

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

En Biologie des interactions - Mécanismes des interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

École doctorale GAIA

Unité de recherche MIVEGEC

Interaction entre l'état physiologique du moustique et le
mode d'action des répulsifs chez les vecteurs de
pathogènes

Présentée par Margaux MULATIER

Le 20 novembre 2018

Sous la direction de Anna COHUET
et Laurent DORMONT

Devant le jury composé de

M Bruno LAPIED, Professeur, Université d'Angers

Mme Sylvia ANTON, Directrice de recherche, INRA Rennes / Agrocampus Ouest Angers

M Claudio LAZZARI, Professeur, Université de Tours

M Pierrick LABBE, Professeur, Université de Montpellier

M Fabrice CHANDRE, Chargé de recherche, IRD Montpellier

Mme Anna COHUET, Directrice de recherche, IRD Montpellier

M Laurent DORMONT, Maître de conférences, Université Paul Valéry Montpellier

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Examineur

Invité

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Ce projet de thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans toutes les personnes qui m'ont soutenue, autant au niveau professionnel que personnel et qui ont, à leur manière, apporté une pierre à l'édifice.

En premier lieu je tiens à remercier Anna Cohuet et Laurent Dormont, sans qui cette thèse n'aurait jamais été possible. Merci d'avoir été les meilleurs encadrants qu'un doctorant puisse espérer. Merci de m'avoir initiée au monde fabuleux des moustiques et de l'écologie chimique, merci d'avoir cru en moi, et d'avoir été toujours présents. Anna, merci de m'avoir fait découvrir ce magnifique pays qu'est la Côte d'Ivoire et merci pour ces midis piscine / attiéké. Merci également d'avoir mis de l'argent de côté pour me garder quelques mois supplémentaires « le temps que je trouve quelque chose ». Laurent, merci de m'avoir proposé des enseignements durant ma prolongation de contrat. Il n'est pas donné à tous les étudiants la chance d'avoir des directeurs aussi impliqués et généreux. Merci à tous les deux pour tout ce que vous m'avez apporté durant ces trois années. C'est avec beaucoup de tristesse que je quitterai cette équipe dans quelques mois.

Je tiens également à remercier chaleureusement la Team Cohuet : Angélique Porciani, David Carrasco, Adeline Valente et Louis Nadalin. Adeline, Louis, vous avez été les meilleurs des stagiaires, j'ai adoré travailler avec vous et j'espère que nous continuerons à nous donner des nouvelles. David, Angélique, merci pour tout : votre aide, votre présence, votre soutien sans faille même quand les manips ne marchent pas, nos discussions sur les stats, mais aussi votre amitié et votre gentillesse. Cette thèse n'aurait jamais été ce qu'elle est sans vous quatre.

Un grand merci à tous les membres du Vectopole : Bethsabee Scheid, Marie Rossignol, Carole Ginibre, Davy Jiolle et Sylvie Cornélie. Merci de m'avoir accueillie dans le laboratoire, merci de votre constante bonne humeur, c'est un plaisir de travailler avec une équipe aussi sympa et agréable. Merci aussi pour tous vos conseils, recommandations, et pour votre aide. Merci

également à Pascal Boutinaud et Nathalie Barougier pour votre gestion au top de l'élevage de lapins et pour votre disponibilité.

Merci à Cédric Pennetier et Fabrice Chandre d'avoir initié ce projet si intéressant, de l'avoir partagé avec moi et de m'avoir donné toutes les clés pour réussir mes expériences.

Je souhaite également remercier Frédéric Simard de m'avoir accueillie dans le laboratoire MIVEGEC, ainsi que les secrétaires et gestionnaires de missions, Katia Grucker et Valérie Delplanque pour leur patience à toute épreuve et leur incroyable gentillesse. Merci à Christine Chevillon de m'avoir encouragée et aidée de l'inscription au concours de l'école doctorale jusqu'à la préparation de la soutenance de thèse, et merci pour ta gestion et ton dynamisme dans l'équipe.

Je tiens également à remercier les responsables de la Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie au CEFÉ, Bruno Buatois et Nicolas Barthès, pour leur aide, leur disponibilité et leur gentillesse. Merci également à Benoit d'avoir partagé avec moi les joies et galères de l'EAG et d'avoir accepté de faire partie du projet moustiques.

Merci à tous les membres de l'IPR de Bouaké, en Côte d'Ivoire, pour leur aide et leur bienveillance. Merci beaucoup à Alphonsine Koffi d'avoir supervisé le projet et de nous avoir permis de réaliser les expériences, et à Soromane Camara pour sa gentillesse, sa rigueur et sa super gestion des infections expérimentales. Ludo, Cédric, merci de m'avoir accueillie et d'avoir fait que je me sente chez moi dès le début.

Merci à tous les copains de bureau du CEFÉ et de l'IRD : Nina, Gaël, Camille, Pias, Tazzio, Michèle, avec qui j'ai partagé les bons moments, les potins, les cafés, les apéros, mais aussi qui m'ont soutenue et que j'ai pu soutenir en retour dans les moments de galère. Merci aux personnes

qui se rajoutent à la team « midi » de l'IRD ou du CEFE pour faire de nos repas un moment de détente, riche en émotions et en débats : Morgane, Anaïs A, Anaïs B, Marion.

Un grand merci à mes proches de Montpellier. Pour commencer la coloc Leenhardt, ma famille d'adoption montpelliéraine. Merci de m'avoir supportée (moi et mon amour des plantes, du thé et des BDs) durant ces quatre ans et d'avoir participé à faire de Montpellier une expérience inoubliable. Un grand merci aux personnes qui comptent pour moi dans cette ville et qui rendent mon quotidien plus que génial: Emeline, Anthony, Camille, Pias, Guillaume, Sarah, Davy, Nina, Beths, Antoine, Éric, Daniel, Iris, Marine.

Un immense merci à ma famille : Papa, Maman, mes sœurs, mes neveux, merci de m'avoir toujours soutenue et d'avoir toujours cru en moi. Mes retours en Bretagne représentent une bouffée d'oxygène, et je repas toujours le cœur gros de vous avoir quittés, en me disant que j'ai une chance infinie de vous avoir à mes côtés. Merci d'être là, tout simplement.

Merci également aux copains bretons pour toutes ces années passées ensemble. Merci d'être toujours là et d'être restés vous-mêmes depuis toutes ces années. Enfin, merci aux personnes que je n'ai pas citées mais qui sont toujours à mes côtés, les copains français, espagnols, québécois, les cousins.

Pour clore ces remerciements, je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse : Sylvia Anton, Bruno Lapied, Pierrick Labbé, Claudio Lazzari. Claudio, merci de m'avoir accueillie si gentiment à Tours et fait visiter le laboratoire, de m'avoir fait rencontrer des gens intéressants, et de partager avec nous ton projet sur l'apprentissage et les répulsifs. Pour finir, un immense merci à Bruno Lapied pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse dans des délais aussi brefs.

Table des matières

Résumé	6
Abstract	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
Abréviations	12
Introduction	13
Chapitre I. Contexte général et problématique	18
1. Etat des lieux sur les maladies transmises par <i>Anopheles</i> et <i>Aedes</i>	18
2. Le comportement de recherche de l'hôte.....	23
A. L'activité spontanée.....	23
B. Le vol orienté.....	24
C. Le contact.....	24
D. La piqûre.....	25
3. Les stratégies de lutte contre les moustiques vecteurs.....	29
4. Limite d'utilisation des insecticides.....	30
5. Perspectives d'utilisation des répulsifs.....	34
6. Mode d'action du DEET.....	38
A. Effet sur le système olfactif.....	38
B. Effet sur le système gustatif.....	41
C. Effet au niveau neurologique.....	41
D. Conclusion - Mode d'action.....	42
7. Cibler les moustiques les plus à même de transmettre.....	44
8. Problématique.....	45
Chapitre II. Effet de l'expérience passée sur l'efficacité du DEET et de la perméthrine	47
Chapitre III. Effet de l'âge sur l'efficacité du DEET	93
Chapitre IV. Effet de l'infection sur l'efficacité du DEET et de la deltaméthrine	102
Chapitre V. Discussion	129

1.	Améliorer l'efficacité des méthodes de lutte : cibler les moustiques les plus à même de transmettre	130
2.	Efficacité à long-terme des outils de lutte antivectorielle.....	134
A.	Perméthrine.....	135
B.	DEET.....	137
C.	Bilan DEET / Perméthrine.....	140
3.	Défis techniques liés à l'imprégnation de moustiquaires avec du répulsif.....	141
4.	Limites méthodologiques.....	143
5.	Expériences complémentaires.....	144
A.	Comprendre le mode d'action du DEET.....	144
B.	Comprendre l'effet de l'âge sur la détection des odeurs et des répulsifs.....	146
C.	Comprendre l'effet de l'infection sur la détection des odeurs et des répulsifs.....	146
D.	Mettre en place un protocole d'apprentissage associatif et mesurer l'effet de l'infection sur l'apprentissage.....	147
E.	Déterminer l'effet des modifications physiologiques de l'hôte sur le comportement des moustiques.....	147
6.	Limite d'utilisation des répulsifs.....	148
7.	Ouverture.....	149
	Annexes	167

Résumé

Les maladies transmises par les moustiques représentent une menace permanente en santé publique. La principale mesure pour protéger les populations contre les piqûres infectieuses repose actuellement sur l'utilisation d'insecticides. Cependant, les moustiques ont développé des mécanismes de résistances à toutes les classes d'insecticides utilisées en lutte antivectorielle, mettant en péril leur efficacité et menaçant de voir augmenter les flambées épidémiques. Dans ce contexte, les répulsifs représentent un outil de choix pour réduire à la fois les nuisances provoquées par les moustiques et le risque d'infection. Parmi eux, le DEET (N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide) a prouvé une efficacité remarquable aussi bien lors d'expérimentations en laboratoire que sur le terrain. Malgré cela, le DEET et plus généralement les répulsifs ont toujours été utilisés de manière empirique, et les mécanismes qui entourent leur mode d'action et leur efficacité restent très mal connus. Le but de ce projet de thèse a été : i) de participer à l'évaluation du potentiel d'intégration du répulsif DEET dans la lutte antivectorielle, ii) de mesurer l'impact de paramètres physiologiques du moustique d'intérêt épidémiologique tels que l'expérience, l'âge et l'infection sur l'efficacité des méthodes de lutte, répulsifs et insecticides pyréthrinoïdes et iii) de quantifier l'impact des répulsifs et insecticides sur les traits d'histoire de vie des moustiques. Les expériences ont été réalisées sur les moustiques *Anopheles gambiae* et *Aedes albopictus*, respectivement vecteurs de l'agent du paludisme et d'arbovirus tels que le virus de la dengue ou du chikungunya. Nos résultats ont permis de démontrer que l'état physiologique du moustique influe sur l'efficacité des méthodes de lutte ; premièrement, les moustiques porteurs de la mutation *kdr* ayant obtenu un repas de sang en contact avec de la perméthrine ne sont plus irrités par ce composé lors d'une seconde exposition, dans les conditions testées et à une dose recommandée pour l'imprégnation de moustiquaires. Au contraire, un repas de sang obtenu en présence DEET n'a pas affecté l'efficacité de ce composé à inhiber un repas de sang à l'exposition suivante. Ensuite, le DEET s'est montré plus efficace chez les moustiques âgés que chez les moustiques jeunes, et les résultats sont similaires chez les deux espèces et indépendants du statut de résistance aux insecticides. D'autre part, l'efficacité de la deltaméthrine et du DEET ne sont pas modifiés lorsque les moustiques sont porteurs de formes infectieuses (sporozoïtes) ou non infectieuses (oocystes) du parasite *Plasmodium falciparum*. Cependant, une augmentation de la mortalité a été observée chez les femelles anophèles infectées au stade sporozoïtes de *P. falciparum* lors de certaines expérimentations, indépendamment du

traitement chimique de la moustiquaire, et suggère un coût de l'infection « réplikat-dépendant ». Enfin, le DEET génère un impact au long terme sur la fécondité et la fertilité des moustiques, effets qui ne sont pas observés dans notre protocole pour la perméthrine. Ces résultats donnent donc des pistes pour redéfinir les priorités dans les programmes de lutte, afin de cibler en premier lieu les moustiques les plus à même de transmettre des pathogènes. Ils soulignent également la nécessité de considérer à la fois l'état physiologique du moustique et l'impact sur le long terme des insecticides et répulsifs lors de l'évaluation des outils de lutte.

Abstract

Mosquito-borne diseases are a permanent public health threat. The main way to protect populations against infectious bites relies on the use of insecticides. However, mosquitoes have developed resistance mechanisms to all class of insecticides used in mosquito control, which undermine the efficacy of control tools and may increase the risk of explosive outbreaks. In this context, repellents are a promising tool for reducing both mosquito nuisance and infection risk. Among them, DEET (N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide) has proven great efficacy both in laboratory and field experiments. Despite this, DEET, and more generally repellents, are still used from an empirical way and their mode of action remains poorly understood. The aim of the present project was to: i) participate to the evaluation of the potential of integration of the DEET repellent in mosquito control, ii) measure the impact of mosquito physiological parameters of epidemiological relevance such as experience, age and infection, on the efficacy of repellents and insecticides, and iii) quantify the impact of repellents and insecticides on mosquito life-history traits. Experiments were performed on two vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes albopictus*, vectors of the malaria parasite and of arboviruses such as dengue and chikungunya, respectively. Our results allowed to demonstrate that mosquito physiological state influences the efficacy of control tools; first, after successfully obtaining a blood meal in contact with permethrin, mosquitoes carrying *kdr* mutation are no longer inhibited by this compound at the subsequent exposure, at the recommended dose for net impregnation and under our experimental design. On the contrary, a first blood meal obtained in presence of DEET does not affect its efficacy at the following exposure. Then, DEET appeared to be more efficient against old mosquitoes that against younger ones, and results are consistent in the two species, independently of the insecticide resistance status. Besides, efficacy of DEET and deltamethrin is not modified when mosquitoes carry infectious forms (sporozoites) or non-infectious forms (oocysts) of the parasite *Plasmodium falciparum*. However, an increased mortality was observed in anopheles when infected with transmissible stages of *P. falciparum* (i.e. sporozoites), independently of chemical exposure, which suggest a cost of infection and seems to be “replicate-dependent”. Finally, DEET produces a long-term impact on mosquito fecundity and fertility, which is not observed with permethrin under our protocol. These results give insights to redefine the priorities in mosquito control programs, in order to specifically targeting mosquitoes that are the most susceptible to transmit pathogens. These observations also underline the need for

considering both mosquito physiological state and the long-term impact of repellents and insecticides during the evaluation of control tools.

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1: Incidence du paludisme dans le monde, 2009.....	18
Figure 2: Incidence de la dengue dans le monde, 2010 - 2016.....	19
Figure 3: Distribution d' <i>Ae. albopictus</i> en Europe, janvier 2018.....	22
Figure 4: Séquence comportementale de la recherche d'hôte chez un moustique.....	26
Figure 5: A : organes olfactifs d'une femelle moustique. B : image en microscopie électronique des sensilles d'une antenne. C : tête d'une femelle moustique avec les neurones olfactifs. D : schéma d'une sensille comprenant les dendrites des neurones olfactifs, ainsi que les cellules auxiliaires.....	28
Figure 6: Différentes hypothèses proposées pour expliquer l'effet du DEET sur le système olfactif des moustiques.....	43
Figure 7: Stades d'intérêt épidémiologique.....	46

Chapitre II - Article 1

Figure 1: Ratios of the mean DEET gas chromatogram peak areas from forearms versus mosquito nets.	54
Figure 2: Proportion of blood-fed <i>An. gambiae</i> during the second blood meal for each treatment.....	54
Figure 3: Effect of the first exposure to DEET on life history traits ensuing the first exposure.....	55
Figure 4: Effect of the first exposure to DEET on life history traits ensuing the second exposure.....	56

Chapitre II - Article 2

Figure 1: Proportion of blood fed <i>An. gambiae</i> during the second blood meal for each treatment.....	87
Figure 2: Assay on the offspring: proportion of blood fed <i>An. gambiae</i> depending on their mother's treatment.....	88
Figure 3: Wing size measurement of <i>An. gambiae</i> after exposure to ethanol or permethrin - treated nets.....	89
Figure 4: Effect of the first exposure to permethrin on life history traits ensuing the first exposure.....	90
Figure 5: Effect of the first exposure to permethrin on life history traits ensuing the second exposure.....	91
Figure 6: Effect of the second exposure to permethrin on life history traits ensuing the second exposure.	92

Chapitre III

Figure 1: Percentage of blood-fed females after blood-feeding through ethanol or DEET-treated nets for the three age classes in <i>An. gambiae</i> (A) and <i>Ae. albopictus</i> (B).....	97
Fig. 2. Mean quantity of excreted haematin after blood feeding for the three age classes in <i>An. gambiae</i> (A) and <i>Ae. albopictus</i> (B).....	98

Fig. 3. Mosquito oviposition rate for the three age classes in <i>An. gambiae</i> (A) and <i>Ae. albopictus</i> (B)....	99
Fig. 4. Mean number of eggs laid per female for the three age classes in <i>An. gambiae</i> (A) and <i>Ae. albopictus</i> (B).....	99
Fig. 5. Mean survival for the three age classes in <i>An. gambiae</i> (A) and <i>Ae. albopictus</i> (B).....	100

Chapitre IV

Figure 1: Passing rate through deltamethrin-impregnated nets (A), blood-feeding (B) and mortality associated (C).....	127
Figure 2: Passing rate through DEET-impregnated nets (A), blood-feeding (B) and mortality (C).....	128

Chapitre V

Figure 8 : chromatogramme représentant l'émanation de composés volatils d'un bras en l'absence de DEET (rose) et en présence de DEET (noir).....	145
--	-----

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1 : Etudes de laboratoire et de terrain ayant démontré l'efficacité des répulsifs.....	37
--	----

Chapitre IV

Table 1: Generalized linear model output estimating the effect of mosquito infection and deltamethrin treatment on entry rate, blood-feeding and mortality associated.....	113
Table 2: Generalized linear model output estimating the effect of mosquito infection and DEET treatment on entry rate, blood-feeding and mortality associated.....	116

Chapitre V

Tableau 2 : Effet de la condition physiologique des moustiques sur l'efficacité des méthodes de lutte et sur la mortalité pendant la phase de recherche de repas de sang.....	130
Tableau 3 : Effet des deux expositions à la perméthrine sur son efficacité à inhiber le gorgement, et à provoquer des effets retardés sur les femelles <i>An. gambiae</i>	136
Tableau 4 : Effet des deux expositions à la perméthrine sur les traits d'histoire de vie des femelles <i>An. gambiae</i>	137
Tableau 5 : Effet des deux expositions au DEET sur son efficacité à inhiber le gorgement, et à provoquer des effets retardés sur les femelles <i>An. gambiae</i>	138
Tableau 6 : Effet des deux expositions au DEET sur les traits d'histoire de vie des femelles <i>An. gambiae</i>	139

Abréviations

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
DEET	N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide
IR3535	Butylacétylaminopropanoate d'éthyle
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
PMD	p-menthane-3,8-diol
KBR 3023	hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxylate
ITNs	Insecticide-treated nets
LLINs	Long-lasting insecticide-treated nets
IRS	Indoor-residual spraying
COV	Composé Organique Volatil
CO ₂	Dioxyde de carbone
OSN	Olfactory receptor neuron
ORN	Odorant receptor
Orco	Odorant Receptor CO-receptor
GRN	Gustatory receptor neuron
GR	Gustatory receptor
IR	Ionotropic receptor
IRco	Ionotropic Receptor CO-receptor
kdr	Mutation knockdown resistance
EIP	Extrinsic Incubation Period
LLAI	Late-Life Acting Intervention
EAG	Electroantennographie
SSR	Single-sensillum recording

Introduction

Les maladies transmises par les moustiques ont, depuis toujours, occupé une place prépondérante dans les sociétés humaines. L'histoire de l'Homme est intimement liée à celle du paludisme, qui menace aujourd'hui la moitié de la population mondiale et a encore été la cause de 445 000 décès dans le monde en 2016. En effet, le médecin grec Hippocrate avait déjà décrit, au IV^e siècle AV JC, des fièvres dont on sait maintenant qu'elles sont caractéristiques du paludisme (Yaya 2013). Les avancées technologiques ont permis de démontrer que le pharaon Toutânkhamon est très probablement décédé des suites de cette maladie dans les années 1330 avant notre ère (Roberts 2010). Cependant, le rôle des moustiques dans la transmission des pathogènes n'a été mis en évidence que bien plus tard. Ce n'est qu'en 1895 que le lien entre les moustiques et la transmission de l'agent causatif du paludisme, le *Plasmodium*, a été établi (Gachelin 2018). Il a fallu attendre la même période, 1856, pour que les moustiques soient mis en cause dans l'épidémie de fièvre jaune qui ravageait l'Amérique et l'Afrique depuis le XVII^e siècle (Le Médecin Généraliste 2014).

A la suite de ces découvertes, les progrès de la biologie et de la médecine ont permis d'identifier de nombreuses espèces de moustiques impliquées dans la transmission de pathogènes humains. Les moustiques du genre *Anopheles* sont responsables de la transmission de *Plasmodium* ; le genre *Aedes* est vecteur de nombreux arbovirus tels que le virus de la dengue, du chikungunya, et le virus Zika ; le genre *Culex* est responsable de la transmission du virus de la fièvre du Nil Occidental, ou encore de l'encéphalite japonaise. Ces découvertes ont donc été le point de départ de vastes programmes d'éradication, à la fois des pathogènes, mais aussi des moustiques qui les transmettent. Ces programmes de lutte, aujourd'hui sous la supervision de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ont permis de réduire considérablement le nombre de décès causés par les maladies transmises par les moustiques dans le monde. Cependant, les pathogènes et les moustiques présentent une plasticité remarquable, et parviennent toujours à s'adapter et à contrer les moyens de lutte qui sont mis en place pour les combattre. Par conséquent, les maladies qui affectaient nos ancêtres telles que le paludisme, la dengue, ou le chikungunya, continuent encore aujourd'hui de faire des ravages. Qui plus est, ces maladies renforcent les inégalités sociales car elles affectent majoritairement les pays en voie de développement, où les infrastructures et les systèmes de santé publique sont trop faibles pour permettre d'endiguer les épidémies et de protéger efficacement les populations. D'une manière inquiétante, la mondialisation, la dégradation de l'environnement par

les activités humaines et les changements globaux ont également permis le transport et l'établissement des moustiques vecteurs tels que le moustique tigre, *Aedes albopictus*, dans des régions où ils n'existaient pas auparavant, rendant ces régions favorables à la transmission de maladies.

Au jour d'aujourd'hui, il n'existe que peu de vaccins disponibles et abordables pour protéger les populations contre les pathogènes véhiculés par les moustiques. La lutte contre les maladies repose donc sur deux stratégies : la lutte médicamenteuse, et la lutte contre les moustiques vecteurs, appelée lutte antivectorielle. La lutte médicamenteuse se heurte d'une part à la difficulté à mettre en place des traitements spécifiques pour certains virus tels que la dengue, le chikungunya et la maladie à virus Zika (WHO 2017a, 2018a, 2018b), et d'autre part aux mécanismes de résistance aux médicaments qui sont maintenant répandus dans les populations de *Plasmodium* (Mita and Tanabe 2012). Dans ce contexte, la lutte antivectorielle représente la clé de voute des programmes de lutte contre les maladies transmises par les moustiques. Jusqu'ici, elle reposait essentiellement sur l'utilisation d'insecticides. Ceux de la famille des pyréthrinoïdes sont particulièrement utilisés, puisqu'ils servent à imprégner les moustiquaires qui sont ensuite distribuées massivement aux populations des pays les plus touchés. Cependant, les moustiques ont également démontré une remarquable adaptabilité en développant des mécanismes de résistances aux insecticides, et mettent donc en péril l'efficacité des programmes de lutte (Labbé et al. 2011, Churcher et al. 2016, Ranson and Lissenden 2016). Pour l'instant, l'offre disponible pour la protection individuelle contre les moustiques est tellement réduite que les insecticides continuent à être utilisés massivement, renforçant toujours plus la pression exercée sur les populations de moustiques, et favorisant donc le développement de mécanismes de résistances.

Dans le contexte actuel, il est donc devenu urgent à la fois d'élaborer de nouveaux outils, mais également de repenser la manière dont la lutte antivectorielle est appréhendée. Avec cet objectif, les répulsifs apparaissent comme des candidats de choix aussi bien pour réduire les nuisances occasionnées par les moustiques que pour participer à la protection des populations contre les maladies (Fradin and Day 2002, Naucke et al. 2007, Syafruddin et al. 2014). Bien que les répulsifs soient communément utilisés depuis longtemps, leur potentiel dans la lutte antivectorielle avait jusqu'ici été sous-évalué. En effet, les répulsifs ont toujours été utilisés de manière empirique, et les mécanismes qui entourent leur mode d'action et leur efficacité restent très mal compris.

Cependant, la conjoncture actuelle particulière, avec l'expansion globale des mécanismes de résistances aux insecticides, l'invasion d'*Ae. albopictus* (Benedict et al. 2008), ainsi que les changements globaux et la menace de réémergences de maladies tropicales (Fischer et al. 2011, Caminade et al. 2012, Ebi and Nealon 2016) accroît subitement les intérêts scientifiques et opérationnels des répulsifs. Ceux-ci offrent un réel potentiel pour protéger les populations aussi bien contre les moustiques diurnes, nocturnes, sensibles et résistants aux insecticides. De plus, comme ils ne tuent pas les moustiques, la pression de sélection qu'ils engendrent est considérablement réduite en comparaison avec les insecticides.

Dans la visée de développer des approches nouvelles et durables pour lutter contre les moustiques, une stratégie prometteuse consiste à cibler spécifiquement les moustiques les plus dangereux, c'est-à-dire les plus à risque de transmettre des pathogènes (Koella et al. 2009, Read et al. 2009). La séquence d'activité qui conduit un moustique à devenir infectieux est la suivante: prise d'un repas de sang contaminé et infectieux, période d'incubation du pathogène au sein du moustique, et passage des formes transmissibles dans les glandes salivaires du moustique. Plusieurs variables concernant le moustique vecteur sont impliquées dans cette séquence et représentent donc un intérêt épidémiologique considérable. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous en avons sélectionné trois qui ne sont que très rarement prises en compte dans l'évaluation des méthodes de lutte : **l'expérience**, **l'âge**, et **le statut infectieux**. Premièrement, la phase d'infection pour les moustiques passe systématiquement ou quasi-systématiquement selon les pathogènes par la prise d'un repas de sang, ce qui signifie qu'un moustique infectieux a au moins eu une expérience passée de repas de sang, ce repas l'ayant infecté. Or, il est admis que les moustiques présentent une plasticité comportementale, et que le comportement qu'ils adoptent à un moment donné dépend de leur expérience passée (Hii et al. 1991, Arredondo-Jimenez et al. 1992, Mwandawiro et al. 2000, McCall et al. 2001, Vantaux et al. 2014). On pourrait donc imaginer qu'un contact passé avec un outil de lutte antivectorielle puisse moduler l'efficacité du composé lors de l'exposition suivante. Dans ce sens, certaines études se sont penchées sur la question et laissent supposer, dans le cas des répulsifs, qu'une pré-exposition à du répulsif diminue son efficacité à l'exposition suivante, par des mécanismes d'apprentissage (Stanczyk et al. 2013, Vinauger et al. 2014). Il est donc envisageable que, si un moustique obtient un repas de sang malgré la présence de répulsif ou d'insecticide, ces composés pourraient, par la suite, être utilisés comme indices de la présence d'un hôte et leur efficacité pourrait s'en voir fortement diminuée.

Après avoir ingéré du sang contaminé, les femelles doivent survivre la période extrinsèque d'incubation (Extrinsic Incubation Period, EIP), qui correspond au temps avant que le pathogène atteigne les glandes salivaires, et donc que le moustique soit infectieux. Or dans le cas du paludisme, l'EIP est d'environ 10 jours (Vanderberg and Yoeli 2016, Vaughan, Hensley, et al. 2016, Vaughan, Noden, et al. 2016) alors que les femelles *Anopheles* ont montré une longévité en milieu naturel allant de 14 à 21 jours (Carnevale and Robert 2009). En ce qui concerne la dengue, l'EIP varie de 6 à 15 jours (WHO 2009a, Chan and Johansson 2012) alors que les *Aedes* sauvages vivent en moyenne de 10 à 39 jours (Delatte et al. 2009). Ces observations signifient que, au sein d'une population de moustiques vecteurs, seuls les moustiques âgés sont réellement impliqués dans l'infection de nouveaux hôtes. Ces moustiques devraient donc être ciblés précisément par les moyens de lutte, ce qui n'est malheureusement pas le cas. Par ailleurs, le processus de sénescence est accompagné de changements délétères pour les moustiques (Ryan et al. 2015), et certains auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'efficacité des insecticides chez les moustiques âgés, qu'ils soient sensibles ou résistants aux insecticides (Lines and Nassor 1991, Hodjati and Curtis 1999, Chouaibou et al. 2012).

Enfin, les moustiques infectieux, c'est-à-dire porteurs de formes transmissibles dans les glandes salivaires sont directement responsables de la transmission de pathogènes. Qui plus est, l'infection par *Plasmodium* a démontré altérer le comportement des moustiques : ces derniers sont plus agressifs et plus activés par les odeurs d'hôtes, ce qui engendre une augmentation des taux de contacts avec les hôtes et donc une augmentation de la transmission (Rossignol et al. 1984, 1986, Smallegange et al. 2013). Or, les moustiques infectieux ne sont jamais considérés lors de l'évaluation des méthodes de lutte. D'une manière inquiétante, certaines études laissent craindre que, dû à ce phénomène, les méthodes de lutte seraient moins efficaces contre les moustiques infectieux, qui sont pourtant précisément ceux qui devraient être ciblés (Thiévent et al. 2018).

Toutes ces considérations démontrent donc la nécessité de prendre en compte l'expérience des moustiques, leur âge ainsi que leur statut infectieux dans le déploiement de méthodes de lutte. La pertinence de cette stratégie vient à la fois du fait qu'elle permettrait de réduire drastiquement la transmission de pathogènes, mais également qu'elle pourrait se faire en exerçant une pression de sélection moindre sur les populations (Glunt et al. 2011). En effet, nous avons vu précédemment que les moustiques impliqués dans la transmission sont âgés, et donc ont réalisé la majeure partie

du processus de reproduction. Cibler précisément ces moustiques réduirait considérablement la pression de sélection induite sur les populations en comparaison avec des insecticides à action directe qui tuent tous les moustiques et de toutes classes d'âges. D'autre part et d'une manière intéressante, même si un outil de lutte ne tue pas les moustiques, ces derniers peuvent subir des effets retardés à la suite de l'exposition, qui diminuent leurs performances reproductives ou encore leurs chances de survie (Viana et al. 2016). Encore ici, l'action retardée n'est jamais mesurée au-delà de 24 heures dans les protocoles opérationnels habituels (WHO 2018c), et ces effets sur des moustiques âgés, expérimentés, ou infectieux ne sont donc pas connus.

Le but de ce travail de thèse était donc de déterminer dans quelle mesure il était possible d'explorer de nouvelles stratégies de lutte, plus pertinentes et plus durables, qui cibleraient les moustiques réellement impliqués dans la transmission et seraient efficaces sur le long terme. Plus particulièrement, ce travail s'est focalisé sur les répulsifs mais aussi sur les insecticides pyréthrinoïdes, car ces composés constituent un maillon clé dans la lutte contre les nuisances provoquées par les moustiques. Ce travail a donc évalué, chez *An. gambiae* et *Ae. albopictus*, l'impact de l'expérience des moustiques, de leur âge ainsi que de leur statut infectieux sur l'efficacité du répulsif DEET (N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide), mais également des insecticides perméthrine et deltaméthrine. De plus, ce projet a mesuré la capacité du DEET et de la perméthrine à induire des effets retardés sur les insectes, et donc leur potentiel d'utilisation à long terme. Nos résultats alimentent donc les données servant à définir les priorités des programmes de lutte, ainsi que la mise en place d'approches nouvelles et durables pour lutter contre les pathogènes transmis par les moustiques.

Chapitre I. Contexte général et problématique

1. Etat des lieux sur les maladies transmises par *Anopheles* et *Aedes*

Les maladies à transmission vectorielle représentent plus de 17 % des maladies infectieuses dans le monde, et provoquent plus d'un million de décès chaque année (WHO 2017b). Parmi les pathogènes responsables de ces maladies, un grand nombre est transmis par des moustiques vecteurs. Plus particulièrement, les genres *Anopheles* et *Aedes* jouent un rôle primordial dans la dynamique de nombreuses maladies vectorielles affectant les humains. En effet, les moustiques du genre *Anopheles* sont les vecteurs du paludisme, maladie parasitaire présente dans 97 pays et qui menace, encore aujourd'hui, 3.4 milliards de personnes (WHO 2017c) (Fig. 1). Cette maladie touche principalement l'Afrique Subsaharienne, où *Anopheles gambiae* est le principal vecteur.

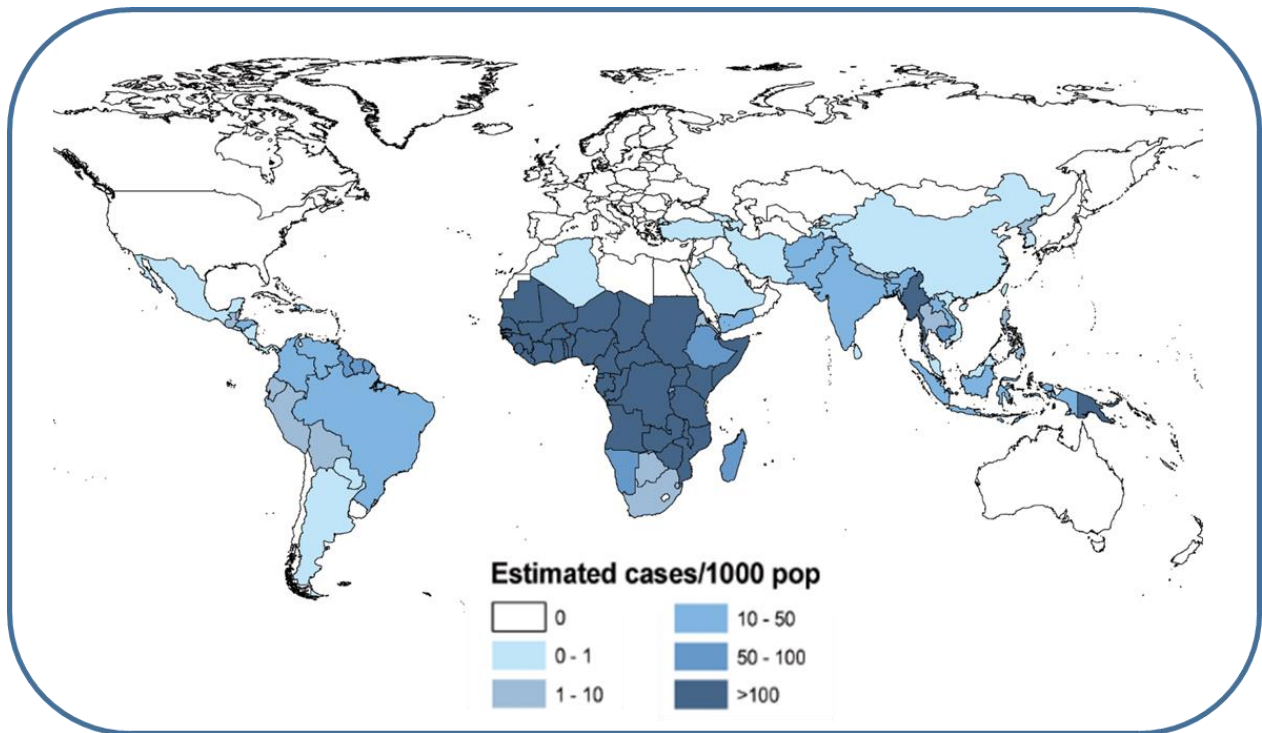


Figure 1 : Incidence du paludisme dans le monde, 2009 (source : Cibulskis et al, 2011)

Le genre *Aedes* est responsable de la transmission de nombreux virus appelés arbovirus. Par exemple, le virus de la fièvre jaune a été la cause d'épidémies historiques en Europe et en Amérique à partir du XVII^e siècle. Le virus de la dengue est, quant à lui, présent dans 128 pays et menace 2.5 milliards de personnes (Gubler 2012) (Fig. 2). Les *Aedes* sont également vecteurs du virus du chikungunya, présent dans 60 pays où il cause régulièrement des flambées épidémiques. Enfin, le virus Zika a été particulièrement étudié ces dernières années, puisqu'il a été responsable de plusieurs épidémies, notamment en 2015 au Brésil où on estime entre 440 000 à 1 500 000 le nombre d'infections (Institut Pasteur 2016). Parmi les virus cités, la dengue et la fièvre jaune sont principalement transmis par *Aedes aegypti*. Cependant, *Aedes albopictus*, qui connaît actuellement une expansion remarquable de son aire de répartition géographique, est compétent pour les virus de la dengue, du chikungunya et le virus Zika, au même titre qu'*Ae. aegypti* (Li et al. 2012, Wong et al. 2013, Chouin-carneiro et al. 2016), et prend localement un rôle prépondérant dans la transmission.

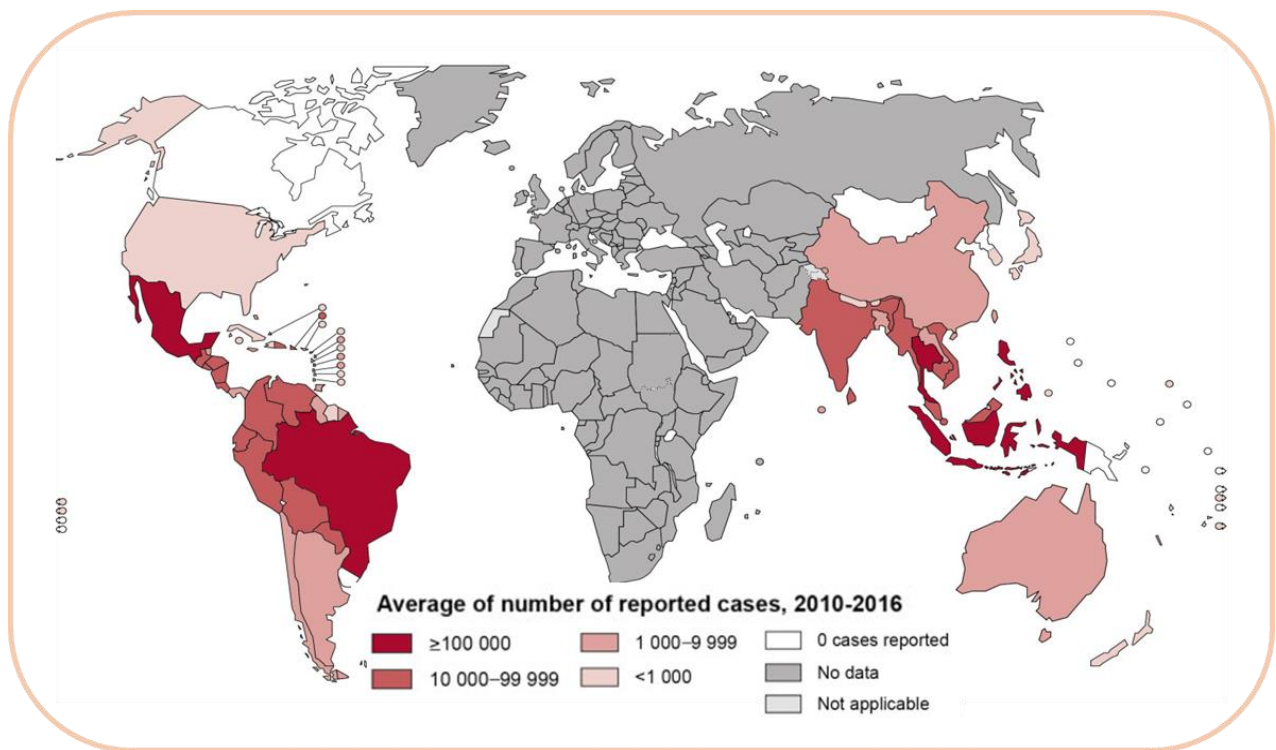


Figure 2 : Incidence de la dengue dans le monde, 2010 - 2016 (source : OMS)

Ces maladies affectent principalement les pays en voie de développement, où les infrastructures et les systèmes de santé publique sont trop faibles pour permettre d'endiguer les épidémies et de protéger efficacement les populations. En plus de générer un impact dramatique sur la santé des populations, ces maladies causent également un lourd tribut économique aux pays concernés. Les conséquences directes sont les coûts exorbitants pour les populations pour l'accès aux soins, et pour les gouvernements dans les dépenses publiques pour la santé. Par exemple, des études ont estimé que le paludisme est responsable d'un retard de développement de 1.3 % par an dans les pays africains les plus touchés. Dans ces pays, cette maladie représenterait plus de 40 % des dépenses publiques en matière de santé (WHO 2010). En ce qui concerne la dengue, une analyse systématique a évalué à 8.9 milliards de dollars le coût mondial annuel de cette maladie (Shepard et al. 2016). A titre d'exemple, au Porto Rico, le coût annuel de la dengue a été évalué à 46 millions de dollars entre 2002 et 2010 (Halasa et al. 2012). En Thaïlande, il était de 31.5 à 51.5 millions de dollars en 2002, dont 45 % étaient payés directement par les patients (Gubler 2002). Associés à ces coûts économiques, de nombreux coûts indirects affectent tous les niveaux de la société. Par exemple, ont été démontrés :

- Un coût économique lié à la perte de productivité, occasionnée par l'absentéisme au travail (Barofsky et al. 2010, WHO 2010).
- Un coût éducationnel : les enfants sujets à des maladies chroniques sont contraints de manquer régulièrement l'école, et ne reçoivent donc pas la formation qu'ils devraient (Barofsky et al. 2010, Thuillilez et al. 2011, Burlando 2012).
- Un coût à long-terme sur la santé des populations : un impact à long-terme des maladies chroniques sur la cognition des enfants a été démontré (Fernando et al. 2010, Thuillilez et al. 2011, Chen et al. 2016).
- Des coûts indirects sur l'économie : les pays concernés ne sont pas attractifs au niveau du tourisme et les investisseurs étrangers sont réticents à venir s'y installer (WHO 2010).

Ces facteurs sont tous interdépendants et forment une spirale qui renforce le retard de développement des pays concernés, empêchant les populations de sortir de la pauvreté, et renforçant toujours plus les inégalités sociales.

En plus de la pression sanitaire constante qu'engendrent ces maladies sur les populations, le risque d'émergence et de réémergence des maladies vectorielles est en augmentation, et ce dans de nombreux pays. En effet, la mondialisation, l'accroissement de la population humaine, la perturbation des habitats par les activités anthropiques ainsi que le changement climatique sont autant de facteurs qui ont modifié durablement l'équilibre des écosystèmes et ainsi favorisé la propagation des moustiques vecteurs (Gubler 2002, Murray et al. 2013, Roche et al. 2015, Ebi and Nealon 2016). En conséquence de cela, on estime que l'incidence de la dengue a été multipliée par 30 au cours des 50 dernières années (WHO 2018d). Un exemple symbolique de l'impact des activités anthropiques sur l'émergence de maladies est le cas du moustique tigre, *Ae. albopictus*. Originnaire d'Asie du Sud-Est et introduite en Europe en 1979, cette espèce a ensuite été recensée en Italie en 1990 où elle provoque depuis de régulières flambées épidémiques de chikungunya (Manica et al. 2017). Cette espèce s'est incroyablement adaptée aux milieux tempérés urbanisés (Benedict et al. 2008), et est maintenant établie dans toute l'Europe, avec des foyers d'infestation majeurs sur le pourtour méditerranéen (Fig. 3). En France métropolitaine, l'espèce est installée depuis 1999, et les premiers cas de dengue et de chikungunya ont été observés en 2010 à Fréjus et en 2014 à Montpellier. En 2017, 17 cas autochtones de chikungunya ont été confirmés en France, tous dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (Fournet et al. 2018). *Ae. albopictus* représente une menace sanitaire pour de nombreux pays qui risquent de subir des émergences et réémergences d'arboviroses (Benedict et al. 2008, Caminade et al. 2017). Qui plus est, la tendance prévue concernant le réchauffement climatique risque de favoriser la propagation de l'espèce selon un gradient Sud-Nord (Fischer et al. 2011, Caminade et al. 2012). *Ae. albopictus* est un cas emblématique mais n'est pas la seule espèce à représenter une menace sanitaire. Par exemple, *Ae. koreicus* a été introduit en Europe en 2011, et est également en train d'étendre son aire de répartition. Il a été démontré comme étant plus résistant au froid qu'*Ae. albopictus*, et est compétent pour le virus de l'encéphalite japonaise (Capelli et al. 2011, Versteirt et al. 2012).

Toutes ces observations soulignent donc la nécessité de lutter contre la propagation des pathogènes responsables de ces maladies, et d'arriver à maintenir la transmission sous des seuils acceptables. En l'absence de vaccin efficace et accessible contre la plupart de ces pathogènes, deux stratégies sont mises en place en parallèle pour réduire la transmission: la lutte médicamenteuse, et la lutte contre les vecteurs. Cependant, la lutte médicamenteuse se heurte à la difficulté de mettre en place des traitements spécifiques pour la dengue, le chikungunya et la maladie à virus Zika (WHO 2017a,

2018a, 2018b). De plus, dans le cas du paludisme, les parasites ont développé des mécanismes de résistance aux dérivés de l'artémisinine, menaçant l'efficacité des principaux traitements actuellement recommandés (Mita and Tanabe 2012). Par conséquent, la lutte antivectorielle est un élément clé dans la lutte contre ces maladies. Pour être efficace, elle doit cependant être basée sur une connaissance approfondie de la biologie des acteurs de la transmission, afin d'appréhender toutes les étapes qui régissent la transmission de pathogènes. Dans ce contexte, le comportement de recherche d'hôte présente un intérêt épidémiologique considérable.

