 47: 84-7.
- Eling, W., G. J. v. Gemert, O. Akinpelu, J. Curtis, C. F. Curtis & G. J. van Gemert. 2003. Production of *Plasmodium falciparum* sporozoites by *Anopheles plumbeus*. European Mosquito Bulletin: 12-13.
- Fourrier, A., R. Becquet, A. Vernes, J. Leblois, Y. Mouton & C. Libersa. 1976. [I. Malaria in northern France]. Lille Medical 21: 447-51.
- Franchesquin, N. & A. Dervieux. 2004. Modélisation de la gestion hydrologique en Camargue : une approche multi-agents., PNR24, Actes du colloque final de Toulouse.
- Garnham, P. C. C. 1966. malaria parasites and other *Haemosporidia*. Blackwell Scientific, Oxford.

- Garrett-Jones, C. & G. R. Shidrawi. 1969.** Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. Bull. World Health Organ. 40: 531-45.
- Gayte, M. J. & R. M. Nicoli. 1969.** [Malaria in western Provence. Spaciotemporal outline of a parasitic disease]. Biol. Med. (Paris) 58: 1-31.
- Gentilini, M. & M. Danis. 1981.** Le paludisme autochtone [Indigenous malaria]. Med. Mal. Infect. 11: 356-362.
- Gentilini, M., M. Danis, J. Y. Dallot, D. Richard-Lenoble & H. Felix. 1978.** [Reappearance of autochthonous malaria]. Annales de medecine interne 129: 405-10.
- Giacomini, T., J. Mouchet, P. Mathieu & J. C. Petithory. 1995.** [Study of 6 cases of malaria acquired near Roissy-Charles-de-Gaulle in 1994. Necessary prevention measures in airports]. Bull. Acad. Natl. Med. 179: 335-51; discussion 351-3.
- Gilles, H. M. & D. A. Warrell. 1993.** Bruce-Chwatt's essential malariology. Edward Arnold, London.
- Gindre, D., P. Heurteaux & R. Vianet. 1999.** Les infrastructures d'irrigation et de drainage sur le territoire du Parc naturel régional de Camargue. Courrier du Parc 48/49: 44-60.
- Grassi, B., A. Bignami & G. Bastianelli. 1899.** Resoconto degli studi fatti sulla malaria durante il mese di gennaio. R. C. Accad. Lincei 8: 100-104.
- Greenwood, B. & T. Mutabingwa. 2002.** Malaria in 2002. Nature 415: 670-2.
- Greenwood, B. M. 1997.** What's new in malaria control? Ann. Trop. Med. Parasitol. 91: 523-31.
- Greenwood, B. M., K. Bojang, C. J. Whitty & G. A. Targett. 2005.** Malaria. Lancet 365: 1487-98.
- Guilbert, L. 1868.** Résumé d'une étude sur la malaria à Périgueux et dans ses environs.
- Guillaumeau, P. J., L. Drouet, Y. Garin, A. Ribrioux, A. Warnet, D. Malbec, M. Larivière & J. Lubetzki. 1980.** Paludisme autochtone à *Plasmodium falciparum*. Une nouvelle observation parisienne. Nouv. Presse Med. 9.
- Guillet, P. 1996.** Paludisme, lutte antivectorielle et démoustication en Corse., pp. 28. ORSTOM, Montpellier.
- Hackett, L. W. 1934.** The present status of our knowledge of the sub species of *Anopheles maculipennis*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 28: 109-140.
- Harant, H. & J. A. Rioux. 1953.** [Autochthonous malaria in Languedoc and Roussillon departments; history and regression.]. Rev. Pathol. Gen. Physiol. Clin. 53: 1240-51.
- Harant, H. & J. A. Rioux. 1964.** [Current status of some diseases imported from warm countries into Languedoc-Roussillon.]. Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales 57: 867-81.
- Harbach, R. E. 2004.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. Bull. Entomol. Res. 94: 537-53.
- Harvier, P. & R. Claisse. 1940.** Paludisme autochtone à *P. falciparum* contracté à Anthony. Bulletins et memoires de la Societe medicale des hopitaux de Paris.: 722-726.
- Horsfall, W. R. 1955.** Mosquitpes: their bionomics and relation to disease. The Ronald Press company.
- Jarry, D. 1953.** Paludisme autochtone en Languedoc. Quels enseignements peut-on tirer de la prophylaxie anti-paludique dans le monde?, Montpellier.
- Jetten, T. H. & W. Takken. 1994.** Anophelism without malaria in Europe. A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Landbouwniversiteit Wageningen (Wageningen Agricultural University), Wageningen, The Netherlands.
- Jetten, T. H., W. J. Martens & W. Takken. 1996.** Model stimulations to estimate malaria risk under climate change. J. Med. Entomol. 33: 361-71.

- Kampen, H., J. Proft, S. Etti, E. Maltezos, M. Pagonaki, W. A. Maier & H. M. Seitz. 2003.** Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: entomological aspects. *Parasitol. Res.* 89: 252-258.
- Karch, S. 1996.** Breeding of *Anopheles plumbeus* in tires in France. *J. Vector Ecol.* 21: 201.
- Kasap, H. 1990.** Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42: 111-7.
- Krüger, A., A. Rech, X. Z. Su & E. Tannich. 2001.** Two cases of autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous *Anopheles plumbeus*. *Trop. Med. Int. Health* 6: 983-985.
- Laigret, J. 1953.** [Remarks of a general nature on the decline of malaria in western Europe.]. *Rev. Pathol. Gen. Physiol. Clin.* 53: 1308-12.
- Legros, F., A. Arnaud, B. El Minouni & M. Danis. 2006a.** Paludisme d'importation en France métropolitaine : données épidémiologiques 2001-2004. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 32: 235-236.
- Legros, F., I. Vaugier, B. L'Mimouni, A. Arnaud & M. Danis. 2006b.** Paludisme d'importation en France métropolitaine : données 2004. CNREPIA.
- Leproux, P. 1952.** Le paludisme autochtone en Charente-Maritime, pp. 58. Université de Bordeaux - faculté de médecine et de pharmacie.
- Lindsay, S. W. & C. J. Thomas. 2001.** Global warning and risk of *vivax* malaria in Great Britain. *Global change and human health* 2: 80-84.
- Logan. 1953.** The Sardinian project, John Hopkins, Baltimore.
- Macdonald, G. 1957.** The epidemiology and control of malaria. Oxford University Press, London.
- Mandoul, H. 1907.** La Malaria en France. La science au XX^e siècle: 359-360.
- Marchant, P., W. Eling, G. J. van Gemert, C. J. Leake & C. F. Curtis. 1998.** Could British mosquitoes transmit *falciparum* malaria? *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 14: 344-345.
- Marty, P., Y. Le Fichoux, M. A. Izri, M. Mora, B. Mathieu & P. Vessaud. 1992.** Autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in southern France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 478.
- Miara, M. 1938.** Le paludisme dans le Bas-Languedoc, pp. 62. Université de Montpellier, Faculté de Médecine, Montpellier.
- Molineaux, L. 1988.** The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. In W. H. Wernsdorfer and I. Sir McGregor (eds.), *Malaria: principles and practice of malariology*. Churchill Livingstone, London.
- Morin, C., P. Dubois, M. Demas, K. Lahsinat, M. Hayet & A. Vivier. 1980.** [Indigenous malaria in children]. *Nouv. Presse Med.* 9: 1241-2.
- Mouchet, J. 2000.** Airport malaria : a rare disease still poorly understood. *Euro. Surveill.* 5: 75-76.
- Mouchet, J., P. Carnevale, M. Coosemans, J. Julvez, S. Manguin, D. Richard-Lenoble & J. Sircoulon. 2004.** Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eurotext, Montrouge, France.
- Niclot. 1910.** Un chapitre de l'histoire du paludisme. Bordeaux : sol marécageux ; population palustre ; faune anophélienne. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 3: 663-670.
- Pasticier, A., D. Mechali, G. Saimot, J. P. Coulaud & M. Payet. 1974.** [Endemic malaria. Diagnostic problems]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 67: 57-64.
- Payré, H. 1922.** Le paludisme en Roussillon, pp. 43. Université de Montpellier, Faculté de médecine, Montpellier.

- Pichot, J. & D. Deruaz. 1981.** Les *Anopheles* du complexe Maculipennis dans la région lyonnaise. Lyon Médical 245: 117-121.
- Ponçon, N., C. Toty, G. L'Ambert, G. Le Goff, C. Brengues, F. Schaffner & D. Fontenille. 2007.** Biology and dynamics of potential malaria vectors in southern France. Malar. J. 6: 18.
- Ponnudurai, T., J. P. Verhave & J. H. Meuwissen. 1982a.** Mosquito transmission of cultured *Plasmodium falciparum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 278-9.
- Ponnudurai, T., J. H. Meuwissen, A. D. Leeuwenberg, J. P. Verhave & A. H. Lensen. 1982b.** The production of mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg 76: 242-50.
- Ponnudurai, T., A. H. W. Lensen, G. J. van Gemert, M. P. E. Bensink, M. Bolmer & J. H. E. T. Meuwissen. 1988.** Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. Parasitology 98: 165-173.
- Pringault, E. 1918.** Les Culicidés de la région marseillaise. Mars. Med. 55: 912-916.
- Pringault, E. 1921.** Paludisme et anophélisme dans les Bouches-du-Rhône. Mars. Med. 6: 241-247.
- Rageau, J. & J. Mouchet. 1967.** Les arthropodes hématophages de Camargue. Cah. ORSTOM, sér. Entomol. méd. et Parasitol. 5: 263-281.
- Ramsdale, C. D. & M. Coluzzi. 1975.** Studies on the infectivity of tropical African strains of *Plasmodium falciparum* to some southern European vectors of malaria. Parassitologia 17: 39-48.
- Ramsdale, C. D. & K. Snow. 2000.** Distribution of the genus *Anopheles* in Europe. European Mosquito Bulletin 7: 1-28.
- Rathery, F., D. Derot, L.-C. Brumpt & F. Siguier. 1940.** Deux cas de fièvre tierce bénigne. Etude épidémiologique d'un foyer de paludisme autochtone à la Croix de Berny. Bulletins et mémoires de la Société médicale des hôpitaux de Paris.: 780-787.
- Reiter, P. 2001.** Climate change and mosquito-borne disease. Environ. Health Perspect. 109 Suppl 1: 141-61.
- Reiter, P., A. J. Thomas, P. M. Atkinson, S. I. Hay, S. E. Randolph, D. J. Rogers, G. D. Shanks, R. W. Snow & A. Spielman. 2004.** Global warming and malaria : a call for accuracy. Lancet Infect. Dis. 4: 323-324.
- Ribeiro, H., J. L. Batista, H. C. Ramos, C. Alves Pires, J. L. Champalimaud, J. M. Costa, C. Araujo, K. Mansinho & M. C. Pina. 1989.** An attempt to infect *Anopheles atroparvus* from Portugal with African *Plasmodium falciparum*. Revista portuguesa de doenças infecciosas 12: 81-82.
- Rioux, J. A. 1958.** Les Culicidés du "Midi" méditerranéen. Editions Paul Lechevalier, Paris, France.
- Robert, J. 1940.** Le paludisme autochtone de la région parisienne, pp. 35. Faculté de médecine de Paris.
- Robert, V. & C. Boudin. 2003.** [Biology of man-mosquito *Plasmodium* transmission]. Bull. Soc. Pathol. Exot. 96: 6-20.
- Rodhain, F. 1985.** Transmission vectorielle : aspects actuels des recherches et perspectives. Bull. Inst. Pasteur 83: 221-243.
- Rodhain, F. 2003.** Emergences de maladies à transmission vectorielle. Epidémiologie et santé animale 43: 33-49.
- Rodhain, F. & G. Charmot. 1982.** Evaluation des risques de reprise de transmission du paludisme en France. Med. Mal. Infect. 12: 231-236.
- Rogers, D. J. & S. E. Randolph. 2000.** The global spread of malaria in a future, warmer world. Science 289: 1763-6.

- Roman, E. 1963.** [Biology of Adults of *Anopheles Maculipennis Messeae* in Dombes]. Bull. Soc. Pathol. Exot. 56: 512-9.
- Roman, E. 1971.** Resting behaviour of the adults of the mosquito *Anopheles maculipennis messeae* in Dombes, during spring and summer and during hibernation. Cahiers des Naturalistes 27: 73-85.
- Romi, R., G. Sabatinelli & G. Majori. 2001.** Could malaria reappear in Italy? Emerg. Infect. Dis. 7: 915-9.
- Roubaud, E. 1918.** Recherches sur la transmission du paludisme par les anophèles français de régions non palustres (Yonne et région parisienne). Ann. Inst. Pasteur (Paris) 32: 430-462.
- Sabatinelli, G., M. Ejov & P. Joergensen. 2001.** Malaria in the WHO European Region (1971-1999). Euro. Surveill. 6: 61-5.
- Salieres, A., A. Guy, J. Suzzoni Blatger, J. Cousserans, J. Blatger & Suzzoni. 1978.** Synopsis of four years of research on the 'Maculipennis complex' (Diptera - Culicidae - Anophelinae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 53: 751-756.
- Sallares, R. 2006.** Role of environmental changes in the spread of malaria in Europe during the Holocene. Quaternary International 150: 21-27.
- Sallares, R., A. Bouwman & C. Anderung. 2004.** The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. Medical history 48: 311-28.
- Sansarricq, H. 1954.** Le paludisme autochtone dans le sud-ouest de la France, pp. 66. Université de Bordeaux - faculté de médecine et de pharmacie.
- Sarrant, P. 1979.** Histoire du paludisme autochtone en France, pp. 121. Paris sud, Paris.
- Sautet, J. 1943.** L'hygiéniste peut avoir raison, ou l'histoire d'une épidémie. Presse Med. 41: 613.
- Sautet, J. 1944.** A propos d'une épidémie de paludisme en Camargue. Mars. Med. 2: 53-64.
- Sautet, J. 1947.** Le paludisme en Camargue autrefois et de nos jours. Revue de pathologie comparée et d'hygiène générale 47: 437.
- Sautet, J. 1948.** A propos de la régression "spontanée" du paludisme. Bull. Soc. Pathol. Exot. 41: 31-33.
- Sautet, J. 1953.** Les fluctuations du paludisme dans le sud de la France et dans les départements insulaires. Rev. Pathol. Gen. Physio. Clin. 50: 119-1208.
- Sautet, J. 1972.** [Is there a possibility of malaria reimplantation in the Fos area?]. Bull. Acad. Natl. Med. 156: 645-8.
- Sautet, J. 1978.** Indice de régression et éradication du paludisme. Bull. Acad. Natl. Med. 162: 839-842.
- Sautet, J. & M. Quilici. 1971.** A propos de quelques cas de paludisme autochtone contractés en France pendant l'été. La presse médicale 79: 524.
- Schaffner, F. 1991.** Le paludisme en Haute-Alsace. Bulletin de l'association philomatique d'Alsace et de Lorraine 27: 47-55.
- Schaffner, F., M. Raymond & N. Pasteur. 2000.** Genetic differentiation of *Anopheles claviger* s.s. in France and neighbouring countries. Med. Vet. Entomol. 14: 264-271.
- Schaffner, F., G. Angel, B. Geoffroy, J.-P. Hervy, A. Rhaeim & J. Brunhes. 2001.** The mosquitoes of Europe. IRD éditions and EID Méditerranée, Paris.
- Senevet, G., L. Andarelli & R. Adda. 1955.** [Presence of *Anopheles plumbeus* St. in Algerian shores.]. Arch. Inst. Pasteur Alger 33: 138-9.
- Shute, P. G. 1940.** Failure to infect english specimens of *Anopheles maculipennis* var. *atroparvus* with certain strains of *Plasmodium falciparum* of tropical origin. J. Trop. Med. Hyg.: 1-4.

- Shute, P. G. & M. Maryon. 1955.** Transmission of *Plasmodium malariae* by laboratory-bred *Anopheles maculipennis* var. *atroparvus* Meigen. Ann. Trop. Med. Parasitol. 49: 451-454.
- Sinden, R. E. 2002.** Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. Cellular Microbiology 4: 713-24.
- Sinègre, G., J. A. Rioux & J. Salgado. 1979.** Fascicule de détermination des principales espèces de moustiques du littoral méditerranéen français. Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen, Montpellier, France.
- Snow, K. R. 1999.** Malaria and mosquitoes in Britain : the effect of global climate change. European Mosquito Bulletin 4: 17-25.
- Snow, K. R. 2000.** Could malaria return to Britain? Biologist 47: 176-180.
- Takken, W. 2003.** Malaria and mosquitoes in The Netherlands. Vector Ecology Newsletter 34: 7-8.
- Takken, W., R. Geene & S. Koenraadt. 2002a.** Malaria mosquitoes in South-Holland, The Netherlands - a future public health risk? Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV) 13: 143-146.
- Takken, W., R. Geene, W. Adam, T. H. Jetten, J. A. v. d. Velden, J. A. v. der Velden & J. A. van der Velden. 2002b.** Distribution and dynamics of larval populations of *Anopheles messeae* and *A. atroparvus* in the delta of the rivers Rhine and Meuse, The Netherlands. Ambio 31: 212-218.
- Tüll, P. 2004.** Imported malaria and the risk of malaria reintroduction in Europe. CD News 34: 3-7.
- Vaughan, J. A. 2007.** Population dynamics of *Plasmodium* sporogony. Trends Parasitol. 23: 63-70.
- Vaughan, J. A., B. H. Noden & J. C. Beier. 1992.** Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. J. Parasitol 78: 716-724.
- Villon, P. 1921.** Le paludisme dans le delta du Rhône, pp. 103. Faculté de médecine et de pharmacie, Lyon.
- WHO. 1966.** Expert Committee on Malaria, Twelfth Report, Technical Report Series, N°324.
- WHO-CISID. 2007.** WHO - CISID-malaria, <http://data.euro.who.int/cisid/>.
- Woodring, J. L., S. Higgs & B. J. Beaty. 1996.** Natural cycles of vector-borne pathogens, The biology of disease vectors. University press of Colorado, Niwot.
- Zahar, A. R. 1990.** Vector bionomics in the epidemiology and control of malaria, pp. 90, Part II. The WHO European Region & the WHO Eastern Mediterranean Region. World Health Organization, Geneva; Switzerland.

Annexes

Annexe 1 : Liste des publications

Article 1 : Ponçon N, Toty C, Langewiesche K, Dervieux A, Fontenille D, 2008. Étude du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue: nécessité de l'interdisciplinarité. In: Bley D, Gruénais ME, Vernazza-Licht N (eds), *Milieux de vie et santé. Quelles pratiques interdisciplinaires*. EDISUD (coll. Ecologie Humaine). In press.

Article 2 : Ponçon N, Toty C, Kengne P, Alten B, Fontenille D, 2007. Molecular evidence for similarity between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae), sympatric potential vectors of malaria in France. *Journal of Medical entomology* (accepted).

Article 3 : Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D, 2007. Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malaria Journal* 6: 18.

Article 4 : Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré JB, Lo Seen D, Roger F, de la Rocque S, Fontenille D, Baldet T, 2007. Use of remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles* species in Southern France. *International Journal of Health Geographics* (accepted).


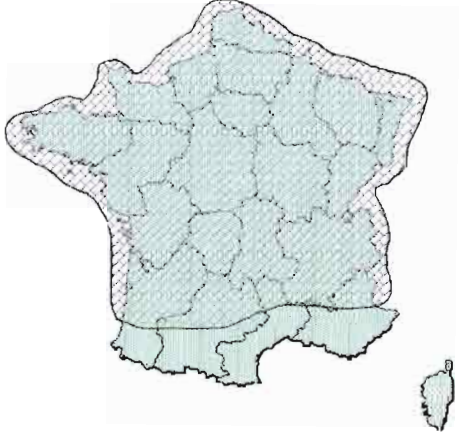




Article 5 : Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer WM, Fontenille D, Rogier C, Parola P, 2007. Autochthonous malaria from Marseilles to Minneapolis? *Emerging Infectious Diseases* 13: 1236-1238.

Article 6 : Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D. Population dynamics of pest mosquitoes and malaria and West Nile virus potential vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue – France. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 350-357.

Article 7 : Ponçon N, Balenghien T, Toty C, Ferré JB, Thomas C, Dervieux A, L'Ambert A, Schaffner F, Bardin O, Fontenille D, 2007. Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerging Infectious Diseases* 13: 1810-1815.

Article 8 : Ponçon N, Tran A, Toty C, Luty A, Fontenille D. A quantitative risk assessment approach for mosquito borne diseases: malaria re-emergence in South East France (en préparation).

Annexe 2 : Distribution des *Anopheles* identifiés en France (bibliographie)

	
<p>Distribution d'<i>An. atroparvus</i>, <i>An. plumbeus</i>, <i>An. maculipennis</i> s.s., <i>An. claviger</i> s.s.</p>	<p>Distribution d'<i>An. messeae</i></p>
	
<p>Distribution d'<i>An. petragrani</i></p>	<p>Distribution d'<i>An. algeriensis</i></p>
	
<p>Distribution d'<i>An. melanoon</i></p>	<p>Distribution d'<i>An. hyrcanus</i></p>

**Étude du risque de ré-émergence du paludisme en
Camargue: nécessité de l'interdisciplinarité.**

Ponçon N, Toty C, Langewiesche K, Dervieux A, Fontenille D

In: Bley D, Gruénais ME, Vernazza-Licht N (eds), *Milieus de vie et santé. Quelles pratiques interdisciplinaires*. EDISUD (coll. Ecologie Humaine). In press.

Étude du risque de ré-émergence du paludisme en Camargue: nécessité de l'interdisciplinarité.

Ponçon N^{1,6}, Toty C^{2,6}, Langewiesche K^{3,7}, Dervieux A^{4,8}, Fontenille D^{5,6}

¹ Doctorant, poncon@mpl.ird.fr; Tél : 04 67 04 19 24

² Assistant ingénieur

³ Docteur en anthropologie

⁴ Ingénieur d'étude

⁵ Directeur de recherches, directeur de l'UR016

⁶ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016 « Caractérisation et contrôle des populations de vecteurs », 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France.