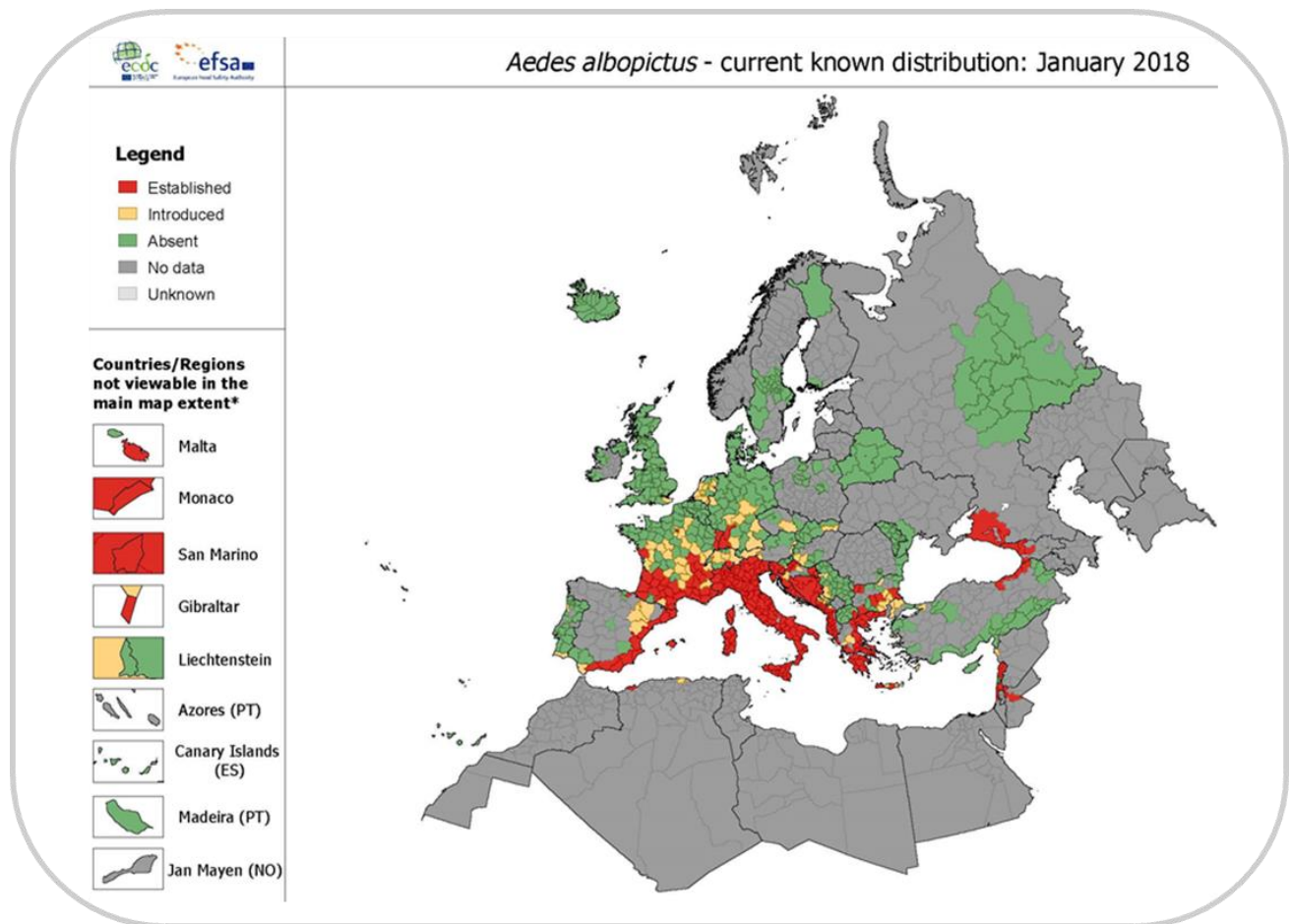


Figure 3 : Distribution d'*Ae. albopictus* en Europe, janvier 2018 (source : ecdc)

2. Le comportement de recherche de l'hôte

Le comportement de recherche d'hôte est un des aspects principaux de la biologie d'une moustique femelle. En effet, l'obtention d'un repas de sang, après accouplement avec un mâle, est indispensable au développement des œufs, et donc à la genèse d'une nouvelle génération de moustiques. Le choix de l'hôte chez la femelle est régi par des processus complexes. Premièrement, les femelles peuvent présenter une préférence intrinsèque pour une espèce d'hôtes. Par exemple, *An. gambiae* est hautement anthropophile (Takken and Verhulst 2013) alors que *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* préfèrent les humains mais se montrent opportunistes et peuvent se nourrir sur une large variété d'hôtes (Savage et al. 1993, Scott et al. 1993, Harrington et al. 2001, Ponlawat and Harrington 2005, Faraji et al. 2014). Ensuite, au sein d'une population d'hôtes de la même espèce, certains individus vont être préférés par les femelles, de sorte que la distribution des piqûres est non aléatoire et non homogène (Dye and Hasibeder 1986). On sait en effet que, concernant *C. quinquefasciatus*, plus de 55 % des piqûres sont reçues par moins de 20 % de la population (Michael et al. 2001). En plus de cette variation interindividuelle, l'attractivité est dépendante de l'état physiologique de l'hôte. Des études ont en effet démontré que les femmes enceintes et les personnes ayant consommé de la bière dans les dernières heures sont plus attractives pour *An. gambiae* que les personnes témoins (Lindsay et al. 2000, Ansell et al. 2002, Lefèvre et al. 2010). De plus, une composante génétique à l'attractivité a été mise en évidence (Fernández-Grandon et al. 2015). Le choix de l'hôte est donc loin d'être un processus passif ; il découle d'une séquence comportementale, où le moustique perçoit, intègre et répond à des stimuli de nature variée. La séquence comportementale de recherche d'hôte est résumée en figure 4, et décrite ci-dessous (Clements 1999, Cardé and Gibson 2010).

A. L'activité spontanée

L'activité spontanée est la première étape de la recherche d'un hôte, et consiste en la détection de composés volatils émanant de ce dernier. Elle ne dépend pas de facteurs internes à l'hôte, mais est régulée de façon endogène selon le rythme circadien et l'état physiologique de la femelle moustique. Ce comportement a lieu préférentiellement la nuit et à l'intérieur des habitations chez les *Anopheles* (Lundwall et al. 2005, Carnevale and Robert 2009) et en extérieur pendant les

premières et dernières heures du jour chez les *Aedes* (Cardé and Gibson 2010). Deux stratégies existent chez les insectes hématophages :

- Passive (stratégie « sit and wait »): l'insecte reste immobile et attend de rencontrer un signal indiquant la présence d'un hôte. Cette stratégie est beaucoup retrouvée chez les insectes diurnes comme *Ae. aegypti*, qui peut se servir de signaux visuels pour localiser son hôte (Cardé and Gibson 2010).
- Active (stratégie « search »): l'insecte effectue un vol de recherche, contre le vent, souvent en zigzag, dans le but de rencontrer un bouquet d'odeurs attractif. Cette stratégie a été observée chez *An. gambiae* et implique un comportement de klinokinèse, où l'insecte s'oriente grâce à un stimulus, et se dirige vers l'endroit où l'intensité de ce stimulus est la plus forte (Cardé and Gibson 2010).

Quand une femelle a perçu un bouquet d'odeurs provenant de l'hôte, elle va modifier son comportement et passer en vol orienté.

B. Le vol orienté

Une fois que la femelle est activée par les composés volatils qui se dégagent d'un hôte, elle change de trajectoire pour se diriger vers celui-ci. Durant cette étape, elle s'oriente grâce à des facteurs distaux : le CO₂ expiré par l'hôte (Gillies 1980), ainsi que les odeurs émises, plus précisément les composés organiques volatils (COVs) qui se dégagent dans l'environnement proche de la peau (Takken and Verhulst 2013). De nombreux COVs ont été identifiés comme actifs pour la femelle moustique (Acree et al. 1968, Bosch et al. 2000, Braks et al. 2001). Parmi ceux-ci, l'acide lactique (Steib et al. 2001, Dekker et al. 2002), les composés aliphatiques (Kwon et al. 2006), les acides carboxyliques (Puri et al. 2006), ou encore l'ammoniac (Geier et al. 1999) sont décrits comme jouant un rôle crucial dans l'attractivité d'un hôte. Durant cette phase, les signaux visuels jouent également un rôle important (Hawkes and Gibson 2016).

C. Le contact

Après s'être rapprochée suffisamment de l'hôte, la femelle va rechercher une zone adéquate à la surface de l'hôte pour effectuer son repas de sang. Durant cette période, elle est soumise aux

comportements défensifs, et le risque de mortalité est donc élevé. Au cours de la phase de contact, la femelle s'oriente grâce à des signaux proximaux, comme la température et l'humidité de l'hôte (Carnevale and Robert 2009, Takken and Verhulst 2013). Encore ici, les moustiques adoptent un comportement de klinokinèse, où ils remontent le gradient de température jusqu'au corps de l'hôte. Les moustiques ont des récepteurs spécialisés très sensibles pour détecter ces stimuli ; *Ae. aegypti* est ainsi capable de percevoir des variations de température de 0.2 °C. Encore ici, les signaux visuels jouent également un rôle important (Cardé and Gibson 2010).

D. La piqûre

Après avoir sélectionné la zone à piquer, la femelle va se poser sur la peau de l'hôte. Elle effectue ensuite une nouvelle évaluation de la qualité de celui-ci à partir des récepteurs gustatifs se trouvant dans les pattes et au niveau du proboscis (Clements 1999). Ces derniers détectent les composés sucrés (Clements 1999) ou encore amers (Kessler et al. 2012), comme par exemple la présence de répulsif (Lee et al. 2010). C'est durant cette étape que la femelle va effectuer le choix définitif de réaliser un repas sanguin. Après acceptation, elle va pouvoir chercher un vaisseau sanguin et commencer à se gorger.

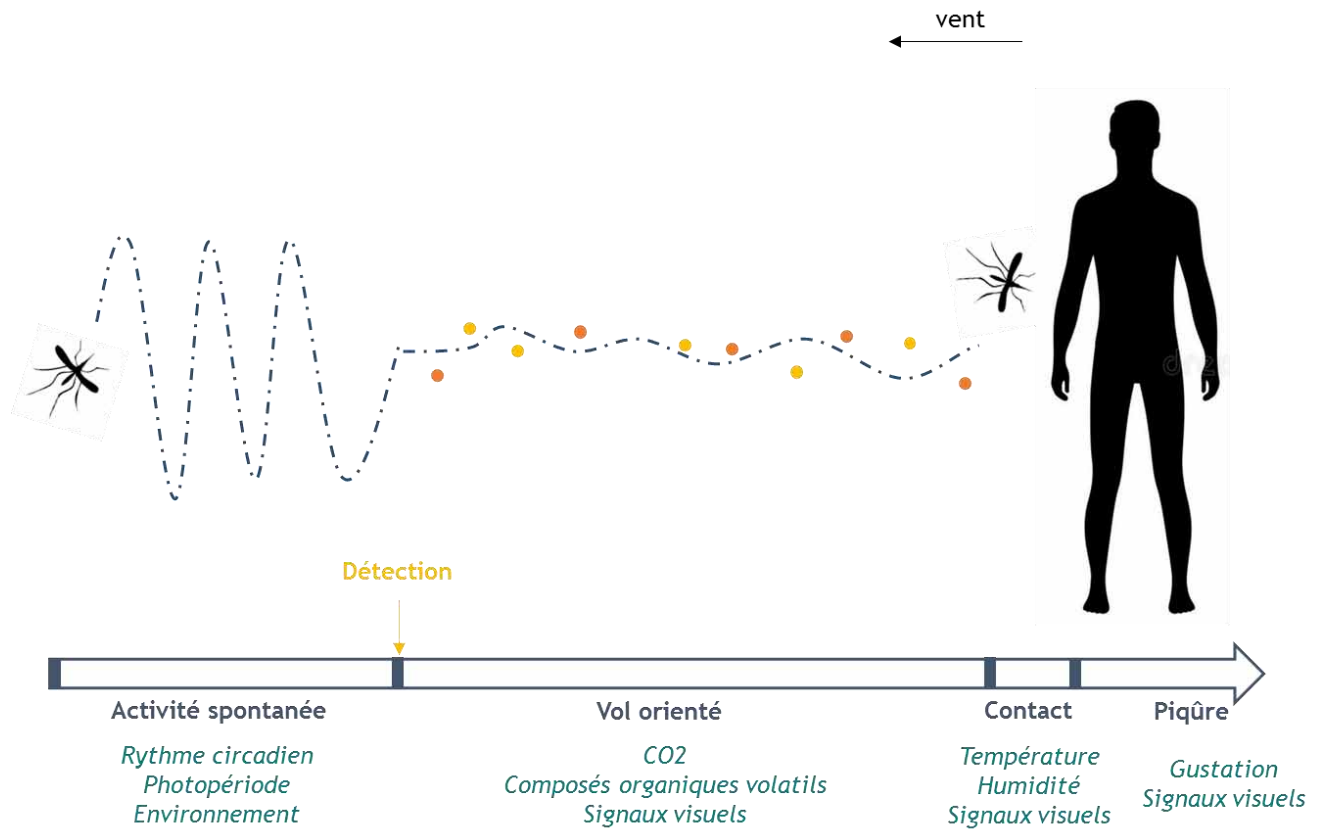


Figure 4 : Séquence comportementale de la recherche d'hôte chez un moustique

Le système sensoriel des moustiques

Le système olfactif joue un rôle capital dans le comportement de recherche d'hôte. Les moustiques détectent les COVs caractéristiques des hôtes par le biais des antennes, du proboscis et des palpes maxillaires (Kwon et al. 2006, Cardé and Gibson 2010) (Fig. 5A). Ces organes possèdent des extensions cuticulaires appelées sensilles (Fig. 5B), porteuses de nombreux pores, par lesquels vont entrer les COVs. Les composés seront détectés par des neurones spécialisés, les **ORNs** (olfactory receptor neurons), qui expriment à leur surface des récepteurs olfactifs, les **ORs** (odorant receptors), ainsi que des récepteurs ionotropiques, les **IRs** (ionotropic receptors) (Cardé and Gibson 2010, Pitts et al. 2017) (Fig. 5C, 5D). Chez *An. gambiae*, chaque sensille héberge 2 à 3 neurones (Riabinina et al. 2016). Chez tous les insectes, les ORs et les IRs sont toujours associés à un co-récepteur (respectivement **Orco** et **IRco**). Enfin, la gustation fait également partie intégrante du comportement de recherche d'hôte. En effet, une fois posé sur son hôte, le moustique va évaluer la qualité de ce dernier grâce à des récepteurs gustatifs, les **GRs** (gustatory receptors). Ceux-ci sont présents sur le labellum du proboscis (Fig. 5A) mais également sur les palpes maxillaires et les tarse. Les récepteurs gustatifs sont aussi indispensables pour la détection de la chaleur et du CO₂ (McIver and Siemicki 1978, Hill and Smith 2000, Sparks et al. 2013).

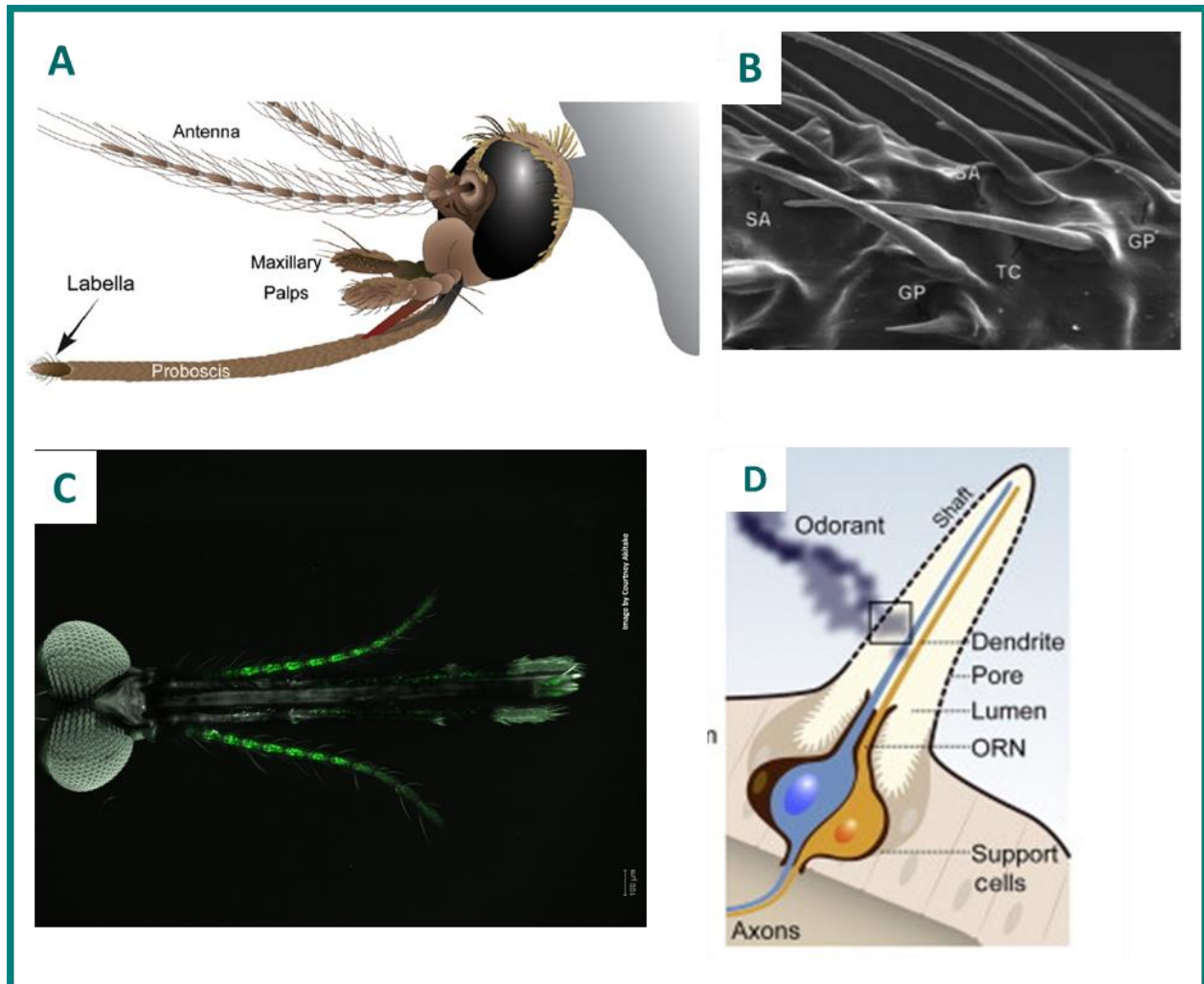


Figure 5 : A : organes olfactifs d'une femelle moustique (ici *Ae. aegypti*) (Dickens, 2013). B : image en microscopie électronique des sensilles d'une antenne (ici, *An. gambiae*) ; SA : sensille ampulacea, GP : sensille rainurée (Grooved peg sensillum), TC : sensille trichoïde sous type C (Qiu & Van loon, 2010). C : tête d'une femelle moustique avec les neurones olfactifs (ici *An. gambiae*) (Riabinina, Akitake & Potter). D : schéma d'une sensille comprenant les dendrites des neurones olfactifs, ainsi que les cellules auxiliaires (Sparks, Bohbot et al 2015).

Le comportement de recherche d'hôte présente un intérêt épidémiologique conséquent, puisque c'est au moment de la piqûre que le moustique risque de s'infecter, ou d'infecter son hôte. Les outils de lutte antivectorielle ont donc pour objectif de perturber ou bloquer la séquence comportementale, afin de limiter les contacts entre les moustiques et les hôtes.

3. Les stratégies de lutte contre les moustiques vecteurs

Les méthodes de lutte conventionnelles contre les moustiques vecteurs reposent sur l'utilisation d'insecticides, qui permettent de lutter à la fois contre les larves et les adultes. Ces insecticides peuvent-être appliqués :

- Dans les gîtes larvaires
- En pulvérisation intra-domiciliaire (« indoor residual spraying », appelé **IRS**)
- Sur des moustiquaires : les moustiquaires conventionnelles (« insecticide-treated nets » (**ITNs**)) qui nécessitent d'être ré-imprégnées tous les 6 à 12 mois, ou, plus récemment, les moustiquaires à longue durée d'efficacité (« long-lasting insecticide-treated nets (**LLINs**)), où l'insecticide est directement incorporé dans les fibres, et qui offrent une efficacité d'au moins trois ans sans besoin de ré-imprégnation (CDC 2015).
- Sur des vêtements

A ce jour, 4 classes d'insecticides sont autorisées dans la lutte contre les maladies vectorielles (Labbé et al. 2011): les pyréthrinoïdes, les organophosphorés, les organochlorés, et les carbamates. Tous ces insecticides sont utilisés en pulvérisation intra-domiciliaire, mais seuls les pyréthrinoïdes sont autorisés en imprégnation de moustiquaires, dû à leur forte spécificité pour les insectes et donc à leur faible toxicité pour les humains. D'autres méthodes de lutte peuvent venir appuyer l'utilisation d'insecticides :

- Les méthodes biologiques, qui consistent à utiliser des organismes auxiliaires afin de diminuer les populations de moustiques. Elles peuvent impliquer des organismes larvivores (poissons, copépodes) (Nam et al. 1998, Seng et al. 2008), des bactéries et champignons entomopathogènes (Regis et al. 2000, Darbro et al. 2011), et des bactéries symbiotiques de moustiques qui diminuent la fertilité, la survie et le taux d'infestation par des parasites (Min and Benzer 1997, Iturbe-ormatxe et al. 2011).
- Les méthodes de stérilisation. Elles consistent à produire des mâles stériles qui sont relâchés dans l'environnement. La stérilisation peut être génétique ou par irradiation aux rayons gamma (Lees et al. 2015).

- Les méthodes de modification environnementale. Elles sont indispensables et consistent à créer un environnement imperméable aux moustiques, via par exemple la structure des bâtiments, le système de canalisation des eaux, ou encore la mise en place de moustiquaires (Lindsay et al. 2002, 2003, Atieli et al. 2009).
- Les méthodes push-pull : elles consistent à exploiter les connaissances que nous avons sur l'écologie sensorielle des moustiques, pour combiner à la fois l'utilisation de répulsifs et de pièges olfactifs (Cook et al. 2007, Menger et al. 2014).

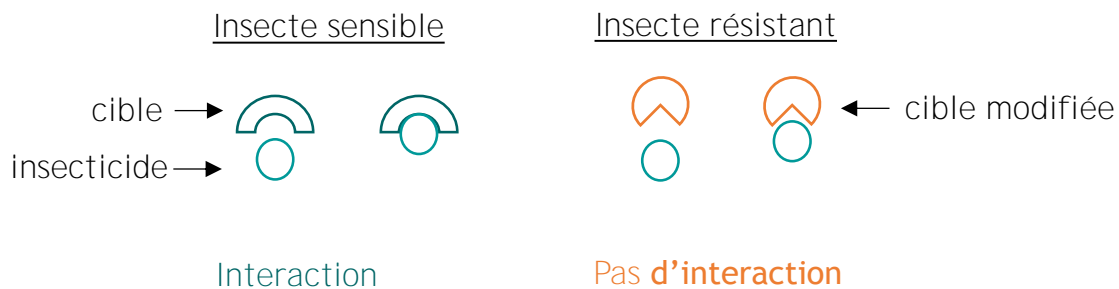
4. Limite d'utilisation des insecticides

Les insecticides ont joué un rôle prépondérant dans la manière dont la lutte vectorielle a été et est encore appréhendée de nos jours. En effet, au début des années 1940 a été mis sur le marché le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) (Nájera et al. 2011). Cette molécule insecticide de la famille des organochlorés fut, pendant un temps, la pierre angulaire de la lutte contre les insectes nuisibles, faisant de l'élimination du paludisme un objectif réalisable. Cependant, l'utilisation massive du DDT aussi bien en agriculture que dans la lutte antivectorielle a très vite été accompagnée de lourdes conséquences. En effet, dès 1951, les premières populations de moustiques résistantes au DDT ont été recensées en Grèce (Livadas and Georgopoulos 1953). Ces observations ont été annonciatrices du phénomène qui allait bientôt se produire : une expansion massive des mécanismes de résistance au DDT à l'échelle globale. Le développement d'insecticides capables de remplacer le DDT est rapidement devenu une priorité, et, aujourd'hui, 4 classes d'insecticides sont donc autorisées dans la lutte contre les moustiques vecteurs. Cependant, ces mesures n'ont fait que retarder le problème, car les populations ont rapidement développé des résistances à ces insecticides. Aujourd'hui, plus de 550 espèces d'arthropodes présentent des résistances aux pesticides, qui ont été observées pour plus de 330 composés chimiques (Gould et al. 2018). Les mécanismes de résistance incluent la résistance génétique, métabolique, et comportementale. Ils peuvent co-exister au sein d'un même individu, et les populations présentent souvent des résistances croisées à plusieurs classes d'insecticides. Les 4 classes d'insecticides actuellement utilisés contre les moustiques vecteurs présentent seulement deux modes d'actions différents (les pyréthrinoïdes et organochlorés ciblent le canal sodium, alors que les carbamates et organophosphorés ciblent l'acétylcholinestérase). Alors que l'alternance d'outils avec des modes

d'action différents est supposée limiter l'apparition de résistances, le faible arsenal disponible ne fait que renforcer la pression de sélection exercée sur les populations (Glunt et al. 2011). D'une manière particulièrement alarmante, la mutation *kdr*, qui confère une résistance au DDT, confère également une résistance croisée aux insecticides pyréthrinoïdes, du fait de leur similarité de mode d'action. Or cette classe d'insecticides est actuellement la seule autorisée pour l'imprégnation de moustiquaires.

La mutation *kdr* : modification de la cible de l'insecticide

Modification d'un acide aminé de la séquence codant pour le canal protéique sodium voltage dépendant (canal situé sur la membrane des neurones), qui est le site de fixation des pyréthrinoïdes et organochlorés dans le système nerveux. L'affinité des insecticides avec leur cible est donc réduite et leur efficacité impactée.



La propagation des mécanismes de résistance aux insecticides menace donc largement l'efficacité de ces derniers (Asidi et al. 2012), et s'accompagne de lourdes craintes dans le domaine de la santé publique. Particulièrement, la mutation *kdr* met en péril l'efficacité des ITNs, qui sont la principale source de protection des populations contre le paludisme. Dans ce sens, les préoccupations sont de plus en plus grandes concernant la réémergence et les épidémies de maladies à transmission vectorielle (Ranson and Lissenden 2016). Dans le cas du paludisme, même un faible taux de résistance aux insecticides dans les populations de moustiques est suffisant pour mettre en échec

l'efficacité des méthodes de lutte (Barbosa et al. 2018) et augmenter le risque d'infection dans les communautés où la prévalence est élevée (Churcher et al. 2016). Par ailleurs, des modèles prédictifs ont déterminé que la résistance aux pyréthrinoïdes pourrait diminuer de 40 % l'efficacité des ITNs en terme de nombre de cas de paludisme (Briët et al. 2013). Néanmoins, certaines études suggèrent que les ITNs resteraient efficaces dans une moindre mesure contre les moustiques résistants ; ces derniers ne sont plus irrités par l'insecticide du fait de la résistance, et passent donc plus de temps en contact avec le produit. La dose qu'ils reçoivent est par conséquent plus forte, ce qui permet de les atteindre (Chandre et al. 2000). De plus, le contact avec les ITNs pourrait induire de la mortalité retardée chez ces moustiques (Viana et al. 2016).

L'impact du DDT et des insecticides sur l'environnement

Aux apparitions de résistances s'ajoutent les dommages dramatiques que les insecticides, et notamment le DDT, ont engendré sur l'environnement. En effet, leur utilisation a provoqué une diminution drastique des populations d'insectes non ciblés de toutes les espèces, qui a été accompagnée d'une contamination sans précédent de l'environnement, affectant irréversiblement les écosystèmes du monde entier, à tous les niveaux trophiques. Par exemple, en Europe, les populations d'oiseaux associés aux milieux cultivés ont diminué de 48 % entre 1980 et 2006 (PAN 2010). Dans le même sens, des modèles ont démontré une diminution dans la richesse taxonomique des invertébrés aquatiques de 42 % dans les sites où les insecticides sont présents (Beketov et al. 2013). Au niveau mondial, les résultats des études sont consistants quant au lien direct entre l'utilisation d'insecticides et la perte de biodiversité (Perfect 1980, Cox 1991, Gibbs et al. 2009, Geiger et al. 2010). De plus, dans les milieux à forte prévalence de paludisme, des résidus de DDT ont été retrouvés dans toutes les strates des écosystèmes : le sol, le milieu aquatique, les animaux, ou encore le lait maternel humain (Noegrohati et al. 1992). Dans ce sens, l'exposition aux insecticides a également révélé un impact conséquent sur la santé humaine, autant au niveau neurologique (Sinha et al. 2004) qu'endocrinien (Thonneau 2016). De nombreuses maladies ont été associées à la présence de DDT, comme par exemple le cancer, ou encore la maladie d'Alzheimer (Richardson et al. 2014). Dans ce contexte, le DDT a été interdit en 1972 dans les pays occidentaux et classé en 2004 sur la liste noire des polluants organiques persistants par la convention de Stockholm. Cependant, les alternatives efficaces et abordables pour le remplacer restent limitées (Berg et al. 2017), de sorte que l'utilisation du DDT a été à nouveau autorisée en 2006 dans certains pays, sous la forme de pulvérisations intra-domiciliaires, afin de lutter contre l'expansion du paludisme.

En conséquence directe de l'utilisation massive des insecticides, les populations de moustiques vecteurs subissent une pression de sélection toujours plus grande, et les phénomènes de résistance ne cessent de s'amplifier. Les conséquences de la résistance aux insecticides sur la transmission des pathogènes sont difficiles à évaluer, et révèlent souvent des résultats contrastés. En l'absence d'insecticides, les mutations qui confèrent un caractère de résistance sont coûteuses, et sont parfois associées à un impact négatif sur la fitness (Brito et al. 2013, Diop et al. 2015, Alout et al. 2016). Cependant, dans certains cas, les moustiques résistants subissent un coût sur la fécondité, mais qui peut être contrebalancé par une augmentation dans la survie, ce qui risque de provoquer un allongement de la durée pendant laquelle ils peuvent transmettre des pathogènes (Alout et al. 2016). Par ailleurs, des interactions complexes ont été observées entre la résistance aux insecticides, l'infection, et les insecticides. Premièrement, les allèles de résistance sont associés avec une augmentation de la compétence vectorielle en l'absence d'insecticides (Alout et al. 2013). Ensuite, un coût de l'infection par *Plasmodium* sur la survie a été démontré chez les moustiques résistants (Alout et al. 2016). Enfin, les moustiques porteurs d'allèles de résistance aux insecticides sont plus affectés par les insecticides lorsqu'ils sont infectés par *P. falciparum* (Alout et al. 2014). Ces données suggèrent donc qu'il existe des compromis entre le système immunitaire et le système de détoxification, qui sont eux-mêmes modulés par la résistance aux insecticides.

Dans le but de contrer la tendance actuelle d'expansion massive des phénomènes de résistance aux insecticides, le domaine de « resistance management » a été développé, et vise notamment à mettre en place de nouveaux produits chimiques avec de nouveaux modes d'action. Cependant, le problème continue à être considéré comme si les insecticides étaient la seule alternative à eux-mêmes, condamnant les programmes de lutte à entrer dans un cycle sans fin de développement de nouveaux insecticides et d'apparition de résistances (Ranson and Lissenden 2016). Ces données soulèvent donc l'urgente nécessité de développer des moyens de lutte durables, qui permettraient de compléter puis, à long-terme, remplacer les insecticides.

5. Perspectives d'utilisation des répulsifs

Le contrôle des maladies à transmission vectorielle repose sur un aspect fondamental : limiter le contact entre les vecteurs et les hôtes. Dans ce sens, les répulsifs offrent un fort potentiel d'utilisation pour lutter contre les nuisances engendrées par les moustiques. Historiquement, une

molécule répulsive est décrite comme « un produit qui engendre un comportement d'évitement de l'insecte par rapport à la source » (Dethier et al. 1960). Il existe différents types de répulsifs en fonction de leur mode d'action (Deletre et al. 2016):

- Le répulsif spatial : il induit un mouvement d'évitement, sans contact direct.
- Le répulsif inhibiteur de l'attraction : il réduit l'attractivité de l'hôte, soit par une modification dans le bouquet odorant, soit par une inhibition de la détection des composés odorants.
- Le répulsif irritant par contact : il induit un mouvement d'éloignement après contact.
- Le répulsif anti-appétant: il inhibe l'activité de piqûre après contact ou ingestion, en agissant sur les récepteurs gustatifs.

Les répulsifs offrent une grande diversité de formats disponibles et peuvent être accessibles sous forme de crèmes, savons, spirales à brûler, bougies, ainsi que sprays pour la peau, les vêtements et les moustiquaires (Kelly et al. 2017), ce qui en fait des composés très prometteurs à intégrer dans les outils de lutte antivectorielle. Les répulsifs peuvent-être utilisés en pulvérisation cutanée, et permettre de repousser efficacement les moustiques diurnes tels que les *Aedes*. Ensuite, ils peuvent être utilisés en imprégnation de vêtements ou de moustiquaire, permettant ainsi de lutter à la fois contre les moustiques diurnes, mais aussi contre les moustiques nocturnes des genres *Anopheles* et *Culex*. Ils peuvent également compléter les insecticides lors d'imprégnation de moustiquaires, et permettre de repousser et tuer les moustiques grâce à un effet synergiste tout en diminuant la dose d'insecticide nécessaire. Les répulsifs peuvent aussi être utilisés sur des substrats imprégnés dans les habitations, afin d'empêcher les moustiques d'y entrer. Enfin, ils peuvent présenter un intérêt lorsqu'utilisés dans les petites réserves d'eau telles que les bassins individuels ou les fontaines des villes, en empêchant les femelles de venir y pondre des œufs (Tikar et al. 2014). Une liste non exhaustive des essais en laboratoire et sur le terrain ayant démontré l'efficacité des répulsifs est présentée tableau 1.

Par rapport aux insecticides, les répulsifs présentent plusieurs points forts : comme ils ne tuent pas les moustiques, la pression de sélection qu'ils engendrent est beaucoup plus faible. De ce fait, bien que l'insensibilité aux répulsifs puisse être sélectionnée en laboratoire (Stanczyk et al. 2010), le risque que des mécanismes de résistances se développent dans la nature semble très faible. Les

répulsifs pourraient donc être un outil efficace pour lutter contre les moustiques résistants aux insecticides, qui ne peuvent pas être atteints par les méthodes de lutte conventionnelles. De plus, les répulsifs ont montré un effet synergiste avec les insecticides de la famille des organophosphorés (Pennetier et al. 2007, 2008, 2009), permettant de restaurer l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides contre des moustiques résistants aux pyréthriinoïdes. Enfin, les répulsifs spatiaux ont l'avantage de créer un espace où la densité de moustiques est réduite, et permettent d'agir sans besoin que les moustiques contactent une surface traitée (Achee et al. 2012, Syafruddin et al. 2014). Ces paramètres font donc des répulsifs un outil de valeur dans la lutte contre les nuisances provoquées par les moustiques.

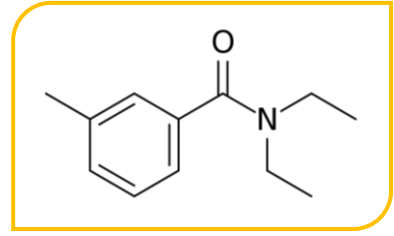
Bien que les répulsifs soient communément utilisés depuis longtemps, les perspectives d'utilisation de ces composés se sont élargies ces dernières années. Cependant, les répulsifs ont toujours été utilisés de manière empirique, et la mécanistique qui entoure leur mode d'action et leur efficacité n'a été considérée que récemment. La gamme de composés disponibles pour repousser les moustiques et autres nuisibles inclut maintenant un large spectre, qu'ils soient naturels ou synthétiques : le DEET, l'IR3535, le PMD, le KBR 3023, plus des molécules naturelles telles que le géraniol et le citronellal. Parmi eux, le DEET est défini comme le « gold standard », et reste la molécule répulsive la plus utilisée dans le monde depuis sa mise sur le marché (Leal 2015).

Condition	Protocole	Répulsif	Présence d'attractif	Paramètre mesuré	Genre	Référence
Laboratoire	<i>Matériau imprégné</i>	DEET, KBR3023, IR3535, Citronellal	Non	Comportement d'évitement, irritabilité, toxicité, impact sur la fitness	<i>Anopheles, Culex, Aedes</i>	(Licciardi et al. 2006, Faulde et al. 2010, Sathantriphop et al. 2014, Lee et al. 2018)
	<i>Répulsif sur peau (« arm in cage »)</i>	DEET, KBR3023, IR3535, Citronellal, Mélange d'huiles essentielles	Oui	Piqûre	<i>Aedes, Anopheles</i>	(Curtis et al. 1987, Fradin and Day 2002, Masetti and Maini 2006)
	<i>Vapeurs</i>	Géraniol, Citronellal	Non	Comportement de recherche d'hôte post-exposition	<i>Aedes</i>	(Hao et al. 2008)
	<i>Répulsif dans l'eau</i>	DEET	Non	Oviposition	<i>Aedes, Culex</i>	(Tikar et al. 2014)
Conditions naturelles : intérieur	<i>Matériau imprégné</i>	DEET	Oui	Piqûre	<i>Anopheles, Culex</i>	(Curtis et al. 1987)
	<i>Spirales encens</i>	Métofluthrine	Oui	Incidence du paludisme Taux de contact moustiques-Hommes	<i>Anopheles</i>	(Syafuruddin et al. 2014)
	<i>Plantes répulsives</i>	-	Oui	Densité de moustiques à l'intérieur	<i>Anopheles</i>	(Mng'ong'o et al. 2011)
Conditions naturelles : extérieur	<i>Matériau imprégné</i>	Métofluthrine	Oui	Taux de contact avec humains	<i>Aedes</i>	(Lucas et al. 2007)
	<i>Répulsif sur peau</i>	IR3535, KBR3023, DEET, PMD	Oui	Piqûre	<i>Aedes, Anopheles</i>	(Trigg 1996, Walker et al. 1996, Naucke et al. 2007)

Tableau 1 : Etudes de laboratoire et de terrain ayant démontré l'efficacité des répulsifs

6. Mode d'action du DEET

De son nom complet N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide et de formule chimique $C_{12}H_{17}NO$, le DEET est un acide monocarboxylique de la famille chimique des amides (Paluch et al. 2010). Il résulte de la condensation du groupe carboxyle de l'acide m-toluique avec l'azote d'une molécule de diéthylamine (Knoess



and Neeland 1998). Ce composé a premièrement été développé par l'armée américaine en 1946, et élargi au grand public en 1957 (DeGennaro 2015, Zermoglio et al. 2015). En France, le DEET entre dans la composition de 56 produits répulsifs (ANSES and Ministère de l'Environnement 2018). Ce répulsif a démontré une efficacité contre une large variété d'arthropodes, et offre une protection d'environ huit heures pour une dose d'application de 0.2 mg/cm^2 (ANSES 2013). Son atout est sa très faible volatilité due à un très haut point d'ébullition, qui le fait subsister longtemps sur n'importe quelle surface. Cependant, depuis son entrée sur le marché il y a 60 ans et malgré son incroyable efficacité, le mode d'action du DEET semble être encore bien méconnu, et son action sur le système sensoriel des insectes reste source de débats. Plusieurs hypothèses se confrontent pour expliquer son efficacité, chacune reposant sur des observations réalisées aussi bien in vivo qu'in vitro (Fig. 6). Celles-ci affirment :

- Que le DEET n'agirait pas directement comme molécule répulsive, mais qu'il masquerait la détection de composés attractifs, soit en bloquant leur émission par la peau, soit en inhibant leur détection par les neurones olfactifs spécifiques.
- Que le DEET agirait à distance, activant des récepteurs olfactifs spécifiques
- Que le DEET agirait par contact, activant des récepteurs gustatifs spécifiques

A. Effet sur le système olfactif

a. Le DEET masque la réponse des neurones olfactifs aux attractants humains

i. Le DEET inhibe la détection de composés attractifs

Les premières études qui se sont intéressées au mode d'action du DEET ont soulevé comme hypothèse que le DEET inhiberait la détection de composés attractifs par les neurones olfactifs. En

effet, en 1976, Davis et Sokolove mesurent les potentiels d'action des neurones sensibles à l'acide lactique chez le moustique de l'espèce *Ae. aegypti*. Ils observent que, lorsque ceux-ci sont soumis en même temps à du DEET, leur réponse à l'acide lactique est inhibée (Davis and Sokolove 1976). En 1999, Dogan confirme ces résultats lors de tests de comportement en utilisant la même espèce, en mettant en évidence que l'attraction à l'acide lactique est inhibée lorsque celui-ci est présenté conjointement avec du DEET (Dogan et al. 1999). Par la suite, chez *Drosophila melanogaster* et *An. gambiae*, des expériences d'électrophysiologie démontrent que la réponse des OSNs au 1-octen-3-ol est inhibée pour certains neurones et activée pour d'autres lorsque ce composé est présenté avec du DEET (Ditzen et al. 2008, Pellegrino et al. 2011). De même qu'avec l'acide lactique, en test de comportement les drosophiles ne sont plus attirées par une odeur auparavant attractive lorsque celle-ci est présentée avec du DEET. D'une manière intéressante, ceci est observé même si la concentration de DEET utilisée n'induit pas d'inhibition lorsque présentée seule (Ditzen et al. 2008). De plus, chez *D. melanogaster*, les auteurs ne trouvent aucun OSN qui répond directement au DEET (Pellegrino et al. 2011). Ces observations semblent donc suggérer que le DEET modulerait ou troublerait l'activité des neurones olfactifs, empêchant la détection des composés attractifs volatils.

ii. *Le DEET empêche l'émission de composés attractifs*

A la suite de cela, en 2008, Syed et Léal observent, tout comme Ditzen, des réponses électrophysiologiques réduites au 1-octen-3-ol lorsque celui-ci est présenté en même temps que du DEET chez *Culex quinquefasciatus*. Cependant, pour la première fois, les auteurs réalisent des analyses chimiques des émanations de composés odorants lorsqu'ils sont présentés avec du DEET, pour les comparer avec des émanations de composés seuls. Ils observent une diminution de l'émanation de 1-octen-3-ol lorsque celui-ci est disposé sur un papier buvard avec le répulsif. La même expérience est réalisée pour mesurer les émanations humaines sur un bras pulvérisé avec du DEET. Les auteurs observent également une diminution de l'émanation des composés d'odeur de peau lorsque du DEET est présent, et suggèrent donc que le DEET présente un effet fixatif, qui limite la volatilité des composés. Le répulsif n'inhiberait pas la réponse des récepteurs spécifiques aux composés odorants, mais il empêcherait la diffusion du composé, le rendant moins disponible pour les récepteurs (Syed and Leal 2008). Cependant, des résultats contradictoires ont par la suite été observés en utilisant un protocole similaire (Pellegrino et al. 2011).

b. Le DEET est détecté par des récepteurs olfactifs spécifiques

i. Le DEET est détecté par un récepteur et induit une répulsion directe

Certaines études viennent contrebalancer les précédentes hypothèses. Premièrement, le DEET a été démontré comme induisant un effet répulsif en tant que tel (Licciardi et al. 2006, Zermoglio et al. 2015). Ensuite, *An. gambiae* et *Ae. aegypti* sont capables de répondre à ce composé en électroantennographie (Costantini et al. 2001, Stanczyk et al. 2013). Ces données suggèrent donc qu'il peut être détecté seul et n'agit donc pas seulement en interaction avec des composés odorants. Cette hypothèse a par la suite été confirmée par la mise en évidence d'un ORN d'une sensille de l'antenne qui répond directement au DEET chez *C. quinquefasciatus* (Syed and Leal 2008). Cet ORN répond également à des composés connus comme ayant une action répulsive, tels que l'eucalyptol et le linalool. Par la suite, chez la même espèce, un OR qui répond au DEET ainsi qu'à d'autres composés répulsifs tels que l'IR3535 ou encore le méthyl jasmonate a été identifié (Xu et al. 2014). Dans le même sens, une sensille qui répond directement au DEET a été identifiée chez *Ae. aegypti* (Boeckh et al. 1996). D'autres auteurs ont également mis en évidence une sensille de l'antenne qui répond au DEET et au linalool chez cette espèce (Stanczyk et al. 2010). Enfin, un OR qui répond au DEET a été identifié chez la larve d'*An. gambiae* (Xia et al. 2008).

ii. Le DEET se fixe sur des récepteurs de composés attractifs, empêchant leur détection

Chez *Ae. aegypti*, des auteurs ont observé que le DEET active un OR qui répond à l'indole en l'absence d'odeurs humaines, mais qu'il inhibe un OR qui répond à l'1-octen-3-ol en présence d'odeurs humaines (Bohbot and Dickens 2010). Le fait que la réponse des ORs aux odeurs humaines soit modulée en présence du DEET rejoint donc les études précédentes (A.a.i). Seulement, les auteurs suggèrent que le DEET ne modulerait pas l'activité de certains récepteurs olfactifs, mais que les récepteurs du DEET seraient les mêmes que ceux de certains composés, tels que le linalool et l'1-octen-3-ol. De par une structure similaire, le DEET se fixerait sur les récepteurs spécifiques et empêcherait donc leur réception (Bohbot and Dickens 2010). Encore ici, de nombreuses questions demeurent. En effet, les moustiques sélectionnés génétiquement pour leur insensibilité au DEET présentent des réponses électrophysiologiques réduites au DEET, mais pas au 1-octen-3-ol (Stanczyk et al. 2010), ce qui semble aller à l'encontre de l'hypothèse d'un même récepteur pour le DEET et le 1-octen-3-ol.

iii. Le DEET agit sur le corécepteur olfactif Orco

Le rôle du co-récepteur olfactif Orco dans la détection du DEET a également été mis en évidence. Chez *Ae. aegypti*, les individus mutés ne possédant plus Orco ne sont plus attirés par les odeurs humaines en l'absence de CO₂, et ne sont plus repoussés par le DEET (Degennaro et al. 2013). Ceci sous-entend qu'Orco est nécessaire pour déclencher la détection à distance du DEET et donc que ce dernier est détecté par un récepteur olfactif. Dans le même sens, le DEET a démontré inhiber Orco chez *An. gambiae* (Tsitoura et al. 2015).

B. Effet sur le système gustatif

Des observations soutiennent que le DEET ne serait pas seulement détecté par le système olfactif, mais que le système gustatif entrerait également en jeu. A titre d'exemple, lorsque du DEET est présent sur la main d'un expérimentateur les moustiques ne s'approchent pas, et quand la main est recouverte par un vêtement, ils se posent mais ne piquent pas (Klun and Khirimián 2006). Ceci signifie bien que la détection du DEET est bimodale. De plus, les moustiques mutés qui ne possèdent plus le corécepteur olfactif Orco ne sont plus repoussés par le DEET à distance, mais sont toujours repoussés durant le contact (Degennaro et al. 2013). Qui plus est, un neurone gustatif qui répond au DEET a été identifié dans la sensille du labellum chez *Ae. aegypti* (Sanford et al. 2013). Ce neurone est connu pour détecter les composés amers, tels que la quinine. Il répond également à l'IR3535, la picaridine et le citronnellal, ce qui est cohérent avec l'idée que le DEET est un anti-appétant. Chez *D. melanogaster*, des GRNs de composés aversifs ont également été identifiés comme répondant au DEET (Lee et al. 2010).

C. Effet au niveau neurologique

Une des particularités du DEET est que, en plus de présenter un effet répulsif contre les insectes, il présente également un effet insecticide. En effet, en comportement, le DEET a démontré induire un effet knockdown et de la mortalité retardée chez les insectes (Xue et al. 2003, Pridgeon et al. 2009). In vivo, le DEET altère le système nerveux des insectes (Legeay et al. 2018), en réduisant l'activité des acétylcholinestérases (Corbel et al. 2009, Abd-ella et al. 2015), et en augmentant l'activité des récepteurs octopaminergiques (Swale et al. 2014). Ces actions résultent en un effet neuroexcitateur et toxique.

D. Conclusion - Mode d'action

Tous les résultats précédemment cités témoignent du mode d'action aussi complexe que fascinant du DEET. En 1985, Davis proposait que les répulsifs ne se comportent pas comme une seule classe de composés avec un seul mode d'action, mais que ce sont plutôt des composés multimodaux, qui agissent sur des systèmes physiologiques divers. Le DEET semble se conformer à cette définition: il est détecté à la fois par le système olfactif et par le système gustatif des insectes (Ray 2015). De plus, il perturbe également la détection des odeurs par les récepteurs olfactifs, et semble moduler l'émanation de composés par la peau. En conclusion, tous ces facteurs font du DEET un composé de choix dans la lutte antivectorielle, puisqu'il présente une action à la fois répulsive, irritante et neurotoxique sur les moustiques.