⁷ ATER à l'Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales, Centre de la Vieille Charité, 2 rue de la Charité 13002 Marseille.

⁸ Laboratoire DESMID, UMR CNRS 6012 ESPACE, Université de la Méditerranée, 1 Rue Parmentier, 13200 Arles, France

Plan :

1. Introduction

1.1. Contexte

1.2. Quelques éléments sur le cycle du paludisme et ses vecteurs

2. Le risque de ré-émergence du paludisme, une approche interdisciplinaire

2.1. Existe-t-il des moustiques capables de transmettre les *Plasmodium* en Camargue?

2.2. Ces moustiques piquent-ils l'homme?

2.3. Ces moustiques rencontrent-ils des *Plasmodium* en Camargue?

3. Conclusion

1. Introduction

Notre planète subit depuis ces quatre dernières décennies des évolutions climatiques, écologiques, démographiques et économiques qui peuvent favoriser la résurgence des principales maladies à transmission vectorielle dont l'impact sanitaire, socio-économique et politique est important. Dans ce cadre, le paludisme, endémique autrefois en Europe et éradiqué au milieu du 20^{ième} siècle, réapparaît sous les feux de l'actualité scientifique européenne. Des foyers ont été répertoriés ces dernières années aux frontières de l'Europe en Azerbaïdjan, Turquie et Georgie où cette maladie avait disparu après la seconde guerre mondiale (WHO 2007). Quelques cas isolés de transmission autochtone ont été reportés ces dernières années en Europe, poussant les scientifiques à s'intéresser à nouveau à cette maladie et à s'interroger sur le risque de ré-émergence du paludisme en Europe et notamment en France (WHO 2007, Baldari et al. 1998, Krüger et al. 2001, Cuadros et al. 2002, Kampen et al. 2003, Armengaud et al. 2006, Doudier et al. 2007).

1.1. Le contexte

Le paludisme est une parasitose due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Quatre espèces peuvent toucher l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*, causant annuellement 300 millions d'accès et plus de 1 million de décès.

Le paludisme sévissait en France métropolitaine dans de nombreuses régions marécageuses comme les Landes, la Dombes, la Bretagne, l'Alsace, la Camargue, la Sologne, le Roussillon, ... et dans certaines zones de Corse. Cette maladie y était endémique jusqu'au début du 20^{ème} siècle et la transmission de l'hématozoaire du paludisme était assurée par des espèces locales de moustique, du genre *Anopheles*. Plusieurs facteurs entraînèrent la régression puis la disparition définitive de cette maladie. L'amélioration des conditions de vie et le recours systématique au traitement par la quinine eurent un impact majeur. La lutte antivectorielle et l'assèchement des marais par la mise en valeur des terres contribuèrent également à cette régression. La Camargue fut le dernier foyer actif en France continentale et il s'éteignit à la fin de la seconde guerre mondiale (Sautet 1944). De nos jours, les seuls cas répertoriés de paludisme en France sont des cas de paludisme importé, c'est-à-dire des personnes contaminées au cours d'un voyage en zone endémique (majoritairement en Afrique de l'Ouest) et qui expriment des symptômes cliniques de retour en France. Ainsi, 3442 cas de paludisme importé ont été notifiés en 2004, correspondant à 6109 cas estimés. Quelques rares cas accidentels (greffe, transfusion, ...) ont été reportés également (Legros et al. 2006).

Malgré la diminution des populations de moustiques suite à l'assèchement de certaines zones marécageuses au cours du siècle dernier et aux opérations de démoustication actuelles, les *Anopheles* sont toujours présents en France et en populations importantes à certains endroits, notamment en Camargue. Cette situation est caractérisée par l'expression « anophélisme sans paludisme ». Dans ce cadre, l'hypothèse de la reprise de cycles vectoriels autochtones impliquant les espèces *Anopheles* locales en Camargue suite à l'introduction régulière de *Plasmodium* par les différents flux humains (touristes, travailleurs saisonniers, ...) mérite d'être considérée. L'évaluation de ce risque implique l'étude du système vectoriel potentiel, dont la compréhension nécessite une approche globale s'intéressant à l'homme, hôte unique et réservoir de *Plasmodium*, aux espèces d'*Anopheles*, moustiques vecteurs potentiels, et à l'environnement dans lequel homme et *Anopheles* évoluent. L'étude du cycle vectoriel potentiel du paludisme en Camargue se pose de la manière suivante :

- Existe-t-il des moustiques capables de transmettre les *Plasmodium* en Camargue ?
- Ces moustiques piquent-ils l'homme ?
- Ces moustiques rencontrent-ils des porteurs de *Plasmodium* en Camargue?

Afin de trouver des réponses à ces questions et d'appréhender le risque de ré-émergence du paludisme en Camargue, l'interdisciplinarité est indispensable. Différentes disciplines des sciences sociales et des sciences biologiques sont mobilisées.

Dans l'exemple présenté dans cet article, les données entomologiques, du milieu et de sciences sociales, actuelles et historiques ont été obtenues par différentes équipes de l'Institut de recherche pour le développement (IRD), du Centre national de la recherche scientifique (CNRS), du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Cirad), de l'Entente interdépartementale pour la démoustication (EID-Méditerranée), de l'Institut universitaire professionnel Environnement Technologies et Société de l'université de Provence (IUP-ENTES), du Centre national de référence de

l'épidémiologie du paludisme d'importation et autochtone (CNREPIA) et des hôpitaux régionaux.

1.2. Quelques éléments sur le cycle du *Plasmodium* et ses vecteurs

Pour assurer sa descendance, la femelle moustique doit effectuer des repas de sang. Le choix de l'hôte est conditionné par la biologie de l'espèce : anthropophile strict, mammophile, ornithophile ou opportuniste,... À la suite de la piqûre, la femelle entre en phase de repos pendant laquelle la digestion du sang assure le développement des œufs. Arrivés à maturité, les œufs sont pondus sur un plan d'eau, le choix de celui-ci dépendant de l'espèce (préférence stricte pour certains milieux, ubiquité, ...). Après la ponte, la femelle recherche à nouveau un hôte, réalise un repas de sang, effectue un nouveau cycle et ainsi de suite jusqu'à sa mort (la durée de vie des moustiques dépendant des facteurs climatiques et de l'accès à la nourriture). La période séparant deux piqûres définit le cycle trophogonique. Les œufs éclosent et libèrent des larves aquatiques qui se développent et évoluent en nymphes qui se métamorphosent en adultes ailés mâles ou femelles.

La femelle peut s'infecter en réalisant un repas de sang sur un homme porteur de la phase gamétocyte des *Plasmodium*. Les parasites réalisent alors un cycle, appelé cycle sporogonique ou extrinsèque, au cours duquel ils migrent de l'intestin aux glandes salivaires du moustique. La phase sporozoïte des *Plasmodium* sera injectée à un humain lors d'une piqûre ultérieure. La durée de ce cycle varie d'une dizaine à une trentaine de jours en fonction de l'espèce plasmodiale et de la température (au-delà d'une température seuil au-dessous de laquelle le cycle est bloqué : 18°C pour *P. falciparum* et 15-16°C pour *P. vivax*) (MacDonald 1957). De plus, des facteurs génétiques de la femelle *Anopheles* déterminent la possibilité pour le *Plasmodium* de réaliser complètement le cycle extrinsèque : cette compatibilité entre le parasite et le vecteur est appelée compétence vectorielle.

La sommation de ces différents facteurs (préférences trophiques, durée du cycle trophogonique, longévité des femelles, durée du cycle extrinsèque) combinés à l'abondance des femelles déterminent la capacité vectorielle qui renvoie à l'efficacité du vecteur dans un environnement donné.

2. Le risque de réémergence du paludisme en Camargue : une approche interdisciplinaire

2.1. Existe-t-il des moustiques capables de transmettre des *Plasmodium* en Camargue?

Un moustique sera un vecteur potentiel s'il est présent, voir abondant dans un milieu donné, si sa durée de vie dépasse celle du cycle sporogonique et s'il est compétent vis-à-vis de *Plasmodium*. L'étude de ces critères nécessite la mobilisation de méthodologies et compétences variées et complémentaires.

Etude du milieu

La Camargue est une zone humide qui couvre le delta du Rhône qui s'étend du Grand Plan du Bourg à l'Est au canal du Rhône à Sète à l'Ouest. Marais, étangs et rizières en constituent une part importante. L'ensemble de cette région est alimenté en eau douce depuis le Rhône par un réseau dense de canaux d'irrigation et de drainage qui sert essentiellement à l'alimentation en eau des parcelles rizicoles. La disponibilité de la ressource a entraîné son utilisation pour l'alimentation des milieux « naturels » (marais, étangs) à des fins

cynégétiques, d'élevage, de conservation de la nature, ou de récolte du roseau. Le réseau de canaux de drainage permet de gérer selon les besoins l'ensemble de ces milieux humides et contribue à l'artificialisation du fonctionnement hydrologique du delta et, *in fine*, à une tendance à la permanence de l'eau tout au long de l'année dans les milieux naturels. Cette région est également caractérisée par une nappe phréatique salée, peu profonde et dont les effets influencent la salinité des sols. Celle-ci dépend de la distance par rapport à la côte et de la fréquence de submersion du sol en eau douce. La flore des marais dépend de la salinité et de la xérophilie. Ces deux facteurs conjoints, combinés à la pression de pâturage, déterminent différentes associations végétales et donc différents types de marais. La Camargue est ainsi couverte d'une juxtaposition de milieux différents (Dervieux et al. 2002, Aznar et al. 2003).

Dans ce contexte fortement anthropisé, la compréhension du milieu passe nécessairement par la compréhension des interactions hommes-milieu. De plus, la caractérisation et la cartographie de la Camargue pour cette étude a nécessité d'inclure la composante vecteur dans la réflexion pour identifier les déterminants pertinents. Finalement, botanique, sciences sociales et biologie ont interagit pour produire une cartographie mobilisant relevés de terrain, images satellites et systèmes d'informations géographiques.

Inventaire et dynamique des populations d'*Anopheles* en fonction du climat et du milieu

Des prospections entomologiques poussées ont été menées régulièrement dans 2 zones représentatives de Camargue, dans le secteur de la Tour carbonnière à l'Ouest, celui des Marais du Vigueirat à l'Est (Figure 1). Différentes méthodes de captures d'adultes et de larves ont été utilisées en différents points de mars à décembre 2005, en lien avec différents milieux. La détermination des différentes espèces a nécessité dans certains cas, le recours aux outils de biologie moléculaire (Proft et al. 1999). Plus de 680 000 moustiques ont été récoltés dont 131 050 *Anopheles*. Quatre espèces d'*Anopheles* ayant des variations spatiales d'abondance ont été répertoriées : *An. hyrcanus*, *An. melanoon*, *An. algeriensis*, *An. atroparvus*. Les dynamiques de populations sont différentes : *An. hyrcanus* et *An. melanoon* sont présent en été, tandis que *An. algeriensis* et *An. atroparvus*, peu abondants, sont présents respectivement au printemps et en hiver (Ponçon et al. 2007).

Figure 1 : La Camargue et les zones d'études

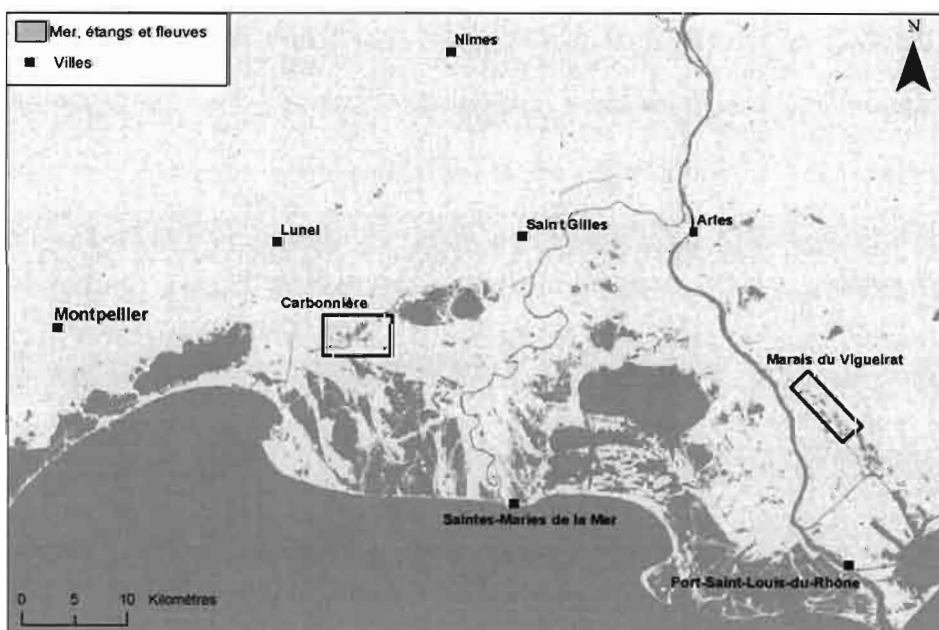


Figure 2a : Dynamique saisonnière d'*An. melanoon* et *An. hyrcanus* à la Carbonnière en 2005

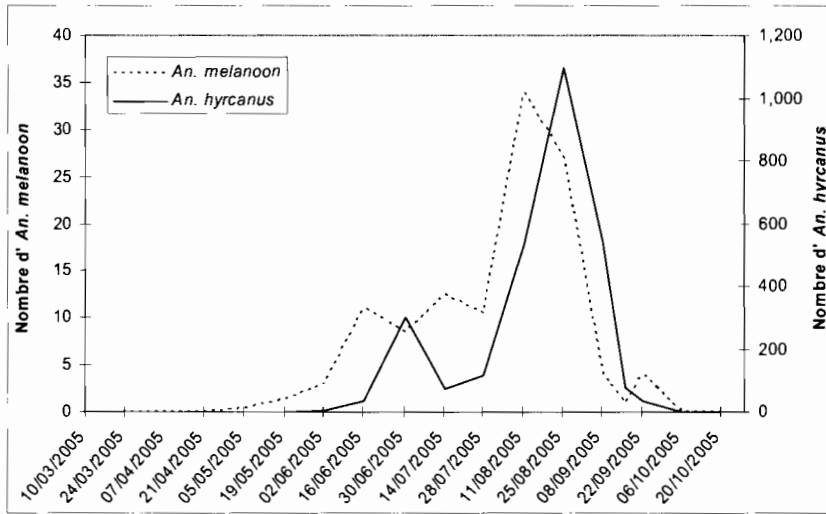


Figure 2b : Dynamique saisonnière d'*An. melanoon*, *An. algeriensis* et *An. hyrcanus* au Marais du Vigieirat en 2005

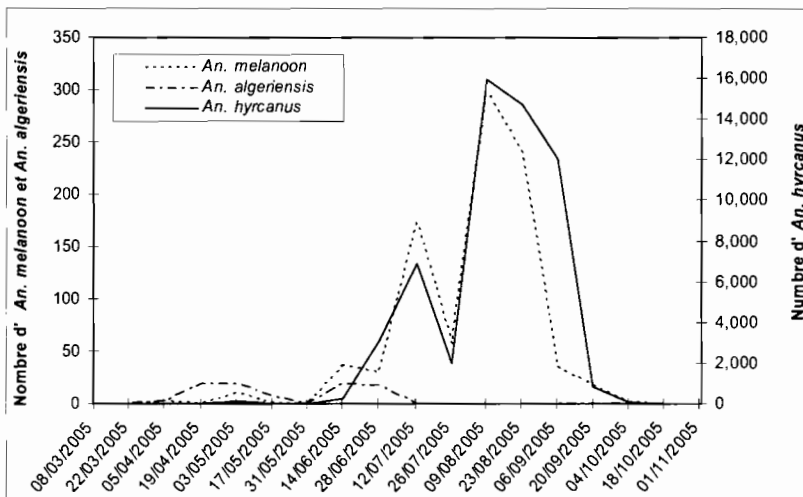
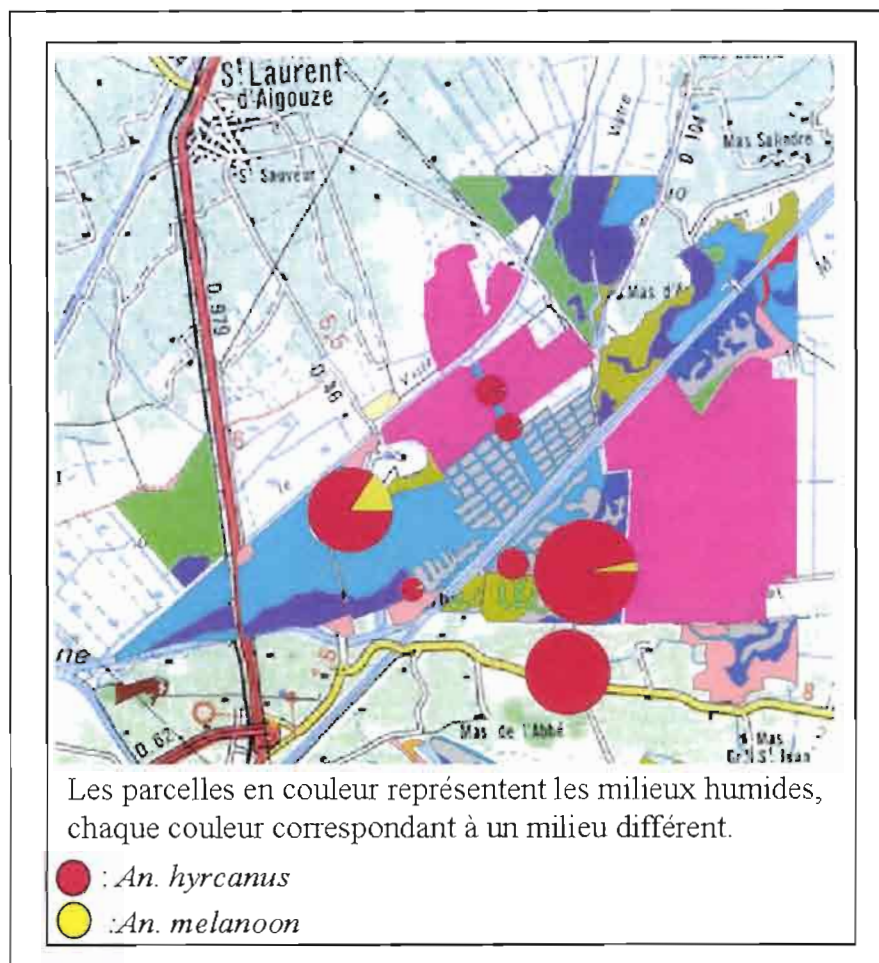


Figure 3 : Abondance d'*An. melanoon* et *An. hyrcanus* en fonction des points et milieux de capture



Longévité des Anopheles

A l'échelle d'une population, la durée de vie des femelles *Anopheles* est estimée à partir du taux de parturité de la population (proportion de femelles ayant pondu au moins une fois), qui a été déterminé après dissection des ovaires de femelles capturées (Detinova 1962).

Compétence vectorielle

Des expériences de transmissions expérimentales sont actuellement menées en laboratoires sécurisés. Des populations locales d'*Anopheles* sont gorgées sur des membranes artificielles leur permettant d'ingérer du sang infecté. Le suivi des infections détermine ensuite la compétence des espèces *Anopheles* françaises vis-à-vis des souches de *P. falciparum* tropicaux. En d'autres termes, les *Anopheles* de Camargue peuvent-ils transmettre?

Les résultats concernant la présence des vecteurs potentiels, leur longévité et leur compétence vectorielle, combinés à la cartographie déterminent la répartition spatio-temporelle des espèces anophèles susceptibles de transmettre des *Plasmodium*. Le milieu et

les facteurs climatiques permettent de détecter les zones entomologiquement à risque à l'intérieur desquelles le contact entre ces *Anopheles* et les hommes doit être étudié.

2.2 Ces moustiques piquent-ils l'homme?

L'un des éléments clé du cycle de transmission du paludisme réside dans le contact entre l'homme et les *Anopheles* – contact indispensable pour que le moustique s'infecte et pour assurer la transmission. Deux composantes interactives déterminent ce contact : le comportement trophique des *Anopheles* et la présence ainsi que les comportements des hommes.

Le comportement trophique est déterminé par 3 facteurs : la préférence d'hôte, la durée du cycle trophogonique et le rythme journalier d'activité (heures préférentielles des repas de sang : crépuscule, nuit, ...). L'efficacité d'un vecteur dépend du choix de son hôte (un bon vecteur de paludisme doit piquer l'homme) et de la fréquence des piqûres (plus le cycle trophogonique est court, plus le vecteur piquera fréquemment). Le rythme journalier d'activité du moustique influe sur les possibilités de contacts avec l'hôte.

De plus, quand bien même un moustique serait disposé à piquer un homme, il est nécessaire qu'un humain soit disponible pour ce repas de sang, c'est-à-dire qu'il soit présent dans l'environnement du moustique et qu'il ne se protège pas suffisamment contre les piqûres.

Afin de trouver une réponse à la question « ces moustiques piquent-ils l'homme ? » une étude des contacts hommes-vecteurs en fonction du comportement trophique des *Anopheles*, de la distribution spatio-temporelle et du comportement des humains s'impose.

Etude du comportement trophique des Anopheles

L'étude du choix de l'hôte a été menée par des piégeages sur différents hôtes (homme et cheval) et par l'analyse des repas de sang des femelles *Anopheles* capturées gorgées (cette analyse fait appel à une technique de type ELISA (Beier et al. 1988)). Des différences nettes ont été observées dans le comportement des espèces, *An. hyrcanus* étant très anthropophile tandis que *An. melanoon*, piquant rarement l'homme, est très zoophile.