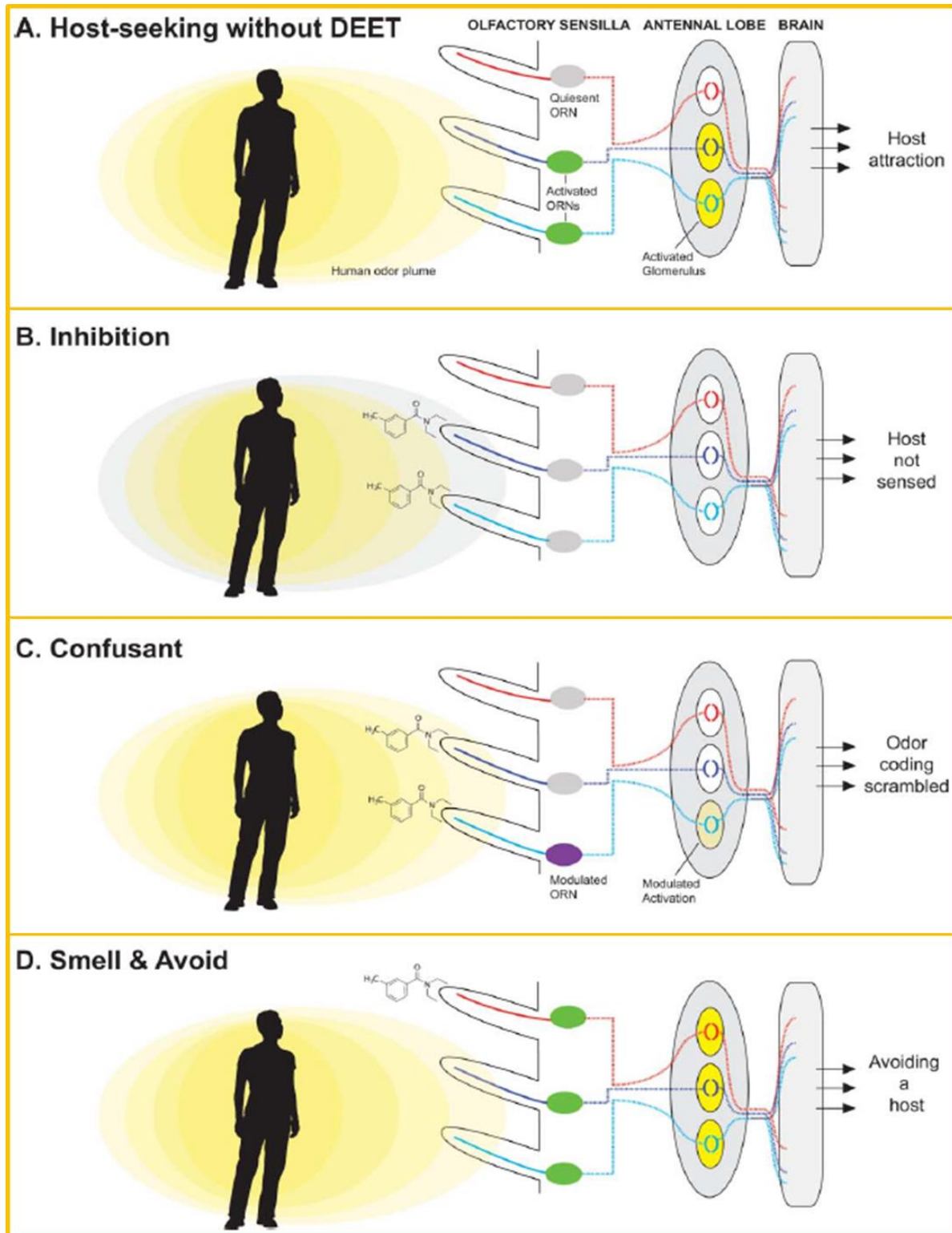


Figure 6 : Différentes hypothèses proposées pour expliquer l'effet du DEET sur le système olfactif des moustiques (DeGennaro, 2015).

Pourquoi le DEET fonctionne-t-il ?

D'un point de vue évolutif, il est tout aussi complexe d'expliquer pourquoi le DEET fonctionne. En effet, ce composé chimique n'est pas un dérivé de plantes et donc pas conçu à partir de quelque chose qui existe dans la nature. Par conséquent, les insectes ne devraient pas avoir la capacité de le détecter. Une des hypothèses pour expliquer son efficacité est que sa structure chimique pourrait ressembler à un composé présent dans la nature, qui induit un caractère répulsif chez tous les insectes. D'une manière intéressante, certains auteurs ont avancé que le DEET présente des motifs structurels similaires au méthyl jasmonate, composé de défense des plantes connu pour repousser les insectes. Par ailleurs, un des OR qui détecte le DEET détecte également le méthyl jasmonate. Il est donc possible que le DEET emprunte la voie de détection de ce composé, et induise une réponse comportementale similaire (Xu et al. 2014, Leal 2015).

7. Cibler les moustiques les plus à même de transmettre

Lors de l'évaluation de l'efficacité des méthodes de lutte contre les moustiques vecteurs, les protocoles sont très standardisés, les organismes tels que l'OMS recommandant d'utiliser des moustiques de 5 à 7 jours, non gorgés (WHO 2009b). Les expériences se font en utilisant des volontaires humains, soit par des protocoles d'« arm in cage » en laboratoire, soit lors d'expérimentations sur le terrain. Cependant, ces paramètres sont très opérationnels et ne prennent pas en compte le mode d'action du composé, ni les variations d'efficacité qui peuvent résulter de l'état physiologique du moustique, et qui sont encore très mal connus. De ce fait, les résultats obtenus en laboratoire sont difficilement applicables dans une situation réelle. En effet, il est admis que l'état physiologique des moustiques varie tout au long de leur vie, et peut avoir une grande influence sur leur comportement à un temps donné. Par exemple, ce dernier a été démontré comme étant affecté par leur état de satiété (Jones and Gubbins 1978), les cycles gonotrophiques (Jones and Gubbins 1978), le rythme circadien (Jones et al. 1972), ou encore leur statut d'insémination (Jones and Gubbins 1977). Il est donc indispensable d'évaluer les répulsifs en prenant en compte

les paramètres susceptibles d'impacter la physiologie du moustique, et donc de moduler leur subséquente efficacité. Plus particulièrement, l'**expérience** du moustique, son **âge**, et son **état infectieux** sont d'un grand intérêt épidémiologique et pourraient interagir avec l'efficacité des répulsifs, mais ne sont que rarement considérés lors d'études expérimentales.

8. Problématique

Il est possible de scinder les séquences d'activité qui conduisent un moustique à devenir infectieux, et donc dangereux pour l'Homme selon les étapes suivantes : expérience d'un repas de sang, période extrinsèque d'incubation, passage de formes transmissibles dans les glandes salivaires (Fig. 7). L'objectif de cette thèse a donc été d'évaluer l'efficacité des répulsifs et plus globalement des méthodes de contrôle contre les moustiques qui sont le plus à même de transmettre des pathogènes, afin de déterminer s'ils pourraient être ciblés spécifiquement. Plus précisément, ce projet a visé à étudier l'efficacité du DEET mais également d'insecticides pyréthrinoïdes, qui sont les outils les plus utilisés dans la lutte antivectorielle, contre deux espèces de moustiques vectrices : *Anopheles gambiae* et *Aedes albopictus*, en considérant l'expérience des moustiques, leur âge, ainsi que leur statut d'infection. De plus, l'impact de ces outils de lutte sur les traits d'histoire de vie des femelles après exposition a été mesuré, dans le but d'avoir une vision de leur efficacité sur le long terme. L'effet de l'expérience sera abordé dans le chapitre II, l'effet de l'âge dans le chapitre III et l'effet de l'infection dans le chapitre IV.

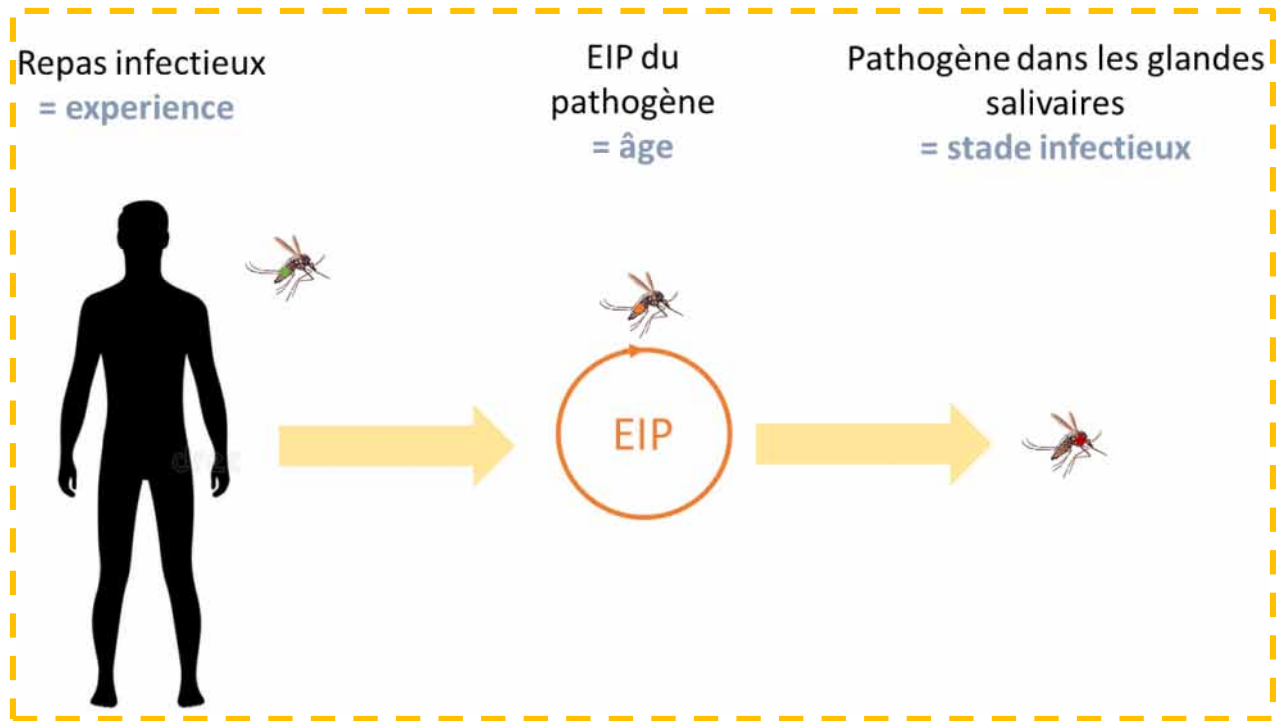


Figure 7 : Stades d'intérêt épidémiologique

Chapitre II. Effet de l'expérience passée sur l'efficacité du DEET et de la perméthrine

Pour un vecteur hématophage, la source d'infection passe soit par la prise de repas de sang, soit par la transmission verticale (*i.e* de la femelle à sa descendance). La transmission verticale n'existe pas dans le cas de *Plasmodium* ; pour ce qui est de la dengue, ce type de transmission existe mais ne contribue que très faiblement au maintien du virus (Adams and Boots 2010) et pour le chikungunya et le virus Zika, elle est extrêmement faible, voire inexistante (Vazeille et al. 2009, Delatte et al. 2018). Ceci signifie que, dans de nombreux couples vecteur-pathogène à fort intérêt épidémiologique, la source d'infection pour le moustique est obligatoirement un repas de sang obtenu sur un hôte infecté. Par conséquent, au sein d'une population, les individus infectés ont tous déjà eu au moins une première expérience de repas de sang sur un hôte et, plus un individu aura pris de repas, plus il aura eu de chances de s'infecter. Dans les milieux à forte infestation de moustiques et à forte prévalence de maladies, les moustiques infectés ont donc également une forte probabilité d'avoir déjà été en contact avec un outil de lutte, répulsif ou insecticide. Étonnamment, l'expérience passée d'un moustique n'est cependant pas prise en compte dans l'évaluation des outils de lutte antivectorielle. Or, les moustiques présentent une forte plasticité phénotypique, et de nombreuses observations, relatées ci-après, suggèrent que les choix qu'ils réalisent à un moment donné sont influencés par l'expérience qu'ils ont eue auparavant.

Les moustiques ont tendance à revenir piquer une espèce d'hôte sur laquelle ils se sont précédemment gorgés (Hii et al. 1991, Mwandawiro et al. 2000). Certains auteurs ont pu démontrer que ce comportement était bien le fruit d'une expérience passée, et non pas une sélection génétique, puisque les descendants ne montrent pas de préférence innée entre les espèces proposées (Mwandawiro et al. 2000). Des résultats contradictoires ont cependant été observés dans d'autres cas, où un repas de sang réussi sur une espèce d'hôte n'a, soit pas modifié les préférences (Arredondo-Jimenez et al. 1992), soit les a diminuées (Vantaux et al. 2014). Ceci suggère donc que l'expérience passée sur le choix réalisé à un temps donné est complexe, et qu'elle ne dépend pas que du succès de la prise de repas de sang mais aussi d'autres facteurs comme la qualité du sang

de l'hôte ou les comportements défensifs qu'il a montré. De plus, il est attendu que l'effet de l'expérience soit contrebalancé par les préférences innées des moustiques. Cependant, ces résultats suggèrent qu'un repas de sang obtenu avec succès sur un hôte peut moduler le comportement des moustiques à l'exposition suivante. Dans le même sens, des expériences de capture - marquage - recapture ont démontré que des femelles capturées dans un lieu et relâchées sont retrouvées dans le même lieu à la capture suivante (McCall et al. 2001). Toutefois, dans ce cas, les descendants n'ont pas été testés. Il est donc difficile de déterminer si ce phénomène est dû à une plasticité phénotypique, ou simplement au fait que le site choisi est celui qui offre le plus de ressources avec le moins de risque de prédation ou de comportements défensifs des hôtes. Par ailleurs, les moustiques ont démontré des capacités d'apprentissage complexes. Ils peuvent en effet être entraînés à associer un stimulus neutre avec un renforcement positif ou négatif, de sorte que leur comportement vis-à-vis de ce stimulus est modifié à la suite de l'apprentissage. Ces associations sont retenues de quelques minutes jusqu'à trois jours (Tomberlin et al. 2006, Chilaka et al. 2012). D'une manière intéressante, certains auteurs sont même parvenus à transformer un stimulus attractif en un stimulus répulsif par la suite de renforcements négatifs (Menda et al. 2013). Dans le cas des outils de lutte, on pourrait alors imaginer que le comportement qu'un moustique va avoir à un moment donné face à du répulsif ou à de l'insecticide serait dépendant de l'expérience qu'il a eue précédemment avec le composé. Dans ce contexte, certaines études ont observé une augmentation de l'efficacité des insecticides après pré-exposition dans certains cas (Hodjati and Curtis 1999), une diminution dans d'autres (Vatandoost 1999), ou aucun effet (Glunt et al. 2011, Viana et al. 2016). Pour ce qui est des répulsifs, chez *Ae. aegypti*, les femelles pré-exposées au DEET présentent une insensibilité comportementale et des réponses électrophysiologiques réduites face au DEET lors de l'exposition suivante (Stanczyk et al. 2013). De plus, chez cette même espèce, le caractère répulsif du DEET a pu être annulé après que les moustiques l'aient associé avec l'obtention d'un repas de sang (Vinauger et al. 2014, De Luca and Lazzari 2017). Ces résultats suggèrent donc que l'efficacité des outils de lutte pourrait ne pas être constante tout au long de la vie du moustique, et ne pas être comparable d'un individu à un autre. Par exemple, dans le cas le plus extrême, si un moustique obtient un repas de sang malgré la présence de répulsif ou d'insecticide, ces composés pourraient, par la suite, être utilisés comme indices de la présence d'un hôte et devenir attractifs. Les interactions entre les outils de lutte et l'expérience du moustique sont donc des processus complexes qu'il est nécessaire de comprendre. Par conséquent, l'étude de


l'efficacité de ces outils sur des populations de moustiques requiert des protocoles à long-terme qui prennent en compte les possibles modifications de comportement dues à l'expérience. Cette étude a donc eu pour but de mesurer l'effet d'un repas de sang obtenu en contact avec soit un répulsif (le DEET) soit un insecticide (la perméthrine) sur la réussite à prendre un second repas de sang en présence du même composé, 3 ou 4 jours après la première exposition. Les expériences ont été réalisées sur des femelles *An. gambiae* porteuses de l'allèle de résistance *kdr-west*. En parallèle, l'impact des deux expositions à chacun de ces composés sur les traits d'histoire de vie des moustiques liés à la fécondité et à la fertilité ont été mesurés. Nos résultats démontrent qu'un repas de sang obtenu en présence du DEET n'affecte pas son efficacité à inhiber un repas de sang à l'exposition suivante. De plus, le DEET provoque un effet délétère à long-terme sur la fécondité et la fertilité des femelles (Article « Effect of DEET-multiple exposures on behavior and life-history traits in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* (s.s.) »). Pour la perméthrine, un repas de sang précédemment obtenu a inhibé complètement son efficacité résiduelle à l'exposition suivante, en utilisant une dose recommandée en imprégnation de moustiquaires conventionnelles (Strode et al. 2014). Par ailleurs, les deux expositions à la perméthrine n'ont pas affecté les traits d'histoire de vie mesurés (Article « Prior contact with permethrin decreases its irritancy at the following exposure among a pyrethroid-resistant malaria vector *Anopheles gambiae* »). Ces résultats renforcent l'intérêt de l'intégration du DEET dans les programmes de lutte antivectorielle, puisqu'il reste efficace lors d'expositions multiples, et permet en outre de réduire la fitness des moustiques. En revanche, la perméthrine, qui est un des outils les plus utilisés, semble ne plus être efficace à la seconde exposition à la dose testée, et n'a aucun impact sur la fitness des moustiques. Ces résultats démontrent donc l'importance de mieux comprendre les effets physiologiques qui se produisent chez le moustique après un premier repas de sang réussi en présence de répulsif ou d'insecticide, et confirment la nécessité de prendre en compte ces éléments nouveaux dans les stratégies de lutte antivectorielle.

RESEARCH

Open Access



Effect of DEET-multiple exposures on behavior and life history traits in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* (s.s.)

Margaux Mulatier^{1,2*} , Ludovic Phamien Ahoua Alou³, Fabrice Chandre¹, Cédric Pennetier^{1,3}, Laurent Dormont^{2†} and Anna Cohuet^{1†}

Abstract

Background: Vector-borne diseases are major public health concerns, and their control is threatened by the spread of insecticide resistance in vector populations. In this context, the use of repellents is an alternative approach to limit vector-host interactions. However, prior exposure to repellents is suspected to affect mosquito behavior at the subsequent exposure, possibly reducing the efficacy of the compound. Despite this, the effect of mosquito experience on repellent efficacy remains poorly documented. In the present study, we tested whether a first blood meal successfully obtained upon a DEET-treated net would affect the success at taking a second blood meal in spite of DEET in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* (s.s.). The impact of DEET on mosquito life history traits after the first and the second exposure was also measured, in order to assess the long-term consequences of multiple exposures to DEET in vector insects.

Results: A first blood meal obtained upon a DEET-treated net did not influence the success of *An. gambiae* females to take a second blood meal in spite of DEET. However, data showed that a prior exposure to DEET negatively affected all life history traits tested in this study related to fecundity and fertility. DEET pre-exposed females displayed a reduction in blood engorgement at the second exposure, as well as a reduction in the number of eggs laid and in the proportion of offspring that reach adult stage. Also, an increase of mosquito activity was observed during the second blood meal in DEET-pre-exposed females. Taken together, these data suggest an overall impact of DEET exposure on mosquito fitness.

Conclusions: Our results did not evidence any effect of a prior exposure to DEET on its efficacy during the second exposure. However, data show a negative impact of DEET exposure on mosquito fitness. These results give insights to understand the long-term efficacy of the most used mosquito repellent, and highlight that DEET induces deleterious effects on mosquito fitness in addition to repellency, potentially increasing its efficacy for controlling vector-borne diseases.

Keywords: DEET, Multiple-exposures, *An. gambiae*, Experience, Fitness

Background

Vector-borne diseases are major public health threats, accounting for more than 17% of all infectious diseases and responsible for about 700,000 deaths annually [1]. Mosquitoes are responsible for the transmission of a

large number of vector-borne pathogens causing these diseases. For example, the deadly malaria parasites are transmitted to humans by *Anopheles* mosquitoes, and emerging arboviruses such as dengue, chikungunya or the Zika virus are vectored by *Aedes* mosquitoes. To date, vector control remains the most efficient method to fight against these diseases, and mostly relies on the use of pyrethroid insecticides. However, resistance mechanisms to insecticides have evolved and are now widespread in the targeted populations [2, 3], which

* Correspondence: margaux.mulatier@ird.fr

† Laurent Dormont and Anna Cohuet contributed equally to this work.

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

²CEFE, University Paul Valéry Montpellier 3, CNRS, University of Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France

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



threatens the efforts made in the control of vector-borne diseases. Moreover, the increased number of arboviral disease outbreaks in intertropical regions [4, 5] and the expansion of *Ae. albopictus* beyond tropical areas [6, 7] entail an urgent need for new control strategies. In this context, the use of repellents has gained increased interest for vector control and their potential is under scrutiny. Repellents have proven efficacy to inhibit the blood meal of *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes when impregnated on nets or clothes [8–10]. Moreover, when applied together on nets with non-pyrethroid insecticides, the repellent DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) and the insecticide revealed synergistic activity [11, 12]. Interestingly, the mixture restored a knockdown effect and mortality similar to pyrethroids against multi-loci resistant mosquitoes [13, 14]. Such synergistic effect was also observed, when used against pyrethroid-resistant mosquitoes, between repellents (both DEET and IR3535) and a pyrethroid insecticide impregnated with long-lasting polymer coating [15]. All together, these studies suggest that repellents may have important potential in vector control when impregnated singly or in mixtures on fabrics. The use of repellents also appears to be a promising tool to target vector insects that are not reached by current insecticide-based methods, for instance conferring an outdoor protection [16].

DEET is estimated as the most broad-spectrum and efficient insect repellent [17]. Although its efficacy has been widely proven, it remains overlooked if DEET entails constant repellency during the whole lifespan of the targeted organism. For instance, in areas of high repellent coverage, insects may face multiple exposures to DEET during their life. This could generate modifications in the behavioral response due to the effect of experience, sensory habituation, desensitization, or more complex learning abilities [18]. Understanding how repellents efficacy may change over mosquito lifetime may have a significant impact on their use for disease control. Of particular interest for most vector-borne diseases affecting humans is that the source of infection for the vector is a previous blood meal on an infectious human. Therefore, if repellents are broadly used, infected vectors will have a high probability to have experienced a contact with a repellent. The fitness and behavioral consequences of prior exposure to repellents of vector insects then deserve attention. In this context, in mosquitoes, experimental studies analyzing the effect of multiple exposures on DEET efficacy remain marginal but are of high interest.

In *Ae. aegypti*, females pre-exposed to DEET displayed decreases in sensitivity and in electrophysiological responses to DEET at a second exposure, three hours after the first [19]. Moreover, an olfactory learning ability was evidenced in *Ae. aegypti*, when the natural aversion for

DEET was rendered ineffective 24 hours after associative learning with a blood source reward [20]. Taken together, these results suggest that mosquitoes can modulate their behavior on the basis of previous events and that prior exposure to DEET may decrease its repellency to mosquitoes, at least within 24 hours following the first exposure. However, under natural conditions, most mosquitoes seek a blood meal every two to four days [21]. To our knowledge, the effects of prior exposure to repellents considering a biologically relevant period between the two blood meals have never been characterized. Additionally, besides olfactory repellency, DEET is also an irritant by contact for mosquitoes [22]. This could induce aversion [23], increasing avoidance behavior over experience with the repellent [18]. Previous exposure to DEET may thus generate contrasted effects and exploring the behavioral outcome is needed to decipher the potential of repellents in vector control strategies.

In the present study, we examined in *An. gambiae* (s.s.) the effects of a blood meal successfully obtained upon a DEET-treated net on the success of taking a second blood meal in spite of DEET presence using a biologically relevant time period between the two blood meals (i.e. 3–4 days). We also measured the impact of DEET exposure on life history traits after the first and the second exposure to provide a comprehensive picture of epidemiological consequences of multiple exposures to DEET in vector insects.

Methods

Mosquito colony

Mosquitoes were reared and tested thanks to the technical/research platform dedicated to vectors at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Centre, Montpellier, France. Experiments were performed using *An. gambiae* (s.s.) females that had the possibility to mate and have never had access to blood-feeding. As pyrethroid resistance is already widespread throughout western and central Africa [24] and is suspected to affect DEET efficacy because of observed behavioral interactions [25], experiments were carried out on pyrethroid-resistant mosquitoes. They belong to the KdrKis strain, harboring the L1014F homozygote mutation (*kdr-west* allele) in the gene coding for the voltage-gated sodium channel. They were reared at 27 °C and 80% relative humidity with a light:dark photoperiod of 14:10 h. They were fed during the larval stage with ground TetraMin (Tetra, Melle, Germany) and in their adult stage with a 10% honey solution.

Selection of DEET concentration and first exposure

Mosquito blood-feeding assays were carried out using 7–11 days old female mosquitoes that were starved for

one day. They were distributed in paper cups (height: 10 cm, diameter: 7 cm) in groups of 25 individuals. Cups were covered with mosquito mesh and placed under glass feeders that were sealed on one end with a parafilm membrane allowing mosquitoes to feed through it. Feeders were filled with 500 μ l of rabbit blood and kept at 37 °C using water bath circulation (Julabo Labortechnik, Seelbach, Germany).

To measure the effect of a successful blood meal taken through a DEET-impregnated mosquito net on the behavior at the second exposure, we selected a DEET concentration responsible for between 25–75% of mean inhibition compared to the control group. The chosen dose induces repellency, but also enables some females to successfully blood-feed and thus to be tested for the second exposure. Preliminary assays indicated that a dose of 3.45 g/l in ethanol, which allowed for a dose of 250 mg/m² of DEET in impregnated net results in such an inhibition of feeding in our experimental setup. For each cup, a 15 × 17 cm piece of polyester net was therefore impregnated with 250 mg/m² of DEET. Control nets were impregnated with the solvent. After impregnation, nets were left 1 h at room temperature to allow the solvent to evaporate. Impregnated nets were placed between the feeder and the paper cup mesh so that mosquitoes would contact the impregnated mesh when blood-feeding. After 1 h of exposure, blood-fed females were counted and maintained in the same conditions as during the rearing for a subsequent exposure. They were supplemented with 10% honey and had the opportunity to oviposit. A subset of the fed females was placed individually into 30 ml tubes for blood meal size measurement. After 48 h, they were pooled into a cage and were allowed to oviposit.

Assessment of the biological relevance of the used concentration of DEET

To assess the biological relevance of the DEET concentration used for net impregnation, we compared the emanation of DEET from nets that were impregnated as described above and emanations over time from human skin sprayed with DEET solution at the recommended dose. The guidance for repellent testing recommends approximately 3 g/m² of DEET for cutaneous application [26, 27]. Additionally, commercial formulations of DEET-based repellents suggest doses of 2 g/m² for adult antivectorial protection [28]. For this study, 2 g/m² was thus applied on the forearm of adult volunteers, on a 7 × 7 cm surface. Kinetic of DEET-emission by the skin was measured at 0, 2, 4 and 6 h after application using solid phase micro-extraction (SPME): the forearm of each subject was enclosed in a nonreactive bag made from polyethylene terephthalate (Nalophan; Kalle Nalo GmbH, Wursthüllen, Germany), and a SPME fiber (65 μ m

polydimethylsiloxane / divinylbenzene stableflex, Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) was introduced with a manual holder into the Nalophan bag, taking care not to touch the skin surface with the fiber. The fiber was then exposed in close proximity (2 cm) to the skin surface for 30 min. Five series of odor collections were carried out from four people. Seven 7 × 7 cm nets impregnated with 250 mg/m² of DEET were also enclosed in separate Nalophan bags, and the headspace was similarly collected 1 h post-impregnation. SPME odor collections were analyzed by chromatography-mass spectrometry using a quadrupole mass spectrometer Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan), interfaced with Shimadzu gas chromatography (GC) apparatus. The GC was equipped with an Optima 5-MS fused silica capillary column (5% diphenyl - 95% dimethylpolysiloxane) (Macherey-Nagel, Düren, Germany) (length: 30 m; diameter: 0.25 mm; 0.25 μ m film thickness), with helium as the carrier gas (1 ml/min), and programmed 5 min isothermal at 40 °C, then 40 °C to 150 °C at 4 °C/min, then to 240 °C at 16 °C/min. DEET mass spectrum was identified by matching the mass spectrum with data of Wiley registry of Mass Spectral Data (9th ed.), NIST MS Database (2011) and Adams software library (2007). DEET peak areas for each time point (T+0 to T+6h) were then compared to the mean DEET peak area of impregnated nets.

Second blood-feeding and exposure to DEET

A second blood meal was provided to female mosquitoes 3 or 4 days after the first. Mosquitoes were starved for 1 day. For this blood meal, each group of mosquitoes (i.e. DEET pre-exposed and control) were split into two subgroups for the second exposure: half were exposed to ethanol and the other half to DEET. Therefore, after the first and second blood meal, we obtained the following four treatments according to the chemical mosquitoes were exposed: (i) DEET-DEET; (ii) DEET-ethanol; (iii) ethanol-DEET; and (iv) ethanol-ethanol. For each replicate during this second blood meal, a subset of DEET pre-exposed and control mosquitoes were followed individually during blood-feeding. To do this, female mosquitoes were individually placed into 30 ml tubes, whereas the remaining mosquitoes were placed into paper cups at 25 females per cup for a grouped blood meal, using the same device as described above for the first exposure. Individual and grouped females were provided the second blood meal again through DEET or ethanol impregnated nets and a parafilm membrane. The dose of 250 mg/m² of DEET was used on 15 × 17 cm nets for the grouped mosquitoes and 7 × 7 cm for the individual mosquitoes. Feeders for grouped mosquitoes were filled with 500 μ l of blood, whereas for individually-exposed females they were filled with 200

µl. After 1 h of exposure, the number of blood-fed females was counted, and they were all kept singly in the same conditions as during the rearing in order to monitor life-history traits. Size of the blood meal, oviposition rate, fecundity, fertility, emergence rate of the offspring and survival were used as fitness indicators to assess the long-term impact of DEET exposure on mosquitoes. Additionally, as the irritancy of DEET may affect the number of attempts to blood-feed and thus the energy spent to take a blood meal may increase, female activity during blood-feeding was also measured.

To control for a potential genetic selection of DEET insensitivity which could affect the feeding success under the presence of DEET, the offspring from the tested females were kept and the descendant females were exposed to a blood meal in the presence/absence of DEET according to the protocol used for the second blood meal of their mothers. Comparisons of the blood-feeding success through DEET-impregnated nets between offspring females from DEET-exposed mothers and from control mothers were thus carried out.

Recording of life history traits

Activity monitoring

Flight activity during exposure to the second blood-feeding was monitored in individually-tested mosquitoes using a locomotor activity monitor system (TriKinetics, Waltham, MA, USA). The device consists of a series of infrared LEDs placed around a 30 ml tube where the mosquito is placed, and each time it crosses the infrared beams, these are interrupted. The infrared beams were placed next to the membrane feeder and as a mosquito came back and forth to the provided blood, interruption of the beams was recorded. The number of interruptions (i.e. crossings) was used as a proxy of the mosquito flight activity during the assay.

Blood meal size

The quantity of excreted haematin during blood digestion was used to assess the quantity of ingested hemoglobin during the first and second blood meals [29]. To do this, a subset of blood-fed females during the first blood meal and all fed females during the second blood meal were maintained in individual vials for 48 h. Female mosquitoes were then removed, and excreta was eluted in 1 ml of 1% lithium carbonate solution. Absorbance of the eluate was measured at 390 nm by a VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The quantity of excreted haematin by individual females was estimated by using the standard curve obtained from known concentrations of porcine haematin (1–100 µg/ml) (Sigma-Aldrich) and used as a proxy for the blood meal size.

Fecundity, fertility and survival

After ingestion of the first blood meal and digestion, groups of 30 fed females were placed into cages with moist cotton and filter paper for oviposition. After the second blood meal and digestion, all females were individually placed in paper cups. The bottom of the cup was covered with moist cotton and filter paper to allow oviposition. Eggs were collected on the moist cotton. Oviposition rate was measured in individual females, and the number of eggs laid by grouped or individual females was counted using Egg Counter [30] software. Eggs were then grouped by treatment and put into demineralized water. The number of adult descendants of each batch was counted to determine the number of offspring produced. The number of dead females was recorded every day to ascertain the survival.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the software R 3.3.2 [31].

Blood-feeding

Logistic regression by generalized linear mixed-effects model (*glmer*, binomial distribution, logit-link, *lme4* package [32]) was used to compare the proportion of blood-fed females after the first blood meal, with batch included as a random effect. The effects of exposure to DEET during the first and second blood meal on the blood-feeding success during the second exposure were also evaluated by *glmer* with binomial distribution. The nature of the first and second exposure was included as fixed effect, and replicate was coded as a random factor. *Post-hoc* comparisons between the four groups of treatment at the second exposure were performed using multiple comparisons (Tukey's tests, *multcomp* package [33]). The effect of mother exposure on the success of blood-feeding of the offspring was analyzed by generalized linear model (*glm*, binomial distribution) with mothers and daughters exposure coded as a fixed factor.

Life-history traits

In a first analysis, we tested for the effect of the first exposure on subsequent life history traits (type 2 ANOVA, *car* package [34]). Quantity of excreted haematin and fertility (mean number of descendants produced) were analyzed using a linear mixed-effects model with a Gaussian distribution, after sqrt-transformation and confirmation of data normality (*lmer* and *lme4* packages). Number of eggs laid (expressed as a mean per female) was also analyzed using *lmer* with a Gaussian distribution, without data transformation. Emergence rate (proportion of eggs that reached adult stage) was assessed by using *glmer* with binomial error distribution. For all these models, replicate was coded as a random factor.

In a second analysis, we tested for the effect of the first and the second exposure on each life history trait considered subsequent to the second exposure (type 2 and 3 ANOVA, *car* package). Quantity of excreted haematin, fertility and emergence rate were analyzed using the same methodology as described above. Oviposition rate was analyzed by *glmer* with binomial error distribution. Number of eggs laid subsequent to the second blood meal was obtained from individually-followed females and analyzed by generalized linear mixed models using AD Model Builder to account for over-dispersion (*glmmadmb*, negative binomial distribution, *glmmADMB* package [35]). Survival was evaluated with a mixed effects Cox proportional hazards regression model (packages *survival*, *coxme* [36, 37]). For these models, the nature of the first and the second exposure was included as a fixed factor and replicate was coded as a random factor. Flight activity was estimated by *glmmADMB* with the nature of the first and the second exposure coded as a fixed factor.

The influence of several explanatory variables was investigated by including in the models: mosquito age, replicates, and the type of exposure (grouped vs individual). The contribution of each explanatory variable was assessed sequentially using ANOVA function, with non-significant terms removed from the model. Model selection was performed using AIC and analysis of the residuals (*plotresid*, *RVAideMemoire* package [38]). Results are presented as mean ± standard error (SE) and proportion ± 95% confidence interval (CI).

Results

Biological relevance of the used concentration of DEET

When female mosquitoes were provided a first blood meal through a net impregnated with 250 mg/m² of DEET versus control, DEET induced a 60% inhibition of blood meal ($\chi^2 = 51.42, df = 1, P < 0.0001$) showing that the dose used significantly affected the feeding success. Emanations of such impregnated net were measured in regards to sprayed DEET on skin according to the guidance for the use of DEET. Odor captures from volunteers' arms with added DEET showed that the concentration used in the assays approximately corresponded to emanations of an arm two hours after DEET cutaneous application at the recommended dose (Fig. 1).

Effect of a prior blood meal in contact with DEET on the success of the second blood meal upon a DEET-treated net

Blood-feeding success at the second blood meal was tested for 706 females (219 for the grouped exposure and 487 for the individual exposure) across eight replicates. Generalized linear mixed model revealed no effect of the first exposure on the success of feeding during the second blood meal ($\chi^2 = 0.18, df = 1, P = 0.67$). The

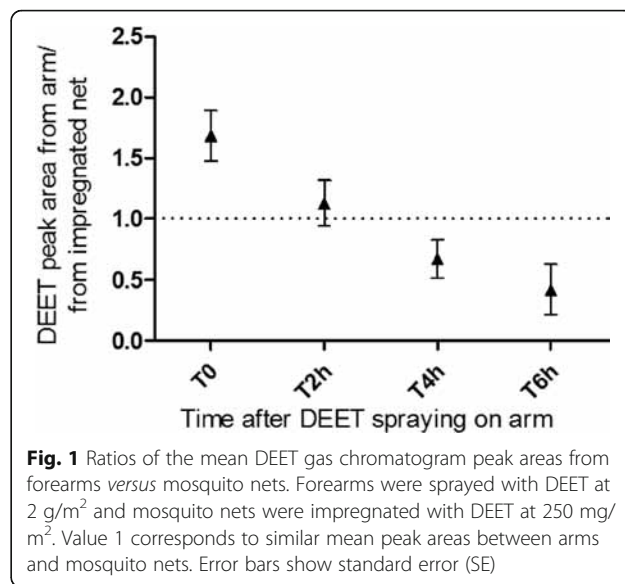


Fig. 1 Ratios of the mean DEET gas chromatogram peak areas from forearms versus mosquito nets. Forearms were sprayed with DEET at 2 g/m² and mosquito nets were impregnated with DEET at 250 mg/m². Value 1 corresponds to similar mean peak areas between arms and mosquito nets. Error bars show standard error (SE)

success of blood-feeding during the second blood meal was only influenced by the nature of the second exposure ($\chi^2 = 105.42, df = 1, P < 0.0001$), the presence of DEET inducing a 75% inhibition of the blood-feeding. When considering the four treatments at the second exposure (Fig. 2), paired comparisons showed no differences in the blood-feeding through an ethanol-treated net between DEET pre-exposed and control females ($P = 0.99$), as well as no differences in the proportion of blood-fed females upon a DEET-treated net between control and DEET-pre-exposed ones ($P = 0.82$). This confirms that the success at taking a blood meal at the second exposure is not influenced by the nature of the first

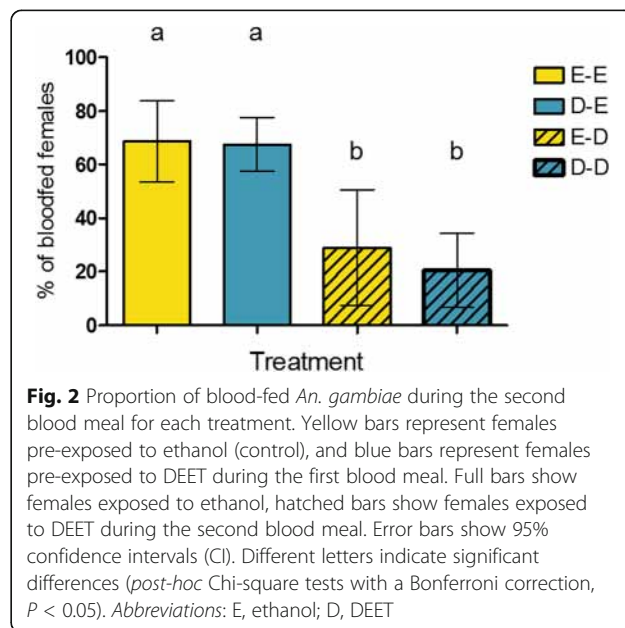


Fig. 2 Proportion of blood-fed *An. gambiae* during the second blood meal for each treatment. Yellow bars represent females pre-exposed to ethanol (control), and blue bars represent females pre-exposed to DEET during the first blood meal. Full bars show females exposed to ethanol, hatched bars show females exposed to DEET during the second blood meal. Error bars show 95% confidence intervals (CI). Different letters indicate significant differences (*post-hoc* Chi-square tests with a Bonferroni correction, $P < 0.05$). Abbreviations: E, ethanol; D, DEET

exposure. Analysis on the offspring revealed no effect of mother exposure to DEET on the success of the daughters to blood-feed upon a DEET-treated net or an ethanol treated net ($\chi^2 = 0.002$, $df = 1$, $P = 0.96$).

Effect of DEET exposure on mosquito life history traits after the first blood meal

The size of the blood meal was assessed using a subset of 173 blood-fed-females followed individually across 3 replicates. Fecundity, fertility and emergence rate were measured in the 1399 blood-fed females followed by group of 30 across eight replicates, and expressed as a mean per female. DEET exposure of female mosquitoes during the first blood meal revealed a strong impact on the subsequent number of eggs laid, with females pre-exposed to DEET laying significantly less eggs than control females ($\chi^2 = 8.37$, $df = 1$, $P = 0.0038$). DEET exposure at the first blood meal, however, did not affect the size of the blood meal ($F_{(1, 169)} = 3.17$, $P = 0.077$), the number of descendants produced ($\chi^2 = 1.56$, $df = 1$, $P = 0.21$) nor the emergence rate ($\chi^2 = 1.67$, $df = 1$, $P = 0.20$) (Fig. 3).

Effect of DEET exposure on mosquito life history traits after the second blood meal

Data related to life history traits after the second blood meal was collected in blood-fed females followed

individually across eight replicates. Activity was assessed in a subset of 203 females during blood-feeding. The size of the blood meal, oviposition rate and survival were measured in 320 females. Fecundity was estimated in the 228 females that oviposited. For fertility and emergence rate measurement, larvae were grouped by treatment so data is expressed as a mean per female. A significant effect of the first exposure was observed on several life history traits ensuing the second blood meal (Fig. 4). Compared to control females, DEET-pre-exposed females showed a reduced volume of blood intake ($\chi^2 = 9.034$, $df = 1$, $P = 0.0027$), as well as a lower number of eggs laid ($\chi^2 = 4.58$, $df = 1$, $P = 0.032$) and a lower number of descendants produced ($\chi^2 = 6.23$, $df = 1$, $P = 0.013$). These effects were observed independently of the nature of the second exposure, as statistical models revealed no effect of the nature of the second exposure on these life history traits ($\chi^2 = 0.58$, $df = 1$, $P = 0.45$; $\chi^2 = 0.0031$, $df = 1$, $P = 0.96$ and $\chi^2 = 0.065$, $df = 1$, $P = 0.80$, respectively). Additionally, a significant interaction was observed between the two exposures regarding the emergence rate subsequent to the second blood meal. Yet, emergence rate is lower in the offspring of DEET-pre-exposed females ($\chi^2 = 152.44$, $df = 1$, $P < 0.0001$). Moreover, independently of the nature of the second exposure ($\chi^2 = 1.30$, $df = 1$, $P = 0.25$), mosquitoes that were pre-exposed to DEET showed a higher flight

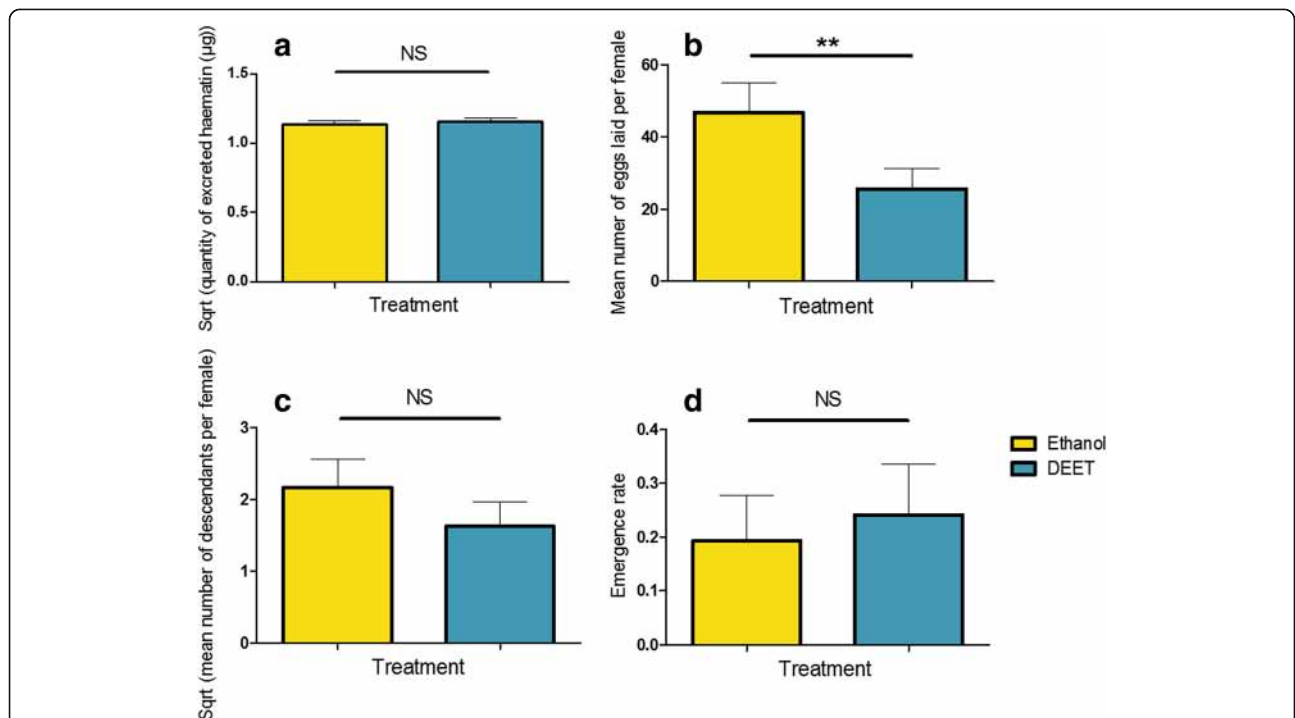
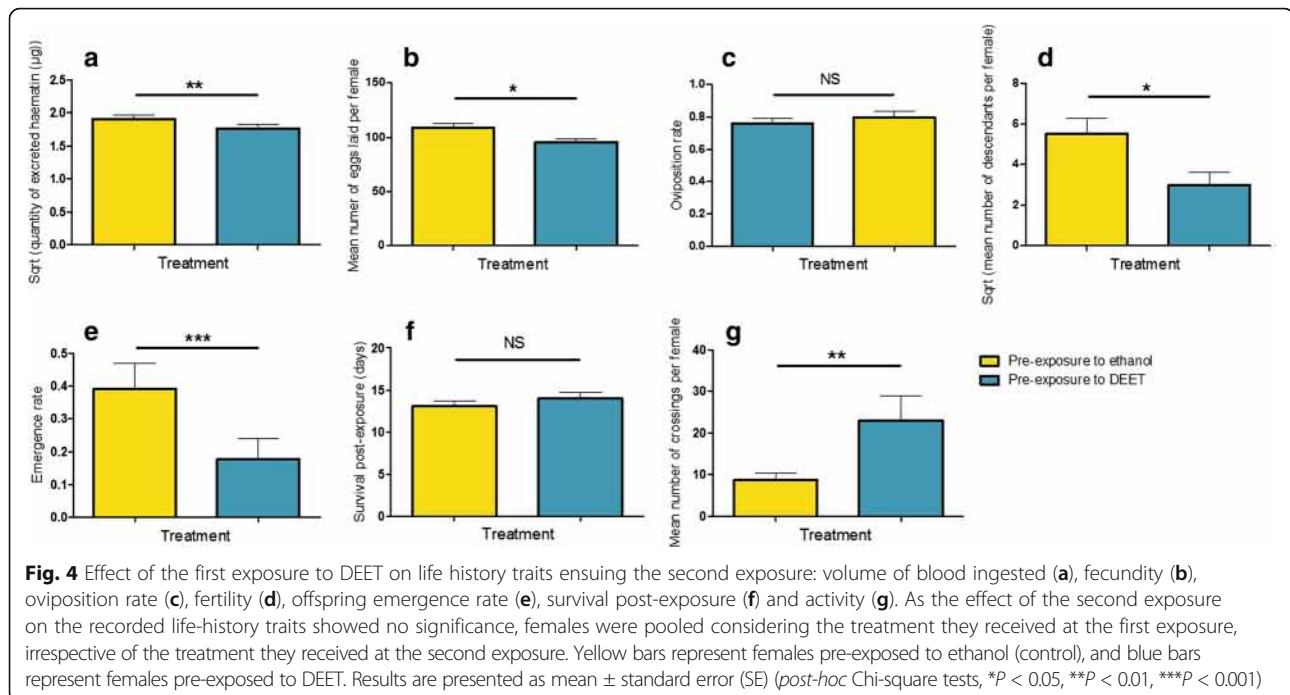


Fig. 3 Effect of the first exposure to DEET on life history traits ensuing the first exposure: volume of blood ingested (a), fecundity (b), fertility (c) and offspring emergence rate (d). Yellow bars represent females pre-exposed to ethanol (control) and blue bars represent females pre-exposed to DEET. Results are presented as mean ± standard error (SE) (post-hoc Chi-square tests, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)



activity at the second exposure than control mosquitoes ($\chi^2 = 8.02$, $df = 1$, $P = 0.0046$). Additionally, oviposition rate and mosquito survival were neither influenced by the first ($\chi^2 = 0.0001$, $df = 1$, $P = 0.99$ and $\chi^2 = 0.0017$, $df = 1$, $P = 0.97$, respectively) nor the second exposure ($\chi^2 = 0.63$, $df = 1$, $P = 0.43$ and $\chi^2 = 1.0045$, $df = 1$, $P = 0.32$, respectively).

Discussion

The present study offers new insights on the effects of multiple exposures to DEET repellent on a vector mosquito. Experiments showed that, in the tested conditions, a prior successful blood meal taken in spite of contact with DEET did not affect the success of blood-feeding at the subsequent exposure. These results contrast with previous observations on mosquitoes which suggested that a prior exposure to DEET reduces the aversion at the following exposure, and may thus affect repellent efficacy over time [19, 20]. These studies evidenced that behavioral repellency can be reduced both by conditioned learning (association of a reward and the repellent odor) [20] and by sensory habituation (olfactory receptors no longer respond to a stimulus after being stimulated) [19]. Our data thus do not support such mechanisms in the tested conditions. The discrepancy in these observations can be explained by differences in experimental setup, design and mosquito species. First, previous studies intended to evaluate mosquito learning abilities, and focused on olfactory repellency rather than contact repellency. In contrast, the present experiment aimed at mimicking blood-feeding

through a DEET-impregnated net or on sprayed skin, so mosquitoes were exposed to a direct contact with the repellent during the blood meal. The exposure here thus involves olfactory and gustatory receptors, which contrasts with previous studies where only olfactory receptors were involved. Recently, progress in the understanding of DEET's mode of action indicates that not only is olfaction implicated in DEET detection, but that DEET is also actively detected by gustatory receptors during contact [39]. Yet, little is known about the interactions between olfactory and gustatory stimulations during the learning process. Olfactory perception of DEET along with its irritancy to gustatory receptors during contact could have triggered more complex responses and prevented the processes of learning and memory. Additionally, because our objective was to test multiple exposures to DEET in epidemiologically relevant conditions, the time between the first and second exposure was chosen to correspond to a gonotrophic cycle; three or four days correspond to the natural period of time between blood meals, rather than the shorter times (a few hours to one day) used in previous studies. The time between the two exposures is expected to be a discriminant parameter that explains discrepancies with previous studies. Indeed, literature data showed that in both conditioned learning and sensory adaptation, insect behavior is impacted for a few minutes to 24 hours after exposure ([40–44], but see [45]). However, female blood-feeding behavior is inherent to gonotrophic cycles, and developing costly mechanisms such as associative learning must be compensated by the selective

advantage they offer. This implies that, to confer selective value, learning abilities should persist at least between two gonotrophic cycles. For now, associative learning in mosquitoes in which the association was retained for several days has been evidenced only once to our knowledge [45]. This raises the consideration that mosquitoes must have the physiological faculties to be conditioned and to memorize an association between two stimuli over two gonotrophic cycles. However, it is possible that learning abilities identified in previous studies may persist beyond three days, even though experimental designs have not provided evidence for it. The absence of apparent long-term memory associated with the learning process could be the consequence of some parameters that were absent from our experimental design. Indeed, others stimuli may be determinant for the establishment of learning, such as host volatiles. Yet, some studies suggest that DEET may act by inhibiting the detection of host odors by mosquitoes [46–48]. As the present design aimed at evidencing the potential effects of DEET exposure using heat as a single attractant, it does not allow the observation of the potential combined effects of repellent and host volatiles on mosquito memory. However, DEET acts *via* a complex mode of action and was also shown to be efficient in the absence of attractant odors [49]. Moreover, the described behavioral changes following a prior exposure to DEET were observed both in the presence and absence of host volatiles [19, 20]. We do not exclude that, under an experimental design using host odors, contrasting effects of DEET exposure on mosquito behavior could be observed. It thus remains an open question whether DEET and host-specific cues can act synergistically in triggering a mosquito associative learning process.

From another perspective, the present study did not aim at testing for the effect of an operant conditioning in laboratory but rather for the effect of multiple exposures to repellents that mosquitoes may actually face over time in biological situations. As our experimental design consisted of one single exposure before testing, it is worth considering that learning requires a higher number of exposures and thus more gonotrophic cycles to take place. Finally, previous studies were performed using *Aedes aegypti*. The contrasted results observed could then lie in the choice of mosquito species, as *Aedes* and *Anopheles* could respond differently to the DEET treatment due to evolutive divergence. The fact that our study did not reveal an impact of a prior exposure to DEET on the success of blood-feeding at the subsequent exposure supports the efficacy of this repellent for protection against mosquito bites. However, further investigations to determine the actual effect of multiple exposures in diverse environmental conditions and mosquito species are still needed.

Interestingly, the present study showed that the contact with DEET during a blood meal affects mosquito life history traits. First, DEET-pre-exposed mosquitoes showed a reduction in both fertility and fecundity, suggesting an overall reduction in the number of offspring produced. These observations are consistent with literature showing decreases in blood engorgement levels in *Ae. aegypti* up to several hours after exposure to DEET [50]. As only the effect of the treatment during the first blood meal is significant and observed after the second blood meal, this DEET effect does not appear to be the consequence of additive effects of the two blood meals, but rather a delayed effect of the first exposure that is expressed beyond the second exposure, even though mosquitoes are no longer exposed to DEET. It can be hypothesized that, since DEET acts as a toxicant against mosquitoes, the energy needed for detoxifying may be used to the detriment of the energy needed for reproduction. This hypothesis needs further investigation, as a possible cost of the detoxification following repellent exposure has, to our knowledge, never been investigated. Then, although mosquito survival was not observed to be affected by DEET exposure in our experimental design, the overall reduction in the number of offspring produced for DEET exposed females may potentiate DEET efficacy to control mosquitoes.

Pre-exposure to DEET also induced an increase of the flight activity during the subsequent blood meal, independently of the nature of the second exposure. DEET acts as an excito-repellent that has been shown to inhibit cholinesterases, which directly affects insect activity [51–53]. Although our study did not find any effect of the increased activity on the insect survival, it can be hypothesized that multiple exposures to DEET may affect the mosquito nervous system in a way that may, in the long-term, impact their survival or their ability to find hosts, mates, or suitable oviposition sites.

Taken together, these results strengthen the idea that the development of repellent-based control methods could potentiate the existing strategies in the fight against vector-borne diseases. Long-lasting-repellent-treated-nets alone or in combination with insecticides could allow the restoration of the efficacy of impregnated nets against nocturnal insecticide-resistant mosquitoes. Indeed, the main weakness of repellents is their volatility, but it has recently been shown that they could be encapsulated for a slow diffusion and be efficient over a period of months [54, 55]. When used as skin aerosols, repellents such as DEET also have a substantial potential in fighting diurnal mosquitoes, and could also affect insecticide-resistant mosquitoes. Moreover, the use of repellents could allow a decrease in the amount of insecticides involved in vector control programmes. This will help slowing down the spread of resistance mechanisms

and reducing the public health challenges caused by the use of insecticides, such as toxicity for non-target insects, persistence in the environment, and human and animal health issues. Additionally, although genetic insensitivity to DEET can be selected in laboratory [56], no evidence for repellent-resistance was found in nature. As repellents do not kill their target but rather deter it for its initial host, the selective pressure induced by the use of repellents may be expected to be lower compared to the one induced by the use of insecticides. Consequently, resistance mechanisms consecutive to the massive use of repellents are less prone to spread rapidly, making repellents potential evolutionary-proof active compounds available to fight pathogen transmission [57].

It is worth noting that a risk that should be taken into account for the establishment of new control strategies is that a reduction of the blood engorgement, such as we observed in DEET-pre-exposed mosquitoes, could have implications on mosquito vectorial capacity, as it has been associated with increased re-feeding [50, 58]. Further investigation is needed to determinate the impact of DEET exposure on mosquito subsequent feeding behavior in natural conditions.

Conclusions

The present study indicates that, under our experimental design, a successful blood meal obtained upon a DEET-treated net does not affect the success of blood-feeding in spite of DEET at the subsequent exposure in *An. gambiae*. However, we evidence here for the first time deleterious effects of DEET exposure on mosquito life-history traits related to fecundity and fertility. The data gathered in this study highlight the potential of repellents such as DEET for controlling vector mosquitoes. Although the observed deleterious effects of DEET exposures on mosquitoes are not expected to significantly reduce transmission alone, they should be taken into account in predictions of efficacy of repellent-based interventions. Additionally, because the use of insecticides alone may no longer be sustainable, repellents could be part of integrated management programs based on complementary and alternating tools that likely avoid the appearance of resistance mechanisms.

Abbreviations

DEET: N,N-diethyl-3-methylbenzamide

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the technical/research platform dedicated on vectors at the IRD centre for providing mosquitoes and technical support. This platform is a member of the Vectopole Sud network and of the LabEX CEMEB (Centre Méditerranéen de l'Environnement et de la Biodiversité) in Montpellier. We also thank the CEFÉ's platform of chemical analyses in ecology (PACE) for technical assistance in chemical analyses. We are very grateful to Angélique Porciani and David Carrasco for their help in statistical analysis and their useful comments on the manuscript.

Funding

This study was supported by The French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (EST-2016/1/39), by the Languedoc-Roussillon (LR)/ Occitanie region and EU-FEDER under the name "Chercheur(se)s d'Avenir", and by the LabEx CeMEB, under an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

AC, CP, FC, PLAA and MM designed the study. LD and MM performed odor collections and chromatograms analyses. MM performed data acquisition. MM and AC performed statistical analysis. MM, LD and AC drafted the manuscript. FC and PLAA helped with mosquito rearing and repellent preparation. CP and AC were responsible for financial support. PLAA, FC and CP reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The protocol received favorable recommendation from the CPP (Comité de Protection des Personnes) (2018-A00119-46).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

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

Author details

¹MIVEGEC, IRD, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France. ²CEFE, University Paul Valéry Montpellier 3, CNRS, University of Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France. ³Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire.

Received: 5 March 2018 Accepted: 18 July 2018

Published online: 25 July 2018

References

1. WHO. Global vector control response 2017–2030. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005625.
3. WHO. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. Geneva: World Health Organization; 2012.
4. Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Heal*. 2017;3(Suppl. 1):e000530.
5. Shragai T, Tesla B, Murdock C, Harrington LC. Zika and chikungunya: mosquito-borne viruses in a changing world. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1399:61–77.
6. Roche B, Léger L, L'Ambert G, Lacour G, Foussadier R, Besnard G, et al. The spread of *Aedes albopictus* in Metropolitan France: contribution of environmental drivers and human activities and predictions for a near future. *PLoS One*. 2015;10:e0125600.
7. Schaffner F, Medlock JM, Van Bortel W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:685–92.
8. N'Gouessan R, Rowland M, Moumouni T, Bli N, Carnevale P. Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:1091–7.
9. Faulde MK, Albiez G, Nehring O. Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. *Parasitology*. 2010;106:957–65.

10. Pennetier C, Chabi J, Martin T, Chandre F, Rogier C, Hougang J. New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. *Parasit Vectors*. 2010;3:81.
11. Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapied B, et al. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J*. 2007;6:38.
12. Bonnet J, Pennetier C, Duchon S, Lapied B, Corbel V. Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2009;2:17.
13. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14:1707–14.
14. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B, et al. Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: efficacy and behavioural response of natural free-flying *An. gambiae* mosquitoes. *PLoS One*. 2009;4:e7896.
15. Faulde MK, Nehring O. Synergistic insecticidal and repellent effects of combined pyrethroid and repellent-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating multi-layer technique. *Parasitol Res*. 2012;111: 755–65.
16. Achee NL, Bangs MJ, Farlow R, Killeen GF, Lindsay S, Logan JG, et al. Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. *Malar J*. 2012;11:164.
17. Leal WS. The enigmatic reception of DEET - the gold standard of insect repellents. *Curr Opin Insect Sci*. 2014;6:93–8.
18. Vinauger C, Lahondère C, Cohuet A, Lazzari CR, Riffell JA. Learning and memory in disease vector insects. *Trends Parasitol*. 2016;32:761–71.
19. Stanczyk NM, Brookfield JFY, Field LM, Logan JG. *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. *PLoS One*. 2013;8:e54438.
20. Vinauger C, Lutz EK, Riffell JA. Olfactory learning and memory in the disease vector mosquito, *Aedes aegypti*. *J Exp Biol*. 2014;217:2321–30.
21. Gillies MT. The duration of the gonotrophic cycle in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*, with a note on the efficiency of hand catching. *East Afr Med J*. 1953;30:129–35.
22. Deletre E, Martin T, Campagne P, Bourguet D, Cadin A, Menut C, et al. Repellent, irritant and toxic effects of 20 plant extracts on adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* mosquito. *PLoS One*. 2013;8:e82103.
23. Menda G, Uhr JH, Wyttenbach RA, Vermeylen FM, Smith DM, Harrington LC, et al. Associative learning in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: avoidance of a previously attractive odor or surface color that is paired with an aversive stimulus. *J Exp Biol*. 2013;216:218–23.
24. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2016.
25. Sathantriphop S, Thanispong K, Sanguanpong U, Achee NL, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. Comparative behavioral responses of pyrethroid-susceptible and -resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to citronella and eucalyptus oils. *J Med Entomol*. 2018;51:1182–91.
26. WHO. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. Geneva: World Health Organization; 2009.
27. EPA. Product performance test guidelines. OPPTS 810.3700: Insect repellents to be applied to human skin. Washington: Office of Chemical Safety and Pollution Prevention; 2010.
28. ANSES. Avis de l'Anses. Avis n° PB-12-00194. INSECT ECRAN ZONES INFESTEES. Maisons-Alfort: 2013; 1–20. https://www.anses.fr/fr/system/files/INSECTECRA_PB-12-00194_BAMM_Ans.pdf.
29. Briegel H. Determination of uric acid and hematin in a single sample of excreta from blood-fed insects. *Experientia*. 1980;36:1428.
30. Mollahosseini A, Rossignol M, Pennetier C, Cohuet A, dos Anjos A, Chandre F, et al. A user-friendly software to easily count *Anopheles* egg batches. *Parasit Vectors*. 2012;5:122.
31. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2008.
32. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear-mixed effects models using lme4. *J Stat Softw*. 2015;67:1–48.
33. Hothorn T, Bretz F, Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical J*. 2008;50:346–63.
34. Fox J, Weisberg S. An R Companion to Applied Regression. 2nd ed. Thousand Oaks, CA: Sage; 2011.
35. Fournier D, Skaug H, Ancheta J, Iannelli J, Magnusson A, Maunder M, et al. AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optim Method Softw*. 2012;27:233–49.
36. Therneau T, Grambsch P. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. New York: Springer; 2000.
37. Therneau T. Coxme: mixed effects Cox Models. R Package version 2.2-5. 2015. <https://CRAN.R-project.org/package=coxme>.
38. Hervé M. RVAideMemoire: diverse basic statistical and graphical functions. R package version 0.9-65. 2017. <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>.
39. Sanford JL, Shields VDC, Dickens JC. Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Naturwissenschaften*. 2013;100:269–73.
40. Tomberlin JK, Rains GC, Allan SA, Sanford MR, Lewis WJ. Associative learning of odor with food- or blood-meal by *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Naturwissenschaften*. 2006;93:551–6.
41. Barbarossa IT, Muroli P, Setzu MD, Angioy AM. Dose-dependent nonassociative olfactory learning in a fly. *Chem Senses*. 2007;32:535–41.
42. Sto KF, Hovemann BT, Carlson JR. Olfactory Adaptation Depends on the Trp Ca 2+ Channel in *Drosophila*. *J Neurosci*. 1999;19:4839–46.
43. Sfara V, Mougabure-Cueto G, Zerba EN, Alzogaray RA. Adaptation of the repellency response to DEET in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*. 2011;57:1431–6.
44. Sfara V, Mougabure-cueto GA, González-audino PA. Modulation of the behavioral and electrical responses to the repellent DEET elicited by the pre-exposure to the same compound in *Blattella germanica*. *PeerJ*. 2016;4:e2150.
45. Chilaka N, Perkins E, Triplet F. Visual and olfactory associative learning in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Malar J*. 2012;11:27.
46. Ditzgen M, Pellegrino M, Voshall LB. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*. 2008;319:1838–42.
47. Davis EE. Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1985;22:237–43.
48. Degennaro M, McBride CS, Seeholzer L, Nakagawa T, Dennis J, Goldman C, et al. Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature*. 2013;498:487–91.
49. Syed Z, Leal WS. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:13598–603.
50. Sugiharto VA, Grieco JP, Murphy JR, Olsen CH, Colacicco-mayhugh MG, Stewart VA, et al. Behavior, chemical ecology effects of preexposure to DEET on the downstream blood-feeding behaviors of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *J Med Entomol*. 2016;53:1100–4.
51. Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Stojan J, Girard E, et al. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol*. 2009;7:47.
52. Williamson SM, Moffat C, Gomersall MAE, Saranzewa N, Connolly CN, Wright GA. Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of honeybees. *Front Physiol*. 2013;4:13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386834>.
53. Jensen CS, Garsdal L, Baatrup E. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environ Toxicol Chem*. 1997;16:1727–32.
54. N'Guessan R, Knols BGJ, Pennetier C, Rowland M. DEET microencapsulation: a slow-release formulation enhancing the residual efficacy of bed nets against malaria vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:259–62.
55. Kitau J, Oxborough R, Matowo J, Moshia F, Magesa SM, Rowland M. Indoor residual spraying with microencapsulated DEET repellent (N, N-diethyl-m-toluamide) for control of *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus*. *Parasit Vectors*. 2014;7:446.
56. Stanczyk NM, Brookfield JFY, Ignell R, Logan JG, Field LM. Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107: 8575–80.
57. Read AF, Lynch PA, Thomas MB. How to make evolution-proof insecticides for malaria control. *PLoS Biol*. 2009;7(4):e1000058.
58. Jackson BT, Brewster CC, Paulson SL, Jackson BT, Brewster CC. La Crosse virus infection alters blood feeding behavior in *Aedes triseriatus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2012;49:1424–9.

1 Prior contact with permethrin decreases its irritancy at the following exposure among a
2 pyrethroid-resistant malaria vector *Anopheles gambiae*

3

4 Margaux Mulatier^{1,2*}, Cédric Pennetier^{1,3}, Fabrice Chandre¹, Laurent Dormont², Anna Cohuet³

5 ¹: MIVEGEC, IRD, CNRS, Univ. Montpellier, Montpellier, France.

6 ²: CEFE, Univ Paul Valéry Montpellier 3, CNRS, Univ Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier,
7 France

8 ³: Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire

9 * Corresponding author: margaux.mulatier@ird.fr

10 **Abstract**

11 Insecticide-treated nets (ITNs) remain major components for vector control despite the spread of
12 resistance mechanisms among mosquito populations. We hypothesized that multiple exposures to
13 pyrethroids may decrease its irritancy to mosquitoes due to physiological and behavioral changes,
14 possibly reducing efficacy of vector control tools. Despite epidemiological relevance, the effects
15 of multiple exposures to pyrethroids on their efficacy against pyrethroid-resistant mosquitoes has
16 received little interest.

17 In the present study, we assessed the effects of a blood-meal successfully obtained upon a
18 permethrin-treated net on the success a taking a second blood-meal in presence of permethrin 3 or
19 4 days later, in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* carrying pyrethroid resistance alleles. We
20 also measured the impact of exposure to permethrin on life-history traits to address the long-term
21 efficacy of ITNs along mosquito's lifespan.

22 Our results showed that females that successfully blood-fed upon a permethrin-treated net were no
23 longer inhibited by permethrin at the following exposure. Bloodmeal inhibition due to permethrin
24 was not affected by female size nor by exposure of mothers when testing the offspring, allowing
25 to discard the effect of genetic or physiological selection and favoring the effect of previous
26 experience. Also, a prior exposure to permethrin did not affect mosquito engorgement and activity
27 during the second blood-meal, nor subsequent fecundity, fertility and survival. These results give
28 insights to understand the long-term efficacy of the most used anti-mosquito compounds, and allow
29 to reevaluate the criteria used when choosing the most efficient compounds to fight malaria
30 mosquitoes.

31 **Keywords**

32 Permethrin, Malaria, Multiple-exposures, *An. gambiae*, Pyrethroid-resistant, Experience, Fitness

33 **Introduction**

34 Mosquito-borne diseases are responsible for 700,000 deaths every year, with communities with
35 poor-living conditions being the most affected [1]. Vector control plays a key role in the fight
36 against these diseases, and mostly relies on the use of insecticides. Particularly, insecticide-treated
37 nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS) are the primary and almost the single tools available
38 to protect people against mosquito bites [2]. The extensive use of insecticides both in vector control
39 and agriculture has triggered considerable selective pressure on mosquito populations [3–6],
40 inducing the spread of multiple resistance mechanisms among them [7]. For instance, the *kdr*
41 mutation is now distributed worldwide and confers resistance to pyrethroids [2,8–10], the main
42 class of insecticides used for vector control and the single allowed on nets impregnation [2,11].
43 The propagation of resistance mechanisms not only threatens the efficacy of the current control

44 tools [12–14], but also indirectly favors the resurgence and explosive outbreaks of mosquito borne
45 diseases, imposing a serious threat to public health programs [15–17].

46 To date, alternatives to replace insecticides in the fight against vector-borne diseases remain
47 limited. In consequence, insecticides still prevail as the main tool for protecting people against
48 vector-borne diseases. This is particularly true in the case of pathogens transmitted by nocturnal
49 mosquitoes such as malaria parasites, against which pyrethroid-impregnated nets are expected to
50 provide physical and chemical barrier against mosquitoes [18]. Pyrethroid-treated nets are also
51 thought to remain efficient to some extent against pyrethroid-resistant mosquitoes, due to their
52 intrinsic characteristics of contact irritancy [12,13,19], interactions with additional stresses such as
53 parasite infection [20,21], added to the possible delayed mortality they induce [22]. Such residual
54 efficacy of ITNs against mosquitoes considered as pyrethroid-resistant may explain the observed
55 paradox between the dramatic spread of resistance alleles among vector populations and the
56 conserved efficacy of ITNs at epidemiological level [23]. In the context of intense use of
57 insecticides for vector control, the residual efficacy of pyrethroids among vector populations that
58 carry resistance mechanisms deserves great attention. However, very little has been dedicated to
59 the effects of multiple exposures to pyrethroids on mosquito physiology and their consequences on
60 long-term ITNs efficacy. Of special interest, as mosquitoes get infected during blood-feeding,
61 infectious mosquitoes are expected to be more prone to have experienced prior contact with
62 pyrethroid-treated nets than young and non-infectious individuals in areas of high ITNs cover.

63 Multiple exposures to pyrethroids among resistant populations could affect several physiological
64 mosquito mechanisms, such as sensory detection of the chemical, nervous integration of the
65 stimuli, and/or chemical detoxification [24–27]. For instance, cumulative exposures to pyrethroids
66 may negatively affect mosquito physiology, increasing their efficacy over time. This has been

67 observed in susceptible strains of *Anopheles* mosquitoes, where a prior exposure to pyrethroids
68 resulted in an increased susceptibility after 24 hours [28]. Also, ITNs efficacy could remain
69 constant along mosquito lifespan, as it was documented in susceptible [29] and insecticide-resistant
70 mosquitoes [22]. On the other hand, pyrethroids, and particularly permethrin, are known to induce
71 irritant effects on mosquitoes, and to act on mosquito behavior [30]. Multiple exposures to
72 pyrethroids could then affect mosquito behavior over time, and its irritancy when contacting
73 pyrethroids. These changes may reduce pyrethroids residual efficacy along the lifespan of resistant
74 mosquitoes. Finally, multiple exposures to pyrethroids could trigger habituation and complex
75 learning mechanisms, reducing their efficacy over time, as it was previously observed with
76 repellents [31,32].

77 Multiple exposures to insecticides may also affect mosquito life-history traits related to fecundity
78 and fertility, as it has been reported in insecticide-susceptible insects [33–35]. Interestingly, to our
79 knowledge, this has never been addressed in insecticide-resistant mosquitoes. Also, insecticide
80 efficacy is rarely assessed considering blood-feeding inhibition, which is nonetheless a biologically
81 relevant parameter directly related to parasite transmission. To this regard, looking beyond the first-
82 contact efficacy and considering insecticide resistance is of crucial interest for understanding the
83 implications of ITNs use for controlling pathogen transmission, as well as the interactions between
84 ITNs and pyrethroid resistance.

85 In the present study, we measured the effect of a successful blood-meal obtained upon a
86 permethrin-treated net on the success at blood-feeding despite the presence of permethrin at the
87 subsequent exposure, 3 or 4 days later, in the malaria mosquito *An. gambiae* s.s carrying pyrethroid
88 resistance alleles. We also measured the effect of permethrin on mosquito fitness after the first and
89 second bloodmeal, to assess the impact of permethrin exposure on mosquitoes' life history traits.

90 **Methods**

91 **Mosquito colony**

92 Experiments were performed on females of *An. gambiae*. that had the opportunity to mate and have
93 not been previously blood-fed. The used colony harbored the L1014F homozygote mutation (*kdr*-
94 west allele) in the gene coding for the voltage-gated sodium channel. This colony was constructed
95 by introgression of the *kdr*-west allele obtained from pyrethroid resistant mosquitoes in Kou
96 Valley, Burkina Faso, into the Kisumu genome. Mosquitoes were reared and tested in the technical
97 / research platform dedicated on vectors at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
98 Centre, Montpellier, France. They were maintained at 27 °C and 80 % of relative humidity with a
99 L:D photoperiod of 14:10. Larvae were provided TetraMin (Tetra, Germany) and adults a 10 %
100 honey solution.

101

102 **First exposure to permethrin: blood-feeding through impregnated net**

103 Permethrin efficacy was assessed regarding mosquito ability to blood-feed through an impregnated
104 net. To do this, batches of 25 females aged of 7 - 11 days old and sugar-starved for 20 hours with
105 access to water were distributed in paper cups (H: 10 cm, \varnothing : 7 cm). In parallel, 15 × 17 cm pieces
106 of polyester net were impregnated with permethrin emulsifiable concentrate (Peripel®), diluted in
107 ethanol at the WHO recommended dose of 500 mg/m² for conventional net impregnation [12].
108 Corresponding control nets were impregnated with the solvent ethanol. After impregnation, nets
109 were left 1 hour at room temperature to allow the solvent to evaporate. They were then placed on
110 the cups containing mosquitoes, covering the mesh that closes the cup. Cups were put under glass
111 feeders sealed on one end with parafilm membrane, so mosquitoes would contact the impregnated

112 net while simultaneously blood-feeding. Feeders were filled with 500 µl of rabbit blood and linked
113 to a water bath circulation (Julabo Labortechnik, Seelbach, Germany) allowing to maintain blood
114 at 37 °C. This device allows the simultaneous exposure of 300 to 400 females for each replicate.
115 Exposure lasted one hour, after which the proportion of blood-fed females was recorded for each
116 treatment. Blood-fed females were then maintained in the same conditions as during the rearing for
117 subsequent recording of life history traits. They were supplemented with 10 % honey and were
118 given the opportunity to oviposit.

119 **Second exposure to permethrin: blood-feeding through impregnated net**

120 A second blood-meal through permethrin-impregnated net was provided 3 or 4 days after the first
121 exposure. Mosquitoes were again sugar-starved for 20 hours with access to water. Each group of
122 mosquitoes (control and permethrin-pre-exposed) was split into two subgroups for this second
123 exposure: half was exposed to ethanol and the other half to permethrin. The following four
124 treatments were then obtained regarding the treatment mosquitoes received at each exposure: i)
125 Ethanol - Ethanol (EE), ii) Permethrin - Ethanol (PE), iii) Ethanol - Permethrin (EP) and iv)
126 Permethrin - Permethrin (PP). During this blood-feeding, a subset of permethrin-pre-exposed and
127 control mosquitoes were followed individually for each replicate. Those females were placed
128 individually into 30 ml plastic vials, whereas the remaining were placed into paper cups at 25
129 females per cup for a grouped blood-meal, using the same device as described for the first exposure.
130 All females (individual and grouped) were provided the second blood-meal following the same
131 protocol as described above. The dose of 500 mg/m² of permethrin was used on 15 × 17 cm nets
132 for the grouped mosquitoes and on 7 × 7 cm nets for the individual mosquitoes. Feeders were filled
133 with 500 µl of blood for grouped mosquitoes and with 200 µl for individually-exposed females.
134 After one hour of exposure, the number of blood-fed females was counted, and they were all kept

135 singly in the same conditions as during the rearing in order to monitor life-history traits. Several
136 life-history traits were recorded and used as fitness indicators to assess the long-term impact of
137 permethrin exposure on mosquitoes: blood-meal size, oviposition rate, fecundity, fertility,
138 emergence rate of the offspring and survival. Besides, as the irritancy of permethrin may affect the
139 success to blood-feed and then possibly increase the energy spent to take a blood-meal, female
140 activity during blood-feeding was also measured.

141 *Life history traits recording*

142 *Mosquito activity*

143 Flight activity during the second blood-feeding and exposure was recorded in individually-tested
144 mosquitoes using a locomotor activity monitor system (TriKinetics, Waltham, MA). The device
145 consists of a series of infrared LEDs placed around a 30 ml vial where the mosquito is placed, and
146 each time it crosses the infrared beams, these are interrupted. The infrared beams were placed next
147 to the membrane feeder and as a mosquito came back and forth to the provided blood, the beams
148 interruption were recorded. The number of interruptions (*i.e.* crossings) was used as a proxy of the
149 mosquito flight activity during the assay.

150

151 *Blood-meal size*

152 Blood-meal size corresponds to the quantity of ingested hemoglobin during blood-meal. This
153 quantity was determined by using the quantity of excreted hematin during blood digestion, as these
154 two variables were shown to be correlated [36]. A subset of fed females after the first blood-meal
155 and all fed females after the second blood-meal were individually placed in plastic vials for 48
156 hours and supplemented with 10 % honey. They were then removed and excreta was eluted in 1

157 ml of 1 % lithium carbonate solution. Absorbance of the eluate was read at 405 nm by a TECAN
158 Sunrise absorbance microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The quantity of excreted
159 haematin by each female was estimated by using the standard curve obtained from known
160 concentrations of porcine haematin (1-100 µg/ml) (Sigma Aldrich).

161

162 *Fecundity, fertility and survival*

163 After ingestion of the first blood-meal and blood digestion, females were placed by group of 30
164 into cages (L: 15 cm, ø: 9 cm). After the second blood-meal and digestion, all females were
165 individually placed in paper cups (H: 6 cm, ø: 4.5 cm). All females were provided moist cotton and
166 filter paper for oviposition. Oviposition rate was measured in individual females. Eggs were
167 collected on moist cotton, and fecundity was estimated by counting the number of eggs laid by
168 grouped or individual females using the software Egg Counter [37]. They were then grouped by
169 treatment and put into demineralized water. Number of adult descendants of each batch was
170 counted to determine fertility. The number of dead females was recorded every day to ascertain the
171 survival.

172

173 *Wing size*

174 Female size is thought to affect its susceptibility to chemicals [38] and then possibly blood-feeding
175 success upon a permethrin-treated net. The selection of blood-fed females after the first exposure
176 to permethrin could then lead to a selection of the largest females and then the most resistant to
177 permethrin, affecting blood-feeding success at the second exposure. To control for this potential
178 experimental bias, size measurements were performed on females exposed to either permethrin or

179 ethanol. Wing size was used as an indicator of female size. After blood-feeding through
180 impregnated net, all females (control and exposed to permethrin, fed and unfed) were kept and
181 frozen at - 30 °C. One wing of each female mosquito was then cut and scanned with a high
182 performance scanner (ImageScanner III, GE Healthcare, Buc, France) at a resolution of 6,000 dpi.
183 Wing size was assessed by measuring the distance from the axillary incision to the tip of the wing,
184 excluding the wing fringe [39]. Wing size was determined by using the open source ImageJ
185 software [40], after which a comparison was established regarding treatment and blood-feeding
186 status.

187

188 *Assays on the offspring*

189 The selection of blood-fed females after the first exposure could genetically select for permethrin
190 insensitivity and then affect the feeding success under permethrin presence at the second exposure.
191 To control for this potential bias, the offspring from all the tested females was kept and the
192 descendant females were exposed to a blood-meal in presence - absence of permethrin according
193 to the protocol used for the second blood-meal of their mothers. Comparisons of the blood-feeding
194 success through permethrin-impregnated nets between offspring females from permethrin-exposed
195 mothers and from control mothers were thus carried out.

196 **Statistical analysis**

197 All statistical analyses were performed using the software R 3.3.2 [41].

198 *Blood-feeding.*

199 The proportion of blood-fed females after the first and the second blood-meal was compared
200 between treatments using generalized linear mixed-effects model (glmer, binomial distribution,

201 logit link, lme4 package [42]). For these analyses, replicate was coded as a random factor. Post-
202 hoc comparisons between the four groups of treatment at the second exposure were performed
203 using multiple comparisons (Tukey's tests, multcomp package [43]). The effect of mother exposure
204 on the success of blood-feeding of the offspring was also assessed by glmer with binomial
205 distribution, considering replicate as a random factor.

206

207 *Life-history traits.*

208 In a first analysis, we tested for the effect of the first exposure on subsequent life history traits (type
209 2 Anova, car package [44]). The quantity of excreted haematin was assessed using linear mixed-
210 effects model with a Gaussian distribution, after sqrt transformation and confirmation of data
211 normality (lmer, lme4 package). Fecundity, fertility and wing size were also analyzed using lmer
212 with a Gaussian distribution, without data transformation. For all these models, replicate was coded
213 as a random factor. Emergence rate (proportion of eggs that reached adult stage) was analyzed
214 using glm with quasibinomial error distribution to account for overdispersion, with replicate coded
215 as a fixed factor.

216 In a second analysis, we tested for the effect of the first and the second exposure on each life history
217 trait considered subsequent to the second exposure (type 2 and 3 Anova, car package). Quantity of
218 excreted haematin, emergence rate and fertility were assessed using the same methodology as
219 described above. Activity during the second blood-meal and fecundity were estimated by using
220 generalized linear mixed models using AD Model Builder to account for overdispersion
221 (glmmadmb, negative binomial distribution, glmmADMB package [45]). Oviposition rate (the
222 proportion of females that oviposited) was assessed by using glmer with binomial distribution.

223 Survival was evaluated with a mixed effects Cox proportional hazards regression model (packages
224 survival, coxme [46,47]). For all these models, replicate was coded as a random factor. Several
225 explanatory variables were included in these models to control for their influence: mosquito age,
226 the day after the first exposure (3 or 4), and the type of exposure (grouped or individual). The
227 contribution of each explanatory variable was assessed sequentially using anova function, with
228 non-significant terms removed from the model. Model selection was performed using AIC and
229 analysis of the residuals (plotresid, RVAideMemoire package [48]). Results are presented as mean
230 \pm standard error (SE).

231

232 **Results**

233 The dose of 500 mg/m² of impregnated permethrin used in the present study significantly affected
234 blood-feeding at first exposure, with a mean inhibition of 37 % compared to the control group (X^2
235 = 246.27, Df = 1, $P < 2.2e^{-16}$).

236 **Effect of a first exposure to permethrin on the blood-feeding success at the second exposure** 237 **upon a permethrin-treated net**

238 Blood-feeding success at the second blood-meal was tested for 753 females (436 for the grouped
239 exposure and 317 for the individual exposure) across 7 replicates.

240 A successful blood-meal obtained upon a permethrin-treated net significantly affected behavior at
241 the second exposure, with a significant interaction observed between the first and the second
242 exposure ($X^2 = 4.45$, Df = 1, $P = 0.035$). When comparing the four treatments (EE, EP, PE, PP),
243 females pre-exposed to permethrin displayed significantly higher blood-feeding rates in presence
244 of permethrin at the second exposure (PP) compared to females pre-exposed to control nets (EP)

245 (P < 0.001). Moreover, the proportion of females pre-exposed to permethrin that successfully
246 blood-fed in presence of permethrin at the second exposure (PP) was not significantly different
247 from the proportion of females that fed on control nets at the second exposure (P= 0.078 for EE
248 and P = 0.1 for PE). Also, a trend was observed for an increased blood-feeding rate upon a control
249 net in permethrin pre-exposed females (PE) compared to control ones (EE), although significance
250 was marginal (P = 0.058) (Fig. 1). In females pre-exposed to control nets, exposure to permethrin
251 at the second blood-meal significantly affected blood-feeding, with a mean 50 % inhibition
252 compared to control group (P = 0.027).

253

254 *Analysis on the offspring*

255 Analysis on the offspring was performed on 1,027 females across 7 replicates. Results showed that
256 blood-feeding rates of females whose mothers were exposed to permethrin did not differ neither
257 on control nets (P = 0.43) nor on permethrin-treated nets (P = 0.40) compared to control females
258 (Fig. 2).

259 *Wing measurements*

260 Wing measurements were performed in a subset of 335 females across 3 replicates. Data showed
261 no significant differences in female body size regarding the treatment they received ($X^2 = 1.30$, Df
262 = 1, P = 0.25). Yet, females that successfully blood-fed upon a permethrin treated net did not
263 significantly differ in their body size from females that unsuccessfully blood-fed (P = 0.1), nor
264 from females that were exposed to ethanol-treated nets and successfully (P = 0.81) or
265 unsuccessfully blood-fed (P = 0.71) (Fig. 3).

266

267 **Effect of permethrin on life-history traits after the first exposure**

268 Quantity of ingested hemoglobin was assessed in a subset of 75 females followed individually
269 across 2 replicates. Fecundity, fertility and emergence rate were measured in all the 1,103 blood-
270 fed females followed by group of 30 across 7 replicates, and expressed as a mean per female. Life-
271 history traits after the first exposure were not affected by permethrin treatment. Indeed, a first
272 exposure to permethrin did not influence the quantity of ingested hemoglobin during the blood-
273 meal ($X^2 = 1.18$, Df = 1, P = 0.28) (Fig. 4A), fecundity ($X^2 = 0.002$, Df = 1, P = 0.96) (Fig. 4B),
274 emergence rate of the offspring ($X^2 = 1.33$, Df = 1, P = 0.25) (Fig. 4C), nor fertility ($X^2 = 0.33$, Df
275 = 1, P = 0.57) (Fig. 4D).

276 **Effect of permethrin on life-history traits after the second exposure**

277 Life-history traits during and after the second exposure were recorded in females followed
278 individually across 7 replicates. Mosquito activity was assessed in a subset of 91 individualized
279 females during the second blood-feeding. Size of the blood-meal, oviposition rate and survival
280 were measured in 222 individualized females. Fecundity was estimated in the 118 females that
281 oviposited. For fertility and emergence rate measurement, larvae were grouped by treatment so
282 data is expressed as a mean per female.

283 *Effect of the first exposure to permethrin on life-history traits following the second exposure*

284 A prior exposure to permethrin did not significantly affect quantity of ingested hemoglobin during
285 the second blood-meal ($X^2 = 0.0018$, Df = 1, P = 0.97) (Fig. 5A), oviposition rate ($X^2 = 2.28$, Df =
286 1, P = 0.13) (Fig. 5B) nor fecundity ($X^2 = 0.27$, Df = 1, P = 0.60) (Fig. 5C). However, for a similar
287 number of eggs laid, the proportion of eggs that reach adult stage was reduced in females pre-
288 exposed to permethrin ($X^2 = 5.34$, Df = 1, P = 0.021), irrespectively of the treatment they received

289 at the second exposure (Fig. 5D). Although a trend was observed for a reduced number of
290 descendants in females pre-exposed to permethrin, this was not significant ($X^2 = 3.63$, Df = 1, P =
291 0.057) (Fig. 5E). Besides, a prior exposure to permethrin did not affect mosquito activity during
292 subsequent blood-feeding ($X^2 = 0.015$, Df = 1, P = 0.90) (Fig. 5F), nor survival ($X^2 = 0.42$, Df = 1,
293 P = 0.52) (Fig. 5G).

294

295 *Effect of the second exposure to permethrin on life-history traits following the second exposure*

296 Exposure to permethrin at the second blood-meal significantly reduced the quantity of blood intake
297 during this blood-meal ($X^2 = 18.0021$, Df = 1, P = $2.21e^{-5}$), irrespectively of the first exposure (Fig.
298 6A). A second exposure to permethrin did not affect subsequent oviposition rate ($X^2 = 2.98$, Df =
299 1, P = 0.084) (Fig. 6B), fecundity ($X^2 = 1.82$, Df = 1, P = 0.18) (Fig. 6C), proportion of eggs that
300 reach adult stage ($X^2 = 3.33$, Df = 1, P = 0.068) (Fig. 6D), nor fertility ($X^2 = 0.14$, Df = 1, P = 0.71)
301 (Fig. 6E). However, mosquito activity during the second blood feeding was significantly influenced
302 by permethrin treatment, with an increased activity in females exposed to permethrin ($X^2 = 4.22$,
303 Df = 1, P = 0.04) (Fig. 6F). Exposure to permethrin at the second blood-meal did not affect
304 mosquito survival ($X^2 = 0.044$, Df = 1, P = 0.83) (Fig. 6G).

305

306

307

308

309

310 **Discussion**

311 In this work, we assessed the effects of multiple exposures to permethrin on its efficacy to inhibit
312 a blood-meal in the malaria mosquito *An. gambiae* carrying pyrethroid resistance alleles. We also
313 measured the impact of permethrin exposure on life-history traits related to fecundity, fertility and
314 survival.

315 Our results evidenced decreases in permethrin efficacy after a prior exposure in the malaria
316 mosquito *An. gambiae* carrying homozygote *kdr* pyrethroid resistance alleles. After having
317 successfully obtained a blood-meal upon a permethrin-treated net despite irritancy, resistant
318 females were not affected anymore by permethrin net treatment in their success to feed at the
319 subsequent exposure. Wing measurements and assays on the offspring showed no evidence for a
320 genetic or physiological selection of permethrin-insensitive females. Also, in this study, permethrin
321 pre-exposed females showed no differences in their response to control untreated net than females
322 pre-exposed to control net. This suggests that the observed effects of pre-exposure are not due to
323 deleterious effects on mosquito fitness that would increase the need for blood-feeding, but rather
324 to the prior exposure to permethrin that induced a reduction of its effect on mosquito behavior. One
325 possible explanation for these behavioral modifications could lie in the effects of hyper excitation
326 and irritancy that characterize pyrethroids mode of action in insects [27,49,50]. Yet, the contact
327 with the insecticide at the first exposure could have induced changes in sensory receptors or in the
328 neuronal activity at the central level, resulting in an absence of detection at the subsequent
329 exposure. Consistently, permethrin has been shown to disrupt chemical communication and
330 cognition in other insect species [51–53]. In mosquitoes, behavioral responses to host-associated
331 attractants were reduced 24 hours after exposition to permethrin [54]. Also, modification in the
332 olfactory preferences after exposure to pyrethroids have been documented in *Ae. aegypti* [55].

333 Pyrethroid and particularly permethrin exposure may then induce long-term alteration in sensory
334 organs. As no host attractants were used in this study, we hypothesize that pre-exposure to
335 permethrin could have altered its detection at the subsequent exposure. Further studies are then
336 needed to depict the effects of multiple exposures to permethrin on pyrethroid-resistant mosquitoes,
337 and on their subsequent ability to detect pyrethroids, hosts odors, mates, and to find food or shelters.
338 Another possible explanation for the observed behavioral modifications could be an enhanced
339 detoxifying activity after the first exposure, resulting in a lower sensibility at the second exposure.
340 Yet, chemical treatment has been shown to induce the production of detoxifying enzymes in insects
341 [56], sometimes conferring an increased protection at the subsequent exposure [57]. This
342 hypothesis however needs further investigation, as the role of enzyme induction in protecting from
343 insecticides and its relationship with insecticide resistance has, to our knowledge, never been
344 assessed.

345 Another hypothesis is that a prior exposure to permethrin could have triggered learning
346 mechanisms in female mosquitoes. Indeed, mosquitoes are known to have the ability to memorize
347 the association between a stimulus and a reward when these are concomitant [58–60]. They could
348 then have associated the presence of permethrin with the probability of obtaining a blood-meal,
349 overstepping the deterrent effects of the insecticide during the second exposure. Consistently,
350 learning abilities have been evidenced in *An. gambiae*, in which the association was retained for
351 up than three days [60]. This hypothesis however raises some interrogations. Yet, is it not known
352 whether a single exposure is sufficient to trigger learning, nor if mosquitoes can learn from an
353 irritant compound such as permethrin. Also, to our knowledge, there is no documentation about the
354 pathways involved in permethrin detection in mosquitoes. This chemical might be detected through
355 the gustatory pathway due to its irritant effects [50], but the gustatory neurons involved have not

356 been described. In the same way, although the involvement of the olfactory pathway is suspected
357 [61,62], evidences for an olfactory detection of permethrin are still lacking. In this context, if
358 learning took place, it is of crucial interest to investigate which pathway is involved, and the effects
359 of pyrethroid resistance on learning. These data would, in the long-term, help to understand the
360 impact of ITNs use on pathogens transmission dynamics.

361 Our results show that, under our experimental design, life-history traits recorded were not affected
362 by multiple exposures to permethrin. Indeed, quantity of ingested hemoglobin, oviposition rate,
363 fecundity, fertility, survival and activity were not modified after prior exposure to the insecticide.
364 Also, during the second blood-meal, females exposed to permethrin displayed increased activity
365 associated with reduced quantity of ingested hemoglobin. This confirms that permethrin is irritant
366 even against pyrethroid-resistant mosquitoes [63], which renders most difficult the blood-feeding
367 and force them to make more attempts to fully engorge. However, this irritant effect does not affect
368 subsequent fecundity nor fertility, as the total number of descendants produced was not
369 significantly different between permethrin-exposed and control females. Consequently, whereas
370 negative effects of pyrethroids on insect fitness have been documented [33–35,64], these effects
371 do not seem to affect pyrethroid resistant mosquitoes. Furthermore, our results did not evidence
372 any effect of the two exposures to permethrin on mosquito survival. This contrasts with the delayed
373 mortality previously observed in insecticide-resistant *An. gambiae* after multiple exposures to
374 pyrethroids [22]. These discrepancies may originate both in the use of different mosquito strains
375 and insecticides tested between the studies. For instance, we used permethrin, which is known to
376 be more irritant for mosquitoes than deltamethrin [13]. Altogether, our data show, in a pyrethroid-
377 resistant strain of *An. gambiae*, both loss of residual permethrin efficacy after a prior exposure, and
378 no effects of permethrin on mosquito life-history traits related to fecundity, fertility and survival.

379 These data may have substantial consequences for vector control, as it suggests that the residual
380 efficacy of permethrin-treated nets against mosquitoes carrying resistance alleles may be much
381 lower than expected. ITNs may then not be efficient nor to inhibit blood-feeding, nor to kill
382 pyrethroid resistant *Anopheles* and may consequently not protect people properly against infectious
383 bites. This is particularly concerning in malaria endemic areas, where most of mosquitoes are
384 resistant to pyrethroids [2] and where ITNs are still main components of vector control. However,
385 it is worth noting that, although the dose we used corresponds to conventional net impregnation
386 [12], it remains lower than the doses currently used for long-lasting net impregnation (it is two
387 times lower than the dose of permethrin in Olyset ®) . In this context, it is of crucial interest to
388 understand the fundamental causes of these behavioral modifications, and if these changes could
389 be observable under natural conditions. Additional experiments are then needed to depict the long-
390 term effects of permethrin on pyrethroid-resistant mosquitoes with regard to nervous system,
391 olfaction, gustation, and learning abilities. Also, investigating the combined effects of experience
392 and infection would allow to model the consequences of the observed effects on pathogens
393 transmission. These data provide great evidences for phenotypic plasticity in the malaria mosquito
394 *An. gambiae*. They also highlight the need for rethinking the way we fight mosquito-borne diseases,
395 and for developing new vector control tools that could complete or replace insecticides and help to
396 reduce and interrupt pathogen transmission. An integrated, multifaceted approach is needed, with
397 alternating tools that limit selective pressure and avoid the apparition of resistances.