Tableau 1 : Captures sur appât cheval et sur homme au Marais du Vigueirat en 2005

	Appât cheval	Appât humain
<i>An. melanoon</i>	1411	10
<i>An. hyrcanus</i>	856	7062

Tableau 2 : Analyse des repas de sang des femelles capturées gorgées

Espèce	Zones d'étude	Nombre de moustiques	Origine du repas de sang					
			Cheval	Bovin	Sanglier	Mixte	Chien	Autres hôtes
<i>An. melanoon</i>	Carbonnière	142	95	41	0	2	0	4
	Marais du Vigueirat	84	67	1	8	0	1	7
<i>An. atroparvus</i>	Carbonnière	12	10	2	0	0	0	0
	Marais du Vigueirat	3	3	0	0	0	0	0
<i>An. maculipennis</i> complex	Carbonnière	11	9	2	0	0	0	0
	Marais du Vigueirat	6	2	1	2	1	0	0
<i>An. hyrcanus</i>	Carbonnière	1	1	0	0	0	0	0
	Marais du Vigueirat	8	7	0	1	0	0	0

Les captures d'adultes ont révélé une activité forte des femelles *An. hyrcanus* en début de nuit tandis que *An. melanoon* semble plus actif en seconde partie de nuit.

La durée du cycle trophogonique est en général de 4-5 jours en France.

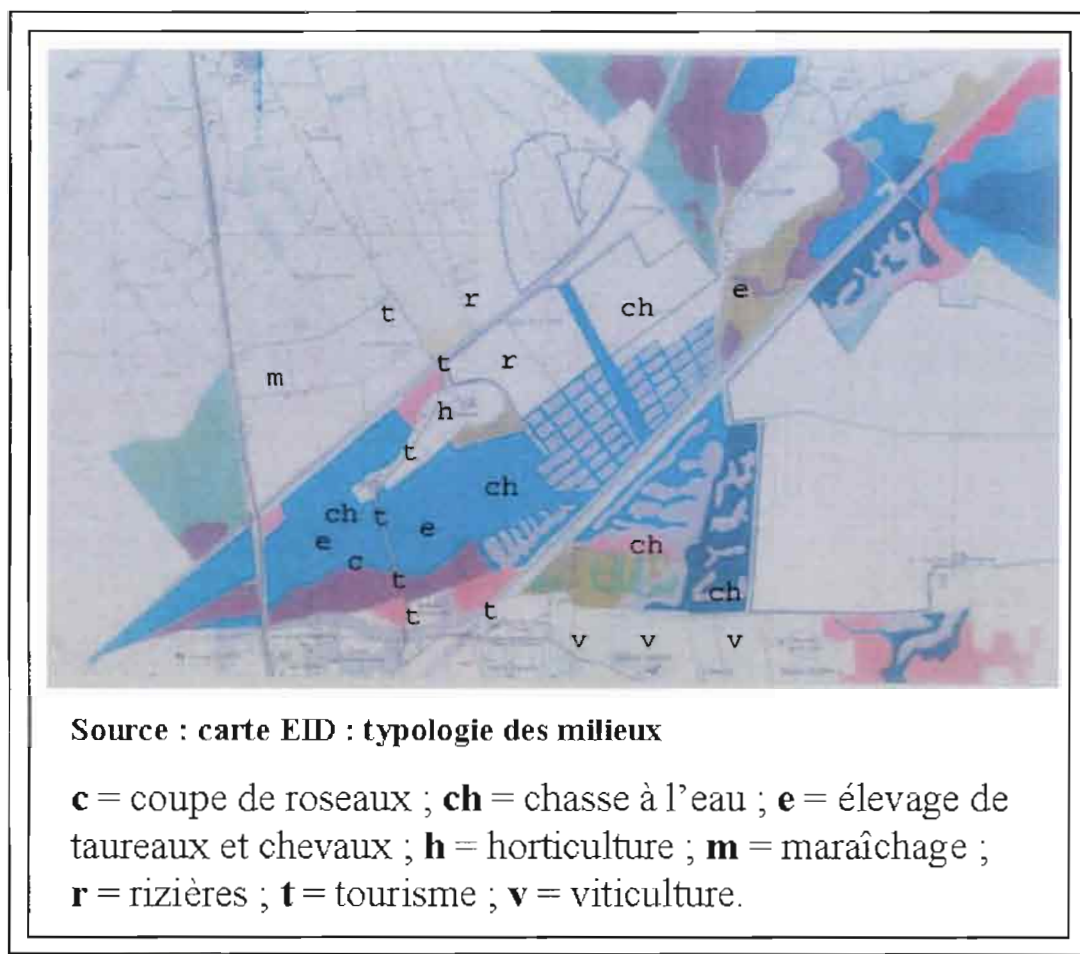
Etude de la distribution spatio-temporelle des hommes.

La répartition spatio-temporelle des hommes a été répertoriée par des enquêtes socio-anthropologiques, en caractérisant la population et ses activités en lien avec le milieu sur une des 2 zones de capture de moustiques. Ce travail a été réalisé à l'échelle annuelle et journalière – le choix des critères caractérisant la population étant lié à la composante vecteur (Langewiesche, Rapport « EDEN- volet sciences sociales », 2005). Cette étude reporte des variations temporelles importantes dues aux activités touristiques dans cette zone. On peut compter 340 personnes par jour en hiver et autour de 2000 en été. La distribution spatiale des hommes varie également dans l'année et dans la journée en fonction de leurs activités (agricoles ou touristiques). Cette étude permet d'identifier des groupes (riziculteurs, viticulteurs, coupeurs de roseaux, éleveurs et chasseurs) exposés aux *Anopheles*, sur la base de leurs activités dans des milieux favorables aux *Anopheles*, ou proches de ceux-ci, et à des horaires correspondant à l'activité des vecteurs potentiels. De plus, les touristes, en particulier les étrangers, sont également très exposés aux piqûres de moustiques, moins par leurs pratiques que par leurs comportements peu adaptés à la nuisance.

Tableau 3 : Estimation du nombre de personnes présentes dans la zone d'étude par jour pour les différents mois de l'année 2005

	janvier	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	septembre	octobre	novembre	décembre
Habitants permanents	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Travailleurs réguliers:												
horticulture	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
viticulture	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
maraîchage, Copam	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
maraîchage, Soproma	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
riziculture	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Travailleurs réguliers Total	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105
Suivi scientifique:												
personel EID	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
personel Scamandre	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Suivi scientifique Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Travailleurs saisonniers:												
viticulture	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	5	5
élevage	0	0	0	6	6	6	6	6	6	0	0	0
coupe du roseaux	1	1	1	0	0	0	10	10	0	0	0	3
maraîchage, Copam	10	10	20	20	60	60	40	40	10	10	10	10
maraîchage, Soproma	0	0	0	40	40	40	0	0	0	0	0	0
Travail. saisonniers Total	11	11	21	66	106	106	56	76	36	30	15	18
Activités touristiques:												
visite de rizière	0	0	0	0	4	1	17	17	17	0	0	0
visite en 4X4	0	0	0	0	5	5	20	20	0	0	0	0
visite guidée	0	0	1	1	1	1	2	2	1	1	0	0
visite en péniche	0	0	0	0	200	600	800	800	800	200	0	0
camping	0	0	0	100	100	100	600	600	100	0	0	0
hôtels/gîtes	0	0	0	50	50	300	300	300	300	0	0	0
Activités touristiques Total	0	0	1	151	360	1007	1739	1739	1218	201	0	0
Activités de loisirs:												
chasse/pêche	13	13	0	0	0	0	0	13	13	13	13	13
Total	337	337	335	530	779	1426	2108	2141	1580	557	341	344

Figure 4 : Répartition spatiale des activités agricoles et touristiques



Etude des comportements humains

Les premiers résultats mettent clairement en évidence des différences d'exposition des différents groupes humains face aux piqûres des moustiques. Les résidents se protègent mieux des moustiques que ne le font les touristes et visiteurs peu familiarisés à cette la nuisance.

Les comportements spécifiques de chaque groupe d'humains combinés aux variations spatio-temporelle de leur présence permettent d'établir une carte des humains « disponibles » pour les repas de sang des *Anopheles*, carte qui varie au cours de la journée et de l'année. Le croisement des données concernant les moustiques et les hommes permet ainsi de cartographier des zones de contacts entre hommes et vecteurs en Camargue, définissant ainsi des zones de transmission potentielle. A l'intérieur de ces zones, la rencontre d'un *Anopheles* capable de transmettre les *Plasmodium* avec un homme porteur de parasites pourra initier un cycle de transmission. Il est donc nécessaire de déterminer la distribution spatio-temporelle des hommes porteurs de *Plasmodium* en Camargue.

2.3. Ces moustiques rencontrent-ils des *Plasmodium* en Camargue?

La transmission autochtone du paludisme ayant cessé en Camargue depuis le milieu du 20^{ème} siècle, les seules sources actuelles de parasites sont représentées par les cas de paludisme importé ou les porteurs chroniques de parasites (après une première contamination par les *Plasmodium*, on observe un portage de parasites dans l'organisme qui varie de quelques mois à plusieurs années en fonction de l'espèce plasmodiale impliquée et d'une éventuelle immunité). Ces sources de parasites dépendent exclusivement des mouvements de populations pour lesquels les déterminants sociaux et économiques sont importants.

Le paludisme importé

Ce travail a été réalisé à 2 échelles : échelle locale et échelle nationale. L'échelle locale a impliqué les hôpitaux régionaux qui recensent les cas de paludisme diagnostiqués dans leurs services. L'approche nationale a utilisé les données collectées par le CNREPIA auprès des hôpitaux du territoire français.

L'espèce plasmodiale dominante est *P. falciparum* avec un pic des cas en septembre (correspondant au retour des vacances) (Danis et al. 2002, Legros et al. 2006). Les contaminations ont lieu majoritairement en Afrique de l'Ouest avec des variations régionales comme à l'hôpital de Marseille où l'on diagnostique des contaminations originaires principalement des Comores. Leur distribution spatiale est très hétérogène dans le Sud Est de la France puisque les grandes agglomérations (Marseille, Nîmes et Montpellier) concentrent la majorité des cas.

La caractérisation de ces cas révèle que la majorité des personnes concernées sont des immigrés de première ou seconde génération retournant dans leur pays d'origine pour les vacances (Legros et al. 2006). L'étude de la population camarguaise permet donc d'identifier les communautés de populations immigrées susceptibles de visiter leur pays d'origine et fournit donc une première approche de la distribution spatio-temporelle des parasites importés. Encore une fois, l'interdisciplinarité s'impose dans la mesure où des facteurs sociaux (dépendant eux-mêmes d'un contexte historique et économique) déterminent la répartition des parasites importés.

Etudes des flux de population

Parallèlement aux parasites importés donnant lieu à des cas cliniques, l'introduction de *Plasmodium* peut également être le fait de personnes porteuses chroniques, en provenance de zones endémiques. Il est donc nécessaire de répertorier et caractériser les flux de populations en provenance de zones endémiques aboutissant en Camargue. Dans ces flux, certains individus pourront correspondre à des porteurs chroniques.

L'étude préliminaire a révélé l'existence de 2 types de flux : des résidents camarguais se rendant en zones endémiques et revenant en Camargue (essentiellement touristes, professionnels et chasseurs/pêcheurs en safaris) et des résidents de zones endémiques de passage en Camargue (essentiellement touristes et travailleurs saisonniers). La majorité des touristes Camarguais se rend plutôt en Afrique du Nord, zone où l'incidence du paludisme est quasi nulle. Les travailleurs saisonniers proviennent essentiellement du Maghreb, et les touristes étrangers de zones non endémiques. Finalement, ce travail a mis en évidence un risque faible d'introduction de parasites par des flux de personnes porteuses chroniques (Bertemes et al. 2006).

L'introduction de *Plasmodium* dans des zones de transmission potentielle (identifiées à l'issu des 2 premières étapes) peut permettre d'initier un cycle de transmission autochtone. L'étude de la distribution spatio-temporelle des hommes porteurs de *Plasmodium* dans l'ensemble de la Camargue permettra donc d'évaluer le risque de ré-émergence du paludisme en Camargue. La caractérisation de ce risque passe, *in fine*, par le croisement de 3 distributions spatio-temporelles en lien avec le milieu (moustiques capables de transmettre des *Plasmodium*, humains disponibles pour les piqûres de ces moustiques et hommes porteurs de *Plasmodium*) et l'identification de facteurs clé caractérisant les zones où ces 3 distributions se superposent.

3. Conclusion

Cette étude illustre la nécessité d'une approche interdisciplinaire afin d'évaluer le risque de ré-émergence de paludisme. La mise en commun des résultats de chacune des disciplines participantes permet d'aborder ce risque avec plus de réalisme. La biologie étudie les *Anopheles* et leur compétence vectorielle, l'anthropologie caractérise la population humaine au niveau local et les flux de populations humaines vers la Camargue, l'épidémiologie fournit des données concernant le paludisme importé en France, l'écologie permet d'aborder les questions relatives aux habitats des vecteurs. De plus, l'approche interdisciplinaire souligne l'importance des facteurs historiques, culturels et socio-économiques qui conditionnent le risque vectoriel en Camargue, « contexte naturel fortement anthropisé ». Ainsi, les changements dans l'utilisation du sol, l'urbanisation montante dans certaines zones de Camargue et le développement du tourisme et des loisirs, influencent de manière importante les contacts possibles entre les hommes et les *Anopheles*, en modifiant la densité et la répartition de ces deux derniers.

Remerciements

Nous remercions l'ensemble des personnes qui ont participé à ce travail dans le cadre des collaborations : Nicole Vernazza et Daniel Bely du CNRS-DESMID, Marc Eric Gruenais de l'IRD, Patrick Baudot, Vincent Bertemes, Céline Miglietti, Joanne Michelutti, Murielle Radix, Lucie Supiot de l'IUP ENTES, Annelise Tran du Cirad, Francis Schaffner, Christophe Lagneau, Grégory L'Ambert, Claire Duchet, Alexandre Carron, Charles Jeannin, Cécile Ivanès, Nicolas Sidos, Michel Babinot, Olivier Bardin, Didier Caire, Dominique Gindre et Nathalie Barras de l'EID-Méditerranée, Jérémie Petit du syndicat mixte pour la protection et la gestion de la Camargue gardoise, Jean Laurent Lucchesi, Nathalie Hecker, Grégoire Massez, Jean Baptiste Nogues et Mathieu Chambouleyron de l'association les Amis du Vigueirat, Robert Meffre, Jean Marie Egidio de la mairie de Mas Thibert, Didiet Basset du CHU de Montpellier, Laurence Lachaud de l'hôpital de Nîmes, Muriel Roumier de l'hôpital d'Arles, Philippe Parola du CHU de Marseille, Fabrice Legros du CNREPIA, Cyrille Thomas du Centre Français du Riz, Thomas Balenghien et Florence Fouque de l'EPSP-TIMC/ENVL, Annie Walter de l'IRD.

Ce travail a été en partie financé par le Ministère de l'Agriculture et le projet européen EDEN, GOCE-2003-010284 (cet article est référencé EDEN0055). Le contenu de cette publication est sous la seule responsabilité des auteurs et n'engage pas l'union européenne.

Bibliographie

- Armengaud, A., F. Legros, I. Quatresous, H. Barre, P. Valayer, Y. Fanton, E. D'Ortenzio, and F. Schaffner. 2006. A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. *Euro Surveill* 11: E061116 3.
- Aznar, J. C., A. Dervieux, and P. Grillas. 2003. Association between aquatic vegetation and landscape indicators of human pressure. *Wetlands* 23: 149-160.
- Baldari, M., A. Tamburro, G. Sabatinelli, R. Romi, C. Severini, G. Cuccagna, G. Fiorilli, M. P. Allegri, C. Buriani, and M. Toti. 1998. Malaria in Maremma, Italy. *Lancet* 351: 1246-1247.
- Beier, J. C., P. V. Perkins, R. A. Wirtz, J. Koros, D. Diggs, T. P. Gargan, 2nd, and D. K. Koeh. 1988. Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol* 25: 9-16.
- Bertemes, V., C. Miglietti, J. Michelutti, M. Radix, and L. Supiot. 2006. Etude et caractérisation des flux de populations : risque d'introduction du paludisme en Camargue., pp. 42. IUP ENTES - Université de Provence, Marseille.
- Cuadros, J., M. J. Calvente, A. Benito, J. Arevalo, M. A. Calero, J. Segura, and J. M. Rubio. 2002. *Plasmodium ovale* malaria acquired in central Spain. *Emerg Infect Dis* 8: 1506-8.
- Danis, M., F. Legros, M. Thellier, and E. Caumes. 2002. Données actuelles sur le paludisme en France métropolitaine. *Med Trop (Mars)* 62: 214-8.
- Dervieux, A., P. Allard, T. Naizot, and Y. Auda. 2002. La Camargue est-elle un polder? Changement et stabilité dans le delta du Rhône depuis le début du XIXème siècle, pp. 315-329, In : Equilibre et ruptures dans les écosystèmes durant les 20 derniers millénaires en Europe de l'Ouest., Besançon.
- Detinova, T. S. 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monogr Ser World Health Organ* 47: 13-191.
- Doudier, B., H. Bogreau, A. DeVries, N. Ponçon, W. Stauffer, D. Fontenille, C. Rogier, and P. Parola. 2007. Autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis ? *Emerg Infect Dis*: In press.
- Kampen, H., J. Proft, S. Etti, E. Maltezos, M. Pagonaki, W. A. Maier, and H. M. Seitz. 2003. Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: entomological aspects. *Parasitol Res* 89: 252-258.
- Krüger, A., A. Rech, X. Z. Su, and E. Tannich. 2001. Two cases of autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous *Anopheles plumbeus*. *Tropical medicine and international health* 6: 983-985.
- Legros, F., A. Arnaud, B. El Minouni, and M. Danis. 2006. Paludisme d'importation en France métropolitaine : données épidémiologiques 2001-2004. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 32: 235-236.
- MacDonald, G. 1957. The epidemiology and control of malaria. Oxford University Press, London.
- Ponçon, N., C. Toty, G. L'Ambert, G. Le Goff, C. Brengues, F. Schaffner, and D. Fontenille. 2007. Biology and dynamics of potential malaria vectors in southern France. *Malar J* 6: 18.
- Proft, J., W. A. Maier, and H. Kampen. 1999. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol Res* 85: 837-43.
- Sautet, J. 1944. A propos d'une épidémie de paludisme en Camargue. *Mars méd* 2: 53-64.
- WHO 2007. CISID-malaria, <http://data.euro.who.int/cisid/malaria>.

**Using remote sensing to map larval and adult populations
of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) a potential
malaria vector in Southern France**

Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré JB, Lo Seen D, Roger F, de La
Rocque S, Fontenille D, Baldet T

International Journal of Health Geographics (accepted)

Using remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) a potential malaria vector in Southern France

Annelise Tran^{1,2*§}, Nicolas Ponçon^{3*}, Céline Toty³, Catherine Linard⁴, Hélène Guis^{1,2}, Jean-Baptiste Ferré⁵, Danny Lo Seen¹, François Roger², Stéphane de la Rocque², Didier Fontenille³, Thierry Baldet²

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

¹ Territories, Environment, Remote Sensing and Spatial Information Joint Research Unit (UMR TETIS), Maison de la Télédétection, 500 rue J.-F. Breton, 34093 Montpellier Cedex 5, France

² French Agricultural Research Center for International Development (CIRAD), Epidemiology and Ecology of Animal Diseases Unit, Baillarguet Campus, 34398 Montpellier Cedex 5, France

³ Institut de recherche pour le développement (IRD), UR016, Caractérisation et contrôle des populations de vecteurs, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

⁴ Department of Geography, Université Catholique de Louvain, 3 place Pasteur, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

⁵ Entente interdépartementale pour la démoustication (EID) Méditerranée, 165 avenue Paul Rimbaud, 34184 Montpellier cedex 4, France

Email addresses:

AT: annelise.tran@cirad.fr

NP: poncon@mpl.ird.fr

CT: Celine.Toty@mpl.ird.fr

CL: linard@geog.ucl.ac.be

HG: helene.guis@cirad.fr

JBF: jbferre@eid-med.org

DLS: danny.lo_seen@cirad.fr

FR: francois.roger@cirad.fr

SDLR: stephane.de_la_rocque@cirad.fr

DF: fontenil@mpl.ird.fr

TB: thierry.baldet@cirad.fr

Abstract

Background

Although malaria disappeared from southern France more than 60 years ago, suspicions of recent autochthonous transmission in the French Mediterranean coast support the idea that the area could still be subject to malaria transmission. The main potential vector of malaria in the Camargue area, the largest river delta in southern France, is the mosquito *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae). In the context of recent climatic and landscape changes, the evaluation of the risk of emergence or re-emergence of such a major disease is of great importance in Europe. When assessing the risk of emergence of vector-borne diseases, it is crucial to be able to characterize the arthropod vector's spatial distribution. Given that remote sensing techniques can describe some of the environmental parameters which drive this distribution, satellite imagery or aerial photographs could be used for vector mapping.

Results

In this study, we propose a method to map larval and adult populations of *An. hyrcanus* based on environmental indices derived from high spatial resolution imagery. The analysis of the link between entomological field data on *An. hyrcanus* larvae and environmental indices (biotopes, distance to the nearest main productive breeding sites of this species *i.e.*, rice fields) led to the definition of a larval index, defined as the probability of observing *An. hyrcanus* larvae in a given site at least once over a year. Independent accuracy assessments showed a good agreement between observed and predicted values (sensitivity and specificity of the logistic regression model being 0.76 and 0.78, respectively). An adult index was derived from the larval index by averaging the larval index within a buffer around the trap location. This index was highly correlated with observed adult abundance values (Pearson $r = 0.97$, $p < 0.05$). This allowed us to generate predictive maps of *An. hyrcanus* larval and adult populations from the landscape indices.

Conclusions

This work shows that it is possible to use high resolution satellite imagery to map malaria vector spatial distribution. It also confirms the potential of remote sensing to help target risk areas, and constitutes a first essential step in assessing the risk of re-emergence of malaria in southern France.

Background

Vector-borne diseases are particularly influenced by environmental conditions and environmental changes [1, 2]. Indeed, arthropod vectors in general, and insect vectors in particular are very sensitive to their environments, which determine their presence, development and behaviour. As a consequence, climatic as well as landscape and land cover factors greatly influence the spatial distribution of vectors and the diseases they transmit [3].