398

399 **Declarations**

400 **Consent for publication**

401 Not applicable.

402 **Availability of data and material**

403 The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding
404 author on reasonable request.

405 **Competing interests**

406 The authors declare that they have no competing interests.

407 **Funding**

408 This study was supported by The French National Research Program for Environmental and
409 Occupational Health of Anses (EST-2016/1/39), by the Languedoc-Roussillon (LR)/ Occitanie
410 region and EU-FEDER under the name “Chercheur(se)s d’Avenir”, and by the LabEx CeMEB,
411 under an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01). The funders had no
412 role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the
413 manuscript.

414 **Authors’ contributions**

415 A.C, C.P, F.C, and M.M designed the study. M.M. performed data acquisition. M.M. and A.C
416 performed statistical analysis. M.M., L.D. and A.C. drafted the manuscript. F.C. performed
417 technical support. C.P. and A.C. were responsible for financial support. F.C. and C.P. reviewed the
418 manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

419 **Acknowledgements**

420 The authors would like to acknowledge the technical / research platform dedicated on vectors at
421 IRD centre for providing mosquitoes and technical support. This platform is a member of the

422 Vectopole Sud network and of the LabEX CEMEB (Centre Méditerranéen de l'Environnement et
423 de la Biodiversité) in Montpellier.

424

425

426 1. WHO. Vector-borne diseases [Internet]. 2017. Available from: [http://www.who.int/news-](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases)
427 [room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases)

428 2. WHO. World malaria report 2017. Geneva: WHO; 2017.

429 3. Hemingway J, Ranson H, Magill A, et al. Averting a malaria disaster: will insecticide
430 resistance derail malaria control? *Lancet* **2016**; 387(10029):1785–1788.

431 4. Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S. Insecticide control of vector-borne
432 diseases : when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* **2010**; 6(8):e1001000.

433 5. Diabate A, Baldet T, Chandre F, et al. The role of agricultural use of insecticides in
434 resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*
435 **2002**; 67(6):617–622.

436 6. Yadouleton AWM, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbeto MC.
437 Development of vegetable farming : a cause of the emergence of insecticide resistance in
438 populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J* **2009**; 8(103).

439 7. Labbé P, Alout H, Djogbénu L, Pasteur N, Weill M. Evolution of resistance to insecticide
440 in disease vectors. In: Michel Tibayrenc, editor. *Genet Evol Infect Dis* 2nd ed. London,
441 U.K: Elsevier Publishing Compagny; 2011. p. 363–409.

442 8. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, et al. Distribution of knock-down resistance

- 443 mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J*
444 **2008**; 8:1–8.
- 445 9. Amelia-yap ZH, Chen CD, Sofian-azirun M, Low VL. Pyrethroid resistance in the dengue
446 vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia : present situation and prospects for management.
447 *Parasit Vectors* **2018**; 11(332).
- 448 10. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the
449 major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* **2017**; 11(7):1–
450 20.
- 451 11. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet*
452 *Entomol* **2000**; 14:1–5.
- 453 12. Strode C, Donegan S, Garner P, Enayati AA, Hemingway J. The impact of pyrethroid
454 resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African Anopheline
455 mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **2014**; 11(3):e1001619.
- 456 13. Chandre F, Darriet F, Duchon S, et al. Modifications of pyrethroid effects associated with
457 kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol* **2000**; 14:81–88.
- 458 14. N’Guessan RN, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-
459 treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area,
460 Benin. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13(2):199–206.
- 461 15. Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes : a
462 worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol*
463 **2016**; 32(3):187–196.

- 464 16. Barbosa S, Kay K, Chitnis N, Hastings IM. Modelling the impact of insecticide-based
465 control interventions on the evolution of insecticide resistance and disease transmission.
466 *Parasit Vectors* **2018**; 11(482).
- 467 17. Churcher TS, Lissenden N, Griffin JT, Worrall E, Ranson H. The impact of pyrethroid
468 resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa. *Elife*
469 **2016**; 5(e16090):1–26.
- 470 18. Malaria Consortium. Malaria prevention through insecticide treated nets. London; 2016.
- 471 19. Grieco JP, Achee NL, Chareonviriyaphap T, et al. A new classification system for the
472 actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. *PLoS One* **2007**; 2(8):e716.
- 473 20. Alout H, Yameogo B, Djogbénou LS, et al. Interplay between *Plasmodium* infection and
474 resistance to insecticides in vector mosquitoes. *J Infect Dis* **2014**; 210(9):1464–70.
- 475 21. Alout H, Dabiré RK, Djogbénou LS, Abate L, Corbel V. Interactive cost of *Plasmodium*
476 infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci Rep*
477 **2016**; 6(26755):1–11.
- 478 22. Viana M, Hughes A, Matthiopoulos J, Ranson H, Ferguson H. Delayed mortality effects
479 cut the malaria transmission potential of insecticide-resistant mosquitoes. *PNAS* **2016**; :1–
480 6.
- 481 23. Alout H, Labbé P, Chandre F, Cohuet A. Malaria vector control still matters despite
482 insecticide resistance. *Trends Parasitol* **2017**; 33(8):610–618.
- 483 24. Lucas P, Renou M. Electrophysiological study of the effects of deltamethrin,
484 bioresmethrin and DDT on the activity of pheromone receptor neurones in two moth

- 485 species. *Pestic Biochem Physiol* **1992**; 43:103–115.
- 486 25. Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. DDT, pyrethrins, pyrethroids
487 and insect sodium channels. *Life* **2007**; 59(3):151–162.
- 488 26. Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, et al. Evidence for a separate mechanism of
489 toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology* **2009**;
490 30:17–31.
- 491 27. Zerba E. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitol*
492 *Today* **1988**; 4(7).
- 493 28. Hodjati MH, Curtis CF. Evaluation of the effect of mosquito age and prior exposure to
494 insecticide on pyrethroid tolerance in *Anopheles* mosquitoes (Diptera : Culicidae). *Bull*
495 *Entomol Res* **1999**; 89:329–337.
- 496 29. Glunt KD, Thomas MB, Read AF. The effects of age , exposure history and malaria
497 infection on the susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to low concentrations of
498 pyrethroid. **2011**; 6(9).
- 499 30. Siegert PY, Walker E, Miller JR. Differential behavioral responses of *Anopheles gambiae*
500 (Diptera : Culicidae) modulate mortality caused by pyrethroid-treated bednets. *J Econ*
501 *Entomol* **2009**; 102(6):2061–2071.
- 502 31. Vinauger C, Lutz EK, Riffell JA. Olfactory learning and memory in the disease vector
503 mosquito, *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* **2014**; :2321–2330.
- 504 32. Stanczyk NM, Brookfield JFY, Field LM, Logan JG. *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit
505 decreased repellency by DEET following previous exposure. *PLoS One* **2013**;

- 506 8(2):e54438.
- 507 33. He Y, Zhao J, Zheng Y, et al. Assessment of potential sublethal effects of various
508 insecticides on key biological traits of the Tobacco Whitefly , *Bemisia tabaci*. Int J Biol
509 Sci **2013**; 9(3):246–255.
- 510 34. Hajjar MJ, Ford JB. The effect of sublethal doses of cypermethrin on egg laying of
511 mustard beetle (*Phaedon cochleariae* (F.)). Pestic Sci **1989**; 26:227–239.
- 512 35. Liu W, Todd RG, Gerberg EJ. Effect of three pyrethroids on blood feeding and fecundity
513 of *Aedes aegypti*. J Am Mosq Control Assoc **1981**; 2(3):310–313.
- 514 36. Briegel H. Determination of uric acid and hematin in a single sample of excreta from
515 blood-fed insects. Experientia **1980**; 36.
- 516 37. Mollahosseini A, Rossignol M, Penetier C, et al. A user-friendly software to easily count
517 *Anopheles* egg batches. Parasit Vectors **2012**; 5(122):0–6.
- 518 38. Owusu HF, Chitnis N, Müller P. Insecticide susceptibility of *Anopheles* mosquitoes
519 changes in response to variations in the larval environment. Sci Rep **2017**; 7(3667).
- 520 39. Nasci RS. The size of emerging and host-seeking *Aedes aegypti* and the relation of size to
521 blood-feeding success in the field. J Am Mosq Control Assoc **1986**; 2(1):61–62.
- 522 40. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem : an open
523 platform for biomedical image analysis. Mol Reprod Dev **2015**; 82:518–529.
- 524 41. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing.
525 Vienna, Austria: R foundation for Statistical Computing; 2008.
- 526 42. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear-mixed effects models using lme4.

- 527 J Stat Softw **2015**; 67(1):1–48.
- 528 43. Hothorn T, Bretz F, Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models.
529 Biometrical J **2008**; 50(3):346–363.
- 530 44. Fox J, Weisberg S. An {R} companion to applied regression. 2nd ed. Thousand Oaks CA;
531 2011.
- 532 45. Fournier D, Skaug H, Ancheta J, et al. AD Model Builder: using automatic differentiation
533 for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. Optim Method
534 Softw **2012**; 27:233–249.
- 535 46. Therneau T, Grambsch P. Modeling survival data: extending the Cox Model. Springer.
536 New York; 2000.
- 537 47. Therneau T. Coxme: mixed effects Cox Models. R Package version 2.2-5. 2015.
- 538 48. Hervé M. RVAideMemoire: diverse basic statistical and graphical functions. R package
539 version 0.9-65. 2017.
- 540 49. Hossain MI, Curtis CF. Permethrin-impregnated bednets: behavioural and killing effects
541 on mosquitoes. Med Vet Entomol **1989**; 3:367–376.
- 542 50. Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-klan R.
543 Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in
544 Thailand. Parasit Vectors **2013**; 6(280).
- 545 51. Haynes KF, Baker TC. Sublethal effects of permethrin on the chemical communication
546 system of the Pink Bollworm moth, *Pednophora gossypiella*. Arch Insect Biochem Physiol
547 **1985**; 2:283–293.

- 548 52. Belzunces L, Tchamitchian S, Brunet J. Neural effects of insecticides in the honey bee.
549 Apidologie **2012**; 43:348–370.
- 550 53. Decourtye A, Devillers J, Genecque E, et al. Comparative sublethal toxicity of nine
551 pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. Arch
552 Environ Contam Toxicol **2004**; 48:242–250.
- 553 54. Cohnstaedt LW, Allan SA. Effects of sublethal pyrethroid exposure on the host-seeking
554 behavior of female mosquitoes. J Vector Ecol **2011**; 36(2):395–404.
- 555 55. Choi DB, Grieco JP, Apperson CS, et al. Effect of spatial repellent exposure on dengue
556 vector attraction to oviposition sites. PLoS Negl Trop Dis **2016**; 10(7):e0004850.
- 557 56. Terriere LC. Induction of detoxication enzymes in insects. Annu Rev Entomol **1984**;
558 29:71–88.
- 559 57. Snyder MJ, Hsu E-L, Feyereisen R. Induction of the cytochrome P-450 activities by
560 nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J Chem Ecol **1993**; 19(12).
- 561 58. Tomberlin JK, Rains GC, Allan SA, Sanford MR, Lewis WJ. Associative learning of odor
562 with food- or blood-meal by *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: *Culicidae*).
563 Naturwissenschaften **2006**; 93(11):551–556.
- 564 59. Menda G, Uhr JH, Wyttenbach RA, et al. Associative learning in the dengue vector
565 mosquito, *Aedes aegypti*: avoidance of a previously attractive odor or surface color that is
566 paired with an aversive stimulus. J Exp Biol **2013**; 216(Pt 2):218–23.
- 567 60. Chilaka N, Perkins E, Tripet F. Visual and olfactory associative learning in the malaria
568 vector *Anopheles gambiae sensu stricto*. Malar J **2012**; 11(27):1–11.

- 569 61. Bohbot JD, Dickens JC. Insect repellents : modulators of mosquito odorant receptor
570 activity. PLoS One **2010**; 5(8):e12138.
- 571 62. Porciani A, Diop M, Moiroux N, et al. Influence of pyrethroid-treated bed net on host
572 seeking behavior of *Anopheles gambiae s.s.* carrying the kdr allele. PLoS One **2017**;
573 12(7):e0164518.
- 574 63. Kawada H, Ohashi K, Dida GO, Sonye G, Njenga SM, Mwandawiro C. Insecticidal and
575 repellent activities of pyrethroids to the three major pyrethroid-resistant malaria vectors in
576 western Kenya. Parasit Vectors **2014**; 7(208).
- 577 64. Bariola LA, Lingren PD. Comparative toxicities of selected insecticides against Pink
578 Bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) moths. J Econ Entomol **1984**; 77(1):207–210.
- 579
- 580
- 581
- 582
- 583

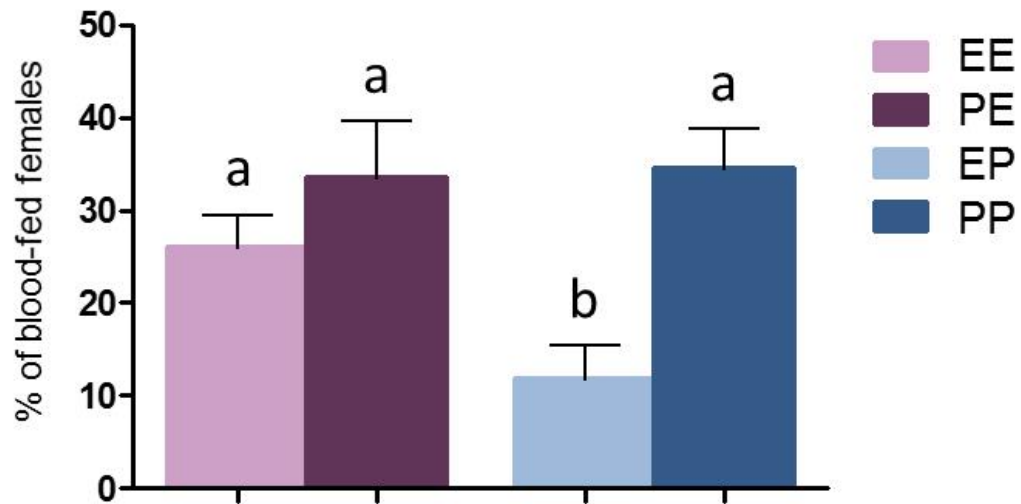


Figure 1: Proportion of blood fed *An. gambiae* during the second blood meal for each treatment. E = ethanol, P = Permethrin. The first letter show treatment received at the first exposure, the second letter show treatment received at the second exposure. Results are presented as mean \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Bonferroni correction, $P < 0.05$).

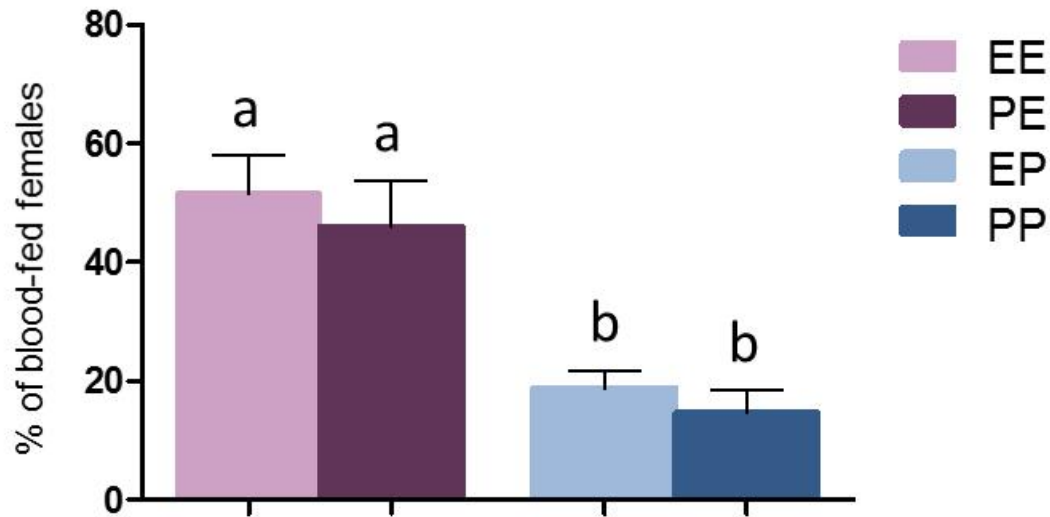


Figure 2: Assay on the offspring: proportion of blood fed *An. gambiae* depending on their mother's treatment. E = ethanol, P = Permethrin. The first letter show treatment received by mothers, the second letter show treatment received by daughters. Results are presented as mean \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Bonferroni correction, $P < 0.05$).

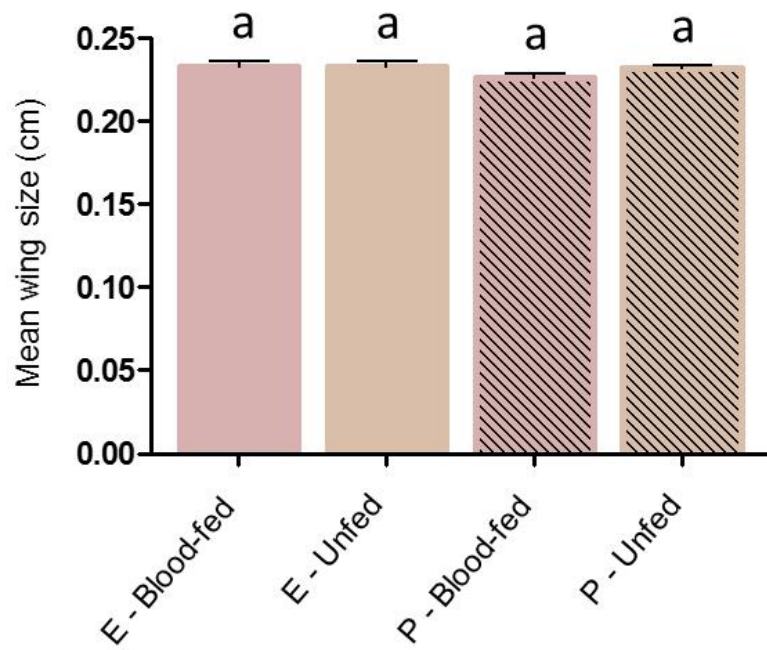


Figure 3: Wing size measurement of *An. gambiae* after exposure to ethanol or permethrin - treated nets. E = ethanol, P = Permethrin. Results are presented as mean \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Bonferroni correction, $P < 0.05$).

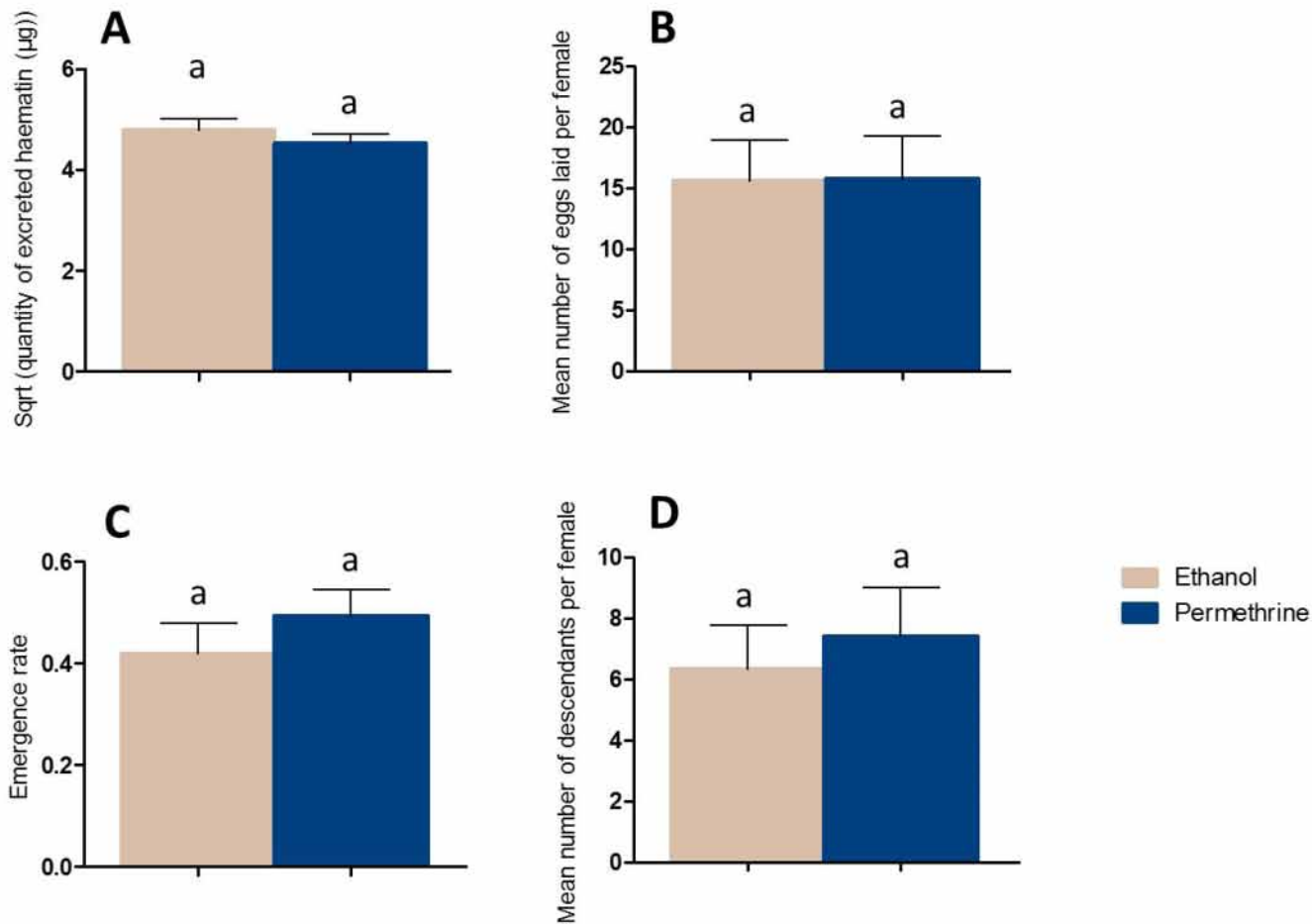


Figure 4: Effect of the first exposure to permethrin on life history traits ensuing the first exposure: volume of blood ingested (A), fecundity (B), offspring emergence rate (C) and fertility (D). Results are presented as mean \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Bonferroni correction, $P < 0.05$).

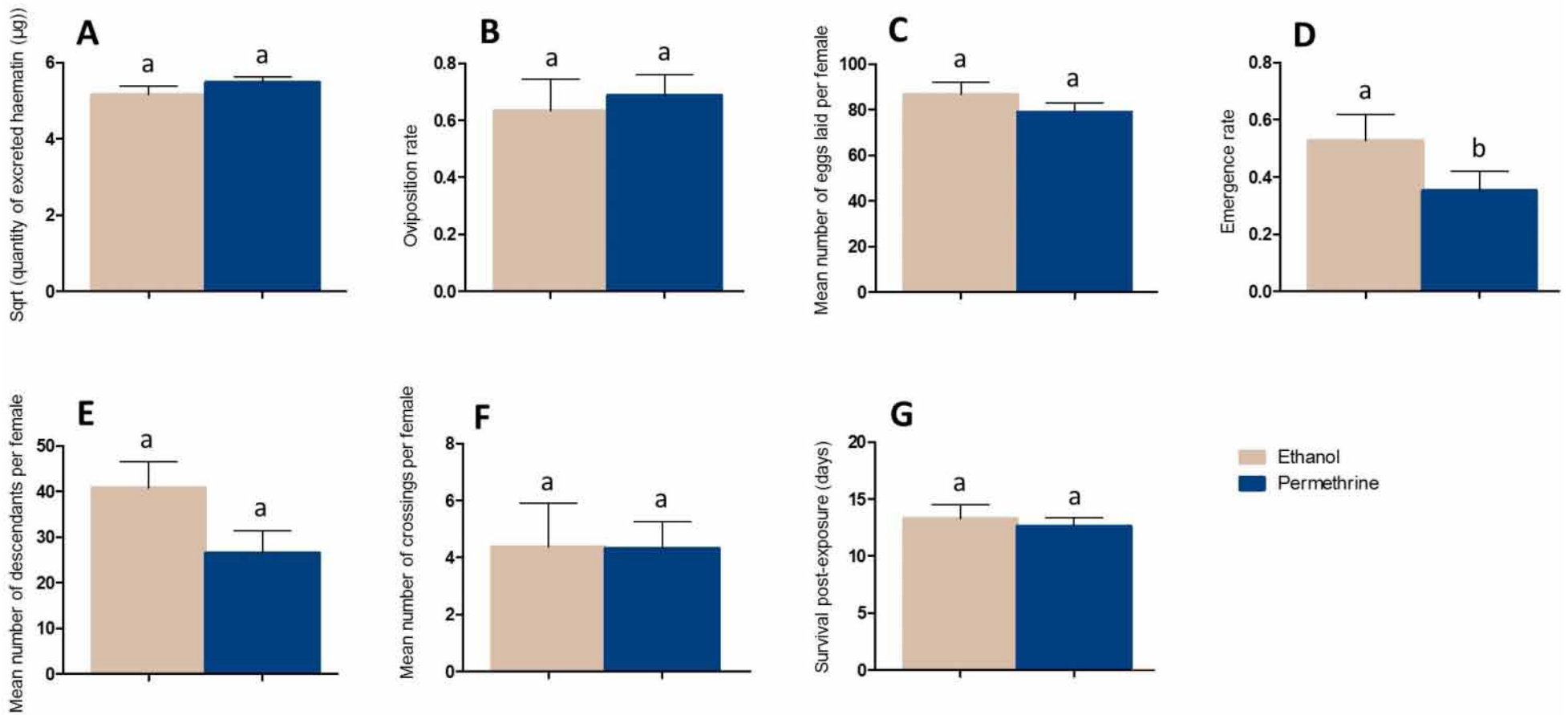


Figure 5: Effect of the first exposure to permethrin on life history traits ensuing the second exposure: volume of blood ingested (A), oviposition rate (B), fecundity (C), offspring emergence rate (D), fertility (E), activity (F) and survival post-exposure (G). For each trait, females were pooled considering the treatment they received at the first exposure. Results are presented as mean \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Bonferroni correction, $P < 0.05$).

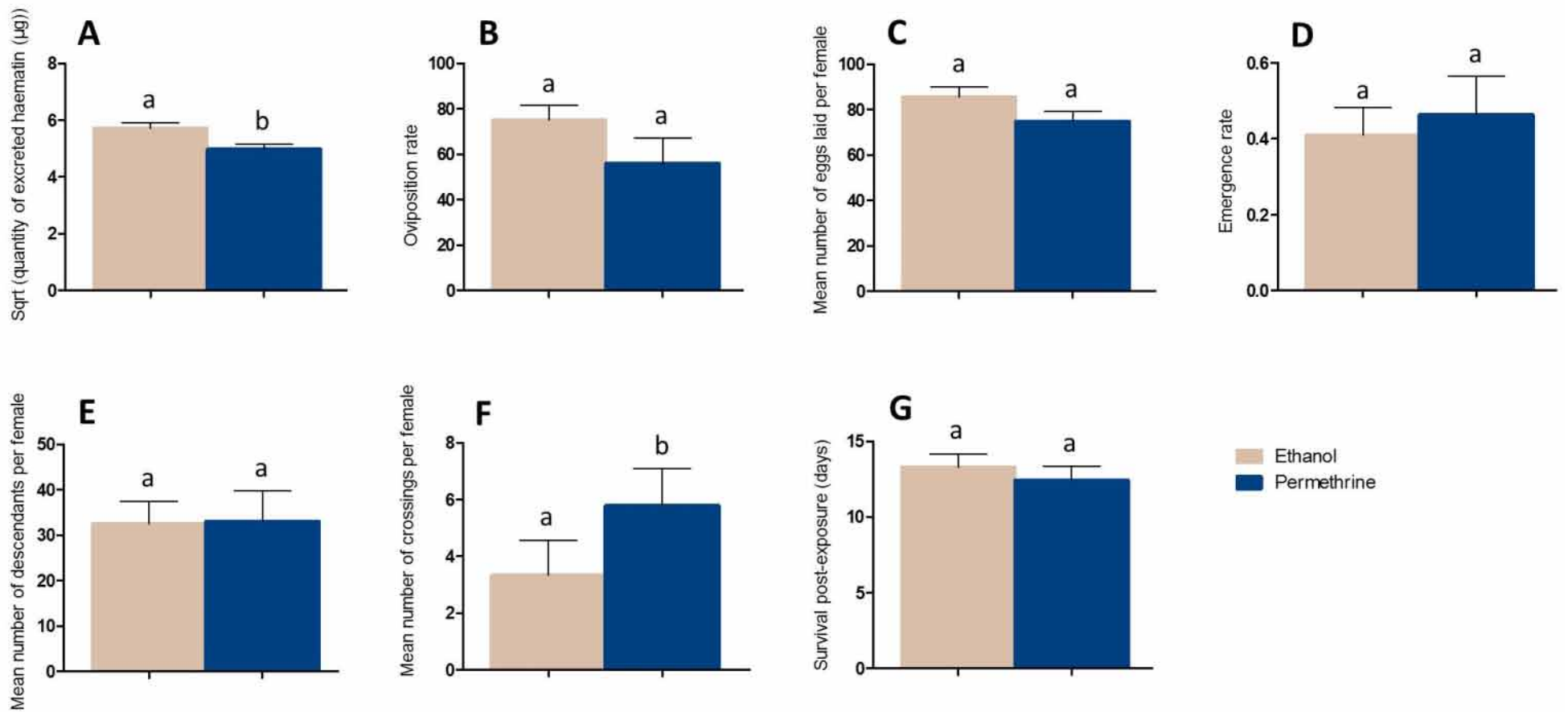


Figure 6: Effect of the second exposure to permethrin on life history traits ensuing the second exposure: volume of blood ingested (A), oviposition rate (B), fecundity (C), offspring emergence rate (D), fertility (E), activity (F) and survival post-exposure (G). For each trait, females were pooled considering the treatment they received at the second exposure. Results are presented as mean \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Bonferroni correction, $P < 0.05$).

Chapitre III. Effet de l'âge sur l'efficacité du DEET

Chez les moustiques des genres *Aedes* et *Anopheles*, le comportement de recherche d'un repas de sang est déclenché par l'insémination, qui a lieu en général 2 à 3 jours après l'émergence. Ensuite, si la femelle s'est gorgée sur un hôte infectieux, elle doit survivre durant toute la période extrinsèque d'incubation (EIP), qui correspond au temps nécessaire au pathogène pour rejoindre les glandes salivaires du moustique pour qu'il devienne à son tour infectieux. L'EIP varie en fonction du pathogène, du vecteur, ainsi que des conditions environnementales (Ohm et al. 2018). Dans le cas du paludisme humain, il est d'environ 10 jours chez les *Anopheles* (Vanderberg and Yoeli 2016, Vaughan, Hensley, et al. 2016, Vaughan, Noden, et al. 2016). Pour les arbovirus, l'EIP chez les *Aedes* dure de 6 à 15 jours pour la dengue (WHO 2009a, Chan and Johansson 2012) et 10 jours pour le virus Zika (Roundy et al. 2017). De plus, la durée de vie moyenne des moustiques sauvages est difficile à déterminer ; certains auteurs ont estimé celle des *Anopheles* d'Afrique Subsaharienne entre 14 à 21 jours (Carnevale and Robert 2009), alors que d'autres ont observé un taux de survie d'environ 80 % par jour (Costantini et al. 1996), ce qui implique que moins de 10 % des femelles atteindraient un âge de 12 jours sur le terrain. Dans le cas d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti*, la durée de vie a été estimée à 10 à 39 jours (Delatte et al. 2009, Goindin et al. 2015). Toutes ces considérations impliquent donc que, dans une population de moustiques vecteurs, seuls les individus âgés sont en mesure de transmettre des pathogènes et d'infecter de nouveaux hôtes. Par conséquent, ils devraient faire l'objet d'études spécifiques, ce qui est rarement le cas. Or, on sait que le processus de senescence chez les moustiques est accompagné de modifications délétères (Ryan et al. 2015), telles qu'une diminution dans les performances de vol (Rowley 1968), dans l'efficacité du système immunitaire (Hillyer et al. 2005) et dans la fertilité (McCann et al. 2010). De plus, une augmentation de la susceptibilité aux insecticides a été constatée chez les moustiques âgés, aussi bien sensibles (Hodjati and Curtis 1999, Glunt et al. 2011, Chouaibou et al. 2012, Aïzoun et al. 2014, Aldridge et al. 2017) que portant des allèles de résistance aux insecticides (Rowland and Hemingway 1987, Lines and Nassor 1991, Hodjati and Curtis 1999, Jones et al. 2012, Kulma et al. 2013). Ces observations laissent supposer que l'efficacité des méthodes de lutte pourrait également être affectée par l'âge des moustiques. Dans le cas des répulsifs, certains auteurs ont observé que le DEET est plus efficace contre les femelles de 15 jours que contre les femelles plus jeunes et plus âgées (Xue et al. 1995), alors que d'autres auteurs n'ont pas trouvé de corrélation

entre la sénescence et l'efficacité du DEET (Barnard 1998). Le but de cette étude a donc été d'évaluer dans quelle mesure l'âge des moustiques pouvait influencer l'efficacité du DEET. Pour ce faire, des expériences de gorgement au travers de moustiquaires imprégnées de DEET ont été réalisées chez deux espèces vectrices, *An. gambiae* (porteur d'allèle de résistance aux pyréthrinoïdes) et *Ae. albopictus* (colonie sensible aux insecticides), dans le but d'évaluer leur capacité à prendre un repas de sang en présence du répulsif. Trois classes d'âge ont été sélectionnées pour chaque espèce : 4, 11 et 18 jours pour *An. gambiae*, et 6, 13 et 20 jours pour *Ae. albopictus*. Par ailleurs, les moustiques gorgés ont été conservés individuellement afin de réaliser un suivi des traits d'histoire de vie post-exposition. Ainsi, pour chaque espèce et entre chaque classe d'âge, ont été comparés : la quantité d'hémoglobine prélevée pendant le repas de sang, le taux de ponte, la taille de la ponte, ainsi que la survie. Les résultats obtenus montrent une grande similarité entre les deux espèces de moustiques, indépendamment du statut de résistance aux pyréthrinoïdes : le taux de gorgement en présence de DEET diminue avec l'âge. Les moustiques âgés (> 13 jours) sont donc plus affectés par le DEET que les moustiques plus jeunes. De plus, chez *Ae. albopictus*, les moustiques d'âge intermédiaire (13 jours) sont également plus affectés que les moustiques jeunes (6 jours). En ce qui concerne l'étude des traits d'histoire de vie, les résultats sont également très conservés entre les deux espèces : aucun effet du DEET n'a été observé pour aucune classe d'âge, cependant, des différences ont été observées entre les classes d'âges indépendamment du DEET (Article « DEET efficacy increases with age in the vector mosquitoes *Anopheles gambiae* s.s. and *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) »). Ces résultats soulignent donc l'importance de considérer l'âge des moustiques lors de l'évaluation des outils de lutte antivectorielle. De plus, ils suggèrent que le contrôle de nombreux pathogènes transmis par les moustiques pourrait être atteint en sélectionnant spécifiquement les femelles âgées. Ceci permettrait de diminuer le réservoir infectieux, tout en réduisant la quantité de produits chimiques nécessaires à la lutte contre ces pathogènes.

DEET Efficacy Increases With Age in the Vector Mosquitoes *Anopheles gambiae* s.s. and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)

Margaux Mulatier,^{1,2,4} Angélique Porciani,¹ Louis Nadalin,¹ Ludovic Phamien Ahoua Alou,³ Fabrice Chandre,¹ Cédric Pennetier,^{1,3} Laurent Dormont,² and Anna Cohuet¹

¹MIVEGEC, IRD, CNRS, Univ. Montpellier, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, ²CEFE, Univ. Paul Valéry Montpellier 3, CNRS, Univ. Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France, ³Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire, and ⁴Corresponding author, e-mail: margaux.mulatier@ird.fr

Subject Editor: Gabriel Hamer

Received 9 May 2018; Editorial decision 19 July 2018

Abstract

Old mosquitoes are the most likely to transmit pathogens due to the higher probability that they will be exposed to pathogens, and the time required before a mosquito becomes infectious, the extrinsic incubation period (EIP). However, old mosquitoes are rarely considered in the evaluation of control tools. This study evaluated the effect of mosquito aging on the repellent efficacy of N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) in two vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* s.s. (Giles) (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), respective vectors of malaria parasites and arboviruses such as dengue, chikungunya, and Zika viruses. For both mosquito species, DEET-induced inhibition of blood-feeding was assessed in three age classes. Life-history traits related to mosquito fecundity and survival following DEET exposure were also measured. Results showed that, in both species, bloodmeal inhibition induced by DEET was significantly higher in old females (>18 d old) than in younger ones (<13 d old). Life history traits recording showed no combined effects of DEET and aging on mosquito blood engorgement, oviposition rate, number of eggs laid nor survival; however, age effects are reported for all these traits. These results highlight the need for taking into account mosquito age in the evaluation of integrated mosquito management tools. They also suggest that the control of vector-borne pathogens with a long EIP could be improved by targeting old mosquitoes and supports the efficacy of repellents in the fight against mosquito-borne diseases.

Key words: vector, mosquito, aging, DEET, repellency

In mosquito vector populations, age is a critical parameter when considering the ability of individuals to transmit pathogens. To maintain pathogen circulation, a vector must live long enough to survive all the steps before becoming infectious, which involve infection, pathogen multiplication, and migration into the salivary glands. The time from exposure to the pathogen and infectiousness, i.e., the extrinsic incubation period (EIP) varies with pathogens, vectors and environmental conditions (Ohm et al. 2018). Human malaria parasites are transmitted by *Anopheles* mosquitoes and require an EIP of about 10 d before the transmissible stages reach the salivary glands (Vanderberg and Yoeli 2016, Vaughan et al. 2016a, Vaughan et al. 2016b). For mosquito-borne viruses such as dengue or Zika, the EIP in *Aedes* vector mosquitoes lasts approximately 6–15 d for dengue viruses (WHO 2009a, Chan and Johansson 2012) and 10 d for Zika virus (Roundy et al. 2017). Also, the life-expectancy of mosquitoes range from 14 to 21 d for most of the *Anopheles* vectors of *Plasmodium* in Sub-Saharan Africa (Carnevale and Robert

2009) and from 10 to 39 d for *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and *Ae. aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (Delatte et al. 2009, Goindin et al. 2015). This implies that young mosquitoes cannot transmit these pathogens and highlights that, in a vector population, only a small proportion is actually infectious to the vertebrate hosts, which may have a substantial impact on the efficacy of integrated mosquito management programs (Bellan 2010). In this context, old mosquitoes should be considered as a priority in the development and evaluation of control tools. However, the process of aging has been largely neglected until recent years and practical limitations still restrain the recommendations for insecticide and repellent testing to 5- to 7 d-old mosquitoes (WHO 2009b).

Deleterious metabolic modifications have been shown to be related to mosquito aging (Ryan et al. 2015), such as changes in flight performances (Rowley 1968), immune functions (Hillyer et al. 2005), salivary gland structure (Beckett 1990) and fertility (McCann et al. 2010). The decline in mosquito performances with age could influence

mosquito response to control tools such as repellents and insecticides, as well as its ability to detoxify these chemicals. Consistently, various studies have documented the effect of mosquito aging on the efficacy of insecticides, which remain the most common tool against vector mosquitoes. Literature highlights increases in insecticide susceptibility alongside increased aging (Hodjati and Curtis 1999, Glunt et al. 2011, Chouaibou et al. 2012, Aizoun et al. 2014, Aldridge et al. 2017). Interestingly, this effect was also observed in mosquitoes carrying insecticide resistance alleles (Rowland and Hemingway 1987, Lines and Nassor 1991, Hodjati and Curtis 1999, Jones et al. 2012, Kulma et al. 2013). Contrasting with insecticides, the effect of mosquito aging on repellents efficacy has received very little attention. However, due to the spreading of insecticide resistance, blocking vector and human contact with the use of repellents remains a valuable tool to control mosquito-borne disease transmission (Fradin and Day 2002, Licciardi et al. 2006, N'Guessan et al. 2006, Pridgeon et al. 2009, Pennetier et al. 2010). In *Ae. albopictus*, DEET was more efficient to inhibit bloodmeal in 15-d-old females than in younger and older females in arm-in-cage assays (Xue et al. 1995). However, contrasting results were observed, as other authors did not find any correlation between mosquito aging and DEET efficacy, using the same experimental design (Barnard 1998). These discrepancies may be attributed to the lack of reproducibility in experiments when using host odors due to inter-host variability. To this regard, studies with standardized protocols must be conducted in order to better understand the potential effect of mosquito aging on repellents efficacy. In this study, we tested the effect of aging on DEET efficacy against two main vectors of human pathogens, *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae), when exposed to a bloodmeal through a DEET-impregnated net. We also tested the effect of DEET exposure on life history traits related to fecundity and survival, in order to show the impact of repellent exposure along a mosquito lifespan.

Materials and Methods

Biological Material

Experiments were performed on adult females of two vector mosquitoes, *An. gambiae* and *Ae. albopictus*. Because the neurotoxicity of DEET may interplay with insecticide resistance (Swale et al. 2014), we used an *An. gambiae* colony that is fixed for the L1014F homozygote mutation (*kdr-west* allele) in the gene coding for the voltage-gated sodium channel. This mutation confers resistance to pyrethroids and DDT and is widespread among malaria mosquito vector populations (WHO 2016). The colony was obtained by introgression into the Kisumu genome the *kdr-west* allele obtained from pyrethroid resistant mosquitoes in Kou Valley, Burkina Faso (Alout et al. 2013). For *Ae. albopictus*, an insecticide-susceptible strain was used, as insecticide resistance is emerging but remain less documented (Moyes et al. 2017). This strain was collected in 2011 in Montpellier, France. Mosquitoes were reared at 27°C and 80% RH with a photoperiod of 14:10 h (L:D). Larvae were fed TetraMin (Tetra, Germany) and adults a 10% honey solution. Mosquitoes were reared in the technical/ research platform dedicated on vectors at Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Montpellier Center, France.

Selection of Different Age Classes

To measure the effect of mosquito age on DEET efficacy, three age classes each separated by 7 d were selected for each mosquito species. Experiments were performed on females that had the opportunity to

mate. They were 4, 11 and 18 d post-emergence for *An. gambiae* and 6, 13, and 20 for *Ae. albopictus*. Oldest females (18 and 20 d, respectively) were given the opportunity to blood feed at day 8 and day 15 post-emergence. Females of intermediate age (11 and 13 d, respectively) were given access to one bloodmeal at day 8 post-emergence. After the bloodmeal, females were given the opportunity to oviposit. Youngest females (4 and 6 d, respectively) were never given access to blood feeding before the assay. This protocol design allows all age classes to be blood-starved for the same period the day of the experiment, which represents 4 d for *An. gambiae* females and 6 d for *Ae. albopictus* females.

Exposure to DEET: Blood Feeding Assays

Females were sugar-starved for 6 h before the assay. For both mosquito species, the three age classes were tested simultaneously. DEET efficacy was tested by blood feeding assays through DEET-impregnated nets. Preliminary assays were performed to select a DEET concentration that corresponds to a mean inhibition between 25 and 75% compared to the control group without repellent. This dose induces repellency but also allows some of the females to blood feed and thus to observe either an increase or a reduction in DEET efficacy between age classes. These assays indicated that a net impregnated with a dose of 25 µg/cm² for *An. gambiae* and 7.5 µg/cm² for *Ae. albopictus* entails such inhibition range in our experimental setup. To perform the assays, batches of 25 females were placed in paper cups (L: 10 cm, ø: 7 cm). Each cup containing mosquitoes was covered by a 15 × 17 cm piece of polyester net that has been previously impregnated either with DEET in ethanol at the selected concentration or with ethanol as a negative control, and left to dry for 1 h at room temperature. Cups were placed under glass feeders, so mosquitoes would contact the impregnated net when blood feeding. Feeders were linked to a water bath circulation (Julabo Labortechnik, Seelbach, Germany) that each maintained 500 µl of rabbit blood at 37°C. They were sealed on one end with Parafilm membrane allowing mosquitoes to feed through it. This device allows for the simultaneous exposure of 800 females for each replicate. After 1 h of exposure, the proportion of blood-fed females was counted for each treatment and each age class, and blood-fed females were maintained in the same conditions as during the rearing for subsequent recording of life history traits.

Recording of Life History Traits

Bloodmeal Size

The quantity of excreted haematin during blood digestion was used to assess the quantity of ingested hemoglobin during the bloodmeal (Briegleb 1980). After exposure, all fed females were individually maintained in plastic vials and supplemented with 10% honey. They were removed after 48 h and excreta was eluted in 1 ml of 1% lithium carbonate solution. Absorbance of the eluate was measured at 405 nm by a TECAN Sunrise absorbance microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The quantity of excreted haematin by individual females was estimated by using the standard curve obtained from known concentrations of porcine haematin (1–100 µg/ml) (Sigma Aldrich, Lyon, France) and used as a proxy of the bloodmeal size.

Fecundity and Survival

After ingestion of the bloodmeal and digestion, females were individually transferred into paper cups and supplemented with 10% honey. The bottom of the cup was covered with moist cotton and filter paper to allow oviposition. The proportion of females that laid eggs (oviposition

rate) was assessed, and eggs were counted by using the software Egg Counter (Mollahosseini et al. 2012). The number and identity of dead females were recorded every day to determine their survival.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using the R software (R Development Core Team 2008).

Blood feeding. Logistic regression by generalized linear mixed-effects model (glmer, binomial distribution, logit link, lme4 package; Bates et al. 2015) was used to compare the proportion of blood-fed females between age classes for both mosquito species, considering replicates and batches as random effects. Treatment, age, and their interaction were included in the model as fixed effects. Post hoc comparisons between the three age classes were performed using multiple comparisons (Tukey's tests, multcomp package; Hothorn et al. 2008).

Life-history traits. For each age class and species, bloodmeal size (measured as the quantity of excreted haematin) was analyzed using a linear mixed-effects model with a normal error distribution (lmer, lme4 package). Oviposition rate was compared using glmer with a binomial error distribution. The number of eggs laid per female was analyzed using a hurdle model with negative binomial distribution (pscl package; Zeileis et al. 2008). The probability of the presence versus absence of eggs was modeled using a binomial distribution. The effects of treatment and age on survival were assessed using a Cox proportional hazards regression model (packages survival, coxme; Therneau and Grambsch 2000, Therneau 2015). For each analysis, age, treatment, and their interaction were included as fixed effects, and replicate was added as random effect. For comparison of the number of eggs laid, bloodmeal size was also included as a fixed factor. The contribution of each explanatory variable and the interaction between age and treatment were assessed sequentially using analysis of variance (ANOVA) function, with nonsignificant terms removed from the model. Model selection was performed using the Akaike Information Criterion (AIC) and analysis of the residuals (plotresid, package RVAideMemoire; Hervé 2017).

Results

Interplay Between Mosquito Age and DEET on Blood-Feeding Success

Blood-feeding success on a DEET or ethanol-treated net was tested among 4,057 females for *An. gambiae* and 3,492 for *Ae. albopictus*,

both across five replicates. For the two species, the concentrations of DEET (25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of net for *An. gambiae* and 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of net for *Ae. albopictus*) significantly affected blood feeding, with a mean inhibition across age classes of 75% for *An. gambiae* ($X^2 = 138.55$, $\text{df} = 1$, $P = 2.2e^{-16}$) and 55% for *Ae. albopictus* ($X^2 = 64.50$, $\text{df} = 1$, $P = 9.66e^{-16}$) compared to control groups.

In both species, aging significantly affected blood feeding in presence of DEET ($X^2 = 13.17$, $\text{df} = 2$, $P = 0.0014$ for *An. gambiae* and $X^2 = 17.55$, $\text{df} = 2$, $P = 0.00015$ for *Ae. albopictus*) (Fig. 1). In *An. gambiae*, the proportion of blood-fed females was significantly higher in young females than in old ones ($P < 0.001$). No differences were observed between young females and intermediate-aged females ($P = 0.20$) and between intermediate-aged females and old females ($P = 0.43$) (Fig. 1A). In *Ae. albopictus*, young females were significantly less inhibited by DEET than females of intermediate age ($P = 0.0074$) and old females ($P < 0.001$). No differences in the blood feeding were observed between females of intermediate age and old females ($P = 0.34$) (Fig. 1B). In both mosquito species, blood feeding was not affected by mosquito aging in the control group ($X^2 = 1.49$, $\text{df} = 2$, $P = 0.47$ for *An. gambiae* and $X^2 = 1.27$, $\text{df} = 2$, $P = 0.53$ for *Ae. albopictus*) (Fig. 1A and B).

Effects of DEET Exposure and Age on Mosquito Life-History Traits

Life-history traits were measured in 600 females of each mosquito species across five replicates.

Blood Meal Size

For both species, bloodmeal size was not affected by DEET treatment compared to control groups ($X^2 = 0.0083$, $\text{df} = 1$, $P = 0.93$ for *An. gambiae* and $X^2 = 1.71$, $\text{df} = 1$, $P = 0.19$ for *Ae. albopictus*). No significant interaction was found between age and treatment for this trait ($X^2 = 3.84$, $\text{df} = 2$, $P = 0.15$ for *An. gambiae* and $X^2 = 2.21$, $\text{df} = 2$, $P = 0.33$ for *Ae. albopictus*). Blood meal size was only influenced by mosquito age ($X^2 = 24.12$, $\text{df} = 2$, $P = 5.80e^{-6}$ for *An. gambiae* and $X^2 = 21.16$, $\text{df} = 2$, $P = 2.54e^{-5}$ for *Ae. albopictus*). Observations were highly similar between species, with young females taking larger bloodmeal than intermediate-aged females ($P = 0.022$ for *An. gambiae* and $P = 0.019$ for *Ae. albopictus*) and old females ($P < 0.001$ for *An. gambiae* and $P < 0.001$ for *Ae. albopictus*) (Fig. 2).

Oviposition Rate

Oviposition rate was not affected by DEET treatment compared to control groups neither in *An. gambiae* ($X^2 = 2.22$, $\text{df} = 1$, $P = 0.14$)

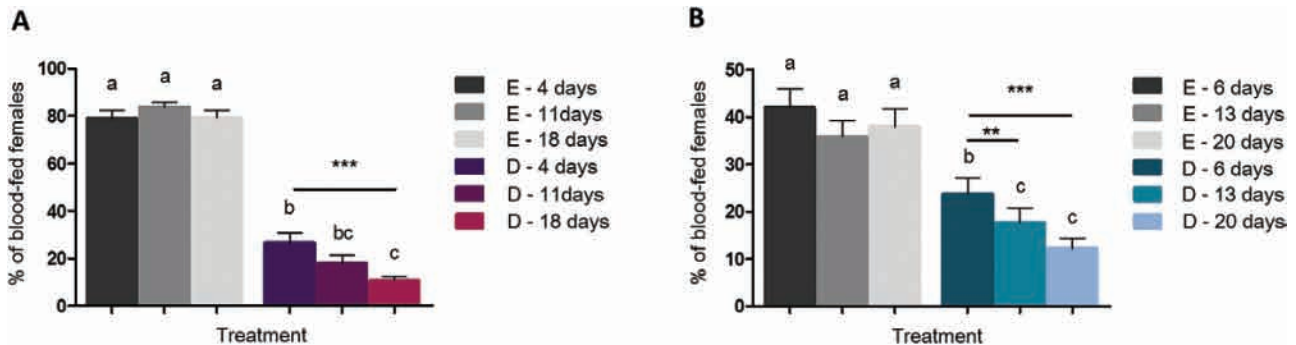


Fig. 1. Percentage of blood-fed females after blood-feeding through ethanol or DEET-treated nets for the three age classes in *An. gambiae* (A) and *Ae. albopictus* (B). E = Ethanol, D = DEET. Results are presented as mean \pm SE. Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Tukey correction, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). $N = 4,057$ females for *An. gambiae* and 3,492 females for *Ae. albopictus*, both across five replicates.

nor in *Ae. albopictus* ($X^2 = 3.40$, $df = 1$, $P = 0.065$). No significant interaction was found between age and treatment for this trait in the two species ($X^2 = 5.79$, $df = 2$, $P = 0.055$ for *An. gambiae* and $X^2 = 0.52$, $df = 2$, $P = 0.77$ for *Ae. albopictus*). In *An. gambiae*, mosquito aging significantly influenced oviposition rate ($X^2 = 21.70$, $df = 2$, $P = 1.94e^{-5}$), with young females laying significantly less than intermediate-aged females ($P < 1e^{-4}$) and old females ($P = 0.0026$). Although a similar trend was observed in *Ae. albopictus*, mosquito age did not significantly influence oviposition rate ($X^2 = 1.28$, $df = 2$, $P = 0.53$) (Fig. 3).

Number of Eggs Laid

For both species, number of eggs laid was not affected by DEET treatment compared to control groups ($X^2 = 1.22$, $df = 1$, $P = 0.27$ for *An. gambiae* and $X^2 = 2.00$, $df = 1$, $P = 0.16$ for *Ae. albopictus*). There was no significant interaction between age and treatment for this trait ($X^2 = 4.75$, $df = 2$, $P = 0.31$ for *An. gambiae* and $X^2 = 1.78$, $df = 2$, $P = 0.41$ for *Ae. albopictus*). In both mosquito species, number of eggs laid seem to be influenced by mosquito age with intermediate-aged females laying more eggs than young and old females, although the difference was not statistically different in *An. gambiae* ($X^2 = 2.23$, $df = 2$, $P = 0.33$). In *Ae. albopictus*, mosquito age did show a significant effect on number of eggs laid ($X^2 = 6.90$, $df = 2$, $P = 0.03$), with old females laying significantly less eggs than intermediate-aged females ($P = 0.012$) (Fig. 4).

Survival

DEET treatment did not affect survival in either *An. gambiae* ($X^2 = 0.33$, $df = 1$, $P = 0.56$) or in *Ae. albopictus* ($X^2 = 0.61$, $df = 1$, $P = 0.43$) compared to control groups. Age and treatment showed no significant interaction for this trait ($X^2 = 3.16$, $df = 2$, $P = 0.21$ for *An. gambiae* and $X^2 = 3.90$, $df = 2$, $P = 0.14$ for *Ae. albopictus*). Survival was only influenced by mosquito age at the time of exposure to bloodmeal and/or the number of blood meals with or without repellent ($X^2 = 7.35$, $df = 2$, $P = 0.025$ for *An. gambiae* and $X^2 = 7.77$, $df = 2$, $P = 0.02$ for *Ae. albopictus*). A similar trend was observed in the two species, with females exposed to bloodmeal when old surviving longer than other classes. Yet, in *An. gambiae*, survival was significantly longer in females that were exposed when old than in intermediate-aged females ($P = 0.04$). In *Ae. albopictus*, survival was significantly longer in females that were exposed when old to the bloodmeal than in females that were exposed when young ($P = 0.015$) (Fig. 5).

Discussion

This study evidenced increases in DEET efficacy alongside increasing aging in two vector mosquitoes. In both *An. gambiae* and *Ae. albopictus*, DEET induced a significantly higher inhibition of blood-feeding in old females (18-d-old for *An. gambiae* and 20-d-old for *Ae. albopictus*) than in young females (4- and 6 d-old). In *Ae. albopictus*, intermediate-aged females (13-d-old) were also more inhibited by DEET than young females (6-d-old). These results support a previous study showing that DEET repellency lasted longer for 15-d-old than 5-d-old mosquitoes (Xue et al. 1995). Taken together, these data highlight that mosquito aging both reduces blood feeding in the presence of DEET and increases the duration of DEET efficacy. It is worth noting that, under our experimental set-up, age and number of blood meals are combined, which do not allow to assess the effects of each independently. This design is, however, the most biologically relevant considering that these two factors are also associated in nature, as gonotrophic cycles and blood feeding take place throughout the whole female lifespan (Carnevale and Robert 2009). Interestingly, the observed increase of DEET efficacy with mosquito age appears to be conserved across mosquito species and insecticide resistance status, as our results were highly consistent in pyrethroid-resistant *Anopheles* and in insecticide-susceptible *Aedes*. The correlation between mosquito aging and increased susceptibility to chemicals irrespectively of insecticide resistance status is reminiscent with previous observations on insecticides (Rowland and Hemingway 1987, Lines and Nassor 1991, Hodjati and Curtis 1999, Glunt et al. 2011, Chouaibou et al. 2012, Jones et al. 2012, Kulma et al. 2013, Aizoun et al. 2014, Aldridge et al. 2017). DEET is the most used mosquito repellent; however, its mode of action remains under debate. It is thought to exert deterrent as well as insecticidal effects in insects (Corbel et al. 2009, Legeay et al. 2018). In this context, the increased susceptibility to DEET observed in old females may be attributed to decreases in the efficacy of detoxification mechanisms. Consistently, mosquito aging has been shown to be associated with decreases in the concentration of enzymes involved in DEET detoxification (Mourya et al. 1993, Hellestad et al. 2011). These decreases have been observed in both insecticide-resistant and susceptible old mosquitoes and are also responsible for increased susceptibility to insecticides (Hazelton and Lang 1983, Mourya et al. 1993). Alternative and non-exclusive hypotheses to explain the observed changes in susceptibility to DEET along mosquito lifespan could also be increased in the rate of cuticle permeability, decreases

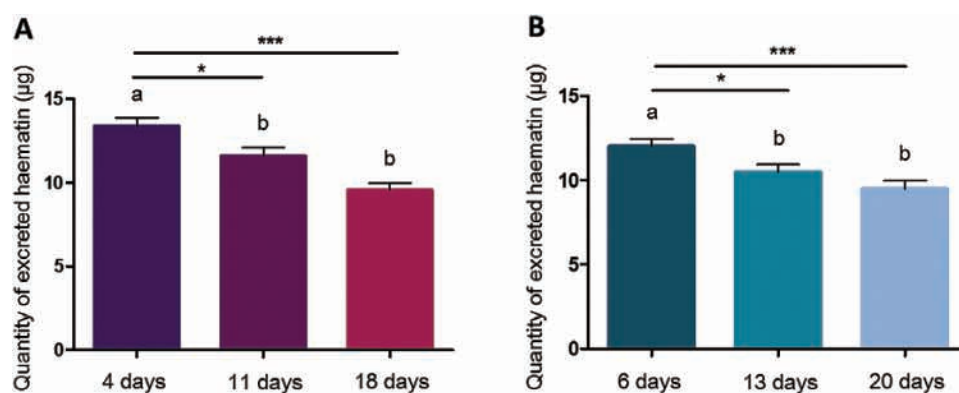


Fig. 2. Mean quantity of excreted haematin after blood feeding for the three age classes in *An. gambiae* (A) and *Ae. albopictus* (B). DEET and control treatments are grouped together, as variability was not explained by DEET treatment but only by mosquito age. Results are presented as mean \pm SE. Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Tukey correction, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). $N = 600$ females of each mosquito species across five replicates.

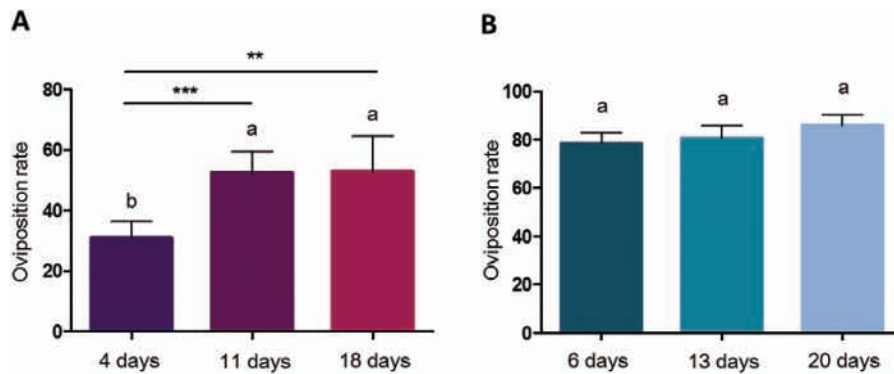


Fig. 3. Mosquito oviposition rate for the three age classes in *An. gambiae* (A) and *Ae. albopictus* (B). DEET and control treatments are grouped together, as variability was not explained by DEET treatment but only by mosquito age. Results are presented as mean \pm SE. Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Tukey correction, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). $N = 600$ females of each mosquito species across five replicates.

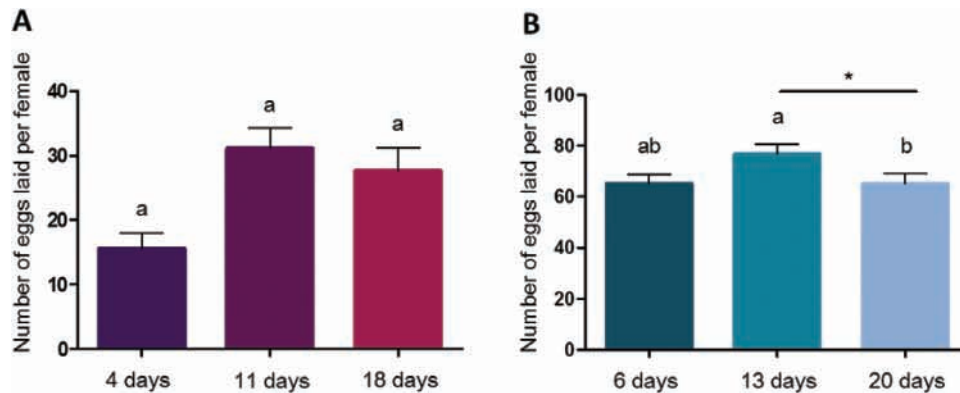


Fig. 4. Mean number of eggs laid per female for the three age classes in *An. gambiae* (A) and *Ae. albopictus* (B). DEET and control treatments are grouped together, as variability was not explained by DEET treatment but only by mosquito age. Results are presented as mean \pm SE. Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Tukey correction, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). $N = 600$ females of each mosquito species across five replicates.

in the rate of xenobiotic excretion or changes in the DEET detection by gustatory or olfactory receptors. For instance, changes in antennal olfactory sensitivity with aging have already been documented in other insect species (Seabrook et al. 1979, Crnjar et al. 1990, Den Otter et al. 1991). However, further studies will need to be implemented, as the evaluation of DEET efficacy regarding age-related changes of these parameters has, to our knowledge, never been investigated. Our results did not show any combined effect of DEET and aging on the quantity of blood intake, oviposition rate and number of eggs laid, nor survival after exposure. This is inconsistent with a reduced ability for chemicals detoxification in old females (Hazelton and Lang 1983, Mourya et al. 1993) and suggests that, if DEET induces fitness costs in exposed mosquitoes, they are not expressed in this study. DEET has been shown to present insecticidal effects by inhibiting insect cholinesterases, but its action is reversible (Corbel et al. 2009). One possible explanation could be that mosquitoes are impacted when contacting DEET during blood feeding, but that the impact does not persist beyond exposure due to the reversible nature of DEET action. Under our experimental setup, the reported life-history traits are only influenced by mosquito aging and/or the number of blood meals taken, with observations being highly consistent between the two mosquito species tested. Yet, young females displayed a higher quantity of blood intake associated with a lower oviposition rate. For this age class, the assay corresponds to the first bloodmeal and then to the first gonotrophic cycle. Observations are in accordance with literature showing that, in the first gonotrophic

cycle, the bloodmeal is used to replenish metabolic reserves to the detriment of eggs development (Charlwood et al. 2003, Carnevale and Robert 2009). The increased longevity observed in females exposed when old may rely on the fact that, throughout gonotrophic cycles, females progressively increase the use of blood lipids for metabolism to the detriment of fecundity, and then accumulate more energetic reserves (Briegel et al. 2002). The decreases in the quantity of blood intake and in the number of eggs laid observed in old females are also consistent with the deleterious modifications associated with mosquito senescence previously documented (Styer et al. 2007, McCann et al. 2010).

Altogether, these observations explain the natural variability in fecundity that occurs throughout female gonotrophic cycles as well as on the relationship between the number of gonotrophic cycles and mosquito longevity. They also reveal the need for considering mosquito age and parity in predictive models of disease transmission as keystone factors that could impact life history traits and, then, pathogen circulation (Ryan et al. 2015).

Our observations highlight that, in two main vectors of pathogens, DEET efficacy increases with mosquito aging. The expected risk of being bitten despite the presence of DEET is then reduced in old mosquitoes, which are the more susceptible to harbor infectious stages of pathogens. This result corroborates previous observations performed on insecticides (Rowland and Hemingway 1987, Lines and Nassor 1991, Hodjati and Curtis 1999, Glunt et al. 2011, Chouaibou et al. 2012, Jones et al. 2012, Kulma et al. 2013,

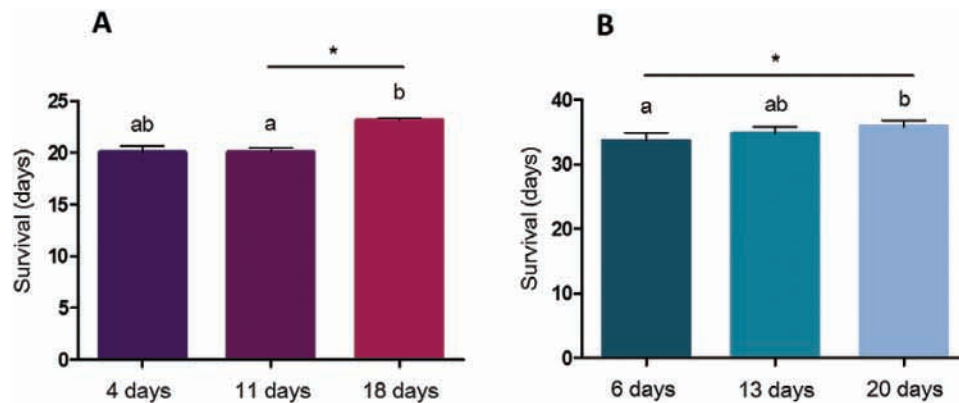


Fig. 5. Mean survival for the three age classes in *An. gambiae* (A) and *Ae. albopictus* (B). DEET and control treatments are grouped together, as variability was not explained by DEET treatment but only by mosquito age. Results are presented as mean \pm SE. Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Tukey correction, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). $N = 600$ females of each mosquito species across five replicates.

Aïzoun et al. 2014, Aldridge et al. 2017), and suggests that old mosquitoes may be more susceptible to chemical-based control tools. This may have significant epidemiological consequences for integrated mosquito management. First, it suggests that the control of vector-borne pathogens with a long EIP could be achieved by selectively eliminating old mosquitoes. This age-structure altering approach, referred to as late-life acting intervention (LLA), has been proposed a few years ago, and involves specifically targeting the most dangerous vectors (Koella et al. 2009, Huijben and Paaijmans 2017). The idea behind this evolutionarily sustainable strategy is to target old mosquitoes, before the pathogen reaches salivary glands, in order to reduce the infectious reservoir. The LLA could then enable the containment of transmission without intense selection for resistance, as it reaches mosquitoes after most of the reproduction has been accomplished (Read et al. 2009). Yet, the increased susceptibility of old mosquitoes to a repellent observed in our study supports the feasibility of such LLA strategies. Besides, this study highlights the need for taking into account mosquito age in the development and evaluation of integrated mosquito management tools. Indeed, bioassays that include only newly-emerged mosquitoes do not reflect the overall population susceptibility level. Here, the increased susceptibility observed in old mosquitoes suggests that the quantity of chemicals necessary to fight infectious vector mosquitoes could be adjusted, which could allow to delay the spread of resistance mechanisms, as well as reduce the damages in the environment and the public health challenges caused by the use of chemicals.

This study, together with previous observations, shows that mosquito aging reduces blood feeding success and increases behavioral repellency to DEET (Xue et al. 1995). Moreover, this increased susceptibility alongside aging seems to be a common trait to mosquito species, and affects both insecticide-susceptible and resistant mosquitoes. Altogether, these data encourage the integration of repellents in LLA strategies. However, it is worth noting that, as fecundity and longevity of old females were not shown to be affected by DEET, repellents may not be used alone but rather as part of integrated control strategies that both deter and kill old mosquitoes. Also, mosquito age is not the only parameter of epidemiological relevance and susceptible to influence the efficacy of control tools. Thus, further studies are warranted to evaluate the combined effects of mosquito infection and aging on DEET efficacy. In the long-term, this would help public health policies in designing personal protection strategies that target the most dangerous mosquitoes and reduce the infectious reservoir.

Acknowledgments

We acknowledge the technical/ research platform dedicated on vectors at IRD center for providing mosquitoes and technical support. This platform is a member of the Vectopole Sud network and of the LabEX CEMEB (Center Méditerranéen de l'Environnement et de la Biodiversité) in Montpellier. This study was supported by The French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (EST-2016/1/39), by the Languedoc-Roussillon (LR)/Occitanie region and EU-FEDER under the name 'Chercheur(se)s d'Avenir', and by the LabEx CeMEB, under an ANR 'Investissements d'avenir' program (ANR-10-LABX-04-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References Cited

- Aïzoun, N., R. Aikpon, R. Azondekon, A. Asidi, and M. Akogbéto. 2014. Comparative susceptibility to permethrin of two *Anopheles gambiae* s.l. populations from Southern Benin, regarding mosquito sex, physiological status, and mosquito age. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4: 312–317.
- Aldridge, R. L., P. E. Kaufman, J. R. Bloomquist, S. A. Gezan, and K. J. Linthicum. 2017. Application site and mosquito age influences malathion- and Permethrin-induced mortality in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 54: 1692–1698.
- Alout, H., N. T. Ndam, M. M. Sandeu, I. Djégbé, F. Chandre, R. K. Dabiré, L. S. Djogbénou, V. Corbel, and A. Cohuet. 2013. Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS One* 8: e63849.
- Barnard, D. R. 1998. Mediation of deet repellency in mosquitoes (Diptera: Culicidae) by species, age, and parity. *J. Med. Entomol.* 35: 340–343.
- Bates, D., M. Maechler, B. Bolker, and S. Walker. 2015. Fitting linear-mixed effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67: 1–48.
- Beckett, E. B. 1990. Development and ageing of the salivary glands of adult female *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes togoi* (Theobald) mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 19: 277–290.
- Bellan, S. E. 2010. The importance of age dependent mortality and the extrinsic incubation period in models of mosquito-borne disease transmission and control. *PLoS One* 5: e10165.
- Briegel, H. 1980. Determination of uric acid and hemo-in in a single sample of excreta from blood-fed insects. *Experientia* 36: 1428.
- Briegel, H., M. Hefti, and E. DiMarco. 2002. Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 48: 547–554.
- Carnevale, P., and V. Robert. 2009. Les anophèles: biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. IRD, Montpellier, France.
- Chan, M., and M. A. Johansson. 2012. The incubation periods of dengue viruses. *PLoS One* 7: 1–7.
- Charlwood, J. D., J. Pinto, C. A. Sousa, C. Ferreira, V. Petrarca, and V. E. Rosario. 2003. "A mate or a meal" – Pre-gravid behaviour of female

- Anopheles gambiae* from the islands of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Malar. J.* 2: 1–11.
- Chouaibou, M. S., J. Chabi, G. V. Bingham, T. B. Knox, L. N. Dri, N. B. Kesse, B. Bonfoh, and H. V. P. Jamet. 2012. Increase in susceptibility to insecticides with aging of wild *Anopheles gambiae* mosquitoes from Côte d'Ivoire. *BMC Infect. Dis.* 12: 1–7.
- Corbel, V., M. Stankiewicz, C. Pennetier, D. Fournier, J. Stojan, E. Girard, M. Dimitrov, J. Molgó, M. Hougard, and B. Lapied. 2009. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *Malar. J.* 11: 1–11.
- Crnjar, R., C. Yin, J. Stoffolano Jr, I. Tomassini Barbarossa, A. Liscia, and A. Angioy. 1990. Influence of age on the electroantennogram response of the female blowfly (*Phormia regina*) (Diptera: Calliphoridae). *J. Insect Physiol.* 36: 917–921.
- Delatte, H., G. Gimonneau, A. Triboire, and D. Fontenille. 2009. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *J. Med. Entomol.* 46: 33–41.
- Den Otter, C., T. Tchicaya, and A. Schutte. 1991. Effects of age, sex and hunger on the antennal olfactory sensitivity of tsetse flies. *Physiol. Entomol.* 16: 173–182.
- Fradin, M. S., and J. F. Day. 2002. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N. Engl. J. Med.* 347: 13–18.
- Glunt, K. D., M. B. Thomas, and A. F. Read. 2011. The effects of age, exposure history and malaria infection on the susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to low concentrations of pyrethroid. *PLoS One.* 6: e24968.
- Goindin, D., C. Delannay, C. Raminini, and J. Gustave. 2015. Parity and longevity of *Aedes aegypti* according to temperatures in controlled conditions and consequences on dengue transmission risks. *PLoS One* 10: 1–21.
- Hazelton, G. A., and C. A. Lang. 1983. Glutathione S-transferase activities in the yellow-fever mosquito [*Aedes aegypti* (Louisville)] during growth and aging. *Biochem. J.* 210: 281–287.
- Hellestad, V. J., B. A. Witthuhn, and A. M. Fallon. 2011. The insect repellent DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) increases the synthesis of glutathione S-transferase in cultured mosquito cells. *Cell Biol. Toxicol.* 27: 149–157.
- Hervé, M. 2017. RVAideMemoire: diverse basic statistical and graphical functions. R package version 0.9–65. <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>
- Hillyer, J. F., S. L. Schmidt, J. F. Fuchs, J. P. Boyle, and B. M. Christensen. 2005. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell. Microbiol.* 7: 39–51.
- Hodjati, M. H., and C. E. Curtis. 1999. Evaluation of the effect of mosquito age and prior exposure to insecticide on pyrethroid tolerance in *Anopheles* mosquitoes (Diptera : Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 89: 329–337.
- Hothorn, T., F. Bretz, and P. Westfall. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* 50: 346–363.
- Huijben, S., and K. P. Paaijmans. 2017. Putting evolution in elimination : winning our ongoing battle with evolving malaria mosquitoes and parasites. *Evol. Appl.* 1–16.
- Jones, C. M., A. Sanou, W. M. Guelbeogo, N. F. Sagnon, P. C. D. Johnson, and H. Ranson. 2012. Aging partially restores the efficacy of malaria vector control in insecticide-resistant populations of *Anopheles gambiae s. l.* from Burkina Faso. *Malar. J.* 11: 1–11.
- Koella, J. C., P. A. Lynch, M. B. Thomas, and A. F. Read. 2009. Towards evolution-proof malaria control with insecticides. *Evol. Appl.* 2: 469–480.
- Kulma, K., A. Saddler, and J. C. Koella. 2013. Effects of age and larval nutrition on phenotypic expression of insecticide-resistance in *Anopheles* Mosquitoes. *PLoS One* 8: 8–11.
- Legeay, S., N. Clere, V. Afaire-Marchais, S. Faure, and B. Lapied. 2018. Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. *Eur. J. Pharmacol.* 825: 92–98.
- Licciardi, S., J. P. Herve, F. Darriet, J. M. Hougard, and V. Corbel. 2006. Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays. *Med. Vet. Entomol.* 20: 288–293.
- Lines, J. D., and N. S. Nassor. 1991. DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. *Med. Vet. Entomol.* 5: 261–265.
- McCann, S., J. F. Day, S. Allan, and C. C. Lord. 2010. Age modifies the effect of body size on fecundity in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* 34: 174–181.
- Mollahosseini, A., M. Rossignol, C. Pennetier, A. Cohuet, A. dos Anjos, F. Chandre, and H. R. Shahbazkia. 2012. A user-friendly software to easily count *Anopheles* egg batches. *Parasit. Vectors.* 5: 0–6.
- Mourya, D. T., J. Hemingway, and C. J. Leake. 1993. Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Med. Vet. Entomol.* 7: 11–16.
- Moyes, C. L., J. Vontas, A. J. Martins, L. C. Ng, S. Y. Kouou, I. Dusfour, K. Raghavendra, V. Corbel, P. David, and D. Weetman. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: 1–20.
- N'Guessan, R., M. Rowland, T. L. Moumouni, N. B. Kesse, and P. Carnevale. 2006. Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100: 1091–1097.
- Ohm, J. R., F. Baldini, P. Barreaux, T. Lefevre, P. A. Lynch, E. Suh, S. A. Whitehead, and M. B. Thomas. 2018. Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. *Parasit. Vectors.* 11: 1–9.
- Pennetier, C., J. Chabi, T. Martin, F. Chandre, C. Rogier, and J. Hougard. 2010. New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. *Parasites and Vectors* 3: 1–7.
- Pridgeon, J. W., U. R. Bernier, and J. J. Becnel. 2009. Toxicity comparison of eight repellents against four species of female mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25: 168–173.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Read, A. F., P. A. Lynch, and M. B. Thomas. 2009. How to Make Evolution-Proof Insecticides for Malaria Control. *PLoS Biol.* 7: 1–10.
- Roundy, C. M., S. R. Azar, S. L. Rossi, J. H. Huang, G. Leal, R. Yun, I. Fernandez-Salas, C. J. Vitek, I. A. Pappalardo, U. Kitron, et al. 2017. Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for zika virus transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 23: 625–632.
- Rowland, M., and J. Hemingway. 1987. Changes in malathion resistance with age in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28: 239–247.
- Rowley, A. 1968. The effect of age on the flight performance of female *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 14: 719–728.
- Ryan, S. J., T. Ben-Horin, and L. R. Johnson. 2015. Malaria control and senescence: the importance of accounting for the pace and shape of ageing in wild mosquitoes. *Ecosphere* 6: 1–272.
- Seabrook, W., K. Hirai, and H. Shorey. 1979. Maturation and senescence of an insect chemosensory response. *J. Chem. Ecol.* 5: 587–594.
- Styer, L. M., J. R. Carey, J. L. Wang, and T. W. Scott. 2007. Mosquitoes do senesce: departure from the paradigm of constant mortality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 111–117.
- Swale, D. R., B. Sun, F. Tong, and J. R. Bloomquist. 2014. Neurotoxicity and mode of action of N, N-diethyl-meta-toluamide (DEET). *PLoS One.* 9: e103713.
- Therneau, T. 2015. Coxme: mixed effects Cox Models. R Package version 2.2–5. <https://CRAN.R-project.org/package=coxme>
- Therneau, T., and P. Grambsch. 2000. Modeling survival data: extending the Cox Model. Springer, New York, NY.
- Vanderberg, J. P., and M. Yoeli. 2016. Effects of temperature on sporogonic development of *Plasmodium beirghei*. *J. Parasitol.* 52: 559–564.
- Vaughan, J., L. Hensley, and J. Beier. 2016a. Sporogonic development of *Plasmodium yoelii* in five Anopheline species. *J. Parasitol.* 80: 674–681.
- Vaughan, J., B. Noden, and J. Beier. 2016b. Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *J. Parasitol.* 78: 716–724.
- WHO. 2009a. Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2009b. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2016. World malaria report 2016.
- Xue, R. D., D. R. Barnard, and C. E. Schreck. 1995. Influence of body size and age of *Aedes albopictus* on human host attack rates and the repellency of deet. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11: 50–53.
- Zeileis, A., C. Kleiber, and S. Jackman. 2008. Regression models for count data in R. *J. Stat. Softw.* 27. <https://www.jstatsoft.org/article/view/v027i08>

Chapitre IV. Effet de l'infection sur l'efficacité du DEET et de la deltaméthrine

Les moustiques porteurs de formes transmissibles de pathogènes sont d'un intérêt crucial dans la dynamique des maladies, puisqu'ils participent directement aux nouvelles infections. Par ailleurs, des modifications comportementales ont été observées chez les moustiques infectés, dans plusieurs couples pathogène-vecteur. Premièrement, les moustiques infectés par le parasite du paludisme sont plus agressifs, se gorgent plus et présentent plus de comportement de piqûres multi-hôtes que leurs homologues non infectés (Rossignol et al. 1984, 1986, Wekesa et al. 1992, Koella et al. 1998, Anderson et al. 1999). Ils sont également plus activés par les odeurs humaines (Smallegange et al. 2013). D'une manière intéressante, ces modifications comportementales sont concomitantes avec la présence de formes transmissibles du parasite dans les glandes salivaires des moustiques, et contribuent toutes à augmenter les contacts entre le vecteur et son hôte, favorisant ainsi la transmission du pathogène. Des changements comportementaux associés à l'infection ont également été recensés chez d'autres espèces de moustiques : les femelles de l'espèce *Ae. aegypti* infectées par le virus de la dengue présentent une augmentation de l'activité locomotrice (Lima-camara et al. 2011), une augmentation dans l'avidité (propension à revenir piquer après qu'un repas de sang ait été interrompu) et, paradoxalement, une diminution dans la motivation à piquer (Maciel-de-freitas et al. 2013). Ces modifications comportementales, en plus d'affecter la dynamique de transmission des pathogènes, sont susceptibles d'impacter directement l'efficacité des moyens de lutte. Dans le cas des méthodes de lutte à base de répulsifs ou d'insecticides, l'infection pourrait affecter la détection des composés par le moustique, ou encore le comportement qui en découle. Les études qui se sont intéressées à cette question ont révélé des résultats contrastés. En ce qui concerne les insecticides, certains auteurs n'ont pas trouvé d'effet d'une infection par le paludisme sur l'efficacité des pyréthrinoïdes (Glunt et al. 2011), alors que d'autres ont observé une diminution de la protection offerte par les ITNs chez les moustiques infectés (Thiévent et al. 2018). Dans le cas des répulsifs, une diminution de l'efficacité du DEET a été décrite chez les *Aedes* infectés par le Sindbis virus (Qualls et al. 2012). D'un autre côté, aucune variation dans l'efficacité du DEET n'a été observée chez les *Anopheles* infectées par *Plasmodium* (Robert et al. 1991), ni chez les

Aedes infectées par le virus de la dengue (Frances et al. 2011) ou par le virus Zika (Leal et al. 2017). Les effets de l'infection sur la physiologie et le comportement des moustiques semblent être dépendants à la fois du pathogène et des conditions environnementales. Par ailleurs, la présence d'allèles de résistance aux insecticides est suspectée imposer un coût métabolique, qui pourrait renforcer l'effet délétère de l'infection sur les moustiques (Alout et al. 2016). Toutes ces données mettent en avant la nécessité d'évaluer l'impact de l'infection par différents pathogènes sur l'efficacité des principales méthodes de lutte, en utilisant des protocoles standardisés afin d'appréhender au mieux les conditions naturelles actuelles. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer l'impact de l'infection par le parasite du paludisme sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées soit du répulsif DEET, soit de l'insecticide deltaméthrine. L'étude s'est portée sur le couple *P. falciparum* / *An. gambiae*, où ce dernier était porteur de l'allèle de résistance aux pyréthrinoïdes *kdr-west* et a été testé à différents stades infectieux. L'efficacité a été mesurée par la capacité à passer au travers d'une moustiquaire traitée contenant des trous, le gorgement après le passage au travers de la moustiquaire, et la mortalité. Nos résultats n'ont pas démontré d'effet significatif de l'infection sur la capacité à trouver un trou dans la moustiquaire ni à se gorger, aussi bien pour le répulsif que pour l'insecticide. Cependant, les moustiques infectieux présentent une augmentation de la mortalité par rapport aux moustiques sains et aux moustiques infectés par des formes non transmissibles, indépendamment du traitement de la moustiquaire. Ceci pourrait être la conséquence d'un coût de l'infection associée à un coût de la résistance aux insecticides. Cette augmentation dans la mortalité n'est cependant pas observée dans tous les cas, ce qui suggère un réplicat, confondu avec un potentiel effet donneur de sang pour le gorgement, ou isolat de parasite (Article «Efficacy of vector control tools against malaria-infected mosquitoes»). Ces résultats supposent que, selon notre protocole expérimental, l'efficacité des méthodes de lutte n'est pas diminuée lorsque les moustiques sont infectieux. De plus, l'augmentation de la mortalité observée au stade infectieux souligne que ces moustiques pourraient être ciblés spécifiquement par les moyens de lutte. Néanmoins, le fait que l'augmentation dans la mortalité ne soit pas systématique suggère l'implication d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux. Cette étude met donc en exergue la nécessité de mieux comprendre les interactions entre infection et mode d'action des outils de lutte antivectorielle.

Efficacy of vector control tools against malaria-infected mosquitoes

Margaux Mulatier^{1,2¶*}, Soromane Camara^{3¶}, Alphonsine Koffi³, David Carrasco¹,
Angélique Porciani¹, Fabrice Chandre¹, Nicolas Moiroux⁴, Thierry Lefevre⁴, Roch Dabiré⁴, Serge
Assi³, Ludovic Phamien Ahoua Alou³, Laurent Dormont², Cédric Pennetier^{1,3}, Anna Cohuet¹

¹: MIVEGEC, IRD, CNRS, Univ. Montpellier, Montpellier, France.

²: CEFE, Univ Paul Valéry Montpellier 3, CNRS, Univ Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier,
France

³: Institut Pierre Richet/Institut National de Santé Publique, Bouaké, Côte d'Ivoire

⁴: Institut de Recherches en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

11

¶: These authors contributed equally to this work

*Correspondence: margaux.mulatier@ird.fr. Phone: 0033750987030

14

Abstract

Background: Within mosquito vector populations, infectious mosquitoes are the ones contributing to the transmission of pathogens to susceptible hosts and they are, consequently, of great epidemiological interest. Mosquito infection by malaria parasites has been shown to affect several traits of mosquito physiology and behavior, and could interplay with the efficacy of control tools.

20 **Methods:** In this study, we evaluated, in pyrethroid resistant *Anopheles gambiae*, the effect of
21 mosquito infection with the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* on the efficacy of nets
22 treated with either the insecticide deltamethrin or the repellent DEET, measuring i) mosquito
23 success to pass through the net, ii) blood-feeding on a host and iii) chemicals-induced mortality.

24 **Results:** Infection status of mosquitoes did not affect their success to pass through the net, to blood-
25 feed, nor chemicals-induced mortality. However, infectious mosquitoes had higher mortality rates
26 than both uninfected mosquitoes and mosquitoes infected with non-transmissible stages,
27 independently of net treatment.

28 **Conclusions:** This data evidenced a cost of infection on mosquito survival at transmissible stages
29 of infection, which could have significant consequences for both malaria epidemiology and vector
30 control. This stresses the need for understanding the combined effects of insecticide resistance and
31 infection on the efficacy on control tools.

32 **Keywords:** *Anopheles gambiae*, malaria, infection, insecticides, repellents, vector control.

33

34 **Background**

35 Mosquito-borne diseases are considerable public health issues, mostly affecting developing
36 countries [1,2]. To reduce their incidence, controlling vector mosquitoes and limiting their contact
37 with human hosts remains the most effective strategy [3]. One promising approach for achieving
38 this goal would be to selectively target, within mosquito populations, individuals that are the most
39 dangerous for humans [4]. Particularly, mosquitoes carrying transmissible forms of pathogens in
40 their salivary glands (i.e. infectious mosquitoes), are of great epidemiological relevance. Yet, the
41 implementation of control means that could specifically reach infectious mosquitoes is dependent

42 upon an extensive knowledge of the effects of mosquito infection on its behavior and physiology.
43 Infection by pathogens has been shown to affect mosquito phenotypic traits [5]. Malaria-infected
44 *Anopheles* mosquitoes generally display increase attraction, biting and feeding rate [6–10].
45 Interestingly, these changes are often concomitant with the presence of transmissible stages of the
46 pathogen and may contribute to increase the number of contacts between human hosts and
47 infectious vectors [11]. These effects may lead to substantial epidemiological consequences, with
48 transmission rates of mosquito borne pathogens being potentially much higher than expected [12].
49 On the other hand, infection by malaria parasites may induce fitness costs on mosquitoes, reducing
50 their survival. This can be especially true when infection is associated with other biotic and abiotic
51 stresses [13–15]. Consequently, all the behavioral and physiological changes associated with
52 infection could directly impact the efficacy of control means.

53 To date, conventional control tools mostly rely on the use of insecticide-treated nets (ITNs),
54 although their efficacy could be threatened by the increase of insecticide-resistant individuals in
55 mosquito populations [16]. Besides, repellents offer a great potential both in cutaneous application,
56 spatial use or net impregnation, and their use may become complementary with ITNs [17–19].
57 Despite epidemiological relevance, the potential effect of infection on the efficacy of control means
58 has received little attention. The effect of *Plasmodium* infection on the efficacy of control tools
59 against *Anopheles* vectors has demonstrated contrasted results; while some observations suggest
60 that it does not affect repellency and knockdown effects induced by permethrin [20,21], a recent
61 study showed that infection reduces personal protection offered by ITNs [22]. Some authors also
62 observed that infection can partially restore susceptibility to DDT among mosquitoes carrying
63 resistance alleles [15]. Besides, DEET- induced repellency was not found to be altered in *Anopheles*
64 mosquitoes infected with *Plasmodium* [20]. Infection by *Plasmodium* could then lead mosquitoes

65 to overcome the deterrent effects of control means, and / or induce cumulating fitness costs for the
66 vector together with insecticides or repellents. Altogether, these results highlight the need to better
67 understand the effects of mosquito infection on the efficacy of control tools.

68 In the present study, we evaluated the impact of infection by *Plasmodium falciparum* on the
69 efficacy of treated nets, the most common control tools against malaria mosquitoes, with either the
70 pyrethroid insecticide deltamethrin or the repellent DEET. In laboratory-controlled experiments,
71 we measured *Anopheles gambiae* success to find a hole and to pass through a treated net,
72 subsequent blood-feeding on a host, and chemicals-induced mortality.

73 **Methods**

74 **Mosquito strain**

75 Experiments were performed on *Anopheles gambiae*. As pyrethroid resistance is widespread
76 among malaria vector populations worldwide [23], we used a KdrKis strain, fixed for the L1014F
77 homozygote mutation (*kdr*-west allele) in the gene coding for the voltage-gated sodium channel
78 [24]. This mutation confers resistance to pyrethroids and DDT. Individuals were reared at 27 °C ±
79 1 °C and 75 % ± 10 % relative humidity. Larvae were fed TetraMin® fish food and adults a 10 %
80 honey solution.

81 ***P. falciparum* Experimental infection of mosquitoes by Direct Membrane Feeding Assays** 82 **(DMFA)**

83 DMFAs were carried out according to procedures previously described by Ouédraogo *et al* [25].
84 Screening for *P. falciparum* infectious human carriers were conducted in primary school groups in
85 Bouaké, Ivory Coast. Ethical approval was obtained from the Ministry of Health and Fight against
86 AIDS in Ivory Coast through the National Ethic Committee N° 063/MSHP/CNER-kp and N°

87 080/MSHP/CNER-kp. All participants were enrolled after receipt of written informed consent from
88 their legal guardians.

89 After collection of gametocyte-containing blood, plasma was removed and replaced with European
90 naive AB serum to limit the potential effect of human transmission-blocking immunity [26]. Blood
91 sample was then divided in 2 batches, one was used as infectious blood, and the other was heated
92 at 42 °C for 15 minutes and used as non-infectious blood. Batches of 3-5 days old females were
93 placed in paper cups (L: 10 cm, ø: 7 cm) that were then placed under glass feeders. Females were
94 allowed to feed either infectious blood or heat-inactivated (non-infectious) blood. After 1 hour of
95 exposure, unfed females were discarded, and only fully fed mosquitoes were kept, in the same
96 conditions as during the rearing. All groups of females were given the opportunity to oviposit. A
97 total of 14 infectious blood samples from distinct blood donors were used.

98 Six to seven days after infective blood meal, infection rate among exposed mosquitoes was
99 assessed in a subset of 10 females per infectious blood sample. Midguts were dissected in 0.4 %
100 mercurochrome stain (mercury dibromo fluorescein, Sigma-Aldrich) and examined by optic
101 microscopy (40 × magnification) for the presence and number of oocysts.

102 **Nets impregnation and behavioral assays in tunnel tests**

103 Pieces of Polyester nets of 25 × 25 cm side (625 cm²) were treated with either the pyrethroid
104 insecticide deltamethrin or the synthetic repellent DEET, two compounds commonly used in vector
105 control, at a dose of 25 mg/m² and 500 mg/m² respectively. Concentrations were selected to induce
106 25 to 75 % of mean blood-feeding inhibition in order to allow for observable differences of
107 treatment efficacy between groups of mosquitoes according to infection status. The dose used for
108 deltamethrin also corresponds to the recommended dose for conventional net treatment [27,28].

109 Deltamethrin and DEET were respectively dissolved in acetone and ethanol and tested
110 independently, using their respective solvents as controls.

111 Behavioral experiments were performed using test tunnels. The equipment consists of 4 square
112 glass tunnels (25 cm high, 25 cm wide, and 60 cm long) each divided in two chambers [29,30]. In
113 one chamber, a male guinea pig from the colony used for mosquito rearing was placed as a bait.
114 The two tunnel compartments were separated by a cardboard frame covered with the impregnated
115 net (25 cm × 25 cm), slotting across the tunnel. The net piece is deliberately holed by nine 1 cm in
116 diameter equidistant holes to give opportunity for mosquitoes to pass into the chamber containing
117 the guinea pig. Groups of 10 to 120 female mosquitoes were released in the chamber without the
118 guinea pig. For a given behavioral replicate, the same number of females were released in the 4
119 tunnels. For each replicate and chemical, 4 groups of mosquitoes were tested simultaneously in 4
120 different tunnels with the following conditions: i) unexposed to infection - control net (NI-Control),
121 ii) unexposed to infection - treated net (NI-Delta and NI-DEET), iii) exposed to infection - control
122 net (I-Control) and iv) exposed to infection - treated net (I-Delta and I-DEET). Treatments were
123 randomly attributed to each of the 4 tunnels at each replicate. Each behavioral replicate corresponds
124 to an experimental infection from one given donor. For each chemical, part of the females were
125 tested at 6 - 8 days post blood-meal (6-8 dpbm), when infected individuals carried oocysts in their
126 midgut (*i.e.* immature, non-infectious stage of the parasite). The other part was tested at 12 - 14
127 days post blood-meal (12-14 dpbm), when infected individuals carried sporozoites in their salivary
128 glands (*i.e.* mature, infectious stages of the parasite). Exposure lasted eight hours, in order to mimic
129 one night of sleeping under a treated net, after which the position of each female mosquito in the
130 tunnel compartments was recorded, as well as mortality at the end of the test, and blood-feeding
131 status.

132 **Determination of infection status**

133 After each behavioral replicate, all females exposed to infectious blood meal and a subset of
134 females exposed to non-infectious blood were tested for their infection status. They were conserved
135 and stored individually in 100 µl of DNAzol® reagent (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati,
136 OH, USA). The entire insect was used for females killed 6-8 dpbm. Only the head and thorax were
137 used for females killed 12-14 dpbm; this allows to detect infected mosquitoes at days 6 to 8 and
138 exclusively the presence of sporozoites in salivary glands at days 12 to 14. DNA extraction from
139 individual mosquitoes was performed using DNAzol® according to the manufacturer's
140 instructions. *P. falciparum* detection was then carried out by qPCR [31,32].