As remote sensing techniques provide valuable information on such environmental conditions [4, 5], several studies have used remote sensing imagery to map the distribution of vector species at different spatial scales [6-10]. The objectives of such studies may differ, according to the epidemiologic context. In endemic areas, mainly in tropical and subtropical regions, these vector maps are designed to improve vector control, which is currently one essential method in limiting the burden of important vector-borne diseases such as malaria or dengue fever. For example, studies mapping suitable areas for malaria vectors or disease have been made at the continental scale for Africa [11-13] and at the regional or local scale in regions of Africa [14-18], Central America [19-21] and Asia [22, 23]. In disease-free areas, analyzing the link between the environment and potential vector distribution may help evaluate the risk of emergence of the disease [24], and lead to better understanding of the ecology of the invasive vector species [25].

In the recent years, several human and zoonotic diseases have emerged (or re-emerged) and spread in European countries formerly free of these diseases [26, 27]. Thus, in a context of climatic and landscape changes, the question of the possible re-emergence of malaria in Europe has to be re-examined [28]. Although several models have predicted a potential increase of malaria in Europe, there is a general agreement that the risk is very low under current socio-economic conditions. However, occasional autochthonous cases recently reported in Italy [29], Spain [30], Germany [31] and Greece [32] highlight the importance of updating the current distribution of the potential European malaria vector as a preliminary “mapping risk” step toward predicting future scenarios.

In metropolitan France, malaria was endemic until the beginning of the 20th century in marshy areas such as the Rhone delta [33]. Malaria disappeared from this area after World War II due to the drying of marshes, growth of livestock, improvement of housing and life conditions, and the use of quinine; the last *Plasmodium vivax* malaria epidemic occurred in 1943 [34]. Nevertheless, autochthonous transmission was suspected in the French Mediterranean coast in 2006 [35], supporting the idea that southern France remains suitable for malaria transmission. Among eight anopheline species described in the Camargue area (Rhone delta), recent entomological surveys identified *Anopheles (Anopheles) hyrcanus* (Pallas) as the main potential malaria vector because of its abundance and anthropophily [36]. Moreover, this species is involved in malaria transmission in Afghanistan [37]. The presence of this species is usually associated with irrigated rice growing areas [6, 38, 39], but *An. hyrcanus* larvae were also reported in other biotopes such as reed beds and marshes with *Scirpus* [40]. Recently, a study highlighted the potential of low spatial resolution imagery in providing pan-European maps of the distribution of five *Anopheles* species

potentially capable of serving as malaria vectors at a continental scale [41]. As far as we know, however, no study has yet mapped *An. Hyrcanus*' presence in Europe.

In this context, the main objective of the study was to determine and quantify the spatial distribution of *An. hyrcanus* larval and adult populations in the Camargue area of the delta of the Rhone River in southern France. A secondary objective was to determine if rice paddies singly explained the distribution of *An. hyrcanus* populations, or if other biotopes may also be favorable to the development of this species. We used high spatial resolution imagery to characterize the land cover and analyzed the link between land cover variables and field data on the presence/absence of *An. hyrcanus* larvae, leading to the definition of a larval index. An adult *An. hyrcanus* index was then derived from the larval index. Field survey data on the abundance of adult *An. hyrcanus* populations were used to validate this index. The method is simple and is designed to be equally applicable for the mapping other mosquito species distributions.

Methods

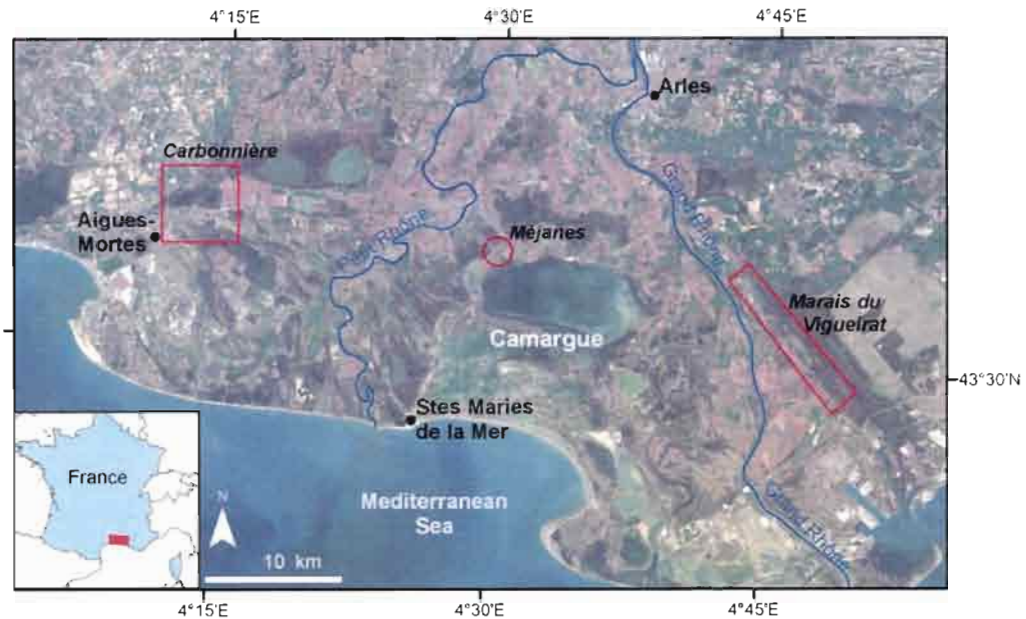
Study area

The study area is located in the south of France, between 43.33° and 43.73° north and 4.05° and 4.93° east (Figure 1). It encompasses the Rhone river delta and its surroundings. This area has a Mediterranean climate with hot, dry summers and mild, wet winters. Landscape is composed of wet areas (coastal lagoons, marshes, rice fields) and dry areas (agricultural zones, Mediterranean scrubland, forests).

Within this area, two main study sites were chosen to carry out entomological surveys on *Anopheles* species (larvae and adult mosquitoes) [36]. The first one, named “Marais du Vigueirat” is a natural reserve minimally impacted by human activity, and is located in the wet area. In the second one, called “Carbonnière”, located between wet and dry areas, human activities are more prevalent and mosquito control is performed against *Ochlerotatus caspius*, a pest mosquito. These control measures have been conducted for 40 years and may impact other mosquito species populations, depending on the period and the places where they are conducted. Both areas present the same variety of biotopes (rice fields, marshes with *Scirpus*, reeds, rush wetlands and meadows). Additional data on larvae were collected in a third site between “Marais du Vigueirat” and “Carbonnière”, in a rice paddy area named “Méjanes” (Figure 1).

Figure 1 – Study area and location of the field study sites for entomological sampling

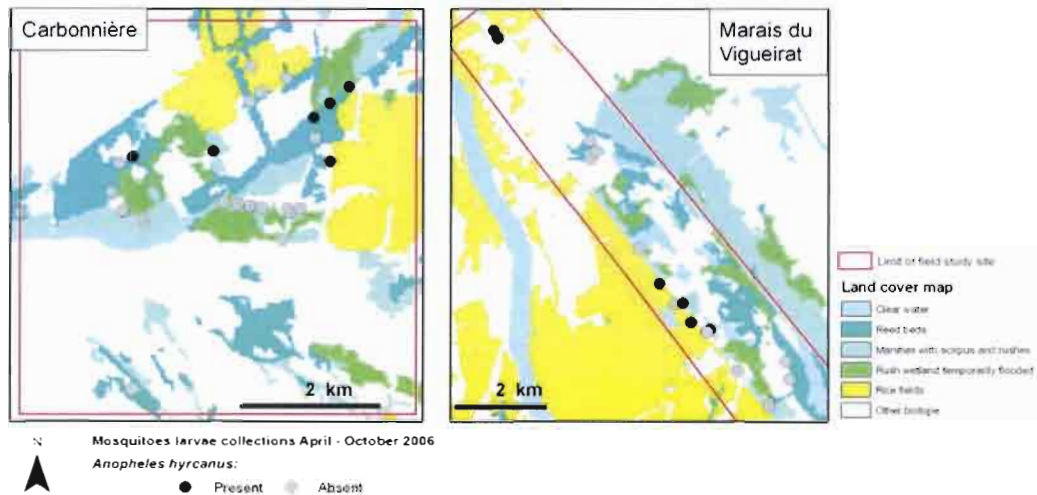
Background: Landsat ETM+ image, 25 October 2001, Eurimage©



Entomological data

80 potential breeding sites (37 in “Marais du Vigueirat”, 41 in “Carbonnière” and two in “Méjanès”), situated in the main biotopes potentially suitable to *An. hyrcanus* larvae, were visited every month from April to October, 2006, except in April and May when only 23 and 52 sites were prospected (due to water management and dryness in summer, some potential breeding sites were dry when visited). This period corresponds to the mosquito season’ duration. Mosquito larvae were collected using standard dipping techniques; larvae were stored in absolute alcohol and identified using morphological keys [42]. For each place visited, the presence or absence of water was reported, as well as other characteristics: temperature, salinity and pH, depth, turbidity, presence or absence of organic matter, exposure to the sun, vegetation and biotope. Finally, the presence (of one or more individuals) or absence of *An. hyrcanus* larvae in each site during the whole period (April-October) was derived from all these observations (Figure 2). Spatial autocorrelations of the mosquito larvae samples were analyzed by calculating Moran’s I index (ArcGIS Spatial Statistics Tools).

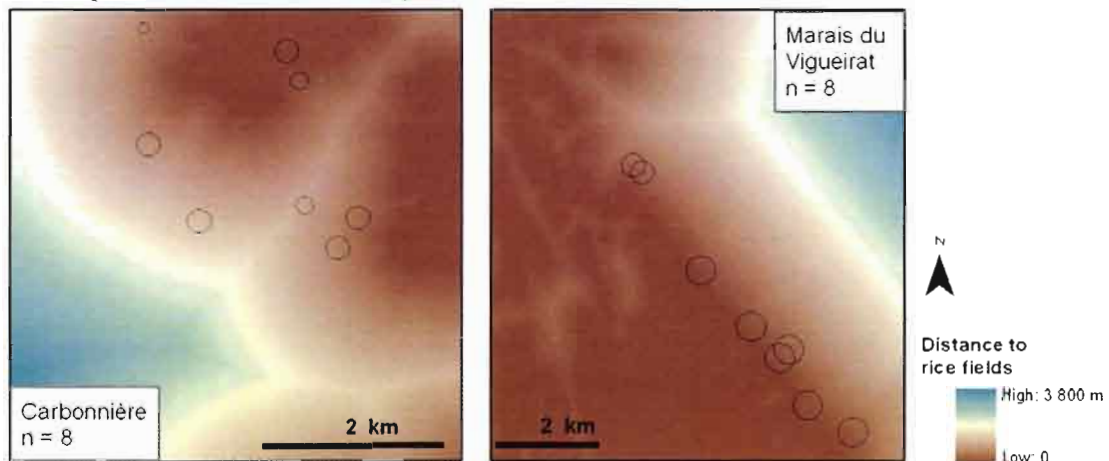
Figure 2 – Land cover map of the study sites (Carbonnière and Marais du Vigueirat, Camargue, France) and results of *Anopheles hyrcanus* larvae collection, April – October 2006



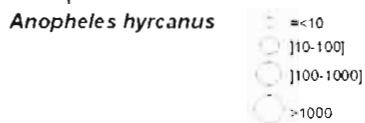
Adult mosquitoes were captured from March to October, 2005. CDC-light traps associated with carbon dioxide dry ice were hung in 8 locations in each study site (“Marais du Vigueirat” and “Carbonnière”) from 19:00 to 10:00 hours, for two consecutive nights, once every two weeks (512 collections). Mosquitoes were identified using morphological keys [36, 42]. The mean number of mosquitoes per trap was calculated using the results of the two consecutive nights. Then the maximum mean number of mosquitoes in the year was computed (Figure 3) to obtain the most abundant capture of the year.

Figure 3 – Results of *Anopheles hyrcanus* adult populations trapping in Carbonnière and Marais du Vigueirat study sites, Camargue area, France, March – October 2005, and distance to the rice fields

The circles show the maximum number of *Anopheles hyrcanus* adult mosquitoes trapped between March and October. The colour of the background indicates the distance to the nearest rice field (points near to rice fields are red-coloured while distant points are blue-coloured)



Mosquitoes adult collections March - October 2005



All collections of adult and larval mosquitoes were localized using Global Positioning System (GPS) receiver.

Environmental data

To describe the environmental characteristics likely to influence the spatial distribution of *An. hyrcanus*, two Landsat Enhanced Thematic Mapper (ETM+) images from dry (July 21, 2001) and wet (October 25, 2001) seasons were used to identify and map the landscape units within the study area (Figure 1). The characteristics of this sensor allow the whole study area (70 x 40 km) to be covered in one scene with a spatial resolution of 30 meters. A supervised object-oriented classification was carried out to produce the land-cover map. July's image was first segmented into homogeneous polygons (objects) (Definiens-imaging eCognition™ software). A training dataset of sites of known land cover (sites identified in the field in 2004 and from existing vegetation maps, 2001 [43, 44]) was then used to classify each object. The image from the autumn period was processed to map water bodies in order to distinguish the areas flooded by end summer and autumn rainfalls from the ones never flooded. The whole image processing method has been described in [45].

We did not use the reflectance values measured by remote sensing (examples of such an approach for malaria studies in [12]) in order to be able to interpret the results from an ecological point of view. Moreover, the use of land-cover classes instead of reflectance values made it possible to simulate long term land-cover changes.

This map (Figure 2) includes the main biotopes where *An. hyrcanus* larvae and adults were collected: rice fields, reed beds, marshes with *Scirpus*, rush wetland temporarily flooded and clear water.

The presence of *An. hyrcanus* was assumed to be strongly dependent on rice paddies [38, 39], and thus the distance to the nearest rice field was computed for each pixel using Geographic Information System (GIS) functionalities (GIS software: ESRI ArcGIS™, Spatial Analyst) (Figure 3).

Finally, the areas where mosquito control measures were applied (EID, unpublished data) were mapped to distinguish rice fields which were not treated with larvicide from those which were. In the “Carbonnière” area, one rice paddy was concerned. No treatments have been performed in the “Marais du Vigueirat”, which is a protected natural area.

Larval population mapping

We used the entomological and environmental data to test for associations between the presence of larvae in breeding sites and land cover variables (biotope and distance to rice field). The presence (at least once over the year) or absence of *An. hyrcanus* larvae in a potential breeding site was the dependant (explained) variable.

We built three logistic regression models using as explanatory variables: i) the biotope, ii) the distance to the nearest rice field, and iii) the simple interaction between i) and ii), as explicative variables. Logistic regression is commonly used to study the relationships between a variable in two modalities (presence / absence) and risk factors which may be qualitative or quantitative variables [46].

The sample size being small (n=80), a multi-cross-validation procedure was performed in order to assess the stability and accuracy of the models. In the multi-cross-validation procedure, the original sample (here n=80) is randomly divided into two subsets ($n_1=60$; $n_2=20$); models (here logistic regression models) are built from the first sample and the second one is used to generate predicted values (*i.e.*, the presence of *An. hyrcanus* larvae, calculated with a given probability threshold) [47]. We used a threshold value of 0.5 [48], which is in correspondence with the optimal cut-off threshold (0.57) estimated by a ROC (Receiver Operating Characteristic) analysis [49]. The accuracy of each model (overall accuracy, sensitivity and specificity [8]) is assessed by comparing the real and predicted values of the second subset. This procedure was repeated 1000 times to test for the stability of the models, to identify the most plausible model and to determine its parameters (R freeware [50]).

Finally, a larval index was computed for each pixel within the image of the study area (ArcGIS Spatial Analyst Tools). The larval index is defined as the probability of observing *An. hyrcanus* larvae in a point at least once during the mosquito season, and is estimated by applying the logistic transformation to each pixel according to its biotope and / or its distance to the nearest rice field.

Two different larval index maps were produced: one with all rice fields (not taking into account mosquito control measures) and one excluding treated rice fields.

Adult population mapping

Assuming that the abundance of adult mosquitoes depends on the presence of breeding sites in the surroundings [51], we used the larval index map to derive an adult index.

This adult index was defined for each trap location as the mean value of the larval index within a buffer around the trap location. Different buffer sizes (ranging from 100 to 1000 metres) were tested.

The adult index was then compared to the observed abundance of *An. hyrcanus*, to identify the best buffer size. The relationship between the maximum mosquitoes captured and the adult index was established to map the maximum abundance of *An. hyrcanus* adult populations in a given site over the whole study area.

Results

Entomological data

An. hyrcanus larvae were collected in all the three field study sites (“Carbonnière”, “Marais du Vigueirat” and “Méjanes”) (Figure 2). Larvae were mostly collected in rice fields (63% of the rice fields were positive sites for *An. hyrcanus*), but were also collected in *Scirpus* marshes (31%) and in a small number of reed beds (1%).

An. hyrcanus adult populations were present in two of the field study sites (“Carbonnière” and “Marais du Vigueirat”), with larger densities at “Marais du Vigueirat” than at “Carbonnière” (Figure 3).

An. hyrcanus larvae abundance was not spatially auto-correlated among the sites sampled (Moran’s I index=0.06, p=0.70). Sites were thus considered as spatially independent in the following analysis.

Larval population mapping

Comparison of the three possible logistic-regression models is shown in Table 1. The model with the best sensitivity/specificity compromise as well as the best overall accuracy explained the presence of larvae as a function of biotope and distance to the nearest rice field (sensitivity=0.76; specificity= 0.78; overall accuracy=80%).

Table 1 - Accuracy assessment of three logistic-regression models for the presence of *Anopheles hyrcanus* larvae, Camargue area, France

Model	% correct	Sensitivity (IC95%)	Specificity (IC95%)
Biotope	77 % (58-89)	0.68 (0.33-1)	0.85 (0.71-1)
Distance	69 % (53-.89)	0.74 (0.38-1)	0.71 (0.44-0.92)
Biotope + distance	80 % (63-95)	0.76 (0.33-1)	0.78 (0.61-0.93)

Distance: Distance to the nearest rice field

The parameters of this model are given in Table 2. The regression coefficients associated with reed beds, rice fields and marshes with *Scirpus* biotopes, as well as with the distance to the nearest rice field were significantly different from zero.

Table 2 – Regression coefficients of the best model for presence of *Anopheles hyrcanus* larvae, Camargue area, France

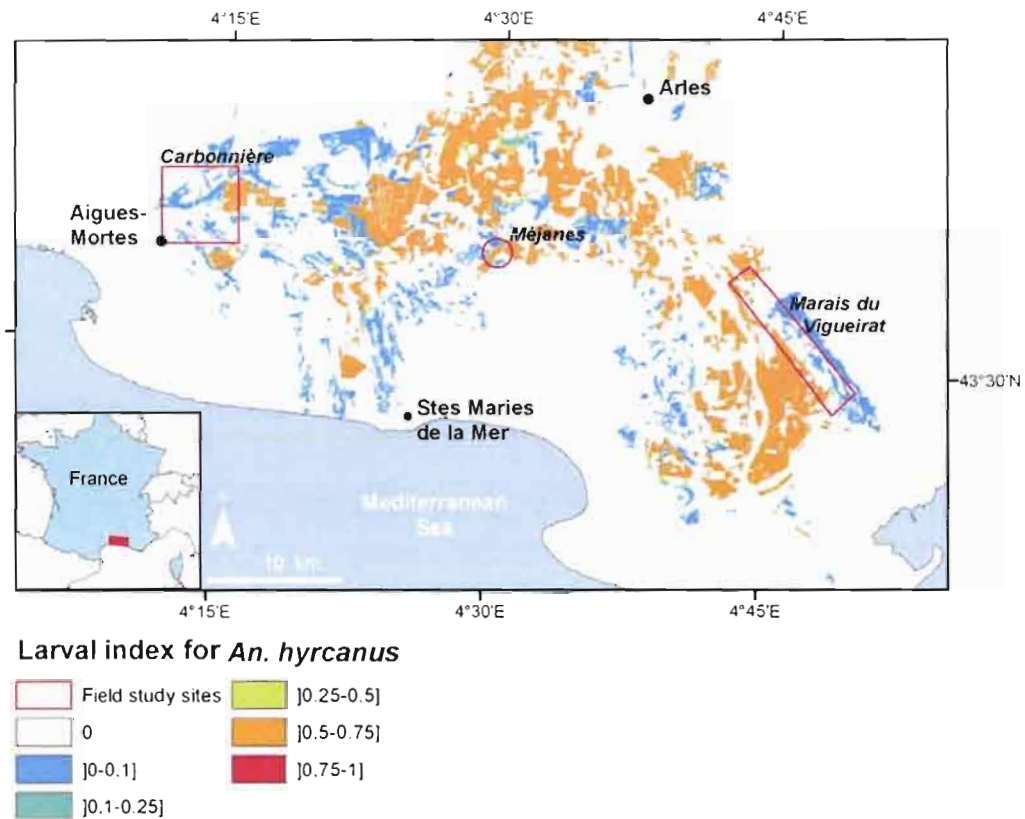
Model	Regression coefficient	[95% CI]	p
Intercept	-17.15	[-18.94;-14.86]	-
Distance	-3.21	[-6.17;-1.74]	0.021
Biotope			
Clear water	0	-	-
Rush wetland	0.92	[-0.64;3.03]	0.25
Rice field	17.67	[15.38;19.45]	0.005
Reeds	14.48	[-0.12;16.59]	0.084
Marshes with scirpus	17.50	[14.99;19.24]	0.009

CI: confidence interval

Distance: Distance to the nearest rice field

The *An. hyrcanus* larval index map (taking mosquito control into account) is presented in Figure 4. This map highlights the dependence of *An. hyrcanus* on rice paddy areas (Figure 4: areas in orange, probability of presence > 0.5), but also the possibility of eggs being laid in some others biotopes such as marshes with *Scirpus*.

Figure 4 – *Anopheles hyrcanus* larval index map derived from satellite imagery, Camargue area, France



Adult population mapping

The best correlation between the adult index and the observed maximum number of *An. hyrcanus* captured was observed for a buffer radius of 300 m. These correlations were significant when the mosquito control measures were taken into account in the rice paddies (Pearson r [buffer radius=300m] =0.97, $p < 0.05$). The optimal size for the buffer around the traps was identified as 300 metres (Table 3).