141 **Statistical Analysis**

142 All statistical analyses were performed using R software [33]. Among females exposed to
143 infectious blood, non-infected females were discarded to avoid confusion when interpreting the
144 results from this group. Only females positive for the presence of *P. falciparum* were included in
145 statistical analysis and hereafter mentioned as “infected” females. Control females exposed to non-
146 infectious blood are hereafter called “non-infected”. DEET and deltamethrin datasets were
147 analyzed independently, using the same statistical method. For each chemical, logistic regression
148 by generalized linear model (glm, quasi-binomial distribution to account for overdispersion, logit
149 link, lme4 package [34]) was used to compare between infected and uninfected females: i) the
150 proportion of females that successfully passed through the impregnated net, ii) the proportion of
151 blood fed females among those that passed the net, and iii) the proportion of dead females. Analysis
152 were performed for females at 6-8 dpbm and for females at 12-14 dpbm separately. Treatment
153 (control *versus* chemical), infection status (infected *versus* non-infected), their interaction, and
154 replicates were coded as fixed factors. Results are presented as mean ± standard error (SE).

155 **Results**

156 Prevalence of infection varied between 15 and 92 % across experimental infections, with a mean
157 total prevalence of 69.77 % \pm 5.88. Dissection at six to seven days post-infective blood meal
158 showed oocysts numbers per female ranging from 1 to 351 across experimental infections. For
159 deltamethrin, 1,230 mosquitoes were tested across 3 behavioral replicates at 6-8 dpbm and 3 at 12-
160 14 dpbm using blood samples from 4 donors. For DEET, 2,095 mosquitoes were tested across 5
161 behavioral replicates at 6-8 dpbm and 8 at 12-14 dpbm using blood samples from 10 donors.
162 Outputs of the models are given in Table 1 and 2. Paired comparisons are showed in Figure 1 and
163 2.

164 **Effect of mosquito infection on efficacy of deltamethrin-impregnated nets**

165 Passing rate was not affected by infection at 6-8 dpbm nor at 12-14 dpbm (Table 1, Fig 1A).
166 Deltamethrin significantly reduced mosquito passing rate both at 6-8 dpbm (mean passing rate =
167 75.42 % \pm 7.71 in NI-Control, 38.80 % \pm 10.42 in NI-Delta, 65.13 % \pm 18.49 in I-Control and 49.58
168 % \pm 11.19 in I-Delta) and at 12-14 dpbm (72.08 % \pm 13.04 in NI-Control, 48.79 % \pm 6.90 in NI-
169 Delta, 76.85 % \pm 14.93 in I-Control and 56.07 % \pm 6.28 in I-Delta) (Table 1; Fig. 1A).

170 Blood-feeding success was not significantly affected by mosquito infection at 6-8 dpbm, but was
171 significantly reduced by deltamethrin treatment (mean blood-feeding = 92.24 % \pm 3.60 in NI-
172 Control, 68.88 % \pm 12.50 in NI-Delta, 96.26 % \pm 1.97 in I-Control and 73.74 % \pm 4.40 in I-Delta).
173 At 12-14 dpbm, a significant interaction was found between infection and treatment regarding this
174 trait. While blood-feeding was significantly reduced by deltamethrin treatment (86.87 % \pm 8.44 in
175 NI-Control, 47.27 % \pm 6.94 in NI-Delta, 98.55 % \pm 1.44 in I-Control and 46.55 % \pm 7.65 in I-Delta),
176 paired comparisons showed no differences in blood-feeding between infected and uninfected

177 females, neither upon control nets ($P = 0.16$) nor upon deltamethrin-treated nets ($P = 0.92$) (Table
178 1; Fig. 1B).

179 Mortality was not significantly affected by infection neither at 6-8 dpbm nor at 12-14 dpbm.
180 Mortality was significantly increased in deltamethrin treatment both at 6-8 dpbm (mean mortality
181 = $3.34 \% \pm 1.86$ in NI-Control, $18.56 \% \pm 7.81$ in NI-Delta, $6.72 \% \pm 0.42$ in I-Control and 20.19
182 $\% \pm 6.34$ in I-Delta) and at 12-14 dpbm ($8.17 \% \pm 4.40$ in NI-Control, $41.77 \% \pm 4.47$ in NI-Delta,
183 $3.66 \% \pm 1.90$ in I-Control and $36.29 \% \pm 15.87$ in I-Delta) (Table 1; Fig. 1C).

184

185

186 **Table 1: Generalized linear model output estimating the effect of mosquito infection and**
 187 **deltamethrin treatment on entry rate, blood-feeding and mortality associated.**

<u>Deltamethrin</u>		6-8 dpbm			12-14 dpbm		
		X ²	Df	P	X ²	Df	P
Passing rate	Treatment	15.41	1	8.67e⁻⁵	6.99	1	0.0082
	Infection	0.0046	1	0.95	0.88	1	0.35
	Treatment * Infection	1.47	1	0.23	0.014	1	0.91
	Replicate	12.87	2	0.0016	9.64	2	0.0081
Blood-feeding rate	Treatment	17.77	1	2.50e⁻⁵	47.97	1	4.33e⁻¹²
	Infection	0.72	1	0.40	1.01	1	0.32
	Treatment * Infection	0.0024	1	0.97	4.52	1	0.034
	Replicate	1.18	2	0.55	4.14	2	0.13
Mortality rate	Treatment	21.10	1	4.35e⁻⁶	19.21	1	1.17e⁻⁵
	Infection	0.41	1	0.52	0.35	1	0.55
	Treatment * Infection	0.40	1	0.53	0.29	1	0.59
	Replicate	13.75	2	0.0010	0.37	2	0.83

188 X² = Chi-squared, Df = degrees of freedom, P = significance, * = effect of the interaction

189

190 **Effect of mosquito infection on efficacy of DEET-impregnated nets**

191 Infection did not significantly affect passing rate, neither at 6-8 dpbm nor at 12-14 dpbm. Passing
192 rate was only significantly reduced in DEET treatment both at 6-8 dpbm (mean passing rate = 70.39
193 % \pm 11.82 in NI-Control, 36.04 % \pm 11.65 in NI-DEET, 83.78 % \pm 7.70 in I-Control and 29.97 %
194 \pm 12.87 in I-DEET) and at 12-14 dpbm (81.52 % \pm 7.60 in NI-Control, 26.61 % \pm 5.60 in NI-DEET,
195 70.56 % \pm 8.89 in I-Control and 35.86 % \pm 7.33 in I-DEET) (Table 2; Fig. 2A).

196 At 6-8 dpbm, blood-feeding was not significantly affected by infection, but was significantly
197 reduced by DEET treatment (mean blood-feeding = 91.13 % \pm 5.88 in NI-Control, 72.57 % \pm 16.11
198 in NI-DEET, 91.06 % \pm 4.06 in I-Control and 68.57 % \pm 18.29 in I-DEET). At 12-14 dpbm, blood-
199 feeding was significantly affected both by DEET treatment and by infection. No statistical
200 difference was however observed between non-infected females and infected when exposed to
201 control nets (86.17 % \pm 4.11 in NI-Control and 69.17 % \pm 11.83 in I-Control, $P = 0.063$), and when
202 exposed to DEET-treated nets (46.19 % \pm 13.46 in NI-DEET and 40.45 % \pm 12.17 in I-DEET, $P =$
203 0.098) (Table 2; Fig. 2B).

204 At 6-8 dpbm, mortality was not affected by infection nor by treatment (mean mortality = 3.31 % \pm
205 1.83 in NI-Control, 2.07 % \pm 2.07 in I-Control, 6.30 % \pm 4.06 in NI-DEET and 6.23 % \pm 3.70 in I-
206 DEET). At 12-14 dpbm, infection showed significant effect on mortality, irrespectively of net
207 treatment. Paired comparisons showed that infectious females displayed higher mortality when
208 exposed to DEET than non-infected ones (11.79 % \pm 5.07 in NI-DEET and 34.83 % \pm 7.80 in I-
209 DEET, $P = 0.023$). Although a trend was observed for an increased mortality in infected females
210 exposed to control nets compared to non-infected ones, this was not significant (10.78 % \pm 4.82 in
211 NI-Control and 21.44 % \pm 10.41 in I-Control, $P = 0.20$) (Table 2; Fig. 2C). In order to assess
212 whether mortality affects females before or after blood-meal, we compared mortality between non-

213 infected and infected females among both blood-fed females and unfed ones. Infection did not
214 significantly affect mortality among blood-fed females ($X^2 = 0.046$, $Df = 1$, $P = 0.83$). However, it
215 did show significant impact among the unfed group ($X^2 = 9.58$, $Df = 1$, $P = 0.0020$), suggesting that
216 mortality occurred during host seeking.

217 To increase statistical power, data from females exposed to control nets were pooled between the
218 two datasets (deltamethrin and DEET), as the two experiments were performed at the same period.
219 Infection showed no significant effect on mosquito mortality when exposed to control nets ($X^2 =$
220 0.16 , $Df = 1$, $P = 0.69$), which confirms that the increased mortality associated with infection
221 occurred only in the DEET dataset.

222

223

224 **Table 2: Generalized linear model output estimating the effect of mosquito infection and**
 225 **DEET treatment on entry rate, blood-feeding and mortality associated.**

226

<u>DEET</u>		6-8 dpbm			12-14 dpbm		
		X ²	Df	P	X ²	Df	P
Passing rate	Treatment	45.48	1	1.54e⁻¹¹	58.24	1	2.32e⁻¹⁴
	Infection	0.63	1	0.43	1.53	1	0.25
	Treatment * Infection	2.87	1	0.090	0.020	1	0.89
	Replicate	30.02	4	4.85e⁻⁶	13.95	7	0.052
Blood-feeding rate	Treatment	8.48	1	0.0036	34.54	1	4.18e⁻⁹
	Infection	0.65	1	0.42	7.48	1	0.0062
	Treatment * Infection	0.59	1	0.44	0.00	1	0.99
	Replicate	18.49	4	0.00099	26.77	7	0.00037
Mortality rate	Treatment	2.03	1	0.15	0.37	1	0.54
	Infection	0.20	1	0.65	7.22	1	0.0072
	Treatment * Infection	0.0018	1	0.97	0.60	1	0.44
	Replicate	2.69	4	0.61	31.9	7	4.22e⁻⁵

227 X² = Chi-squared; Df = degrees of freedom; P = significance; * = effect of the interaction

228

229 **Discussion**

230 The results presented here did not provide evidence for an effect of *Plasmodium* infection in
231 mosquitoes on their ability to pass through a hole of a deltamethrin-impregnated net, to blood-feed
232 after passing through the net, nor on their mortality. This is consistent with previous observations
233 that did not find any impact of *Plasmodium* infection on pyrethroid efficacy [20,21]. However, it
234 seems to contradict the recent published results that showed decreases in the efficacy of ITNs
235 against infectious mosquitoes [22]. These contrasting results are at first sight surprising considering
236 that experimental protocols were very similar regarding parasite species, infection method and
237 behavioral assay. However, some differences in the designs may be responsible for these
238 divergences. First, the two chemicals used belong to two distinct classes of pyrethroids and are
239 known to induce different effects on mosquito nervous system [35], deltamethrin (used in the
240 present study) being less irritant after contact than permethrin (used in the previous study) [36].
241 Then, we used a homozygous *kdr* *An. gambiae* strain whereas the previous study used an *An.*
242 *arabiensis* strain partially resistant to pyrethroids. *An. arabiensis* has been shown to be more
243 irritated by pyrethroids than *An. gambiae* when both strain carry insecticide resistance alleles [37].
244 Also, *kdr* mutation is known to decrease the irritant effects of pyrethroids [30]. The choice of the
245 species as well as the high prevalence of *kdr* allele in our study could have impacted the results.
246 The decreases in pyrethroids efficacy observed in the previous study [22] may be counterbalanced
247 by the generalized insecticide resistance in vector populations [23]. The present data then offer a
248 complementary view on the effects on infection on control tools efficacy in a *kdr* homozygous
249 population.

250 The experiment testing the interactions between DEET impregnation on nets and infection status
251 of mosquitoes showed that the presence of oocysts in mosquito midgut did not influence passing

252 rate through the net, blood-feeding, nor mortality. In the same way, when mosquitoes harbored
253 sporozoites, passing rate was not affected by infection under our experimental design. This is
254 consistent with a previous study that did not find any changes in DEET efficacy in infectious *An.*
255 *stephensi* [20]. However, mosquitoes harboring sporozoites displayed an overall increased
256 mortality, irrespectively of the net treatment. Surprisingly, this effect was not observed in the
257 deltamethrin dataset. A likely explanation for these divergences is a lower statistical power in the
258 experiment with deltamethrin, with a lower number of replicates. Also, data from the deltamethrin
259 dataset were collected in March and August whereas data from the DEET dataset were collected
260 in July and December. These variations in environmental conditions could have impacted mosquito
261 rearing and its subsequent resistance to infection. It is worth noting that a high variability was
262 observed between replicates in the DEET dataset, so the increased mortality was not evidenced in
263 each assay. This variability could be an effect of blood donor, which has been shown to modulate
264 the impact of infection on mosquito fitness [13], and of parasite isolates.

265 The increased mortality observed in infectious mosquitoes suggests that infection by *Plasmodium*
266 could generate a fitness cost, affecting their survival. This is consistent with previous studies
267 showing deleterious effects of infection in the *Anopheles* – *Plasmodium* system [38–40]. Although
268 the cost of *Plasmodium* infection on mosquitoes is under debate for long time [41,42], it appears
269 that this cost might be expressed or amplified when associated to other stresses [13,14] or to fitness
270 costly mutations such as resistance alleles [43]. Interestingly, the increased mortality was observed
271 only in non-blood-fed females, suggesting that it occurred during host-seeking. This behavior is
272 costly for mosquitoes [44], and might interact synergistically with infection. Accordingly,
273 infectious females were previously shown to display higher feeding-associated mortality, which

274 could be a direct cost of the effort to host-seek [45]. The fitness cost associated with infection then
275 seems to be enhanced under different types of stresses.

276 Our results show that infection with *Plasmodium* does not affect ability of *kdr* resistant mosquitoes
277 to find a hole and to pass through a net impregnated with deltamethrin or DEET. However, in some
278 cases, infection increases mosquito mortality. Interestingly, when this fitness cost is expressed, it
279 is observable only in females that harbor sporozoite stages of the parasite. This may lead to
280 important epidemiological consequences. Yet, insecticide-resistant and infectious mosquitoes are
281 the priority targets in the fight against mosquito-borne diseases. However, if insecticide resistant
282 mosquitoes are more likely to die when infectious and if mortality occurs during host-seeking,
283 transmission rates might be lower than expected. Moreover, due to their higher probability to die,
284 those mosquitoes may be reached more easily by control tools. Altogether these observations
285 reinforce the idea of targeting specifically infectious mosquitoes in the fight against mosquito borne
286 diseases [46]. This could be achieved by using both lower doses of chemicals that only target
287 infectious mosquitoes and biological control agents that act against late-life stages [47,48].
288 Nonetheless, the fact that the increased mortality we observe was not evidenced in each dataset
289 suggest complex interactions between environment, control tools, infection and insecticide
290 resistance. Understanding these interplays is a keystone for successfully targeting within a vector
291 population individuals that are the more susceptible to transmit pathogens.

292 **Funding statement**

293 This work was supported by The French National Research Program for Environmental and
294 Occupational Health of Anses (EST-2016/1/39), by the Languedoc-Roussillon (LR)/ Occitanie
295 region and EU-FEDER under the name “Chercheur(se)s d’Avenir”, and by the LabEx CeMEB,
296 under an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01) and by the French

297 Initiative 5 %—Expertise France (N° 15SANIN213). The funders had no role in study design, data
298 collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

299 **Acknowledgements**

300 The authors acknowledge all the participants involved in the study as well as the local authorities
301 for their support. We are also very grateful to the IPR staff in Bouaké for technical assistance and
302 to Félix Zoumènou and Awa Soro for administrative support.

303 **Conflict of interest statement**

304 The authors declare they have no competing interest.

305 **Mention of any meeting(s) where the information has previously been presented**

306 Data on the effects of infection on deltamethrin efficacy were previously presented in the
307 Multilateral Initiative against Malaria (MIM), Dakar, Senegal, 2018. The results of the effect of
308 infection on DEET efficacy were presented in the European Congress of Entomology (ECE),
309 Naples, Italy, 2018.

310 **Corresponding author contact information**

311 Margaux Mulatier

312 Institut de Recherche pour le Développement (IRD)

313 911 Avenue Agropolis, BP 64501

314 34394 Montpellier Cedex 5, France

315 Phone: 0033750987030

316 Email: margaux.mulatier@ird.fr

- 317
- 318 1. WHO. Global vector control response 2017-2030. Geneva; 2017.
- 319 2. WHO. A global brief on vector-borne diseases. Geneva; 2014.
- 320 3. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium*
321 *falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **2015**; 526(7572):207–211.
- 322 4. Koella JC, Lynch PA, Thomas MB, Read AF. Towards evolution-proof malaria control
323 with insecticides. *Evol Appl* **2009**; 2:469–480.
- 324 5. Stanczyk NM, Mescher MC, Moraes CM De. Effects of malaria infection on mosquito
325 olfaction and behavior: extrapolating data to the field. *Curr Opin Insect Sci* **2017**; 20:7–12.
- 326 6. Rossignol PA, Ribeiro JMC, Spielman A. Increased biting rate and reduced fertility in
327 sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **1986**; 35(2):277–279.
- 328 7. Wekesa JW, Copeland RS, Mwangi RW. Effect of *Plasmodium falciparum* on blood
329 feeding behavior of naturally infected *Anopheles mosquitoes* in Western Kenya. *Am J*
330 *Trop Med Hyg* **1992**; 47(4):484–488.
- 331 8. Koella JC, Sørensen FL, Anderson RA. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*,
332 increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*.
333 *Proc Biol Sci* **1998**; 265:763–8.
- 334 9. Smallegange RC, Van-Gemert G-J, Van-de-Vegte-Bolmer M, et al. Malaria infected
335 mosquitoes express enhanced attraction to human odor. *PLoS One* **2013**; 8(5):e63602.
- 336 10. Cator LJ, Lynch PA, Read AF, Thomas MB. Do malaria parasites manipulate
337 mosquitoes ? *Trends Parasitol* **2012**; 28(11):466–470.

- 338 11. Anderson RA, Koella JC, Hurd H. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection
339 on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle.
340 Proc R Soc B **1999**; 266(1430):1729–1733.
- 341 12. Cator LJ, Lynch PA, Thomas MB, Read AF. Alterations in mosquito behaviour by malaria
342 parasites : potential impact on force of infection. Malar J **2014**; 13(164).
- 343 13. Sangare I, Dabire R, Yameogo B, Da DF, Michalakis Y, Cohuet A. Stress dependent
344 infection cost of the human malaria agent *Plasmodium falciparum* on its natural vector
345 *Anopheles coluzzii*. Infect Genet Evol **2014**; 25:57–65.
- 346 14. Aboagye-antwi F, Guindo A, Traoré AS, Hurd H, Coulibaly M, Traoré S. Hydric stress-
347 dependent effects of *Plasmodium falciparum* infection on the survival of wild- caught
348 *Anopheles gambiae* female mosquitoes. Malar J **2010**; 9(243):1–12.
- 349 15. Alout H, Yameogo B, Djogbénu LS, et al. Interplay between *Plasmodium* infection and
350 resistance to insecticides in vector mosquitoes. J Infect Dis **2014**; 210(9):1464–70.
- 351 16. Labbé P, Alout H, Djogbénu L, Pasteur N, Weill M. Evolution of resistance to insecticide
352 in disease vectors. In: Michel Tibayrenc, editor. Genet Evol Infect Dis 2nd ed. London,
353 U.K: Elsevier Publishing Compagny; 2011. p. 363–409.
- 354 17. Achee NL, Bangs MJ, Farlow R, et al. Spatial repellents : from discovery and development
355 to evidence-based validation. Malar J **2012**; 11(164):1–9.
- 356 18. Pennetier C, Chabi J, Martin T, Chandre F, Rogier C, Hougard J. New protective battle-
357 dress impregnated against mosquito vector bites. Parasit Vectors **2010**; 3(81):1–7.
- 358 19. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B. Mixture for

- 359 controlling insecticide- resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14(11):1707–
360 1714.
- 361 20. Robert LL, Schneider I, Wirtz RA. DEET and permethrin as protectants against malaria-
362 infected and uninfected *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*
363 **1991**; 7(2):304–306.
- 364 21. Glunt KD, Thomas MB, Read AF. The effects of age , exposure history and malaria
365 infection on the susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to low concentrations of
366 pyrethroid. *PLoS One* **2011**; 6(9):e24968.
- 367 22. Thiévent K, Hofer L, Rapp E, Tambwe MM, Moore S, Koella JC. Malaria infection in
368 mosquitoes decreases the personal protection offered by permethrin-treated bednets.
369 *Parasit Vectors* **2018**; 11(284):1–10.
- 370 23. WHO. World malaria report 2017. Geneva: WHO; 2017.
- 371 24. Alout H, Ndam NT, Sandeu MM, et al. Insecticide resistance alleles affect vector
372 competence of *Anopheles gambiae s . s .* for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS*
373 *One* **2013**; 8(5):e63849.
- 374 25. Ouédraogo AL, Guelbéogo WM, Cohuet A, et al. A protocol for membrane feeding assays
375 to determine the infectiousness of *P . falciparum* naturally infected individuals to
376 *Anopheles gambiae*. *Malar World J* **2013**; 4(16):17–20.
- 377 26. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, et al. Mosquito feeding assays to determine the
378 infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS*
379 *One* **2012**; 7(8):e42821.

- 380 27. Horn K, Boecker T, Grofmeyer D, Nentwig G, Stoecker R. Technology for conversion of
381 conventional mosquito nets in the field into long lasting bed nets. Proc Fifth Int Conf
382 Urban Pests 2005. p. 287–294.
- 383 28. WHO. Insecticide-treated mosquito net interventions. Geneva; 2003.
- 384 29. Elissa N, Curtis CF. Evaluation of different formulations of deltamethrin in comparison
385 with permethrin for impregnation of netting. Pestic Sci **1995**; 44:363–367.
- 386 30. Chandre F, Darriet F, Duchon S, et al. Modifications of pyrethroid effects associated with
387 kdr mutation in *Anopheles gambiae*. Med Vet Entomol **2000**; 14:81–88.
- 388 31. Marie A, Boissière A, Tsapi MT, et al. Evaluation of a real-time quantitative PCR to
389 measure the wild *Plasmodium falciparum* infectivity rate in salivary glands of *Anopheles*
390 *gambiae*. Malar J **2013**; 12(224):1–7.
- 391 32. Boissière A, Gimonneau G, Tchioffo MT, et al. Application of a qPCR Assay in the
392 investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An .*
393 *gambiae s . s .* in Cameroon. PLoS One **2013**; 8(1):e54820.
- 394 33. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing.
395 Vienna, Austria: R foundation for Statistical Computing; 2008.
- 396 34. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear-mixed effects models using lme4.
397 J Stat Softw **2015**; 67(1):1–48.
- 398 35. Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, et al. Evidence for a separate mechanism of
399 toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. Neurotoxicology **2009**;
400 30:17–31.

- 401 36. Siegert PY, Walker E, Miller JR. Differential behavioral responses of *Anopheles gambiae*
402 (Diptera : Culicidae) modulate mortality caused by pyrethroid-treated bednets. J Econ
403 Entomol **2009**; 102(6):2061–2071.
- 404 37. Kawada H, Ohashi K, Dida GO, Sonye G, Njenga SM, Mwandawiro C. Insecticidal and
405 repellent activities of pyrethroids to the three major pyrethroid-resistant malaria vectors in
406 western Kenya. Parasit Vectors **2014**; 7(208).
- 407 38. Gad AM, Maier WA, Piekarski G. Pathology of *Anopheles stephensi* after infection with
408 *Plasmodium berghei berghei*. Parasitol Res **1979**; 60:249–261.
- 409 39. Klein TA, Harrison BA, Andre RG, Whitmire RE, Inlao I. Detrimental effects of
410 *Plasmodium cynomolgi* infections on the longevity of *Anopheles dirus*. Mosq News **1982**;
411 42(2):265–271.
- 412 40. Ferguson H, Read AF. Genetic and environmental determinants of malaria parasite
413 virulence in mosquitoes. Proc R Soc B **2002**; 269:1217–1224.
- 414 41. Ferguson HM, Read AF. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still
415 unresolved ? Trends Parasitol **2002**; 18(6):256–261.
- 416 42. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on Anopheles : what
417 makes a malaria vector ? Trends Parasitol **2010**; 26(3):130–136.
- 418 43. Alout H, Dabiré RK, Djogbénu LS, Abate L, Corbel V. Interactive cost of *Plasmodium*
419 infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Sci Rep
420 **2016**; 6(26755):1–11.
- 421 44. Lyimo IN, Ferguson HM. Ecological and evolutionary determinants of host species choice

422 in mosquito vectors. Trends Parasitol **2009**; 25(4).

423 45. Anderson RA, Knols BGJ, Koella JC. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase
424 feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s . l . Parasitology
425 **2000**; 120:329–333.

426 46. Alout H, Labbé P, Chandre F, Cohuet A. Malaria vector control still matters despite
427 insecticide resistance. Trends Parasitol **2017**; 33(8):610–618.

428 47. Read AF, Lynch PA, Thomas MB. How to make evolution-proof insecticides for malaria
429 control. PLoS Biol **2009**; 7(4):1–10.

430 48. Lynch PA, Grimm U, Thomas MB, Read AF. Prospective malaria control using
431 entomopathogenic fungi : comparative evaluation of impact on transmission and selection
432 for resistance. Malar J **2012**; 11(383):1–15.

433

434

435

Figure 1

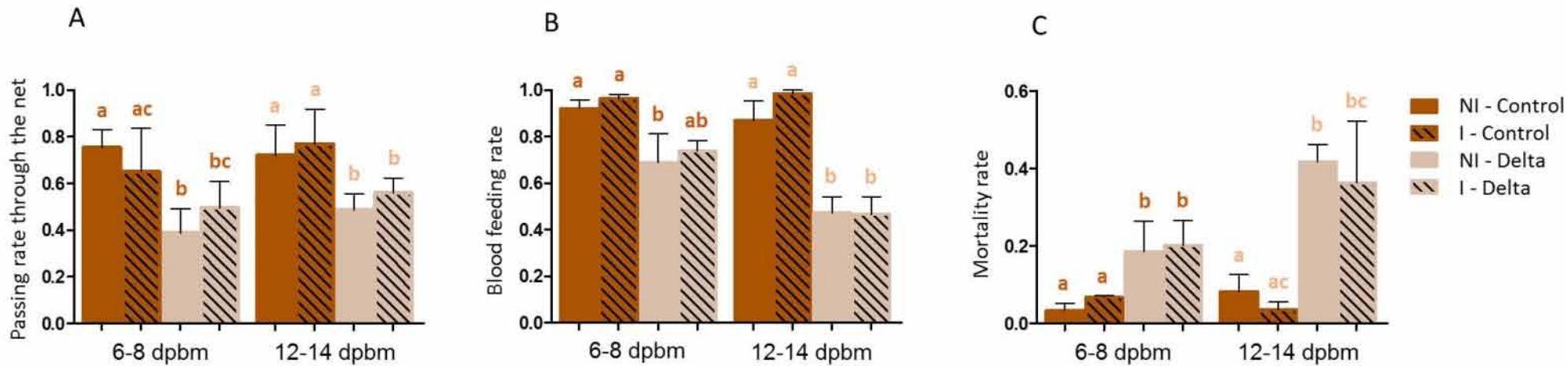


Figure 1: Passing rate through deltamethrin-impregnated nets (A), blood-feeding (B) and mortality associated (C). Blood-feeding was calculated for females that successfully passed through the impregnated net. Hatched bars show infected females, and full bars show non – infected ones. I = Infected, NI = Non-Infected. Results are presented as mean \pm standard error (s.e). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Tukey correction).

Figure 2

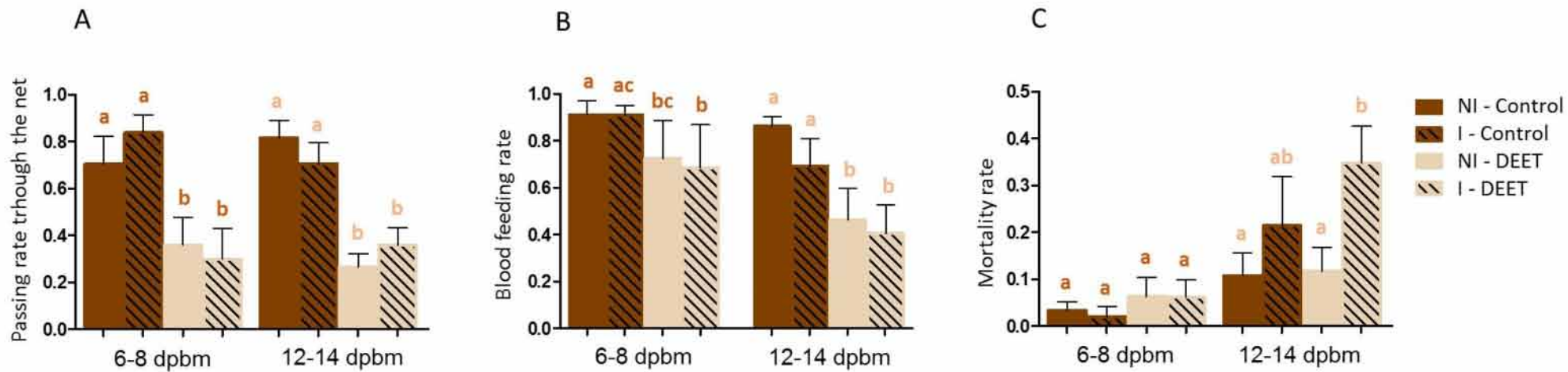


Figure 2: Passing rate through DEET-impregnated nets (A), blood-feeding (B) and mortality (C). Blood-feeding was calculated for females that successfully passed through the impregnated net. Hatched bars show infected females, and full bars show non – infected ones. I = Infected, NI = Non-Infected. Results are presented as mean \pm standard error (s.e). Different letters indicate significant differences (post hoc chi-squared tests with a Tukey correction).

Chapitre V. Discussion

Les résultats de cette étude mettent en lumière l'incroyable plasticité comportementale que présentent les moustiques (Takken and Verhulst 2013) et confirment que le comportement de recherche d'hôte et la réponse face aux outils de lutte antivectorielle ne sont pas constants, mais varient selon leur état physiologique. Nos résultats ont en effet permis de démontrer que, pour les doses et les expositions testées :

- Un repas de sang obtenu en présence de DEET ne modifie pas l'efficacité du répulsif à l'exposition suivante (*An. gambiae*).
- Un repas de sang obtenu en présence de perméthrine pourrait limiter l'effet de l'irritabilité par l'insecticide à l'exposition suivante (*An. gambiae*).
- L'efficacité du DEET augmente avec l'âge des moustiques (*An. gambiae*, *Ae. albopictus*).
- L'infection par *Plasmodium* n'affecte pas l'efficacité du DEET ni de la deltaméthrine (*An. gambiae*).
- L'infection par *Plasmodium* engendre, dans certaines conditions, un coût sur la survie des femelles (*An. gambiae*).
- Une exposition au DEET affecte les traits d'histoire de vie des femelles dans les conditions et doses testées (*An. gambiae*).
- Une exposition à la perméthrine n'impacte pas les traits d'histoire de vie dans les conditions et doses testées (*An. gambiae*).

Ces observations rappellent la variabilité au sein des populations de moustiques, mais aussi la nécessité de la prendre en compte lors de l'évaluation des outils de lutte. En effet, les protocoles opérationnels actuels ne considèrent que très peu la physiologie du moustique et ne permettent donc pas de déterminer le niveau global de susceptibilité d'une population, ni les effets à long terme des outils de lutte antivectorielle. Or, ces derniers devraient être pensés en gardant en considération que les moustiques sont des organismes complexes, qui réagissent en fonction des stimuli qu'ils reçoivent, et dont les actions dépendent de l'expérience passée qu'ils ont eue.

1. Améliorer l'efficacité des méthodes de lutte : cibler les moustiques les plus à même de transmettre

a. Interaction entre état physiologique du moustique et efficacité des méthodes de lutte

Un des objectifs de cette thèse était de déterminer dans quelle mesure il était possible de cibler les moustiques les plus dangereux, et donc d'évaluer l'effet de paramètres physiologiques d'intérêt épidémiologique sur l'efficacité des méthodes de lutte. Les résultats sont présentés tableau 2.

Condition physiologique	<i>Conséquence sur l'efficacité du DEET</i>	<i>Conséquence sur l'efficacité des pyréthrinoïdes</i>	<i>Mortalité pendant la recherche de repas de sang</i>
Expérience	0	-	0
Age	+	NT	0
Infection	0	0	+

Tableau 2 : Effet de la condition physiologique des moustiques sur l'efficacité des méthodes de lutte et sur la mortalité pendant la phase de recherche de repas de sang. 0 : aucun impact ; - : impact négatif ; + : impact positif ; NT : non testé.

L'effet de l'expérience passée sur l'efficacité des moyens de lutte présente des résultats contrastés en fonction du composé chimique. Nos résultats indiquent une diminution de l'efficacité de la perméthrine chez les femelles pré-exposées, mais aucun impact d'une pré-exposition au DEET sur son efficacité. Ces résultats seront discutés plus en détail en partie 2.

L'étude sur l'effet de l'âge démontre des résultats rassurants puisqu'ils suggèrent que le DEET est plus efficace contre les moustiques âgés, qui sont justement ceux qui doivent être ciblés en priorité. De plus, cette augmentation de l'efficacité observée avec l'âge est très consistante entre espèces, et entre moustiques sensibles et résistants aux pyréthrinoïdes. Ces résultats corroborent des observations antérieures réalisées sur les insecticides, et indiquent que ce phénomène semble être

généralisé entre des populations de moustiques même très différentes. Ils suggèrent que les moustiques âgés sont plus facilement atteignables par les moyens de lutte.

En ce qui concerne l'effet de l'infection, nos résultats sont également rassurants dans le sens où ils ne soutiennent pas l'hypothèse selon laquelle l'efficacité des méthodes de lutte est réduite lorsque les moustiques sont infectieux. Qui plus est, la présence de *Plasmodium* semble imposer un coût sur la fitness des moustiques lorsqu'elle est associée à des allèles de résistance, provoquant une augmentation dans la mortalité. Ces observations suggèrent donc que les moustiques infectieux et résistants pourraient être ciblés plus facilement par des méthodes de lutte qui tuent les moustiques, alors que ce sont, encore ici, précisément les moustiques les plus à même de transmettre des pathogènes. Cependant, il est important de noter que le coût observé sur la fitness est très variable entre réplicats, ce qui est probablement le fruit d'une interaction entre le donneur, l'isolat de parasite et les conditions environnementales. Cette variabilité a été observée lors d'études antérieures, où l'impact de l'infection sur la fitness des femelles était dépendant du sang du donneur (Sangare et al. 2014). L'interaction entre infection, mécanismes de résistance et efficacité des méthodes de lutte semble être complexe et dépendre de nombreux facteurs, et il est possible que les résultats soient contexte-dépendant.

Nos résultats renforcent l'idée de cibler les moustiques âgés et infectieux, qui sont les plus à même de transmettre, dans les stratégies de lutte contre les vecteurs. Ces objectifs sont en adéquation avec une stratégie proposée il y a quelques années, appelée Late-Life Acting Intervention (LLAI).

b. LLAI

La stratégie LLAI, proposée par l'équipe d'Andrew Read en 2009 (Koella et al. 2009, Read et al. 2009), a pour objectif de cibler les moustiques les plus à même de transmettre des pathogènes. Plus précisément, elle vise une fenêtre optimale où les moustiques vivent assez vieux pour se reproduire mais meurent avant d'avoir pu transmettre des pathogènes. Cette stratégie n'a pas pour but de réduire drastiquement les populations de moustiques, mais plutôt de cibler les individus d'intérêt épidémiologique et donc de permettre de diminuer la transmission (Read et al. 2009). L'objectif premier de la LLAI était appliqué aux insecticides, et visait à la fois à réduire les doses utilisées afin de ne cibler que les moustiques âgés, et à développer des insecticides à effet retardé (Koella et al. 2009). Comparé aux stratégies classiques, la LLAI comporte un avantage majeur : comme elle

cible uniquement les moustiques âgés, ces derniers ont déjà réalisé la majeure partie du processus de reproduction lorsqu'ils sont atteints. De ce fait, la pression de sélection qu'elle engendre est beaucoup plus faible qu'avec des insecticides à action létale directe, qui tuent les moustiques de toutes classes d'âge. Cibler les moustiques âgés permet donc de réduire considérablement le risque d'apparition de résistances. Des modèles ont en effet démontré que le temps avant l'émergence de la résistance pour un insecticide utilisé de manière conventionnelle est de 5 ans, alors qu'il est de 35 ans lorsqu'utilisé selon la stratégie LLAI (Koella et al. 2009). Qui plus est, les moustiques âgés sont plus affectés par les insecticides, même s'ils sont porteurs d'allèles de résistance. Par exemple, une dose de 0.25 % de perméthrine est efficace pour tuer des *Anopheles* de 12 à 16 jours post-émergence, alors que la dose recommandée par l'OMS est de 0.75 % (Glunt et al. 2011). La LLAI permet donc également de réduire la dose de produits chimiques nécessaire pour atteindre les moustiques âgés, et donc de ralentir la propagation des mécanismes de résistance, et les dommages associés sur l'environnement.

Le défi majeur de la LLAI est de parvenir à cibler spécifiquement les moustiques âgés. Pour atteindre cet objectif, la solution serait de trouver des doses de produits qui n'affectent que cette classe d'âge, ou d'utiliser des méthodes qui agissent avec un effet retardé. Notre étude sur un répulsif a pu mettre en évidence que : i) plus les moustiques sont âgés, plus ils sont repoussés par le DEET, ii) le DEET induit un effet retardé sur les moustiques, diminuant leur fécondité et leur fertilité et iii) l'efficacité du DEET n'est pas altérée chez les moustiques ayant été pré-exposés. De plus, la dose que nous avons utilisée est 8 fois inférieure à la dose recommandée pour *An. gambiae*, et nous avons obtenu en moyenne 87 % d'inhibition de gorgement pour les classes les plus âgées (66 % pour les plus jeunes). En ce qui concerne *Ae. albopictus*, la dose que nous avons utilisée est 26 fois inférieure à la dose recommandée et nous avons obtenu une inhibition de gorgement de 67 % pour les classes les plus âgées (44 % pour les plus jeunes). Ces résultats supposent donc que le DEET possède plusieurs propriétés requises pour être intégré dans la LLAI, et à des doses réduites par rapport aux doses actuellement recommandées. Il pourrait par exemple être appliqué sur des moustiquaires, en complément ou non avec des insecticides, et permettre de réduire les doses de ces derniers tout en protégeant efficacement contre les piqûres infectieuses. Par ailleurs, plusieurs méthodes biologiques ont prouvé exercer une mortalité sur les âges avancés des moustiques et sont donc également de bons candidats à la LLAI :

- Les densovirus. Ces virus sont capables de se répliquer dans le noyau des cellules des insectes. Ils présentent un intérêt particulier contre les moustiques car certains de ces virus infectent les larves mais se répliquent principalement dans le corps des adultes. Des observations ont démontré que la quantité de virus dans le corps des moustiques de l'espèce *An. gambiae* augmente drastiquement à partir de 7 jours post-émergence, ce qui permet d'atteindre les individus adultes, et qui ont déjà réalisé au moins une partie du processus de reproduction (Ren and Rasgon 2010).
- Les microsporidies. Ces parasites ont une réplication continue dans le corps du moustique, résultant en une augmentation de la quantité de spores dans le corps avec le temps. Ils peuvent donc provoquer de faibles effets contre les moustiques jeunes, mais qui s'accroissent avec le temps, provoquant une réduction dans la durée de vie. Par exemple, des auteurs ont constaté qu'une infection par *Vavraia culicis* réduisait la durée de vie des moustiques de l'espèce *An. gambiae* d'environ 27 % (Lorenz and Koella 2011).
- Les champignons entomopathogènes. Plusieurs espèces provoquent de la mortalité retardée et peuvent être utilisées pour lutter contre les moustiques. Par exemple, *Beauveria bassiana* a démontré induire 80 % de mortalité à 14 jours après infection chez *Anopheles stephensi*. De plus, les moustiques infectés par ce pathogène présentent des taux d'infection réduits avec le parasite du paludisme murin *Plasmodium chabaudi* (Blanford et al. 2005).
- La bactérie symbiotique *Wolbachia*. Cette bactérie est une bactérie généralement symbiotique, très répandue chez les insectes. Cependant, des observations chez *Drosophila melanogaster* ont démontré que, dans certains cas, certaines souches peuvent être quiescentes durant le développement mais virulentes au stade adulte et engendrer de la mortalité précoce, à partir de 15 jours après infection (Min and Benzer 1997).

Les répulsifs tels que le DEET pourraient donc être intégrés dans la LLAI et utilisés en synergie avec ces méthodes (s'il est démontré que leur utilisation combinée est possible et efficace), et permettre de réduire l'utilisation des insecticides dans la lutte contre les moustiques vecteurs. Par ailleurs, la résistance aux insecticides favorise les moustiques porteurs dans un contexte de haute pression sélective : des modèles ont en effet démontré que leur fitness était six fois supérieure à celle des moustiques sensibles (Read et al. 2009). Cependant, les allèles de résistance aux insecticides tels que l'allèle *kdr* sont coûteux et ont montré un coût sur la fitness des moustiques lorsque la pression de sélection par l'insecticide est réduite (Brito et al. 2013, Diop et al. 2015,

Alout et al. 2016). Par conséquent, une réduction des doses d'insecticides utilisés induirait un désavantage sélectif pour les moustiques porteurs d'allèles de résistance, et pourrait potentiellement permettre, à terme, de contre-sélectionner ces allèles. Des études sont désormais nécessaires afin de déterminer si le coût des mutations sur la fitness est suffisamment élevé pour permettre de faire reculer les populations résistantes, et donc le retour progressif de la sensibilité aux insecticides dans les populations de vecteurs.

La LLAI offre donc un nouveau paradigme qu'il est intéressant d'exploiter. Nos données montrent à la fois que cette stratégie est cohérente, mais aussi que les répulsifs pourraient en faire partie intégrante. Un des aspects à prendre en compte lors du développement de nouvelles méthodes est la conséquence à long terme sur les populations de vecteurs et de parasites. Or, dans le cas de la LLAI, un risque serait que les pathogènes finissent par s'adapter et développent des EIPs plus courts (Billingsley 2009). Par conséquent, pour atteindre les objectifs de la LLAI, il est nécessaire de mieux caractériser, grâce à des modèles prédictifs, la pression de sélection induite sur les parasites et les conséquences à long terme de cette méthode de lutte.

2. Efficacité à long-terme des outils de lutte antivectorielle

Lors de l'évaluation de l'efficacité des outils de lutte antivectorielle, les paramètres mesurés sur les moustiques sont souvent le taux de gorgement et la mortalité immédiate ou à 24h, qui sont relatifs à l'efficacité instantanée. Ces paramètres sont nécessaires puisqu'ils permettent de déterminer si l'outil est efficace pour protéger des piqûres infectieuses. Cependant, les effets à long-terme qui découlent d'une exposition aux produits de lutte sont rarement pris en compte, alors qu'ils sont également d'un intérêt capital. En effet, même si un moustique exposé n'est pas directement affecté, il peut subir des effets retardés des conséquences de l'exposition et des coûts liés à la détoxification du composé. Par ailleurs, le DEET et les pyréthriinoïdes sont connus pour induire un effet toxique sur les moustiques (Licciardi et al. 2006, Chareonviriyaphap et al. 2013), qui pourrait donc se poursuivre bien après l'exposition. Dans ce sens, notre étude a mesuré, chez *An. gambiae*, l'impact d'une pré-exposition au DEET et à la perméthrine sur leur efficacité à inhiber le gorgement lors de l'exposition suivante, mais également la capacité de ces composés à provoquer des effets retardés sur la fécondité, la fertilité et la survie.

A. Perméthrine

a. Protection contre les piqûres après pré-exposition

Nos résultats indiquent que, selon notre protocole expérimental et en utilisant une dose recommandée en imprégnation de moustiquaires conventionnelles (Strode et al. 2014), l'efficacité de la perméthrine à empêcher une piqûre est annulée si les femelles ont déjà obtenu un repas de sang en présence de ce composé (Tableau 3). Les contrôles que nous avons effectués sur la descendance et la taille des ailes démontrent que ces résultats ne sont pas dus à une sélection des femelles les plus résistantes à la perméthrine, que ce soit au niveau de la taille ou au niveau génétique. Nos résultats peuvent s'expliquer par les hypothèses suivantes :

- La première exposition a pu induire la production d'enzymes de détoxification, ce qui aurait protégé les moustiques lors de l'exposition suivante (Vatandoost 1999).
- La première exposition a pu altérer le système sensoriel des moustiques, réduisant la détection de la perméthrine à la seconde exposition.
- Un repas de sang réussi lors de la première exposition a pu engendrer des mécanismes d'apprentissage, réduisant le comportement d'évitement à l'exposition suivante.
- La première exposition a pu induire la sélection de femelles insensibles à la perméthrine, sur la base de caractéristiques non génétiques. Dans cette étude, nous avons mesuré la taille des ailes comme possible facteur discriminant car celle-ci a démontré influencer la susceptibilité aux insecticides (Owusu et al. 2017). Cependant, il peut en exister d'autres que nous n'avons pas mesurés comme par exemple, le statut d'insémination, ou encore l'état de satiété. Ces effets non génétiques sont susceptibles de moduler la sensibilité aux insecticides au sein d'un groupe de moustiques.

Ces résultats laissent penser, d'une manière préoccupante, que la perméthrine serait moins efficace à la suite d'expositions multiples chez les individus porteurs d'allèles de résistance aux pyréthrinoïdes. La dose de perméthrine utilisée dans cette expérience, bien que correspondant aux doses recommandées pour l'imprégnation de moustiquaires conventionnelles, est toutefois inférieure à la concentration actuellement utilisée pour l'imprégnation de moustiquaires à longue durée d'efficacité (elle est deux fois plus faible que la concentration utilisée sur les moustiquaires Olyset®). Des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer les effets

d'expositions multiples en conditions naturelles, en considérant d'autres types de résistances aux insecticides et les doses d'insecticides utilisées dans les moustiquaires à longue durée d'efficacité.

	<i>Conséquence sur l'efficacité</i>	
	Expérience	Effets retardés
Perméthrine	-	0

Tableau 3 : Effet des deux expositions à la perméthrine sur son efficacité à inhiber le gorgement, et à provoquer des effets retardés sur les femelles *An. gambiae*. 0 : aucun impact ; - : impact négatif sur l'efficacité.

b. Contrôle des populations

Plusieurs travaux suggèrent que les pyréthrinoïdes continuent à être efficaces contre les populations résistantes, à la fois car les individus sont moins irrités et passent donc plus de temps en contact avec le composé (Chandre et al. 2000), et car les moustiques subiraient une mortalité retardée à la suite de l'exposition (Viana et al. 2016). Ici, nos résultats indiquent que deux expositions successives à la perméthrine n'ont pas affecté l'activité, la fécondité, la fertilité, ni la survie des femelles (Tableau 4). Néanmoins, la dose que nous avons utilisée induit un effet irritant chez les moustiques, et nous nous serions donc attendus à observer des effets négatifs de l'exposition à la perméthrine sur les traits d'histoire de vie. Qui plus est, notre population n'est pas porteuse d'une résistance métabolique, et ne devrait donc pas présenter une détoxification accrue des insecticides. Les auteurs ayant observé de la mortalité retardée à la suite d'exposition aux pyréthrinoïdes ont travaillé sur une colonie présentant une résistance aux quatre classes d'insecticides (Viana et al. 2016). Dans notre étude, les moustiques sont porteurs d'une mutation qui confère une résistance à deux classes, les pyréthrinoïdes et les organochlorés. De plus, la précédente étude a travaillé avec de la deltaméthrine alors que nous avons travaillé avec de la perméthrine. Il est possible que les différences dans les résultats aient été occasionnées par des interactions entre le coût des mécanismes de résistances et le mode d'action des insecticides. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux appréhender l'effet d'exposition multiples aux insecticides sur les traits d'histoire de vie des moustiques vecteurs porteurs d'allèles de résistances, dans des conditions

naturelles. D'un point de vue évolutif, ceci pourrait laisser suggérer que la mutation *kdr* confère une protection contre la perméthrine, à la fois lors du contact mais aussi après exposition. Encore ici, ces résultats sont inquiétants puisqu'ils signifient que l'efficacité de l'insecticide à protéger contre les piqûres infectieuses est compromise (A.a.), et qu'elle n'est pas contrebalancée par la mortalité retardée.