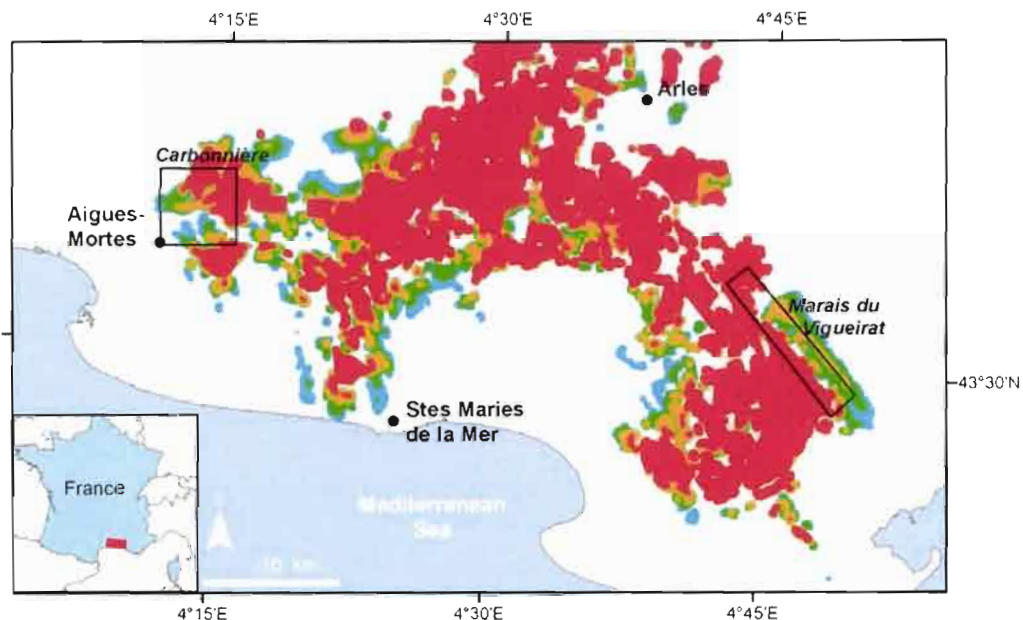
Table 3 - Influence of buffer size in the calculation of the *Anopheles hyrcanus* adult index to the correlation coefficient between adult index and real mosquito abundance

Buffer radius (m)	Pearson r	p-value
100	0.63	$9.4 \cdot 10^{-3}$
200	0.94	$6.11 \cdot 10^{-8}$
300	0.94	$3.68 \cdot 10^{-8}$
400	0.83	$6.71 \cdot 10^{-5}$
500	0.71	$2.10 \cdot 10^{-3}$
600	0.64	$8.15 \cdot 10^{-3}$
700	0.59	$1.53 \cdot 10^{-2}$
800	0.56	$2.30 \cdot 10^{-2}$
900	0.59	$1.71 \cdot 10^{-2}$
1000	0.57	$2.03 \cdot 10^{-2}$

The final relation between the maximum number of *An. hyrcanus* mosquitoes likely to be observed in a given point and the adult index was determined as (Figure 5):
 $\text{maximum } An. \text{ hyrcanus} = 38\,918 * \text{adult index [buffer radius=300m]}$
 The final *An. hyrcanus* adult population predictive map is presented in Figure 6. The distribution area of the species includes the breeding sites and their surroundings.

Figure 5 – Bidimensional representation of the real abundance of *Anopheles hyrcanus* populations in 2005, Camargue area, France versus the adult index derived from satellite imagery.

The circles show the real abundance of *Anopheles hyrcanus* mosquitoes (maximum number of adults trapped in CDC-light traps from March to October) and the solid line is the regression line.



Predictive density map for *An. hyrcanus*

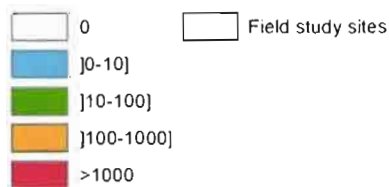
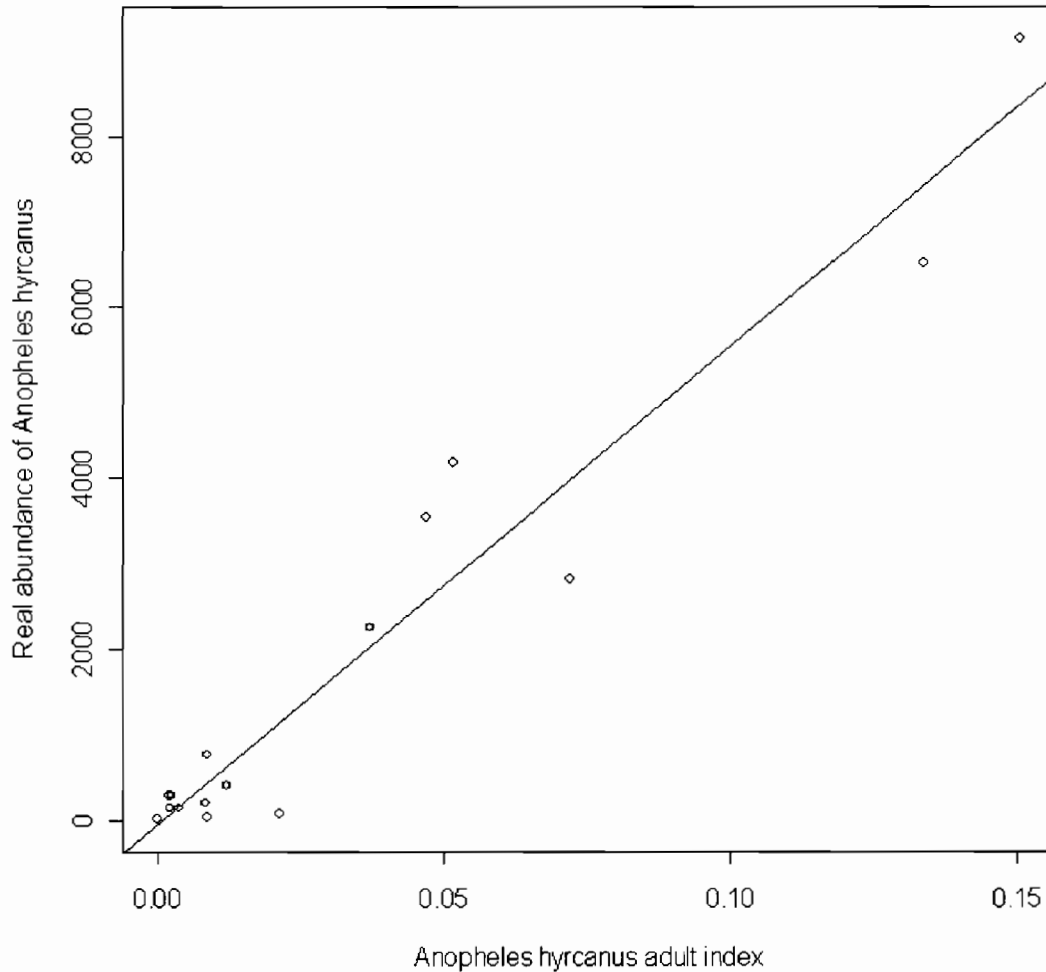


Figure 6 – *Anopheles hyrcanus* density map derived from satellite imagery, Camargue area, France



Discussion

In order to assess the risk of re-emergence of malaria in Europe, a preliminary step is to understand the spatial distribution of potential vector breeding habitats and adult populations. However, carrying out entomological surveys on broad areas remains a heavy task. In this study, remotely sensed data were successfully used to produce predictive maps of larval and adult populations of the main potential malaria vector over a region of southern France, at a scale that provides a locally precise-enough description of the spatial distribution of the vector's abundance, which is an essential component of the risk of emergence of the disease.

Our results highlight a strong link between land cover variables and the presence or absence of *An. hyrcanus* larvae. In particular, the importance of irrigated croplands such as rice fields, which has been described in other contexts [6, 23, 38, 39], is confirmed for the Camargue area. The potential of other biotopes such as *Scirpus* marshes to constitute favourable breeding sites for *An. hyrcanus* was also confirmed. This result is of great importance in explaining the presence of this species in the area even when rice paddies are dry (end of summer and autumn). Thus, the final model describing the distribution of *An. hyrcanus* larvae includes both biotope and distance to the rice fields as risk factors. From a biological point of view, this suggests that *An. hyrcanus* females preferentially lay their eggs in rice fields, but also in other biotopes, provided that the latter are close to the main breeding sites (*i.e.*, the rice fields). Although these results were already known, this analysis quantifies this relationship, leading to a predictive map of the potential breeding sites for *An. hyrcanus* (Figure 4). An external accuracy assessment of the model revealed a good agreement between observed and predicted values for the larval presence, with both having correct sensitivity and specificity values (Se=76%; Sp=78%).

The accuracy of the best logistic regression model is also confirmed by the very strong correlation between the *An. hyrcanus* adult population index, directly derived from the larval index, and field entomological data on adult population abundance (Pearson $r=0.97$; $p<0.05$). Indirectly, this result can be considered as a second external validation for our larval index map, strengthening the fact that our method is relevant and would also be useful for mapping other mosquito species at high spatial resolutions.

Another result of interest in our study is the determination of the optimal buffer size to compute the adult index (300 metres). This size can be interpreted as the active distance flight of *An. hyrcanus* mosquitoes around the breeding site from which they emerge. A 300 m distance is consistent with ranges usually reported in the literature. Indeed, the active dispersal as appetential flight for mosquitoes usually cover short distances, such as a few hundred meters [52].

This study also stresses the importance of mosquito control measures. When such measures were taken into account, the correlation between the adult index and observed data strongly varied in the “Carbonnière” area but remained unchanged in the natural “Marais du Vigueirat” area, as this area is not treated. Although mosquito control measures in the study area do not target *An. hyrcanus* populations, it seems that the latter are affected.

It was finally possible to map *An. hyrcanus*'s adult population due to the linear relationship found between the adult index for a 300 m buffer radius and the real abundance of the adult population (Figures 5 and 6). As the adult index gives an approximation of the number of adult mosquitoes in each pixel, the final map corresponds to a density map for *An. hyrcanus*.

Some limitations of our method must be pointed out. A first weakness of our analysis concerns the time lag between the acquisition of the satellite imagery that was used to map the land cover (2001) and entomological surveys (2005-2006). We assumed that in the study area, land use does not change so much within a 4-5 year duration. Indeed, stakeholders interviewed in October 2006 argued that the land cover tended to

stabilize these last years [53]. Between 1991 and 2001, only 3% of the area of the natural regional park of Camargue changed their main class of land cover [43]. In other areas, where important landscape changes take place (deforestation, active urbanization, etc.) [18], the acquisition of the satellite scene has to be concomitant with the field surveys.

In this study, the influence of local parameters (such as water temperature, water depth, substrate type, predators, nutrients and physicochemical such as pH) on mosquito larvae presence was not evaluated. As the main objective was to map *An. hyrcanus* populations, we focused our analysis on environmental variables which could be mapped, *i.e.*, which could be easily estimated in each point of the study area. Further studies are nevertheless required to fine-tune the link between local environmental determinants and indices derived from satellite imagery.

Due to the limited adult *An. hyrcanus* population sampling (only 16 sites), it was not possible to directly validate the final abundance map with independent observations. Further entomological surveys are therefore needed to achieve this. Thus, it is essential to verify the hypothesis that there is a correlation between the probabilities of mosquito larvae presences *versus* mosquito adult abundances, by identifying a series of standardized mosquito wimples carried out within the Camargue region.

It should also be noted that the final map of larvae presence (the larvae index) indicating the probability of observing *An. hyrcanus* larvae at least once in the year (*i.e.*, expressed as an index ranging from 0 to 1), does not correspond to the larval abundance and does not describe the seasonal variations of larvae presence. In the same way, the adult index giving the maximum number of *An. hyrcanus* observed at one time in a year does not describe the temporal dynamics of the adult population. In Camargue, *An. hyrcanus* adult populations are known to increase in June, reach a peak near the middle of August and decrease drastically in September [36]. Thus, to describe and quantify the spatial and temporal distribution of larvae and adult populations, a model for the population dynamics of *An. hyrcanus* has to be developed. This model could integrate the larval index map and meteorological data which drive mosquitos' population dynamics (such as temperature and rainfall) as input.

This study could therefore be considered as the first step in modeling *An. hyrcanus* spatio-temporal dynamics. For instance, the larval index map could be used to derive monthly maps of the potential breeding sites available for *An. hyrcanus* by combining the larval index with data on periods during which sites are flooded (breeding sites are available for *An. hyrcanus* only when they are in water). Then, the dynamics of mosquitoes could be described by a simulation model (agent-based model or a spatial diffusion model [54]).

Another application of this work consists of combining the vector distribution maps with entomological characteristics (life span, trophic preferences, extrinsic incubation period) and host characteristics (human spatial distribution, contact rates) to map *An. hyrcanus* vectorial capacity [55] and the malaria basic reproductive rate (R_0) [56]. These indices would help to assess the risk of the emergence of malaria in southern France under different land use changes scenarios, bearing in mind that this risk is considered minimal under the current combination of environmental and socio-

economics conditions. Changes in land-cover (increasing rice-field surfaces, urbanization growth, etc) could be easily simulated using GIS, and their impact on the malaria vector's distribution could be calculated using our method.

Moreover, our approach could be combined with other studies mapping *Anopheles* species distributions at a continental scale [41] to derive a multi-scale complementary tool adapted to map the distributions of potential vector species i) at an European scale and ii) more precisely in each risk area (as the Camargue area).

From a broader perspective, it would be pertinent to apply our method to other vector-borne diseases for which the vectors are present in the Camargue, and which have recently re-emerged in Europe, such as the West Nile Virus [45].

Conclusions

The analysis of the relationships between *An. hyrcanus* larvae presence and environmental indices derived from Landsat imagery allowed us to map the potential breeding sites of this species in the Camargue, a former malaria endemic area in southern France. Based on this larval index, an adult index was calculated, which was strongly correlated with the observed abundance of adult *An. hyrcanus*. This work is a first essential step in assessing the risk of the re-emergence of malaria in this area.

Authors' contributions

AT carried out the image processing, data analysis and drafted the manuscript. NP contributed to the conception of the study, participated to the entomological field work and participated to results interpretation. CT carried out the entomological field work and identification of mosquitos' species. CL participated in the conception of the study and manuscript revision. HG and DLS contributed in the data analysis and results interpretation. JBF contributed in the entomological field work. FR and SDLR contributed in the conception of the study. DF and TB contributed in the conception of the study, results interpretation and manuscript revision.

Acknowledgements

This publication has been funded under the EU 6th Framework Program (GOCE-CT-2003-010284 EDEN); Nicolas Ponçon salary was paid by the French Ministry of Agriculture. It is officially catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0059. The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and don't necessarily reflect the views of the European commission.

The Landsat ETM+ image (July 21, 2001) data was available from USGS/EROS, Sioux Falls, SD. Source for this dataset was the Global Land Cover Facility.

The authors thank Pr. David Rogers, TALA Research Group, Oxford University, and Renaud Lancelot, Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, for their comments on the manuscript.

References

1. Gratz NG: **Emerging and resurging vector-borne diseases.** *Annu Rev Entomol* 1999, **44**:51-75
2. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY: **Effects of environmental change on emerging parasitic diseases.** *Int J Parasitol* 2000, **30**:1395-405
3. Norris D: **Mosquito-borne diseases as a consequence of land use change.** *EcoHealth* 2004, **1**:19-24
4. Beck LR, Lobitz BM, Wood BL: **Remote Sensing and Human Health: new sensors and new opportunities.** *Emerging infectious diseases* 2000, **6**:217-226
5. Hay SI, Packer MJ, Rogers DJ: **The impact of remote sensing on the study and control of invertebrate intermediate hosts and vectors for disease.** *International Journal of Remote Sensing* 1997, **18**:2899-2930
6. Vanwambeke SO, Somboon P, Harbach RE, Isenstadt M, Lambin EF, Walton C, Butlin RK: **Landscape and land cover factors influence the presence of *Aedes* and *Anopheles* larvae.** *Journal of Medical Entomology* 2007, **44**:133-144
7. Pecoraro H, Day H, Reineke R, Stevens N, Withey J, Marzluff J, Meschke J: **Climatic and landscape correlates for potential West Nile virus mosquito vectors in the Seattle region.** *Journal of Vector Ecology* 2007, **32**:22-28
8. Rogers D: **Models for vectors and vector-borne diseases.** *Advances in parasitology* 2006, **62**:1-35
9. Bouyer J, Guerrini L, Desquesnes M, de la Rocque S, Cuisance D: **Mapping African Animal Trypanosomosis risk from the sky.** *Veterinary Research* 2006, **37**:633-645
10. Benedict M, Levine R, Hawley W, Lounibos L: **Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*.** *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2007, **7**:76-85
11. Craig MH, Snow RW, le Sueur D: **A climate-based distribution model of malaria transmission in sub-Saharan Africa.** *Parasitol Today* 1999, **15**:105-11
12. Rogers DJ, Randolph SE, Snow RW, Hay SI: **Satellite imagery in the study and forecast of malaria.** *Nature* 2002, **415**:710-715
13. Moffett A, Shackelford N, Sarkar S: **Malaria in Africa: vector species' niche models and relative risk maps.** *PLoS ONE* 2007, **2**:e824
14. Diuk-Wasser MA, Dolo G, Bagayoko M, Sogoba N, Toure MB, Moghaddam M, Manoukis N, Rian S, Traore SF, Taylor CE: **Patterns of irrigated rice growth and malaria vector breeding in Mali using multi-temporal ERS-2 synthetic aperture radar.** *International Journal of Remote Sensing* 2006, **27**:535-548

15. Thomas CJ, Lindsay SW: **Local-scale variation in malaria infection amongst rural Gambian children estimated by satellite remote sensing.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**:159-63
16. Omumbo JA, Hay SI, Snow RW, Tatem AJ, Rogers DJ: **Modelling malaria risk in East Africa at high-spatial resolution.** *Tropical Medicine & International Health* 2005, **10**:557-566
17. Bogh C, Lindsay SW, Clarke SE, Dean A, Jawara M, Pinder M, Thomas CJ: **High spatial resolution mapping of malaria transmission risk in the Gambia, west Africa, using LANDSAT TM satellite imagery.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**:875-81
18. Jacob BG, Muturi E, Halbig P, Mwangangi J, Wanjogu RK, Mpanga E, Funes J, Shililu J, Githure J, Regens JL, Novak RJ: **Environmental abundance of *Anopheles (Diptera: Culicidae)* larval habitats on land cover change sites in Karima Village, Mwea Rice Scheme, Kenya.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**:73-80
19. Beck LR, Rodriguez MH, Dister SW, Rodriguez AD, Rejmankova E, Ulloa A, Meza RA, Roberts DR, Paris JF, Spanner MA, Washino RK, Hacker C, Legters LJ: **Remote Sensing as a landscape epidemiologic tool to identify villages at high risk for malaria transmission.** *Am J Trop Med Hyg* 1994, **51**:271-280
20. Rejmankova E, Roberts DR, Pawley A, Manguin S, Polanco J: **Predictions of adult *anopheles albimanus* densities in villages based on distances to remotely sensed larval habitats.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **53**:482-488
21. Roberts DR, Paris JF, Manguin S, Harbach RE, Woodruff R, Rejmankova E, Polanco J, Wullschleger B, Legters LJ: **Predictions of malaria vector distribution in Belize based on multispectral satellite data.** *Am J Trop Med Hyg* 1996, **54**:304-308
22. Sharma VP, Nagpal BN, Srivastava A, Adiga S, Manavalan P: **Estimation of larval production in Sanjay Lake and its surrounding ponds in Delhi, India using remote sensing technology.** *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and PublicHealth* 1996, **27**:834-840
23. Sithiprasasna R, Lee WJ, Ugsang DM, Linthicum KJ: **Identification and characterization of larval and adult anopheline mosquito habitats in the Republic of Korea: potential use of remotely sensed data to estimate mosquito distributions.** *Int J Health Geogr* 2005, **4**:17
24. Tatem AJ, Baylis M, Mellor PS, Purse BV, Capela R, Pena I, Rogers DJ: **Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and north Africa using satellite imagery.** *Veterinary Microbiology* 2003, **97**:13-29
25. Guis H, Tran A, de La Rocque S, Baldet T, Gerbier G, Barrague B, Biteau-Coroller F, Roger F, Viel JF, Mauny F: **Use of high spatial resolution satellite imagery to characterize landscapes at risk for bluetongue.** *Vet Res* 2007, **38**:669-683

26. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H: **West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: The return after 35 years.** *Emerging Infectious Diseases* 2001, **7**:692-696
27. Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PPC, Baylis M: **Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe.** *Nature Reviews Microbiology* 2005, **3**:171-181
28. Jetten TH, Martens WJ, Takken W: **Model stimulations to estimate malaria risk under climate change.** *J Med Entomol* 1996, **33**:361-71
29. Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna G, Fiorilli G, Allegri MP, Buriani C, Toti M: **Malaria in Maremma, Italy.** *Lancet* 1998, **351**:1246-7
30. Cuadros J, Calvente MJ, Benito A, Arevalo J, Calero MA, Segura J, Rubio JM: **Plasmodium ovale malaria acquired in central Spain.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**:1506-8
31. Kruger A, Rech A, Su XZ, Tannich E: **Two cases of autochthonous Plasmodium falciparum malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous Anopheles plumbeus.** *Trop Med Int Health* 2001, **6**:983-5
32. Kampen H, Proft J, Etti S, Maltezos E, Pagonaki M, Maier WA, Seitz HM: **Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: entomological aspects.** *Parasitol Res* 2003, **89**:252-8
33. Rodhain F, Charmot G: **Evaluation des risques de reprise de transmission du paludisme en France.** *Médecine et Maladies Infectieuses* 1982, **12**:231-236
34. Sautet J: **A propos d'une épidémie de paludisme en Camargue.** *Marseille-Médical* 1944, **2**:53-64
35. Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Poncon N, Stauffer WM, 3rd, Fontenille D, Rogier C, Parola P: **Possible autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1236-1238
36. Poncon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D: **Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France.** *Malar J* 2007, **6**:18
37. Faulde M, Hoffmann R, Fazilat K, Hoerauf A: **Malaria re-emergence in northern Afghanistan.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1402-1404
38. Ramsdale CD, Lodge V: **Internal taxonomy of the Hyrcanus group of Anopheles (Diptera, Culicidae) and its bearing on the incrimination of vectors of continuing or resurgent malaria in the West of the Palaearctic region.** *European Mosquito Bulletin* 2001, **10**:1-8
39. Kaiser A, Jerrentrup H, Samanidou Voyadjoglou A, Becker N: **Contribution to the distribution of European mosquitoes (Diptera: Culicidae) : four new country records from northern Greece.** *European Mosquito Bulletin* 2001, **10**:9-12

40. Rioux JA: *Les Culicidés du "Midi" méditerranéen*. Paris: Editions Paul Lechevalier; 1958.
41. Kuhn KG, Campbell-Lendrum DH, Davies CR: **A continental risk map for malaria mosquito (Diptera: Culicidae) vectors in Europe**. *J Med Entomol* 2002, **39**:621-30
42. Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, Hervy J-P, Rhaeim A, Brunhes J: *The mosquitoes of Europe*. Paris: IRD éditions and EID Méditerranée; 2001.
43. Parc Naturel Régional de Camargue: *Occupation du sol en Camargue : cartographie du territoire du Parc naturel régional de Camargue en 2001 et évolution depuis 1991*. Arles: 2001.
44. Entente Inter-départementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen: *Données sur les milieux humides soumis à démoustication*. Montpellier, 2001.
45. Tran A, Gaidet N, L'Ambert G, Balenghien T, Balança G, Chevalier V, Soti V, Ivanes C, Etter E, Schaffner F, Baldet T, De la Rocque S: **On the use of remote sensing for the ecological description of multi-host disease systems: a case study on West Nile virus in southern France**. *Veterinaria Italiana* 2007, **43**:687-697
46. Bouyer J: **Logistic regression in epidemiology, Part I**. *Rev. Epidém. et Santé Publ.* 1991, **39**:79-87
47. Yu C: **Resampling methods: concepts, applications, and justification**. *Practical assessment, Research and Evaluation* 2003, **8**:
48. Greene W: *Econometrics analysis*. Englewood cliffs: Prentice Hall; 2003.
49. Park SH, Goo JM, Jo CH: **Receiver operating characteristic (ROC) curve: Practical review for radiologists**. *Korean Journal of Radiology* 2004, **5**:11-18
50. R Development Core Team: *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2006.
51. Minakawa N, Seda P, Yan G: **Influence of host and larval habitat distribution on the abundance of African malaria vectors in western Kenya**. *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:32-8
52. Service MW: **Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal--the long and short of it**. *J Med Entomol* 1997, **34**:579-88
53. Langewiesche K: *Evaluation des risques d'émergence, d'installation et de diffusion du paludisme en France dans un contexte de changement global (environnement et climat): projet EDEN, volet sciences sociales*. Montpellier: 2006.
54. Raffy M, Tran A: **On the dynamics of flying insects populations controlled by large scale information**. *Theoretical Population Biology* 2005, **68**:91-104
55. Garrett-Jones C: **Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity**. *Nature* 1964, **204**:1173-1175

56. MacDonald G: **The analysis of equilibrium in malaria.** *Tropical diseases bulletin* 1952, **49**:813-829

Autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis?

Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer WM, Fontenille D,
Rogier C, Parola P.

Emerging Infectious diseases, 2007, 13, 1236-1238

Possible Autochthonous Malaria from Marseille to Minneapolis

Barbara Doudier,*† Hervé Bogreau,†
Aaron DeVries,‡ Nicolas Ponçon,§
William M Stauffer III,‡ Didier Fontenille,§
Christophe Rogier,† and Philippe Parola*†

We report 2 cases of *Plasmodium falciparum* malaria in southern France in a French woman and an American man of Togolese origin who reported no recent travel to malaria-endemic countries. Both infections occurred after a stay near Marseille, which raises the possibility of autochthonous transmission. Entomologic and genotypic investigations are described.

Endemic malaria was eradicated from France during the middle of the past century. However, *Plasmodium falciparum* malaria has recently been reported in several Western European countries in persons with no history of travel or blood transfusion (1–3). The most recent case of an autochthonous case of vivax malaria was reported in 2006 in Corsica, where susceptible vectors persist (4). In southern France, a favorite destination for tourists, the last malaria cases in patients without any recent travel in malaria-endemic areas were reported in 1994 and 2000 (5,6). We report 2 cases that occurred in southern France during early spring and early summer 2006.

The Cases

On June 30, 2006, a 41-year-old woman was admitted to the North University Hospital in Marseille, France, with a 12-day history of fever, chills, and diarrhea. She had never traveled outside Europe and had no history of blood transfusion or injection drug use. She was born in Marseille and had lived there her entire life. Her home residence was >20 km from the nearest airport and 10 km from the seaport. The case-patient did not work outside the home and did not report any recreational activities near either location. Her neighborhood included families of Comorian descent. Laboratory testing demonstrated low leukocyte and erythrocyte counts and thrombocytopenia. Peripheral blood

smear also demonstrated intra-erythrocytic forms consistent with *P. falciparum* infection with a parasitemia level of 0.1%. *P. falciparum* antigen was detected (Test NowICT; Fumouze, Levallois-Perret, France) and subsequently confirmed by PCR. Treatment comprised a 3-day regimen of quinine-clindamycin (7) and the case-patient recovered.

A 34-year-old man with tactile fever, bilateral frontal headache, and diarrhea was examined at a clinic in Minneapolis, Minnesota, on May 1, 2006. This man had lived in Togo, his birth country, all of his life until he emigrated to Minnesota in April 2000. Before becoming ill, he had traveled to Paris and from Paris by train to Marseille on April 7, 2006. Also during this timeframe, he reported a day trip to Camargue (Sorgues, France) where he sustained multiple mosquito bites. On April 24, 2006, he returned to Paris by train and then traveled by air a few hours later to Minneapolis. The first symptoms of malaria developed on April 27. His medical history included 4 episodes of malaria in childhood (none in the past decade) and no blood transfusions. On his last visit to Togo in December 2004, the case-patient had reported no chemoprophylaxis for malaria and had experienced no illness or intervening fevers since that time. Physical examination showed a moderately ill person with hematologic test results indicating thrombocytopenia and intra-erythrocytic ring forms consistent with *P. falciparum* malaria with a 3% parasitemia level. PCR testing confirmed *P. falciparum*. He was given 4 tablets of atovoquone-proguanil once a day for 3 days and recovered completely.

We conducted entomologic surveillance on July 26, 2006, in and around the first case-patient's residence in Marseille, 26 days after she became ill. No adult mosquitoes were found in the patient's home, on external staircases, in cellars located around the patient's home, or in surrounding buildings. Two pools of standing water were identified: a single pool (1 m², 2 cm deep) within a cellar in her building and another pool (10 m², 5 cm deep) located 20 m outside the building. No other containers or places that could collect water were identified. Several *Culex theileri* larvae were identified in the outdoor pool, but there was no evidence of *Anopheles* larvae.

DNA was extracted from blood samples by using the ENZA blood DNA kit according to the manufacturer's recommendations (Biofidal, Vaulx en Velin, France) and eluted in 100 µL of elution buffer per 250 µL of whole blood. Microsatellites loci (C4M79, Pf2689, TRAP, Pf2802, 7A11, and C4M69) were genotyped by fluorescent end-labeled PCR. Primers sequence, PCR conditions, and methods for genotyping have been described elsewhere (8,9). Drug-resistant mutations were genotyped. Genotyping of the 2 isolates demonstrated different alleles for the 6 microsatellite loci. We also observed different alleles from codon 59 (dihydrofolate reductase), 437 (dihydropteroate

*Hôpital Nord, Marseille, France; †Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Marseille, France; ‡University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA; §Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France

Table 1. Microsatellite loci genotyping and single nucleotide polymorphism in drug-resistant genes

	C4M79	Pf2689	Pf2802	7A11	C4M69	TRAP
Autochthonous 1*	190	87	141	88	378	132
Autochthonous 2†	221	95	138	99	364	149
3D7‡	221	87	138	94	364	137
W2‡	188	87	146	109	319	140

*Patient 1, *Plasmodium falciparum* diagnosed in France.

†Patient 2, *P. falciparum* diagnosed in the United States.

‡Two parasite strains (3D7 and W2) were genotyped as a positive control; water was used as a negative control.

synthase), and 76 (*P. falciparum* chloroquine-resistance transporter) (Tables 1, 2).

Conclusions

The World Health Organization defines introduced autochthonous malaria as that acquired by mosquito transmission from an imported case in an area where malaria is not a regular occurrence (10). In France, it is rare to find *P. falciparum* in a blood smear from patients who have not traveled to a malaria-endemic area in the previous 12 months. History of transfusion, organ transplantation, intravenous drug use, or mother-to-fetus transmission must also be excluded (10).

In Europe, some recent autochthonous malaria cases have been related to close proximity to airports and shipping ports receiving flights and water craft from malaria-endemic areas (5,6,11). Inadvertent carriage of infective *Anopheles* mosquitoes by airplane, ship, baggage, or bilge water may be responsible for these occurrences. Also, large populations of migrants from areas highly endemic for malaria (12) may act as human reservoirs for potential gametocyte carriers. Marseille has a large population of persons of Comorian origin, and most of the patients with imported malaria cases diagnosed in Marseille contracted the disease during a trip to the Comoros Islands (13,14). Our first case-patient's malaria may have been linked to her neighborhood, which included Comorian families who had recently traveled to Comoros. Despite the absence of *Anopheles* larvae near the first patient's neighborhood, local transmission cannot be excluded during the late spring and summer. Summer temperatures in Marseille induce a short *P. falciparum* sporogonic cycle (≈ 11 days at 28°C), which is compatible with mosquitoes' longevity at that time.

The Minnesota case-patient likely represents a second case of autochthonous malaria. First, this patient had no illness to suggest an untreated, active infection since his last trip to Togo. Second, even if he had been persistently infected with *P. falciparum* and was semi-immune, this case would still represent an extremely long incubation period (16 months). Third, onset of symptoms was acute, hematologic testing showed infection with a 3% parasitemia level, and the case-patient was moderately ill, which suggests a more recent exposure. Moreover, the genotype was monoallelic for each locus, indicating a clonal infection, which would be expected in areas of relatively low transmission frequency. In contrast, in areas of frequent endemic transmission, such as Togo, multiple allelic polymorphisms would be expected (9). Finally, genotyping demonstrated different clones of *P. falciparum*; this finding suggests potential multiple introductions, temporally related, of the parasite into the environment.

The last malaria focus in continental France occurred near the end of World War II in the Camargue region, which was visited by our second case-patient in April 2006. However, large *Anopheles* populations, including potential vectors such as *An. hyrcanus*, *An. melanoon*, and *An. Atroparus*, are still present from March to November (N. Ponçon and D. Fontenille, unpub. data) in southeastern France, generating an "anophelism without malaria" situation (15).

Migrants from malaria-endemic countries, climate, and *Anopheles* populations make southern France a favorable area for sporadic cases of autochthonous malaria in Europe. Given these 2 temporally related cases, clinicians should suspect malaria in patients with unexplained fevers who have recently traveled to areas of southern France.

Table 2. Two strains of *Plasmodium falciparum* obtained from 2 patients with no recent travel history in malaria-endemic areas*

	Dhfr					Dhps					Pfcr
	51	16	108	164	59	613	540	581	436	437	76
Autochthonous 1†	—	GCA	AAC	ATA	IGT	GCC	AAA	GCG	TCT	GCT	ACA
Autochthonous 2‡	ATT	GCA	AAC	ATA	CGT	GCC	AAA	GCG	TCT	GCT	AAA
3D7§	AAT	GCA	AGC	ATA	IGT	GCC	AAA	GCG	TCT	GCT	AAA
W2§	ATT	GCA	AAC	ATA	CGT	ICC	AAA	GCG	ITT	GCT	ACA

*Dhfr, dihydrofolate reductase gene; Dhps, dihydropteroate synthase; Pfcr, *P. falciparum* chloroquine-resistance transporter. Underlines indicate positions that are mutated.

†Patient 1, *P. falciparum* diagnosed in France.

‡Patient 2, *P. falciparum* diagnosed in the United States.

§Two parasite strains (3D7 and W2) were genotyped as a positive control; water was used as a negative control.

Acknowledgments

We are grateful to the Geo Sentinel Network, whose findings led to the connection of these 2 cases.

This work was partly supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique Régional 2003, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, and the French Armed Forces Health Service.

Dr Doudier is an infectious disease fellow in the University Hospital of Marseille, France. Her research interests include malaria and imported diseases.

References

- Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna G, et al. Malaria in Maremma, Italy. *Lancet*. 1998;351:1246-7.
- Kruger A, Rech A, Su XZ, Tannich E. Two cases of autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous *Anopheles plumbeus*. *Trop Med Int Health*. 2001;6:983-5.
- Kampen H, Maltezos E, Pagonaki M, Hunfeld KP, Maier WA, Seitz HM. Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: serological aspects. *Parasitol Res*. 2002;88:261-6.
- Armengaud A, Legros F, Quatresous I, Barre H, Valayer P, Fanton Y, et al. A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. *Eurosurveillance Weekly Releases* 2006, 11: E061116.3
- Delmont J, Brouqui P, Poullin P, Bourgeade A. Harbour-acquired *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 1994;344:330-1.
- Baixench MT, Suzzoni-Blatger J, Magnaval JF, Lareng MB, Larrouy G. Two cases of inexplicable autochthonous malaria in Toulouse, France. *Med Trop (Mars)*. 1998;58:62-4.
- Parola P, Ranque S, Badiaga S, Niang M, Blin O, Charbit JJ, et al. Controlled trial of 3-day quinine-clindamycin treatment versus 7-day quinine treatment for adult travelers with uncomplicated falciparum malaria imported from the tropics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:932-5.
- Nair S, Brockman A, Paiphun L, Nosten F, Anderson TJ. Rapid genotyping of loci involved in antifolate drug resistance in *Plasmodium falciparum* by primer extension. *Int J Parasitol*. 2002;32:852-8.
- Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi SB, Henry MC, et al. Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:953-9.
- WHO regional Office for Europe. From malaria control to elimination in the WHO European region 2006-2015. Copenhagen, 2006. [cited 2007 Mar 28]. Available from <http://www.euro.who.int/document/e88840.pdf>
- Mantel CF, Klose C, Scheurer S, Vogel R, Wesiraw AL, Bienzle U. *Plasmodium falciparum* malaria acquired in Berlin, Germany. *Lancet*. 1995;346:320-1.
- Stauffer WM, Newberry AM, Cartwright CP, Rosenblatt JE, Hanson KL, Sloan L, et al. Evaluation of malaria screening in newly arrived refugees to the United States by microscopy and rapid antigen capture enzyme assay. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:948-50.
- Parola P, Gazin P, Pradines B, Parzy D, Delmont J, Brouqui P. Marseilles: a surveillance site for malaria from Comoros Islands. *J Travel Med*. 2004;11:184-6.
- Parola P, Soula G, Gazin P, Foucault C, Delmont J, Brouqui P. Fever in travelers returning from tropical areas: prospective observational study of 613 cases hospitalized in Marseille, France, 1999-2003. *Travel Med Infect Dis*. 2006;4:61-70.
- Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D. Biology and dynamics of potential malaria vectors in southern France. *Malar J*. 2007 21;6:18.

Address for correspondence: Philippe Parola, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Nord, AP-HM, Chemin des Bourrelly, 13915 Marseille CEDEX, France; email: philippe.parola@medecine.univ-mrs.fr

Annexe 6 : Identification des espèces du complexe Maculipennis : spécimens capturés dans l'Ain

Collecteur	Point	Commune	Lieu	X	Y	Date	Méthode de capture	Type de milieu/gîte	An. messeae	An. maculipennis s.s.
EID-Ain Isère	RA 1	Bourget du lac	Château Thomas II			-	Capture sur homme		2	0
Rhône Savoie	RA 2	Ruffieux la loi	Rensudat			11/08/2006	Capture sur homme		1	0
note 1	RA 3	Culoz	M. Rousset			27/07/2006	Capture sur homme		-	-
	RA 4	Serrière en Chautagne	Mme Solann			18/07/2006	Capture sur homme		0	1
	RA 5	Vions	M. Hendry			25/07/2006	Capture sur homme		1	0
J Pradel	RA 6	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	04/07/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	5	0
note 1 et 2	RA 7	Peronnas	Réna3	822525	2129200	11/07/2006	Piège lumineux+CO2	Sous-bois	2	0
	RA 8	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	09/08/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	4	0
	RA 9	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	01/08/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	2	0
	RA 10	Péronnas	Réna3	822525	2129200	25/07/2006	Piège lumineux+CO2	Sous-bois	7	0
	RA 11	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	25/07/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	6	0
	RA 12	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	01/08/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	2	0
	RA 13	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	04/07/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	15	0
	RA 14	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	19/07/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	31	0
	RA 15	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	25/07/2006	Capture sur homme	Etang, clairière de forêt	16	0
	RA 16	Villars les Dombes	Parc des oiseaux	808815	2113165	25/07/2006	Capture sur homme	Bord d'étang	3	0
	RA 17	Villars les Dombes	La Conche	811105	2113130	10/08/2006	Capture sur homme	Bord d'étang	1	0
	RA 18	Villars les Dombes	Parc des oiseaux	808815	2113165	26/07/2006	Capture sur homme	Bord d'étang	6	0
	RA 19	Péronnas	Réna4	821910	2129140	09/08/2006	Piège lumineux+CO2	Etang entouré de bois	3	0
	RA 20	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	19/07/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	3	0
	RA 21	Château Gaillard	BVA 2	828098	2111985	09/08/2006	Piège lumineux+CO2	Fossé et basse en sous bois	-	0
	RA 22	Péronnas	Réna3	822525	2129200	01/08/2006	Piège lumineux+CO2	sous-bois	2	0
	RA 23	Château Gaillard	BVA 2	828098	2111985	01/08/2006	Piège lumineux+CO2	Fossé et basse en sous bois	1	0
	RA 24	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	09/08/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	2	0
	RA 25	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	19/07/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	5	0
	RA 26	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	11/07/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	5	0
	RA 27	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	11/07/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	1	0
	RA28	Villars les Dombes	La conche	811105	2113130	06/09/2006	Capture sur homme	Bord d'étang	3	0
	RA29	Péronnas	La réna 3	822525	2129200	15/06/2006	Piège lumineux+CO2	Sous-bois en bordure d'étang	5	0
	RA30	Château Gaillard	BVA2	828098	2111985	07/06/2006	Piège lumineux+CO2	Fossé et basse en sous bois	-	0
	RA31	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	14/06/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	4	0
	RA32	Péronnas	La réna 4	821910	2129140	06/09/2006	Piège lumineux+CO2	Etang entouré de bois	1	0
	RA34	Saint Paul de Varax	SPDV	817575	2126020	22/08/2006	Piège lumineux+CO2	Basses et fossés en sous bois	1	0

Collecteur	Point	Commune	Lieu	X	Y	Date	Méthode de capture	Type de gîte	An. messeae	An. maculipennis s.s.
J Pradel note 1 et 2	RA35	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	14/06/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	5	0
	RA36	Villars les Dombes	La conche	811105	2113130	14/06/2006	Piège lumineux+CO2	Bord d'étang	10	0
	RA37	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	04/07/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	8	0
	RA38	Villars les Dombes	Charnay	810935	2115265	04/07/2006	Piège lumineux+CO2	Etang, clairière de forêt	1	0
	RA40	Villars les Dombes	Parc des oiseaux	808815	2113165	18/10/2006	Prospection larvaire	Fossé en bordure d'étang	1	0
	RA41	Saint Nizier le Desert	Gîte 3	817665	2121505	08/09/2006	Prospection larvaire	Fossé entre 2 champs	3	5
	RA42	Villars les Dombes	Parc des oiseaux	808815	2113165	08/09/2006	Prospection larvaire	Fossé en bordure d'étang	5	0
	RA43	Villars les Dombes	Parc des oiseaux	808815	2113165	08/09/2006	Prospection larvaire	Fossé en bordure d'étang	15	0

Notes :

1 : EID-AIRS Démoustication, BP2, 73310 Chindrieux, www.eid-rhonealpes.com

2 : Équipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525), École nationale vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile, France

Les spécimens collectés et fournis par l'EID-AIRS et Jennifer Pradel n'ont pas été tous identifiés : un sous échantillonnage par point de capture a été réalisé et identifié. L'analyse des échantillons a été réalisée avec la participation de C. Toty (IRD, UR016) et Mathieu Boulesteix.

Annexe 7 : Identification des espèces du complexe Maculipennis : larves collectées en Alsace

Commune	Lieu	N	E	Date	Type de gîte	An. maculipennis s.s.	An. messeae
Pulversheim 68 840	Marais du Grossmatt	47°50.696	7°217.284	11/07/2006	Roselière à phragmites et carex	2	7
Rosenau 68 128	Petite Heid Nord	47°38.060	7°31.679	19/07/2006	Roselière à typha	0	9
Saint Louis 68 300	Untere Au, Saulaie Nord	47°37.870	7°29.706	19/07/2006	Roselière à phragmites	0	2
Saint Louis 68 300	Sud écluse 2, fossé est	47°37.112	7°32.894	19/07/2006	Roselière à phragmites et carex	0	10
Saint Louis 68 300	Heid Luzenière	47°37.626	7°32.192	26/07/2006	Scirpe	0	10
Bollwiller-feldkirch 68 540	Cité Alex, pré inondé	47°51.186	7°16.085	18/08/2006	Pré inondé, graminées et carex	11	0
Ungersheim		47°51.528	7°17.217	22/09/2006	Carex	2	8
Wittelsheim		47°46.799	7°13.365	22/09/2006	Carex et glycérie aquatique	10	0

Ces larves ont été collectées par **T Krebs, P Bindler et R Hava**, Brigade Verte, Service départemental de démoustication du Haut Rhin, 92 rue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 68360 Soultz, operationmoustiques@wanadoo.fr

Les spécimens collectés et fournis par la Brigade Verte n'ont pas été tous identifiés : un sous échantillonnage par point de capture a été réalisé et identifié. L'analyse des échantillons a été réalisée avec la participation de C. Toty (IRD, UR016) et Mathieu Boulesteix.

Annexe 8 : Identification des espèces du complexe Maculipennis : spécimens récoltés par

F. Schaffner

(Francis.Schaffner@access.uzh.ch. University of Zürich, Institute of parasitology,

Winterthurerstrasse 266a, CH-8057 Zürich, Switzerland)

L'analyse des échantillons a été réalisée avec la participation de C. Toty (IRD, UR016).

Département	Lieu	Référence	Milieu	N° identification LIN	Espèce
13	Arles, les Isles	1754		1754.1	<i>An. atroparvus</i>
				1754.2	<i>An. melanoon</i>
				1754.3	<i>An. melanoon</i>
				1754.4	<i>An. melanoon</i>
				1754.5	<i>An. melanoon</i>
				1754.6	<i>An. melanoon</i>
13	Arles, les Isles	1754		8 F.S.	<i>An. melanoon</i>
13	Arles, les Isles	1747		18 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				19 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				20 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				21 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				22 F.S.	<i>An. melanoon</i>
13	Arles, les Isles	1740		37 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				38 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				39 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				40 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				41 F.S.	<i>An. melanoon</i>
13	Arles, les Isles	1747		42 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				43 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				44 F.S.	<i>An. melanoon</i>
20		1894		24 F.S.	<i>An. labranchiae</i>
20		1917		34 F.S.	<i>An. labranchiae</i>
20		1898		1898	<i>An. labranchiae</i>
30	Saint Gilles	1762		1762.1	<i>An. melanoon</i>
				1762.2	<i>An. melanoon</i>
				1762.3	<i>An. melanoon</i>
				1762.4	<i>An. melanoon</i>
				1762.5	<i>An. melanoon</i>
30	Saint Gilles	1752		1752.1	<i>An. melanoon</i>
				1752.2	<i>An. melanoon</i>
30	Saint Gilles	1755		9 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				10 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				11 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				12 F.S.	<i>An. melanoon</i>
30	Aigues Mortes, Psalmody	1751		14 F.S.	<i>An. atroparvus</i>
				15 F.S.	<i>An. melanoon</i>
				16 F.S.	<i>An. melanoon</i>
30	Aigues Mortes, Saint Jean	1750		17 F.S.	<i>An. melanoon</i>
34	Sussargues	1759		1759	<i>An. melanoon</i>
34		1743		1743	<i>An. maculipennis s.s.</i>
34	Sussargues	1744		13 F.S.	-
34	Sussargues	1884		26 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				27 F.S.	<i>An. atroparvus</i>
				28 F.S.	-
				29 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				30 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
68		1760	Mare	1760.1	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				1760.2	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				1760.3	-
83		1753	Mare	1753.1	<i>An. melanoon</i>
				1753.2	<i>An. melanoon</i>
				1753.3	<i>An. atroparvus</i>
				1753.4	<i>An. melanoon</i>
				1753.5	<i>An. melanoon</i>
83		1852	Flaque	35 F.S.	-
		1853	Mare	36 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
	Le Mialet	1913	Creux de roche	3 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				4 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				5 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				6 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
	Causse Quercy	1880	Mare	23 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
		1918 ou 1919	Riviere	25 F.S.	-
		1918 ou 1919	Riviere	31 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
		1920	Riviere	32 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
		1921	Riviere	33 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
Grèce		1928		1 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>
				2 F.S.	<i>An. maculipennis s.s.</i>

**Population dynamics of pest mosquitoes
and potential malaria and West Nile virus vectors in
relation to climatic factors and human activities
in the Camargue, France.**

Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D

Medical and veterinary Entomology 21: 350-357

Population dynamics of pest mosquitoes and potential malaria and West Nile virus vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue, France

N. PONÇON¹, C. TOTY¹, G. L'AMBERT², G. LE GOFF¹,
C. BRENGUES¹, F. SCHAFFNER^{2,3} and D. FONTENILLE¹

¹Department of Health, Research Unit 016, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France, ²Department of Research and Development, Entente Interdépartementale pour la Démoustication (EID) Méditerranée, Montpellier, France and

³Institute of Parasitology, University of Zürich, Zürich, Switzerland

Abstract. The Camargue is an extensive wetland in the southeast of France, which is highly influenced by human activities. Large ponds, marshes and irrigated fields provide abundant potential breeding sites for mosquitoes. Mosquitoes, which are important in terms of the nuisance they cause to people and animals, the limitations they impose on tourism and their potential threat to human health. Several of the mosquito species present are potential vectors of malaria and West Nile virus. Therefore, the population dynamics of these species were monitored over an entire breeding season during March–October 2005. Mosquito populations were sampled in two study areas once every 2 weeks, using CDC light traps baited with CO₂. Sixteen species were collected. The majority (98.7%) of the catch were *Aedes caspius* (Pallas) (Diptera: Culicidae), *Culex modestus* (Ficalbi), *Culex pipiens* L. and *Anopheles hyrcanus* (Pallas). The population dynamics of these species varied considerably in relation to the species' biology, climatic conditions (rainfall, temperature and season), water management, implementation of mosquito control campaigns and landscape use.

Key words. *Aedes caspius*, *Anopheles hyrcanus*, *Culex modestus*, *Culex pipiens*, irrigation, population dynamics, France.

Introduction

The Camargue is an extensive wetland in the Rhone river delta, located in southern France. Most of its surface is covered by large ponds, marshes and irrigated fields. It is very famous for its beautiful landscapes, but also for an abundance of mosquitoes, which limits tourism in the area. In September 2005, for example, large populations of mosquitoes caused such a nuisance that tourists left the Camargue and schools were closed. Moreover, the potential impact of mosquitoes on human and animal health needs to be considered. Malaria was endemic in the Camargue until World War II, and, although there is currently no autochthonous transmission, potential vectors are still present in the Camargue, leading to an 'anophelism without

malaria' situation (Rodhain & Charmot, 1982; Ponçon *et al.*, 2007a). Moreover, three suspected autochthonous malaria cases were described recently in southern France, supporting the supposition that the region remains suitable for malaria transmission (Armengaud *et al.*, 2006; Doudier *et al.*, 2007). Several, although limited, West Nile virus (WNV) outbreaks have been reported since 1960 in this area, and associated vectors were reported recently in the Camargue (Zeller & Schuffenecker, 2004; Balenghien *et al.*, 2006).

The abundance of potential vectors in the Camargue has varied greatly over the last 70 years. Environmental changes, mainly caused by anthropogenic practices, have had an impact on inter-annual variations in the abundance of mosquitoes (Ponçon *et al.*, 2007b). The study presented here was undertaken

Correspondence: N. Ponçon, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: + 33 4 67 04 19 24; Fax: + 33 4 67 54 20 44; E-mail: poncon@mpl.ird.fr

to investigate the impact of environmental factors on the population dynamics of nuisance mosquito species and potential malaria and WNV vectors in the Camargue.

Materials and methods

Study area and location

The Camargue has a Mediterranean climate, characterized by warm, dry summers and mild, wet winters. Total annual rainfall range is usually 500–700 mm, with a maximum during October. The annual mean temperature is 14°C. Mean daily minimum and maximum temperatures range from 0°C to 10°C in winter and 15°C to 30°C in summer. The population dynamics of mosquitoes were investigated in two areas, representative of the main habitat types in the Camargue, Carbonnière and Marais du Vigueirat, which are ~ 45 km apart (Fig. 1). In these areas, marshes are flooded either naturally by rain or artificially by irrigation. The salinity and dryness of the soil have a strong influence on natural vegetation type within the marshes (Dervieux *et al.*, 2002).

'Carbonnière' (4°13'E, 43°35'N) consists of different types of marshes and some arable paddies. Human presence is clearly evident, both in the residential areas and in the extensive activities that take place, which include tourism, agriculture (including wine growing and cultivated reedbeds) and animal husbandry (cattle and horse breeding) and hunting, etc. Mosquito control is practised in Carbonnière, mainly against *Aedes caspius* (Pallas), an extreme nuisance species because of its aggressive daytime biting activity, using *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* and temephos.

'Marais du Vigueirat' (4°46'E, 43°30'N) is a nature reserve, which consists of similar biotopes to Carbonnière. However, on the western border there is a large area of cultivated rice paddies, which provide a greater area of wetland than would occur naturally, especially in the summer months. Human activities and impacts in the reserve are limited and no mosquito control is conducted.

Mosquito sampling

Adult mosquitoes were captured during March–October 2005. Miniature CDC (Centers for Disease Control) light traps (John W. Hock Co., Gainesville, FL, U.S.A.) (Sudia & Chamberlain, 1962) baited with CO₂ dry ice, in eight locations in each of the two areas, overnight (19.00–10.00 hours) for two consecutive nights, once every 2 weeks. Locations for the CDC light traps were chosen with the aim of sampling the range of biotopes that were accessible.

Processing of mosquitoes

Mosquitoes were identified using morphological characteristics (Schaffner *et al.*, 2001). When more than 100 females were captured per light trap, a random sample of 100 mosquitoes was

identified, and the number of mosquitoes per species was extrapolated. Specimens belonging to the *Anopheles maculipennis* Meigen complex were identified to species level using species-specific multiplex polymerase chain reaction (PCR) (Proft *et al.*, 1999). For each night, the numbers of mosquitoes per species, caught from the eight traps, were added together, and an average was calculated based on the two consecutive nights. Hence, the results show the mean number of mosquitoes collected in the area from the eight traps per night.

Environmental data

Climatic data, including daily mean temperature and rainfall, were provided by Météo France, the French national meteorological centre, and were recorded at two different stations: Aigues Mortes (4°12'E, 43°32'N), located 7 km from the Carbonnière site, and Tour du Vallat (4°41'E, 43°30'N), located 9 km from Marais du Vigueirat. Data concerning artificial or natural flooding, in rice fields or marshes, were recorded during mosquito collection periods and completed by surveys among local people.

Statistical analysis

Median abundance (the date dividing the first half of the total number of collected mosquitoes from the second half) has been calculated for every species in both location. Pearson correlations (linear correlation) were tested between the mean number of mosquitoes collected per species per night and climate data (the mean temperature and cumulative rainfall registered for the period 14–28 days before the date of mosquito sampling).

Results

A total of 670 614 mosquitoes belonging to 16 species were caught in both areas. Numbers of mosquitoes caught per study area and per species are reported in Table 1. Only two species from the *Anopheles maculipennis* complex were identified: *Anopheles melanoon* Hackett and *Anopheles atroparvus* Van Thiel. Of these, *Anopheles atroparvus* had been the main malaria vector in the past when malaria was endemic in the Camargue. Only four specimens were caught because the species is currently rare, indicating that its potential future role as a malaria vector is insignificant (Rioux, 1958; Ponçon *et al.*, 2007a). *Anopheles hyrcanus* (Pallas), which is currently the main potential malaria vector (Ponçon *et al.*, 2007a), was the third most abundant species. *Culex pipiens* L. and *Culex modestus* Ficalbi, the fourth and second most abundant species, respectively, are considered to be the main WNV vectors (Balenghien *et al.*, 2007). *Aedes caspius*, *Cx modestus*, *Cx pipiens* and *An. hyrcanus* were the main species collected, representing 98.7% of all mosquitoes collected.

The mean number of mosquitoes caught per night and the median abundance of *Cx modestus*, *Cx pipiens*, *An. hyrcanus*

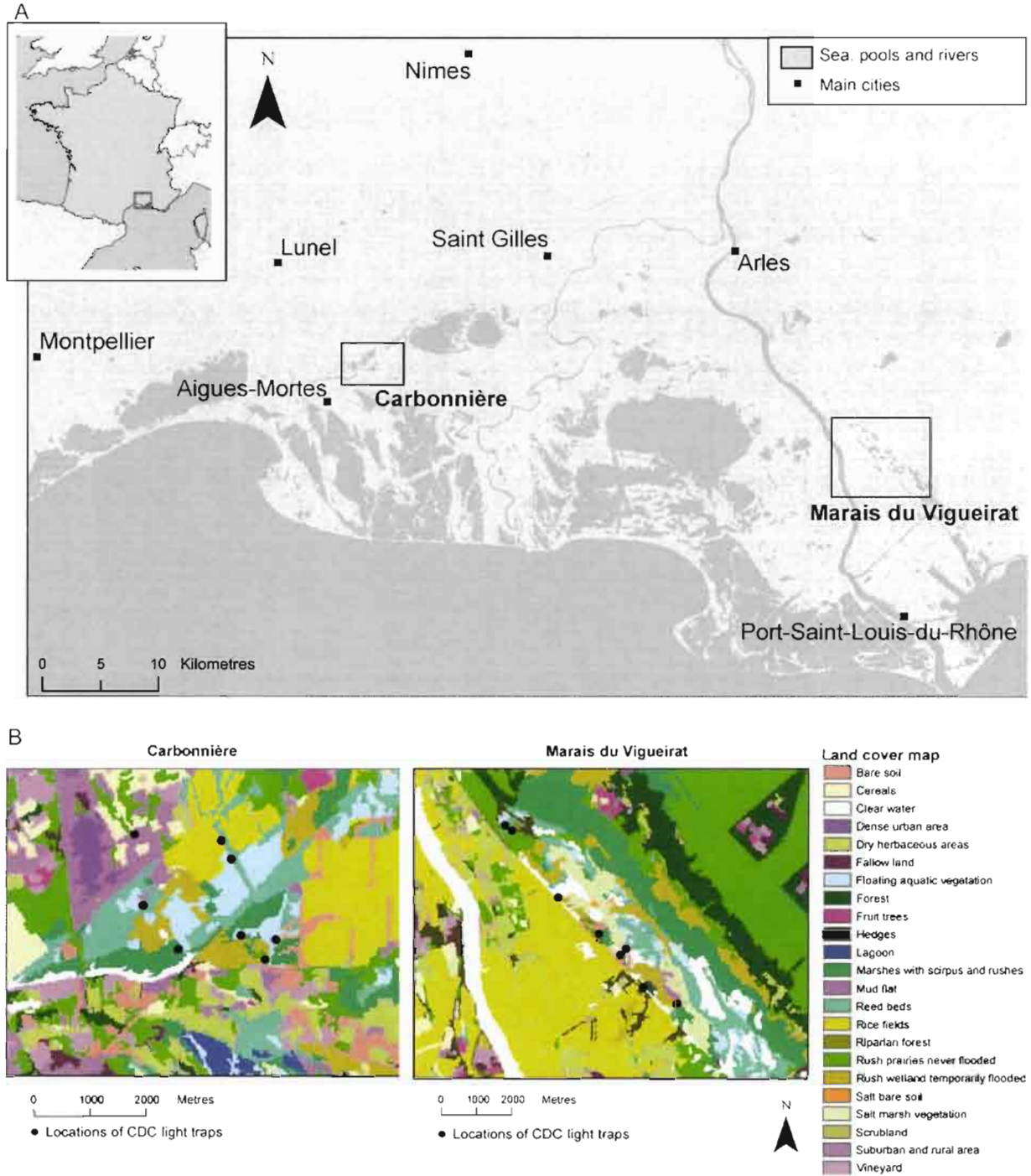


Fig. 1. Locations of (A) the Camargue and field study areas, and (B) CDC light traps in both field study areas, with descriptions of land cover.

and *Ae. caspius*, cumulative rainfall and mean temperature for the 2 weeks preceding the sampling day for each area are presented in Figs 2 and 3. Ponçon *et al.* (2007a) previously reported a detailed study of the population dynamics and biology of *Anopheles* populations in the Camargue. In the present study, the population dynamics of a range of species are presented to highlight differences between the patterns of catches of the

main mosquito species and the impact of different environmental factors.

The mean temperature and the mean catch size of *An. hyrcanus* were significantly correlated at Carbonnière ($P < 0.05$) (Fig. 2A). At Marais du Vigueirat, the mean catch size of *An. hyrcanus*, and *Cx pipiens* were significantly correlated with the mean temperature ($P < 0.001$; $P < 0.05$, respectively) (Fig. 2B)

Table 1. Total number of mosquitoes collected per species and area.

	Carbonnière (243 trap nights)	Marais du Vigueirat (239 trap nights)	Total
<i>An. (Ano.) algeriensis</i> Theobald	0	170	170
<i>An. (Ano.) atroparvus</i> Van Thiel	4	0	4
<i>An. (Ano.) hyrcanus</i> (Pallas)	5551	111 931	117 482
<i>An. (Ano.) melanoon</i> Hackett	232	1806	2038
<i>Ae. (Och.) caspius</i> (Pallas)	42 432	221 740	264 172
<i>Ae. (Och.) detritus</i> * (Haliday)	44	3936	3980
<i>Ae. (Fin.) geniculatus</i> (Olivier)	44	50	94
<i>Ae. (Rus.) rusticus</i> (Rossi)	0	21	21
<i>Ae. (Adm.) vexans</i> (Meigen)	45	1189	1234
<i>Cq. (Coq.) richiardii</i> (Ficalbi)	30	872	902
<i>Cs. (Cus.) subochrea</i> (Edwards)	0	51	51
<i>Cs. (Cus.) annulata</i> (Schrank)	5	42	47
<i>Cx (Bar.) modestus</i> Ficalbi	25 480	163 921	189 401
<i>Cx (Cux) pipiens</i> L.	29 739	60 975	90 714
<i>Cx (Cux) theileri</i> Theobald	0	3	3
<i>Ur. (Psc.) unguiculata</i> Edwards	8	293	301
Total	103 614	567 000	670 614

*and/or *Ae. (Och.) coluzzii*.

and the catch size of *Ae. caspius* and cumulative rainfall were significantly correlated at Marais du Vigueirat ($P < 0.01$) (Fig. 3B).

Some species were found only during a short period: *Aedes vexans* (Meigen) was present only during September–October, *Aedes detritus* s.l. (*Ae. detritus* (Haliday) and/or *Aedes coluzzii* Rioux, Guilvard & Pasteur) only in October, and *Coquillettidia richiardii* (Ficalbi) only at the beginning of the summer.

Discussion

Although the total numbers of mosquitoes collected in each area were very different, the four most abundant of the 16 species present were the same in both areas. The proportions of each species differed, however, depending on biotopes and human activities. The 12 remaining species represented only 1.3% of the total catches, which may be related to the rareness of particular breeding sites in the Camargue in 2005, or possibly to the species-specific efficacy of CDC light traps baited with CO₂ for sampling.

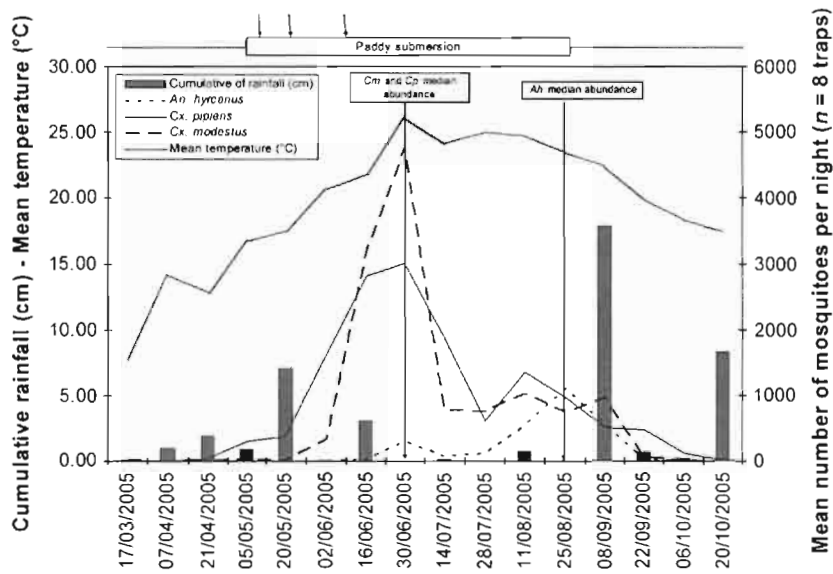
In general, the reproduction strategies of a particular genus of mosquitoes interacts differentially with environmental variables, such as short-term rainfall patterns and seasonal weather patterns. For example, the eggs of *Anopheles* and *Culex* cannot withstand desiccation, hence exceptionally dry periods depress the population until the availability of free-standing water enables surviving adult females to lay eggs successfully again, and populations slowly increase. In these genera, females overwinter in a state of diapause and the few surviving females lay eggs in spring when leaving the diapause state, which begin the next generation. By contrast, *Aedes* species lay eggs which resist desiccation and hatch whenever flooding occurs if eggs are not in a winter diapause state (Kettle, 1995). Consequently, the population density of *Aedes* responds more

quickly to successive periods of artificial or natural flooding and dryness.

Anopheles hyrcanus has recently been found to be increasing in abundance in the Camargue and to have relatively high human biting rates, which suggest that it is currently the only mosquito likely to play a role in malaria transmission (Ponçon *et al.*, 2007a,b). Moreover, it is currently responsible for malaria transmission in the north of Afghanistan (Onori *et al.*, 1975; Faulde *et al.*, 2007). During this study, the population dynamics of *An. hyrcanus* were similar at the two sites. Both populations increased in the middle of June, reached a peak near the middle of August and decreased dramatically from the middle of September. This pattern was related to the condition of the rice fields, as these are the main breeding sites for this species, especially from mid-June to the end of August (Rioux, 1958; Ponçon *et al.*, 2007a). During this period rice fields were continuously flooded and rice plants covered the surface of the water. Moreover, the increase in mean temperature throughout the summer increased the rate of larval development and hence the rate of population growth (Jetten & Takken, 1994). Before mid-June, the rice fields, which had been flooded since May, were drained two or three times and rice plants no longer covered the surface, thereby reducing the survivorship of *Anopheles* mosquitoes. None of the following factors – wind, temperature, humidity, intensity of moonlight, modification of *Anopheles* breeding sites or larviciding – were associated with the drop in *An. hyrcanus* density at the end of July in either area. Finally, water was removed from the paddies at the end of August, and, consequently, *An. hyrcanus* populations began decreasing soon afterwards.

Culex modestus is considered to be the main WNV vector, based on abundance, feeding behaviour (Mouchet *et al.*, 1970; Balenghien *et al.*, 2006), previous WNV isolations (Hannoun *et al.*, 1964) and recent experimental transmission (Balenghien *et al.*, 2007). It presented a similar pattern in both areas, being

A



B

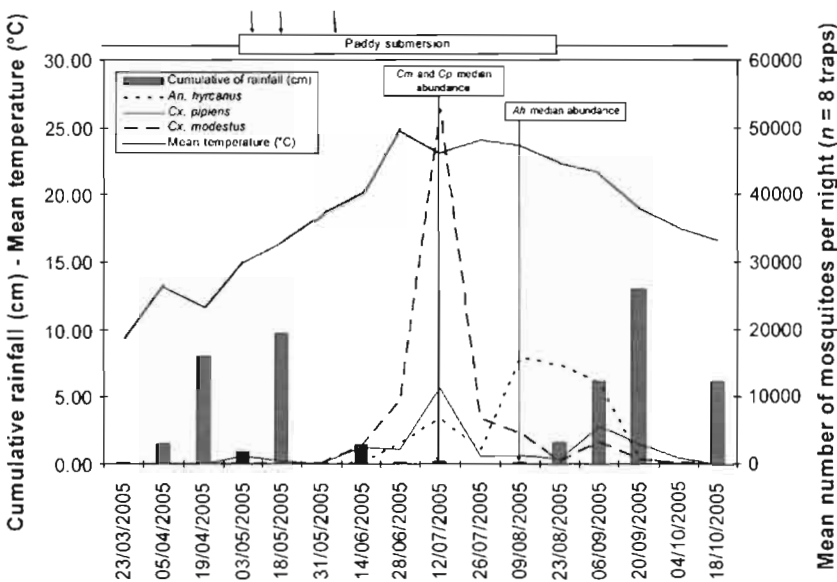


Fig. 2. Seasonal changes in trap catches of *Anopheles hyrcanus*, *Culex modestus* and *Culex pipiens*, and rainfall and temperatures at (A) Carbonnière and (B) Marais du Vigueirat during March–October 2005. Paddy submersion is indicated at the top of each figure, and arrows indicate periods when water was drained from the paddies. Mean number of mosquitoes collected from the eight traps per night is shown. Climate data represent cumulative rainfall and mean temperatures for the two weeks before the samples were collected. The median abundance indicates the date dividing the first half of the total number of collected mosquitoes from the second half. *Cm*, *Culex modestus*; *Cp*, *Culex pipiens*; *Ah*, *Anopheles hyrcanus*.

most abundant near the beginning of the summer. Reed marshes constituted the main natural breeding site for *Cx modestus* in spring and early summer 2005, when these areas were naturally flooded. Post-overwintering females initiated population growth in the spring, which rose with increasing air temperatures (Mouchet *et al.*, 1970; Ludwig *et al.*, 2005). In both areas, natural breeding sites dried up during the course of the summer, with little rainfall from late May to early September, which might explain the spectacular drop in *Cx modestus* catch sizes at the end of July and maintenance at a low level throughout August.

Although this species has been described as highly prolific in paddies in the Camargue (Mouchet *et al.*, 1970), the catch size was low in the late summer, especially compared with that of *An. hyrcanus*, the main paddy breeder. This may be related, at least in part, to the shorter distance over which *Cx modestus* adults could disperse from paddies to be captured by the CDC traps, which were located ~ 400 m from the paddies. Although September rains filled the reed marshes, unfavourable climatic autumn conditions did not allow huge populations to develop and females went into over-wintering diapause in October

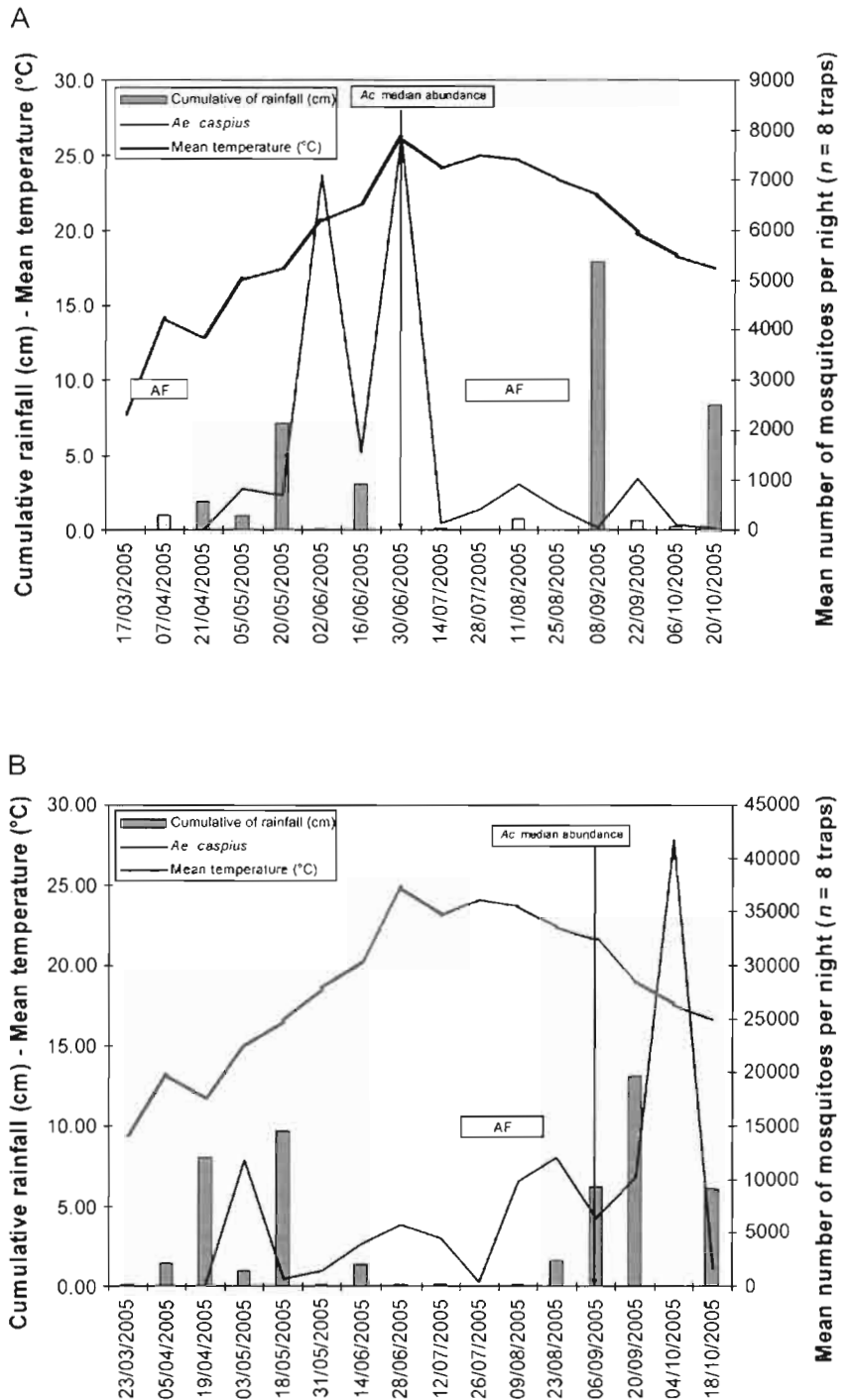


Fig. 3. Seasonal changes in trap catches of *Aedes caspius*, rainfall and temperatures at (A) Carbonnière and (B) Marais du Vigueirat during March–October 2005. Mean number of mosquitoes collected from the eight traps per night is shown for each day of capture. Climate data represent cumulative rainfall and mean temperatures for the two weeks before the samples were collected. AF, artificial flooding conducted in marshes. The median abundance indicates the date dividing the first half of the total number of collected mosquitoes from the second half. *Ac*, *Aedes caspius*.

(Mouchet *et al.*, 1970), and hence mosquito populations decreased.

Culex pipiens is also considered to be a WNV vector in the Camargue, based on abundance and feeding behaviour (Balenghien *et al.*, 2006). Moreover, although no WNV isolation has been reported from *Cx pipiens* in the Camargue, it has been found to be naturally infected with WNV in the Czech Republic (Hubalek *et al.*, 1998), Portugal (Esteves *et al.*, 2005),

Romania (Savage *et al.*, 1999) and Russia (Fyodorova *et al.*, 2006). The ability of this species to transmit WNV by blood-feeding has been established in several countries (Tahori *et al.*, 1955; Hurlbut, 1956; Turell *et al.*, 2000; Goddard *et al.*, 2002; Tiawsirisup *et al.*, 2005). In the present study, it presented nearly the same pattern as *Cx modestus*, although it has been reported to breed in every type of fresh-water breeding site, including marshes, natural and artificial pools, flooded pastures and rice

fields, and also in salt marshes (Rioux, 1958; Schaffner *et al.*, 2001).

The three main factors that appear to have determined the abundance of *Ae. caspius* in both areas in the Camargue in 2005 were: the characteristics of the breeding sites; the degree and repetition of flooding, and the extent of larvicide treatments. Previous studies have shown that *Ae. caspius* females lay eggs predominantly in the marshes in the Camargue, unlike in Italy, where rice cultivation is responsible for high populations of this nuisance species (Gabinaud *et al.*, 1975; Bellini *et al.*, 1994). It has been reported that during January–October, *Ae. caspius* females appear within 2 weeks following the natural or artificial flooding of breeding sites, corresponding to the time required to complete development from egg through all larval instars (Gabinaud *et al.*, 1975). In the study reported here, an increase in rainfall induced massive natural flooding in May and October and appears to have been responsible for the sharp increase in abundance of *Ae. caspius* at Marais du Vigueirat. Moreover, artificial flooding conducted near Marais du Vigueirat for human activities (e.g. hunting and nature conservation) was responsible for catches of *Ae. caspius* during August, as has been previously observed in the Camargue (Balenghien *et al.*, 2006).

Larviciding against *Ae. caspius* reduced catches dramatically. Catches of *Ae. caspius* at Carbonnière were low after artificial flooding conducted at the beginning of April, at the end of July and at the beginning of August. When significant amounts of rain occurred at Carbonnière in May and June, large flooded areas were successfully treated with larvicides by aircraft application. However, smaller breeding sites, which are less accessible but very abundant and productive, were not treated with larvicides. This resulted in significant local increases in the populations in June (F. Schaffner, personal communication). However, flooding of breeding sites following heavy rains in September did not result in increased numbers of *Ae. caspius*, even though no larviciding took place. It is likely that larvae were washed out by the inundations of water produced by heavy rain. Finally, the overall pattern of catches for *Ae. caspius*, as reflected by median abundance, differed between the two areas as a result of differences in the timing and impact of flooding and larvicidal treatments.

The population dynamics of nuisance mosquitoes and potential vectors of malaria and WNV in the Camargue clearly depend on many climatic factors (e.g. temperature, rainfall and season) and anthropogenic factors (e.g. water management in relation to landscape use and mosquito control activities). A clearer understanding of these dynamics is needed to enable us to model and predict changes in the entomological risk factors contributing to malaria or WNV disease transmission.

Acknowledgements

We thank Michel Babinot, Olivier Bardin, Didier Caire, Dominique Gindre, Nathalie Barras, Christophe Lagneau, Claire Duchet, Alexandre Carron, Charles Jeannin, Cécile Ivanès and Nicolas Sidos from Entente Interdépartementale pour la Démoustication for information and support; Annelise Tran from Cirad for geographic support; Jérémiah Petit from the Syndicat

Mixte pour la Protection et la Gestion de la Camargue Gardoise; Jean Laurent Lucchesi, Nathalie Hecker, Grégoire Masseur, Jean Baptiste Nogues and Mathieu Chambouleyron from the Marais du Vigueirat Association for hospitality and information; Cyrille Thomas from the French Rice Centre for information on paddies, and Alain Dervieux for his knowledge of the Camargue. This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement and was partially funded by the French Ministry of Agriculture and EU grant GOCE-2003-010284 EDEN (the paper is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0061 [<http://www.eden-fp6project.net/>]). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and can in no way be taken to reflect the views of the EU.

References

- Armengaud, A., Legros, F., Quatresous, I. et al. (2006) A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, November 2006. *EuroSurveillance*, **11**, E061116.3.
- Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P. & Bicout, D.J. (2006) Horse, bird, and human-seeking behaviour and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 936–946.
- Balenghien, T., Vazeille, M., Reiter, P., Schaffner, F., Zeller, H. & Bicout, D.J. (2007) Evidence of the laboratory vector competence of *Culex modestus* Ficalbi for West Nile virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **23**, 233–236.
- Bellini, R., Veronesi, R. & Rizzoli, M. (1994) Efficacy of various fish species (*Carassius auratus* [L.], *Cyprinus carpio* [L.], *Gambusia affinis* [Baird and Girard]) in the control of rice field mosquitoes in Northern Italy. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*, **19**, 87–99.
- Dervieux, A., Allard, P., Naizot, T. & Auda, Y. (2002) La Camargue est-elle un polder? Changement et stabilité dans le delta du Rhône depuis le début du XIX^{ème} siècle. *Équilibre et Ruptures dans les Écosystèmes durant les 20 derniers Millénaires en Europe de l'Ouest. Actes du colloque international de Besançon* (ed. by H. Richard and A. Vignot), vol. 1, pp. 315–329. Presses Universitaires Franc-Comtoises, Besançon.
- Doudier, B., Bogreau, H., DeVries, A. et al. (2007) Autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis? *Emerging Infectious Diseases*, **13**, 1236–1238.
- Esteves, A., Almeida, A.P., Galao, R.P. et al. (2005) West Nile virus in Southern Portugal, 2004. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **5**, 410–413.
- Faulde, M.K., Hoffmann, R., Fazilat, K.M. & Hoerauft, A. (2007) Malaria re-emergence in Northern Afghanistan. *Emerging Infectious Diseases*, **13**, 1402–1404.
- Fyodorova, M.V., Savage, H.M., Lopatina, J.V., Bulgakova, T.A., Ivanitsky, A.V., Platonova, O.V. & Platonov, A.E. (2006) Evaluation of potential West Nile virus vectors in Volgograd region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 552–563.
- Gabinaud, A., Croset, H., Cousserans, J. & Rioux, J.A. (1975) Ecologie de deux *Aedes halophiles*, *Aedes (O.) caspius* (Pallas, 1771) et *Aedes (O.) detritus* (Haliday, 1833) dans le midi de la France. I. Structure chorinque et critères d'identification des deux espèces au stade oeuf. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **50**, 123–130.
- Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K. & Scott, T.W. (2002) Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, **8**, 1385–1391.

- Hannoun, C., Panthier, R., Mouchet, J. & Eouzan, J.P. (1964) Isolement en France du virus West-Nile à partir de malades et du vecteur *Culex modestus* Ficalbi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Série D: Sciences Naturelles*, **259**, 4170–4172.
- Hubalek, Z., Halouzka, J., Juricova, Z. & Sebesta, O. (1998) First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virologica*, **42**, 119–120.
- Hurlbut, H.S. (1956) West Nile virus infection in arthropods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **5**, 76–85.
- Jetten, T.H. & Takken, W. (1994) *Anophelism without malaria in Europe. A review of the ecology and distribution of the genus Anopheles in Europe*. Landbouwwuniversiteit Wageningen (Wageningen Agricultural University), Wageningen, the Netherlands.
- Kettle, D.S. (1995) *Medical and Veterinary Entomology*, pp. 116–117. CAB International, Wallingford, U.K.
- Ludwig, A., Bicout, D.J., Chalvet-Monfray, K. & Sabatier, P. (2005) Modélisation de l'agressivité de *Culex modestus*, vecteur potentiel de West-Nile en Camargue, en fonction de données météorologiques. *Environnement, Risques et Santé*, **4**, 109–113.
- Mouchet, J., Rageau, J., Laumond, C. et al. (1970) Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. V. Le vecteur: *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae. *Annales de l'Institut Pasteur*, **118**, 839–855.
- Onori, E., Nushin, M.K., Cullen, J.E., Yakubi, G.H., Mohammed, K. & Christal, F.A. (1975) An epidemiological assessment of the residual effect of DDT on *Anopheles hyrcanus* s.l. and *An. pulcherrimus* (Theobald) in the North Eastern region of Afghanistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**, 236–242.
- Ponçon, N., Balenghien, T., Toty, C. et al. (2007b) Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and the West Nile virus vector *Culex modestus* Camargue (France). *Emerging Infectious Diseases*, in press.
- Ponçon, N., Toty, C., L'Ambert, G., Le Goff, G., Brengues, C., Schaffner, F. & Fontenille, D. (2007a) Biology and dynamics of potential malaria vectors in southern France. *Malaria Journal*, **6**, 18.
- Proft, J., Maier, W.A. & Kampen, H. (1999) Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitology Research*, **85**, 837–843.
- Rioux, J.A. (1958) *Les Culicidés du 'Midi' Méditerranéen*, Vol. 35. Editions Paul Lechevalier, Paris.
- Rodhain, F. & Charmot, G. (1982) Evaluation des risques de reprise de transmission du paludisme en France. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **12**, 231–236.
- Savage, H.M., Ceianu, C., Nicolescu, G. et al. (1999) Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61**, 600–611.
- Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J.-P., Rhaeim, A. & Brunhes, J. (2001) *The Mosquitoes of Europe*. IRD Éditions and EID Méditerranée, Paris, France.
- Sudia, W.D. & Chamberlain, R.W. (1962) Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquito News*, **22**, 126–129.
- Tahori, A.S., Sterk, V.V. & Goldblum, M. (1955) Studies on the dynamics of experimental transmission of West Nile virus by *Culex modestus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **4**, 1015–1027.
- Tiawsirisup, S., Platt, K.B., Evans, R.B. & Rowley, W.A. (2005) A comparison of West Nile virus transmission by *Ochlerotatus trivittatus* (COQ.), *Culex pipiens* (L.), and *Aedes albopictus* (Skuse). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **5**, 40–47.
- Turell, M.J., O'Guinn, M. & Oliver, J. (2000) Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**, 413–414.
- Zeller, H.G. & Schuffenecker, I. (2004) West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **23**, 147–156.

Accepted 14 September 2007

Etude des risques de ré-émergence du paludisme en Camargue

Résumé : Dans le contexte de changement global actuel, la question de la réapparition du paludisme se pose dans des zones indemnes comme l'Europe. Cette question est d'autant plus pertinente dans d'anciennes régions endémiques où les vecteurs sont toujours présents, comme la Camargue – sud-est de la France. Des suivis longitudinaux, locaux et régionaux, des populations adultes et larvaires de *Culicidae* ont déterminé la dynamique des 5 espèces *Anopheles* collectées en Camargue, parmi lesquelles, *An.hyrceanus* est le vecteur potentiel principal en raison de son abondance et de son anthropophilie. Des études génétiques ont clarifié son statut systématique, proposant ainsi la synonymie des espèces *An. hyrceanus* et *An. pseudopictus* en Camargue. L'analyse spatiale des données de terrain a permis de déterminer la distribution spatio-temporelle des adultes de cette espèce en fonction de marqueurs environnementaux générés par images satellites.

Parallèlement, les tests expérimentaux de la compétence vectorielle des *Anopheles* de Camargue ont démontré que, bien que très faible, celle-ci n'était pas nulle vis-à-vis des *Plasmodium falciparum* tropicaux.

Une étude rétrospective de l'évolution de l'abondance d'*An. hyrceanus* en lien avec l'évolution du milieu camarguais, dépendant du contexte politique, des contraintes environnementales, du progrès technique et des facteurs socio-économiques a permis d'expliquer l'évolution de son rôle vecteur, nul à l'époque endémique, à un rôle de vecteur potentiel majeur actuellement.

Enfin, le risque de ré-émergence du paludisme en Camargue a été analysé en spatialisant le risque entomologique à l'aide d'une approche probabiliste – approche innovante dans le domaine des maladies vectorielles – et en étudiant la distribution des *Plasmodium* importés en Camargue. Outre l'absence de risque de ré-émergence du paludisme en Camargue, ce travail souligne l'intérêt de la méthodologie mise en place, applicable à d'autres régions ou à d'autres systèmes vectoriels.

Mots clés : paludisme, *Anopheles*, *Anopheles hyrceanus*, Camargue, France, environnement, biologie, génétique, capacité vectorielle, compétence vectorielle, modélisation, approche probabiliste

Risks of malaria re-emergence in the Camargue

Abstract : Within the frame of global change currently occurring, the issue of malaria has been examined in current malaria-free areas such as Europe, and seems particularly of interest in former endemic areas where potential vectors are still abundant, such as the Camargue – South East France. Longitudinal field surveys of larvae and adult populations, conducted at the local and regional scale, determined the dynamics of the 5 *Anopheles* species identified in the Camargue. Among them, *An. hyrceanus* is the current main potential malaria vector, based on its abundance and human habit feeding behavior. Genetic study clarified its systematic position, suggesting that *An. hyrceanus* and *An. pseudopictus* would be synonymous forms in the Camargue. Spatial analysis of field data determined the spatio-temporal distribution of adult *An. hyrceanus*, in relation with environmental key factors calculated by remote sensing methodology. Moreover, susceptibility of French *Anopheles* was tested with tropical *P. falciparum* and showed that, while very low, it was not nil.

A retrospective study concerning the abundance of *An. hyrceanus* populations showed how this species has become the main potential malaria vector in the Camargue due to the influence of political context, environmental constraints, technical improvements and social and economical factors which have modified biotopes of the Camargue.

Finally, the risk of malaria resurgence was inferred by spatializing the entomological risk, which was based on an innovative probabilistic method, and by inferring the distribution of malaria imported cases. This work concluded on the absence of risk of malaria resurgence and emphasized the overall methodology which could be used in other areas or with others vector-borne diseases.

Keywords: malaria, *Anopheles*, *Anopheles hyrceanus*, Camargue, France, environment, biology, genetics, vectorial capacity, susceptibility, modelling, probabilistic method.

Discipline : Microbiologie/Parasitologie

Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), UR016, IRD, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5