Perméthrine	<i>Activité</i>	<i>Fécondité</i>	<i>Fertilité</i>	<i>Survie</i>
Expo 1	0	0	0	0
Expo 2	0	0	0	0

Tableau 4 : Effet des deux expositions à la perméthrine sur les traits d'histoire de vie des femelles *An. gambiae*. 0 : aucun impact.

B. DEET

a. Protection contre les piqûres après pré-exposition

Nos résultats indiquent qu'un repas de sang obtenu en présence de DEET n'affecte pas l'efficacité de ce composé lors de l'exposition suivante (Tableau 5). Etant donné que le DEET impacte la fitness des femelles, nous nous attendions à ce que celles-ci refusent de prendre un second repas de sang en présence de DEET. Ces résultats contrastent également avec des études précédentes qui laissaient suggérer que l'efficacité du DEET pourrait diminuer à la suite de mécanismes d'apprentissage (Stanczyk et al. 2013, Vinauger et al. 2014). Les hypothèses qui peuvent expliquer nos résultats sont les suivantes :

- Pas de mise en place de mécanismes d'apprentissage. Ceci pourrait être dû à une interaction entre le renforcement positif obtenu avec le repas de sang, et le renforcement négatif associé à l'effet toxique du DEET pendant et après le contact.
- Mise en place de mécanismes d'apprentissage mais qui ne persistent pas au-delà de trois jours.

Il est important de souligner que notre protocole diffère des études précédentes où les auteurs ont observé une diminution dans l'efficacité du DEET après une pré-exposition (Stanczyk et al. 2013, Vinauger et al. 2014). Dans l'une des études, les moustiques sont soumis à un entraînement afin qu'ils associent le DEET avec l'obtention d'un repas de sang à la suite d'expositions répétées (Vinauger et al. 2014). Dans l'autre, les moustiques pré-exposés au DEET sont testés trois heures après la première exposition (Stanczyk et al. 2013). Le protocole que nous avons utilisé n'est pas un protocole d'apprentissage, mais un protocole permettant d'évaluer l'effet de l'expérience passée du moustique sur son comportement et sur l'efficacité des méthodes de lutte, en considérant une période biologique entre les deux repas et en respectant donc les cycles gonotrophiques des femelles. Les différences dans le protocole ont donc pu occasionner les divergences observées dans les résultats. Encore ici, ces résultats nécessitent d'être confirmés lors d'expériences se rapprochant au mieux des conditions naturelles. Dans cette étude, le DEET reste efficace lors d'expositions multiples, ce qui renforce son potentiel d'utilisation dans la lutte antivectorielle.

<i>Méthode de contrôle</i>	<i>Conséquence sur l'efficacité</i>	
	Expérience	Effets retardés
DEET	0	+

Tableau 5 : Effet des deux expositions au DEET sur son efficacité à inhiber le gorgement, et à provoquer des effets retardés sur les femelles *An. gambiae*. 0 : aucun impact ; + : impact positif sur l'efficacité.

b. Contrôle des populations

Le DEET a démontré qu'il pouvait occasionner des effets neurotoxiques sur les insectes (Corbel et al. 2009). Toutefois, l'effet « insecticide » qu'il induit n'est pas puissant, et de fortes doses sont nécessaires pour induire de la mortalité (Licciardi et al. 2006, Pridgeon et al. 2009). Dans ce sens, nous ne nous attendions pas à observer des effets négatifs sur la fitness à la suite d'une exposition au DEET, d'autant que la concentration utilisée dans notre étude est dix fois inférieure à la concentration recommandée en application cutanée (EPA. 2010). Dans notre étude, des effets négatifs sur les traits d'histoire de vie ont été observés pendant et après la deuxième exposition, et sont attribuables à la première exposition que les moustiques ont reçue. En effet, les moustiques

pré-exposés au DEET présentent, indépendamment de la seconde exposition, une diminution dans la fécondité et dans la fertilité, ainsi qu'une activité accrue lors du gorgement (Tableau 6). Une hypothèse pouvant expliquer ces observations peut être un coût métabolique lié à une détoxification du DEET. L'énergie nécessaire à la détoxification serait dépensée au détriment de la fécondité. Il est toutefois important de noter que, dans la première étude (Chapitre I), nous avons observé une diminution du nombre d'œufs pondus après une première exposition au DEET, alors que cette diminution n'est pas observée dans l'étude suivante (Chapitre II). Dans ces études, les protocoles sont identiques en ce qui concerne la souche de moustiques, leur âge, et la concentration de répulsif. Ces divergences démontrent que le mode d'action du DEET sur les insectes est complexe et peut être modulé par des variables environnementales. En effet, les deux expériences ont été effectuées à deux périodes différentes de l'année. Alors que la température du laboratoire est contrôlée, des variations dans l'humidité ont pu avoir eu lieu et occasionner ces différences. Il est d'ailleurs admis que des conditions faibles d'humidité peuvent affecter négativement la fitness des femelles adultes (Almeida Costa et al. 2010, Yamana and Eltahir 2013), ce qui a pu interagir avec leur susceptibilité au DEET. De même, les différences dans les conditions environnementales ont pu altérer la volatilité du DEET (et donc sa concentration au contact du moustique), ou encore sa pénétration au travers de la cuticule des femelles. Les résultats de cette étude confirment toutefois que le DEET présente un effet insecticide, ce qui renforce son potentiel d'utilisation dans la lutte contre les nuisances occasionnées par les moustiques.

DEET	<i>Activité</i>	<i>Fécondité</i>	<i>Fertilité</i>	<i>Survie</i>
Expo 1	0	- /0	0	0
Expo 2	-	-	-	0

Tableau 6 : Effet des deux expositions au DEET sur les traits d'histoire de vie des femelles *An. gambiae*.

0 : aucun impact ; - : impact négatif.

C. Bilan DEET / Perméthrine

Dans la présente étude, l'objectif était de déterminer si des composés de nature et mode d'action différents (répulsif *versus* insecticide) conduisent à des effets similaires sur les moustiques, en utilisant deux protocoles rigoureusement identiques. Les résultats que nous observons sont contraires pour les deux composés : un repas de sang obtenu en présence de DEET n'affecte pas l'efficacité du répulsif à l'exposition suivante, et le DEET induit des effets toxiques sur le long terme sur les moustiques. Pour ce qui est de la perméthrine, un repas de sang précédemment obtenu en présence du composé a annulé l'efficacité de ce composé à l'exposition suivante, et la perméthrine n'a pas affecté les traits d'histoire de vie des moustiques sur le long terme aux doses et dans les conditions testées. La différence observée dans la réponse comportementale à chacun des composés après pré-exposition pourrait être expliquée par des différences dans leur mode d'action et dans leur détection par le système sensoriel des moustiques.

Le mode de détection des pyréthriinoïdes par le système sensoriel des insectes reste très peu connu. Cependant, de par leur action anti-appétante et irritante, il semble qu'ils soient au moins détectés par les récepteurs gustatifs des insectes. Les pyréthriinoïdes ne sont pas considérés comme des composés volatils, et leur détection à longue distance par des récepteurs olfactifs n'a jamais été mise en évidence. Dans notre étude, le fait que les effets de la perméthrine soient différents entre la première et la deuxième exposition suggère un effet direct de la première exposition. La modification comportementale observée à la suite de la première exposition pourrait être liée au système gustatif des moustiques : elle pourrait être attribuée à un effet négatif de la perméthrine sur les récepteurs gustatifs, qui aurait altéré la détection à la seconde exposition, ou encore à un apprentissage qui implique le système gustatif. Le DEET, quant à lui, est détecté à la fois par les récepteurs olfactifs et gustatifs des moustiques. Le comportement observé, qui peut être aussi bien une absence d'apprentissage qu'un apprentissage qui n'a pas perduré ou que nous n'avons pas pu mettre en évidence, implique donc ici les récepteurs olfactifs et gustatifs. Les effets observés pourraient donc résulter d'une interaction entre les stimulations olfactives et gustatives durant le contact avec le DEET. Au niveau du système nerveux, les pyréthriinoïdes agissent sur les canaux sodiques (Soderlund and Bloomquist 1989) alors que le DEET perturbe l'activité des acétylcholinestérases (Corbel et al. 2009). La colonie étudiée est porteuse d'une mutation qui

affecte les canaux sodiques, mais pas les acétylcholinestérases. Les résultats observés peuvent donc également avoir pour origine les modes d'action très différents de ces composés.

En 2012, l'OMS publiait le « Global plan for insecticide resistance management », qui visait à développer des stratégies pour faire face à l'expansion des mécanismes de résistance aux insecticides dans les populations de moustiques. Les options proposées dans ce rapport sont clairement limitées, car l'objectif principal reste d'atteindre une couverture universelle en ITNs (WHO 2012). La recommandation est donc d'agir comme si la résistance n'impactait pas la transmission, et de combiner l'IRS aux ITNs dans les zones où des hauts niveaux de résistances sont observés. Cependant, alors que la conjugaison ITNs - IRS a montré un effet positif dans certains cas (West et al. 2014), plusieurs études n'ont observé aucun bénéfice dans la réduction du paludisme (Corbel et al. 2012, Pinder et al. 2015). Comme mentionné précédemment, les insecticides sont donc toujours considérés comme la seule alternative à eux-mêmes, et la lutte antivectorielle repose presque uniquement sur l'IRS et les ITNs. Nos résultats sont donc très préoccupants au vu de ces recommandations, puisqu'ils pourraient laisser supposer que certains mécanismes, en plus de la résistance aux insecticides, limiteraient l'efficacité des moustiquaires imprégnées de perméthrine pour protéger les populations contre les piqûres de moustiques. Nos résultats indiquent donc que, pour les deux paramètres mesurés, le DEET offre un avantage en complément aux insecticides : son efficacité n'est pas altérée contre les moustiques ayant déjà été exposés, et il impose un impact à long terme en réduisant la fitness des moustiques. Ces expériences nécessitent d'être confirmées lors d'expérimentations de terrain, avec des populations sauvages et des doses correspondant aux recommandations actuelles pour l'imprégnation longue durée. De plus, ces observations mettent en avant que le mode d'action de ces composés sur le système sensoriel des moustiques, à la fois olfactif et gustatif, reste trop mal connu, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats.

3. Défis techniques liés à l'imprégnation de moustiquaires avec du répulsif

Les répulsifs offrent un potentiel d'utilisation dans la lutte antivectorielle ; lorsqu'imprégnés sur des moustiquaires, ils pourraient permettre de restaurer l'efficacité des ITNs pour protéger les populations contre les piqûres d'insectes nocturnes, en complétant ou en remplaçant les

insecticides. De plus, le coût économique pour l'utilisateur serait réduit en comparaison avec l'application de répulsif sur la peau, qui reste onéreuse. Les moustiquaires imprégnées de répulsifs tels que le DEET et l'IR3535 ont permis de réduire le gorgement d'*An. gambiae* d'environ 60 % en cas expérimentales, et d'induire une mortalité de 70 %, et ce durant six semaines (N'Guessan et al. 2006). Lorsqu'utilisés en bi-imprégnation avec des insecticides, les répulsifs DEET et KBR3023 couplés à un insecticide organophosphoré ont permis d'induire une mortalité de 95 % pendant plus de quatre mois chez *An. gambiae* (Pennetier et al. 2007). Lorsque les répulsifs sont appliqués sur une moustiquaire, ils sont absorbés dans les fibres et libérés progressivement, ce qui augmente la durée de protection en comparaison avec une application cutanée (N'Guessan et al. 2006). Cependant, bien que les résultats soient prometteurs, la durée d'efficacité n'est encore pas suffisante : une durée d'efficacité de quelques semaines ou quelques mois sous-entend que la moustiquaire doit être ré-imprégnée régulièrement, ce qui représente une contrainte pour l'utilisateur. A titre de comparaison, la durée d'efficacité des moustiquaires traitées de pyréthriinoïdes est d'au moins trois ans (WHO 2007). Le principal défi technique dans la mise en place de moustiquaires imprégnées par des répulsifs est donc la volatilité de ces derniers. En effet, même si les répulsifs chimiques tels que le DEET, l'IR3535 et le KBR 3023 ont un point d'ébullition élevé et sont beaucoup moins volatils que les composés issus d'huiles essentielles comme la citronnelle, ils restent plus volatils que les insecticides et ont donc une durée de vie sur moustiquaire relativement courte.

La technologie de la microencapsulation pourrait permettre d'atteindre les objectifs d'efficacité des moustiquaires imprégnées de répulsifs. Dans cette technologie, l'ingrédient actif est enfermé dans une capsule de polymère et libéré graduellement. Une formulation microencapsulée de DEET a été développée il y a plusieurs années, et des essais de laboratoires ont démontré que le DEET microencapsulé permet d'inhiber de 80 % le gorgement d'*An. gambiae* juste après imprégnation, et atteint un pic d'efficacité autour de 100 % entre trois et six mois après l'imprégnation. En comparaison, le DEET non encapsulé a une efficacité immédiate de 100 % mais celle-ci diminue graduellement jusqu'à atteindre 0 % entre trois et six mois après imprégnation (N'Guessan et al. 2007). En plus de l'effet répulsif, les microcapsules de répulsif peuvent adhérer au tarse des moustiques et induire une toxicité (N'Guessan et al. 2007). Dans des conditions de test similaires, l'effet protecteur du DEET microencapsulé contre les piqûres d'*Anopheles* est supérieur à celui de la perméthrine (Corbel et al. 2004). Le DEET microencapsulé a également démontré une efficacité

lorsqu'utilisé en IRS contre *An. arabiensis* et *C. quinquefasciatus* (Kitau et al. 2014), et son utilisation pourrait être élargie à l'imprégnation de vêtements et couvertures.

Cette méthode soulève néanmoins des défis supplémentaires. Premièrement, ce système ne résiste pas au lavage de la moustiquaire (N'Guessan et al. 2007), et la prochaine étape dans la mise en place d'une microencapsulation consiste donc à la rendre résistante aux lavages. Ensuite, il est nécessaire d'évaluer le coût des moustiquaires imprégnées de répulsif microencapsulé, et leur accessibilité pour les populations qui en ont le plus besoin. Enfin, des études de toxicité sur l'Homme devront être réalisées afin d'évaluer l'impact d'une exposition à long terme aux vapeurs du DEET ou d'autres répulsifs sur la santé humaine.

4. Limites méthodologiques

Cette thèse a eu pour objectif de mettre en place des protocoles reproductibles afin d'évaluer l'efficacité des principales méthodes de lutte contre les moustiques vecteurs, selon différents paramètres physiologiques. Cependant, elle se heurte à certaines limites méthodologiques qui rendent difficile l'extrapolation de ces résultats à des conditions naturelles. Premièrement, nous avons travaillé avec une souche de moustiques de laboratoire. L'intérêt d'utiliser des colonies de laboratoires est qu'il est possible de contrôler toutes les conditions expérimentales: état physiologique des moustiques, température, humidité, qualité du sang, etc. Ceci permet de minimiser la variabilité afin de se concentrer sur un seul facteur, qu'il est trop difficile d'observer en conditions naturelles où les effets confondants sont nombreux. Ce type de sélection et conditionnement a cependant très certainement modifié l'expression des gènes impliqués dans l'olfaction, ainsi que le comportement de recherche d'hôte. Qui plus est, ces moustiques sont exclusivement nourris sur sang de lapin (colonie de l'IRD Montpellier) ou cobaye (colonie de l'IPR Bouaké, Côte d'Ivoire). Or, chez *An. gambiae*, seulement quelques générations sont nécessaires pour modifier les préférences d'hôtes d'une forte préférence à l'homme à une préférence pour le bétail (Gillies 1964). Les résultats observés avec des souches de laboratoires sont donc difficilement extrapolables à des populations de terrain, qui sont, elles, hautement anthropophiles et soumises à des stimuli beaucoup plus nombreux et variés. De même, en raison des conditions d'élevage, les insectes de laboratoire présentent un microbiote très différent de celui des insectes sauvages (Xiang et al. 2006, Rani et al. 2009, Belda et al. 2011) alors que celui-ci a été démontré

comme facteur déterminant dans le comportement et la susceptibilité à l'infection chez les insectes (Weiss and Aksoy 2011, Boissière et al. 2012, Minard et al. 2013, Archie and Tung 2015).

Ensuite, dans l'étude sur l'effet de l'expérience et l'effet de l'âge, nous avons utilisé la chaleur comme stimulus attractif, et exclu les odeurs de vertébrés. Or, ces odeurs peuvent interagir aussi bien avec l'efficacité des composés chimiques qu'avec la mise en place d'un mécanisme d'apprentissage. Dans le même sens, lors de notre étude sur l'effet de l'expérience, nous n'avons pas séparé la partie olfactive de la partie gustative. De ce fait, nous ne pouvons conclure sur les mécanismes sous-jacents éventuels impliqués dans les modifications comportementales. Il serait intéressant de séparer la partie olfactive et gustative lors d'expériences ultérieures afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine du comportement observé.

Enfin, dans l'étude de l'infection, le nombre de réplicats est faible et la variabilité élevée, et les résultats sont donc à considérer avec prudence.

Nos résultats représentent donc un point de départ quant à l'évaluation des effets de l'état physiologique du moustique sur l'efficacité des méthodes de lutte, mais ils nécessitent d'être confirmés dans des conditions plus représentatives du milieu naturel, avec des populations sauvages et des doses correspondant à celles actuellement utilisées dans les imprégnations de moustiquaires à longue durée d'efficacité. Des expériences complémentaires ont été réalisées, ou sont actuellement en cours, afin de confirmer et étayer nos observations, et donc de mieux appréhender l'ensemble de ces résultats.

5. Expériences complémentaires

A. Comprendre le mode d'action du DEET

Comme nous l'avons vu précédemment, le mode d'action du DEET reste source des débats, et l'interaction entre le DEET et les COVs de la peau mal connue. Une étude a observé que la quantité de COVs libérée par la peau diminue lorsque du DEET est présent sur celle-ci. Le même phénomène a été rapporté lorsqu'un COV caractéristique de l'odeur de peau est disposé sur un papier buvard : si du DEET est ajouté sur ce papier, l'émission du composé d'odeur de peau diminue (Syed and Leal 2008). Cependant, d'autres auteurs ont réalisé la même expérience et n'ont

pas rapporté ce phénomène (Pellegrino et al. 2011). A la Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie (PACE) du CEFÉ-CNRS de Montpellier, nous disposons du matériel nécessaire pour effectuer des analyses d'odeurs, et nous avons réalisé fréquemment, au cours d'autres projets, des captures d'odeurs de peau humaine. Dans le but de comprendre l'interaction entre le DEET et l'émission des composés organiques volatils de la peau, nous sommes donc actuellement en train d'effectuer des mesures d'odeurs de peau après application de DEET, pour les comparer avec les émanations en l'absence de DEET. Nous avons pour le moment effectué les mesures sur deux participants, et observé que l'émission des composés de la peau semble en effet réduite lorsque du DEET est présent. Les résultats préliminaires sont présentés Figure 8. La suite de l'étude consistera à déterminer si ce phénomène n'est pas dû à une saturation du matériel de capture par le DEET, qui empêcherait de capter les autres molécules. A terme, ces résultats devraient permettre de confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle le DEET bloque ou gêne l'émission des composés de la peau.

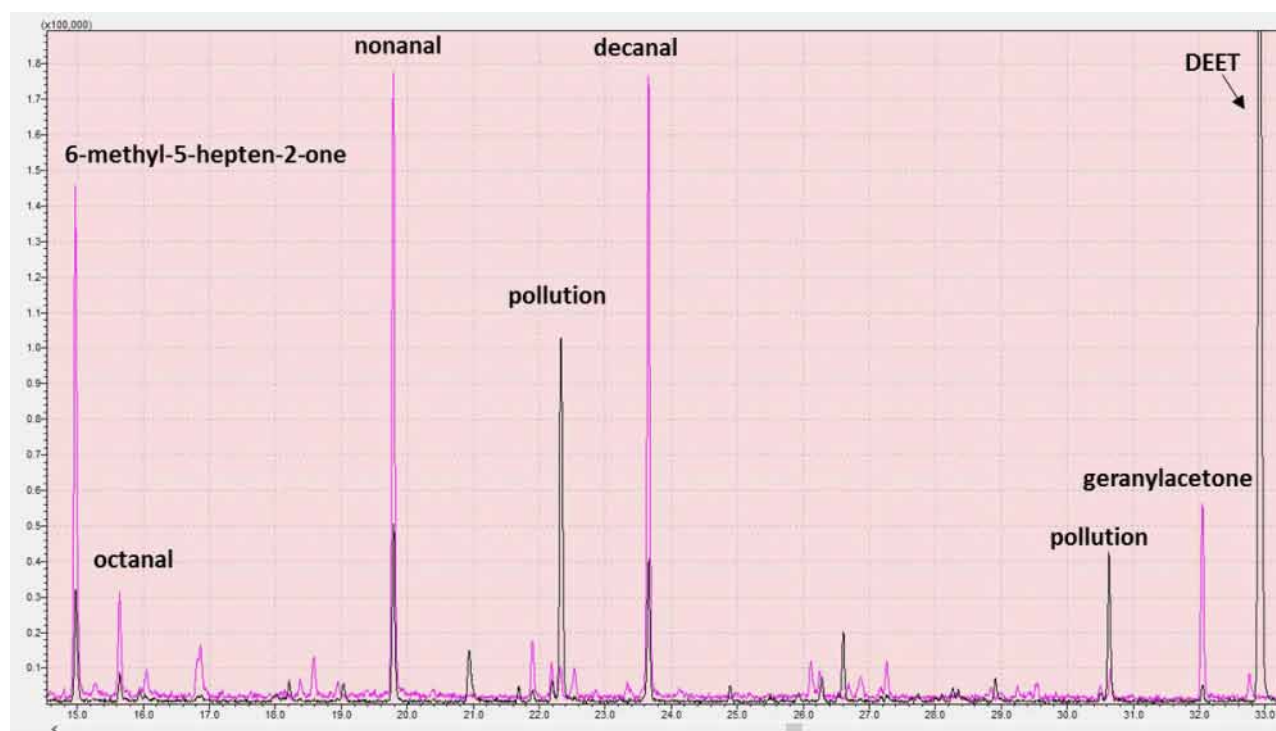


Figure 8 : chromatogramme représentant l'émission de composés volatils d'un bras en l'absence de DEET (rose) et en présence de DEET (noir). Chaque pic correspond à une molécule composant le bouquet odorant. La quantité de chaque molécule est déterminée par le nombre d'ions venant frapper le détecteur.

B. Comprendre l'effet de l'âge sur la détection des odeurs et des répulsifs

La suite de l'étude sur l'effet de l'âge sur l'efficacité des répulsifs vise à déterminer dans quelle mesure l'âge affecte la détection des répulsifs, et, plus largement, des composés caractéristiques de l'odeur de peau des hôtes. Avec cette volonté, nous avons réalisé des analyses d'électroantennographie (EAG) afin de comparer les réponses globales des antennes de moustiques au DEET entre les différentes classes d'âges. Nous nous sommes cependant heurtés à une difficulté : nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de réponse au DEET chez *An. gambiae*, et ce chez aucune classe d'âge considérée, alors que nous avons testé une large gamme de concentrations, allant de 10^{-5} à 1 molaire. Les auteurs qui ont mis en évidence des sensilles et neurones répondant au DEET chez les moustiques adultes ont travaillé sur les genres *Aedes* et *Culex* (Boeckh et al. 1996, Syed and Leal 2008, Xu et al. 2014). A ce jour, une seule étude a réussi à mettre en évidence des réponses EAG au DEET chez *Anopheles* (Costantini et al. 2001). Il est possible que le mode de détection du DEET soit différent entre le genre *Anopheles* et les genres *Aedes* et *Culex* et qu'il n'implique pas une détection olfactive directe. La suite de ce projet sera donc d'essayer de mettre en évidence la détection du DEET lors d'expériences d'électrophysiologie plus poussées, en utilisant la technique de single-sensillum recording (SSR), et de comparer la détection de composés caractéristiques de l'odeur de peau humaine, en EAG ou SSR, entre les différentes classes d'âges.

C. Comprendre l'effet de l'infection sur la détection des odeurs et des répulsifs

Plusieurs études ont mis en évidence des modifications comportementales chez les femelles *Anopheles* infectées par *Plasmodium*, dans un sens qui augmente la transmission du parasite. Cependant, la détection des composés caractéristiques d'odeurs de peau des hôtes et des répulsifs ou insecticides n'a jamais été évaluée chez les moustiques infectieux. Durant ce projet, nous avons commencé à comparer la réponse EAG à différents composés entre des moustiques sains et infectés par *P. falciparum* à différents stades de développement du parasite, en Côte d'Ivoire. La réponse au DEET a été mesurée et, comme avec la colonie de Montpellier, nous n'avons pas pu observer de réponse au DEET. Nous avons également mesuré la réponse à différents composés attractifs, soit de l'odeur humaine, soit de plantes, et nous n'avons pas observé de différences significatives selon le statut infectieux. La suite de l'expérience consistera à mesurer la réponse EAG sur un plus

large panel de composés, ainsi que de mesurer la réponse comportementale sur des moustiques testés individuellement.

D. Mettre en place un protocole d'apprentissage associatif et mesurer l'effet de l'infection sur l'apprentissage

Une expérience qui sera débutée prochainement consistera à mettre en place un protocole d'apprentissage associatif chez les moustiques. L'objectif de cette expérience est de poursuivre les travaux effectués par Lazzari, Vinauger et De Luca (Vinauger et al. 2014, De Luca and Lazzari 2017), dans lesquels ils ont pu mettre en évidence que les moustiques étaient capables d'associer la présence du DEET avec la possibilité d'obtenir un repas de sang, de sorte que l'aversion pour le DEET est annulée à la suite de l'apprentissage. Dans les mois qui viennent, nous mettrons en place le protocole d'apprentissage associatif, afin, par la suite, de mesurer les variables qui peuvent moduler cet apprentissage. Particulièrement, nous étudierons l'effet d'une infection par des arbovirus (virus de la dengue, du chikungunya), sur les capacités d'apprentissages des moustiques de l'espèce *Ae. albopictus*.

E. Déterminer l'effet des modifications physiologiques de l'hôte sur le comportement des moustiques

Dans cette étude nous nous sommes concentrés sur les facteurs physiologiques du moustique qui pouvaient faire varier l'efficacité des moyens de lutte, mais il existe tout autant de facteurs propres à l'hôte qui peuvent faire varier cette efficacité. Par exemple, il est admis que les personnes porteuses de formes infectieuses de *Plasmodium* sont plus attractives pour les moustiques vecteurs que leurs homologues non infectées ou infectées à un stade non infectieux. Une étude que nous avons effectuée en parallèle donne des pistes quant au mécanisme sous-jacent : il semblerait dû à une modification des odeurs corporelles. Nous avons en effet comparé les odeurs corporelles d'enfants sains et infectés par *P. falciparum* à différents stades développementaux, et nous avons observé que les enfants porteurs de formes infectieuses du parasite émettent des composés caractéristiques. Les résultats des captures d'odeurs sont surprenants dans le sens où nous avons trouvé que les personnes infectées émettent des composés caractéristiques des plantes, qui ne sont normalement pas synthétisés par le corps humain (Article « Human skin odors associated with transmission stages of malaria parasites », Annexe 1). Des analyses supplémentaires plus poussées

sont donc en cours pour confirmer ces résultats, ainsi que des tests de comportements. Ce projet a fait l'objet de mon travail de seconde année de master, et une publication est actuellement en cours. L'article associé est introduit en annexe 1. Ce travail rejoint l'étude décrite en 5D, qui vise à comprendre l'effet d'une infection sur l'épidémiologie des pathogènes et l'efficacité des moyens de lutte, en considérant à la fois les hôtes et les vecteurs.

6. Limite d'utilisation des répulsifs

Bien que les répulsifs présentent un potentiel dans la lutte antivectorielle, ces composés ne doivent pas faire l'objet d'une utilisation massive, mais plutôt d'un usage ciblé. En effet, il est difficile d'évaluer quels seront les impacts d'une utilisation trop importante de répulsifs.

Les principales limites des répulsifs et particulièrement du DEET sont les suivantes :

- Le coût des répulsifs est assez élevé et ils ont donc, pour l'instant, un usage limité dans les pays en voie de développement.
- Dans les zones à forte couverture en répulsifs, ceux-ci pourraient détourner les moustiques vers les populations ne pouvant pas se l'offrir, renforçant encore plus les inégalités sociales. Des études en conditions naturelles ont en effet démontré que l'utilisation de répulsifs autant sous la forme de spirales à brûler qu'en application cutanée détourne les moustiques vers les personnes qui ne les utilisent pas (Moore et al. 2007, Maia et al. 2016), multipliant dans certains cas par quatre le risque de piqûres (Maia et al. 2013).
- Les populations de moustiques peuvent développer des mécanismes d'habituation ou d'apprentissage face aux répulsifs, qui pourraient impacter l'efficacité de ces derniers. En effet, des observations ont démontré que des larves de moustiques élevées dans de l'eau contenant du répulsif sont plus à même de pondre dans ce type d'eau, ce qui montre bien qu'il peut y avoir un effet d'habituation (McCall and Eaton 2001, Ruktanonchai et al. 2015).
- Les répulsifs pourraient pousser les moustiques à se tourner vers d'autres hôtes. En effet, un modèle a déjà démontré que les ITNs ont favorisé des préférences pour le bétail (Stone and Gross 2018). Ces changements de préférence pourraient à terme induire une augmentation des maladies zoonotiques.

- Les répulsifs sont susceptibles d'induire une contamination de l'environnement. Le DEET a été retrouvé dans de nombreux environnements aquatiques, parfois en quantités extrêmement élevées (Costanzo et al. 2007, Dsikowitzky et al. 2014, Sorensen et al. 2015). Même s'il présente une biodégradation modérée à rapide et une bioaccumulation faible (Weeks et al. 2011), son impact sur les communautés aquatiques est largement méconnu. Certains auteurs ont observé un impact sur les insectes non ciblés (Campos et al. 2016), mais d'autres n'ont pas observé d'effet sur les invertébrés aquatiques (Xue et al. 2000). Les effets négatifs que nous avons observés sur la fitness à la suite d'expositions multiples pourraient aussi affecter les insectes non ciblés.
- Un risque sur la santé humaine. Le DEET présente une toxicité faible, et les principaux effets adverses démontrés sont des allergies et réactions cutanées (Osimitz et al. 2010). Cependant, des cas de troubles neurologiques après exposition au DEET ont été démontrés, particulièrement sur les enfants (Osimitz et al. 2010). Des atteintes neurologiques ont également été observées chez les rats exposés au DEET (Del-Rahman et al. 2010). Ceci signifie que le DEET peut passer la barrière hémato-encéphalique et atteindre le système nerveux central (Legeay et al. 2018). Le risque au long-terme sur la santé résultant d'un usage répété du DEET étant mal connu, son utilisation peut s'en trouver limitée et difficilement acceptée par une partie des populations.
- Les répulsifs pourraient induire une sélection génétique pour l'insensibilité. Des expériences en laboratoire ont pu mettre en évidence ce phénomène (Stanczyk et al. 2010). Bien qu'il semble peu probable qu'une sélection soit observé sur le terrain, ce risque est à considérer.

7. Ouverture

Les approches méthodologiques développées ici constituent une première étape dans la mise en œuvre de méthodes de lutte ciblées contre les moustiques les plus à même de transmettre des pathogènes. Ces résultats pourraient aider à redéfinir les priorités dans la lutte contre les vecteurs afin de réduire l'apparition de résistances, tout en protégeant efficacement contre les maladies.

Le taux de contacts entre un hôte et un vecteur a toujours été considéré comme un déterminant crucial de la transmission de pathogènes. Dans ce sens, les répulsifs présentent un réel potentiel d'utilisation pour limiter ces contacts. Comme nous l'avons vu, les répulsifs ne peuvent cependant pas être utilisés seuls mais doivent faire partie de programmes plus vastes de lutte intégrée, qui permettent à la fois de repousser les moustiques et de réduire leurs populations. Afin d'être efficaces, les objectifs de lutte doivent être basés sur une alternance d'outils biologiques, physiques et chimiques, afin de limiter l'utilisation de produits insecticides. En effet, un outil de lutte ne pourra jamais être utilisé seul : les populations de moustiques finissent toujours par développer des mécanismes d'habituation, d'apprentissage, et de résistances.

Toutefois, il est important de mentionner que les stratégies ciblées devraient être précédées de méthodes parallèles pour protéger les populations humaines, simples, abordables, et applicables dans les pays en voie de développement. Par exemple, avant de mettre en place des stratégies complexes alliant produits chimiques et biologiques, le premier obstacle à franchir devrait être de protéger les populations à l'intérieur même de leurs habitations. En effet, de nombreux auteurs ont mis au point des modifications simples et peu chères de celles-ci, qui permettraient de réduire durablement l'entrée des moustiques, mais qui restent malheureusement encore ignorées dans les stratégies de lutte (Lindsay et al. 2002, 2003, Atieli et al. 2009). Ces stratégies présenteraient un réel bénéfice direct à moindre coût, sans porter préjudice à l'environnement. Nos résultats appellent donc à continuellement repenser et améliorer les stratégies de lutte antivectorielle, ainsi qu'à mettre en place des programmes de lutte intégrés, multimodaux et durables.

Références bibliographiques

- Abd-ella, A., M. Stankiewicz, K. Mikulska, and W. Nowak. 2015.** The repellent DEET potentiates carbamate effects via insect muscarinic receptor interactions : an alternative strategy to control insect vector-borne diseases. *PLoS One*. 10: e0126406.
- Achee, N. L., M. J. Bangs, R. Farlow, G. F. Killeen, S. Lindsay, J. G. Logan, S. J. Moore, M. Rowland, K. Sweeney, S. J. Torr, L. J. Zwiebel, and J. P. Grieco. 2012.** Spatial repellents : from discovery and development to evidence-based validation. *Malar. J.* 11: 1–9.
- Acree, F., R. B. Turner, H. K. Gouck, and M. Beroza. 1968.** L-Lactid acid: a mosquito attractant isolated from humans. *Science* (80-.). 161: 1346–1347.
- Adams, B., and M. Boots. 2010.** How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue ? Insights from a mathematical model. *Epidemics*. 2: 1–10.
- Aïzoun, N., R. Aïkpon, R. Azondekon, A. Asidi, and M. Akogbéto. 2014.** Comparative susceptibility to permethrin of two *Anopheles gambiae s . l .* populations from Southern Benin, regarding mosquito sex, physiological status, and mosquito age. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4: 312–317.
- Aldridge, R. L., P. E. Kaufman, J. R. Bloomquist, S. A. Gezan, and K. J. Linthicum. 2017.** Application site and mosquito age influences malathion- and permethrin-induced mortality in *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). *J. Med. Entomol.* 54: 1692–1698.
- Almeida Costa, E., M. De Mendonça Santos, J. Cavalcanti Correia, and M. Ribeiro De Albuquerque. 2010.** Impact of small variations in temperature and humidity on the reproductive activity and survival of *Aedes aegypti* (Diptera , Culicidae). *Rev. Bras. Entomol.* 54: 488–493.
- Alout, H., R. K. Dabiré, L. S. Djogbéno, L. Abate, and V. Corbel. 2016.** Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* 6: 1–11.
- Alout, H., N. T. Ndam, M. M. Sandeu, I. Djégbé, F. Chandre, R. K. Dabiré, L. S. Djogbéno, V. Corbel, and A. Cohuet. 2013.** Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae s . s .* for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS One*. 8: e63849.
- Alout, H., B. Yameogo, L. S. Djogbéno, F. Chandre, R. K. Dabiré, V. Corbel, and A. Cohuet. 2014.** Interplay between *Plasmodium* infection and resistance to insecticides in vector mosquitoes. *J. Infect. Dis.* 210: 1464–70.
- Anderson, R. A., J. C. Koella, and H. Hurd. 1999.** The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc. R. Soc. B.* 266: 1729–1733.
- Ansell, J., K. A. Hamilton, M. Pindeti, G. E. L. Walraven, and S. W. Lindsay. 2002.** Short-range mosquitoes attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96: 113–116.
- ANSES. 2013.** Avis de l’Anses. Avis n° PB-12-00194. INSECT ECRAN ZONES INFESTEES. 1–20.
- ANSES, and Ministère de l’Environnement. 2018.** Simmbad: Inventaire Biocides. (<https://simmbad.fr/public/servlet/produitList.html>).

- Archie, E. A., and J. Tung. 2015.** Social behavior and the microbiome. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 6: 28–34.
- Arredondo-Jimenez, J. I., D. N. Bown, M. H. Rodriguez, C. Villarreal, E. G. Loyola, and C. E. Frederickson. 1992.** Tests for the existence of genetic determination or conditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 29: 894–897.
- Asidi, A., R. N. Guessan, M. Akogbeto, C. Curtis, and M. Rowland. 2012.** Loss of household protection from use of insecticide-treated nets against pyrethroid-resistant mosquitoes, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1101–1106.
- Atieli, H., D. Menya, A. Githeko, and T. Scott. 2009.** House design modifications reduce indoor resting malaria vector densities in rice irrigation scheme area in western Kenya. *Malar. J.* 8.
- Barbosa, S., K. Kay, N. Chitnis, and I. M. Hastings. 2018.** Modelling the impact of insecticide-based control interventions on the evolution of insecticide resistance and disease transmission. *Parasit. Vectors.* 11.
- Barnard, D. R. 1998.** Mediation of deet repellency in mosquitoes (Diptera : Culicidae) by species, age, and parity. *J. Med. Entomol.* 35: 340–343.
- Barofsky, J., C. Chase, T. Anekwe, and F. Farzadfar. 2010.** The economic effects of malaria eradication : Evidence from an intervention in Uganda. *Program on the Global Demography of Aging.*
- Beketov, M. A., B. J. Kefford, R. B. Schäfer, and M. Liess. 2013.** Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *PNAS.* 110: 11039–11043.
- Belda, E., L. Pedrola, J. Peretó, J. F. Martínez-Blanch, A. Montagud, E. Navarro, J. Urchueguía, D. Ramón, A. Moya, and M. Porcar. 2011.** Microbial diversity in the midguts of field and lab-reared populations of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *PLoS One.* 6: e21751.
- Benedict, M. Q., R. S. Levine, W. A. Hawley, and P. L. Loubinos. 2008.** Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 76–85.
- Berg, H. Van Den, G. Manuweera, and F. Konradsen. 2017.** Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector - borne diseases. *Malar. J.* 16.
- Billingsley, P. F. 2009.** Only the good die young: a novel paradigm for mosquito control. *Trends Parasitol.* 26: 53–55.
- Blanford, S., B. H. K. Chan, N. Jenkins, D. Sim, R. J. Turner, A. F. Read, and M. B. Thomas. 2005.** Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* (80-.). 308: 1638–1642.
- Boeckh, J., H. Breer, M. Geier, F. Hoever, B. Kriiger, G. Nentwig, and H. Sass. 1996.** Acylated 1, 3-aminopropanols as repellents against bloodsucking arthropods. *Pestic. Sci.* 48: 359–373.
- Bohbot, J. D., and J. C. Dickens. 2010.** Insect repellents : modulators of mosquito odorant receptor activity. *PLoS One.* 5: e12138.
- Boissière, A., M. T. Tchioffo, D. Bachar, L. Abate, A. Marie, S. E. Nsango, H. R. Shahbazkia, P. H. Awono-ambene, E. A. Levashina, R. Christen, and I. Morlais. 2012.** Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* 8: e1002742.

- Bosch, O. J., M. Geier, and J. Boeckh. 2000.** Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. *Chem. Senses*. 25: 323–330.
- Braks, M. A. ., J. Meijerink, and W. Takken. 2001.** The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and L -lactic acid, in an olfactometer. *Physiol. Entomol.* 26: 142–148.
- Briët, O. J. T., M. A. Penny, D. Hardy, T. S. Awolola, W. Van Bortel, V. Corbel, R. K. Dabiré, J. Etang, B. G. Koudou, P. K. Tungu, and N. Chitnis. 2013.** Effects of pyrethroid resistance on the cost effectiveness of a mass distribution of long- lasting insecticidal nets : a modelling study. *Malar. J.* 12: 1–12.
- Brito, L. P., J. G. B. Linss, T. N. Lima-camara, T. A. Belinato, A. A. Peixoto, B. P. Lima, D. Valle, and A. J. Martins. 2013.** Assessing the effects of *Aedes aegypti kdr* mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS One*. 8: e60878.
- Burlando, A. 2012.** The impact of malaria on education : Evidence from Ethiopia. University of Oregon. Oregon.
- Caminade, C., J. M. Medlock, E. Ducheyne, K. M. McIntyre, S. Leach, M. Baylis, and A. P. Morse. 2012.** Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* : recent trends and future scenarios. *J. R. Soc. Interface*.
- Caminade, C., J. Turner, S. Metelmann, J. C. Hesson, M. S. C. Blagrove, T. Solomon, A. P. Morse, and M. Baylis. 2017.** Global risk model for vector-borne transmission of Zika virus reveals the role of El Niño 2015. *PNAS*. 114: 119–124.
- Campos, D., C. Gravato, C. Quintaneiro, A. M. V. M. Soares, and J. L. T. Pestana. 2016.** Responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to DEET exposure. *Aquat. Toxicol.* 172: 80–85.
- Capelli, G., A. Drago, S. Martini, F. Montarsi, M. Soppelsa, N. Delai, S. Ravagnan, L. Mazzon, F. Schaffner, A. Mathis, M. Di Luca, R. Romi, and F. Russo. 2011.** First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes (Finlaya) koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae. *Parasit. Vectors*. 4: 188.
- Cardé, R., and G. Gibson. 2010.** Host finding by female mosquitoes: mechanisms of orientation to host odours and other cues. *In* Takken, W., Knols, B. (eds.), *Olfaction Vector-Host Interact.* Wageningen Academic, Wageningen.
- Carnevale, P., and V. Robert. 2009.** Les anophèles: biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle, IRD. ed. Montpellier, France.
- CDC. 2015.** Insecticide-treated bed nets. (https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/itn.html).
- Chan, M., and M. A. Johansson. 2012.** The incubation periods of dengue viruses. *PLoS One*. 7: 1–7.
- Chandre, F., F. Darriet, S. Duchon, L. Finot, S. Manguin, P. Carnevale, and P. Guillet. 2000.** Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 81–88.
- Chareonviriyaphap, T., M. J. Bangs, W. Suwonkerd, M. Kongmee, V. Corbel, and R. Ngoen-klan. 2013.** Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasit. Vectors*. 6: 1.
- Chen, I., S. E. Clarke, R. Gosling, B. Hamainza, G. Killeen, A. Magill, W. O’Meara, R. N. Price, and E. Riley. 2016.** “Asymptomatic” malaria : A chronic and debilitating infection

- that should be treated. *PLoS Med.* 13: e1001942.
- Chilaka, N., E. Perkins, and F. Tripet. 2012.** Visual and olfactory associative learning in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Malar. J.* 11: 27.
- Chouaibou, M. S., J. Chabi, G. V Bingham, T. B. Knox, L. N. Dri, N. B. Kesse, B. Bonfoh, and H. V. P. Jamet. 2012.** Increase in susceptibility to insecticides with aging of wild *Anopheles gambiae* mosquitoes from Côte d'Ivoire. *BMC Infect. Dis.* 12: 1–7.
- Chouin-carneiro, T., A. Vega-rua, M. Vazeille, A. Yebakima, R. Girod, D. Goindin, M. D. Dupont-Rouzeyrol, R. Lourenço-de-Oliveira, and A. B. Failloux. 2016.** Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: e0004543.
- Churcher, T. S., N. Lissenden, J. T. Griffin, E. Worrall, and H. Ranson. 2016.** The impact of pyrethroid resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa. *Elife.* 1–26.
- Clements, A. N. 1999.** *The Biology of Mosquitoes : Sensory reception and behaviour.* CABI, Wallingford.
- Cook, S. M., Z. R. Khan, and J. A. Pickett. 2007.** The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 375–400.
- Corbel, V., M. Akogbeto, G. B. Damien, A. Djenontin, F. Chandre, C. Rogier, N. Moiroux, J. Chabi, B. Banganna, G. G. Padonou, and M. Henry. 2012.** Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin : a cluster randomised controlled trial. *Lancet.* 12: 617–626.
- Corbel, V., F. Chandre, C. Brengues, M. Akogbéto, F. Lardeux, J. M. Hougard, and P. Guillet. 2004.** Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar. J.* 3.
- Corbel, V., M. Stankiewicz, C. Pennetier, D. Fournier, J. Stojan, E. Girard, M. Dimitrov, J. Molgó, M. Hougard, and B. Lapied. 2009.** Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *Malar. J.* 11: 1–11.
- Costantini, C., M. A. Birkett, G. Gibson, J. Ziesmann, N. F. Sagnon, and H. A. Mohammed. 2001.** Electroantennogram and behavioural responses of the malaria vector *Anopheles gambiae* to human-specific sweat components. *Med. Vet. Entomol.* 15.
- Costantini, C., S.-G. Li, A. Della Torre, N. Sagnon, M. Coluzzi, and C. E. Taylor. 1996.** Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. *Med. Vet. Entomol.* 10: 203–219.
- Costanzo, S. D., A. J. Watkinson, E. J. Murby, D. W. Kolpin, and M. W. Sandstrom. 2007.** Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N, N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments ? *Sci. Total Environ.* 384: 214–220.
- Cox, C. 1991.** Pesticides and birds : From DDT to today's poisons. *J. Pestic. Reform.* 11: 2–6.
- Curtis, C. F., J. D. Lines, J. Ijumba, A. Callaghan, and N. Hill. 1987.** The relative efficacy of repellents against mosquito vectors of disease. *Med. Vet. Entomol.* 1: 109–119.
- Darbro, J. M., R. I. Graham, B. H. Kay, P. A. Ryan, and M. B. Thomas. 2011.** Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 21: 1027–1047.
- Davis, E. E., and P. G. Sokolove. 1976.** Lactic acid-sensitive receptors on the antennae of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Comp. Physiol.* 105: 43–54.

- DeGennaro, M. 2015.** The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly (Austin)*. 9: 45–51.
- Degennaro, M., C. S. McBride, L. Seeholzer, T. Nakagawa, J. Dennis, C. Goldman, N. Jasinskiene, A. A. James, B. Leslie, and M. Genetics. 2013.** Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature*. 498: 487–491.
- Dekker, T., B. Steib, R. T. Carde, and M. Geier. 2002.** L-lactic acid : a human-signifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.* 16: 91–98.
- Del-Rahman, A., A. M. Dechkovskaia, and L. B. Goldstein. 2010.** Neurological deficits induced by malathion, deet, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 67: 331–356.
- Delatte, H., G. Gimonneau, A. Triboire, and D. Fontenille. 2009.** Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *J. Med. Entomol.* 46: 33–41.
- Delatte, H., C. Paupy, J. S. Dehecq, J. Thiria, A. B. Failloux, and D. Fontenille. 2018.** *Aedes albopictus*, vecteur des virus du chikungunya et de la dengue à la Réunion: biologie et contrôle. *Parasite.* 15: 3–13.
- Deletre, E., B. Schatz, D. Bourguet, and F. Chandre. 2016.** Prospects for repellent in pest control : current developments and future challenges. *Chemoecology.* 26: 127–142.
- Dethier, V. G., B. L. Browne, and C. N. Smith. 1960.** The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J. Econ. Entomol.* 53: 134–136.
- Diop, M. M., N. Moiroux, F. Chandre, and H. Martin-herrou. 2015.** Behavioral cost & overdominance in *Anopheles gambiae*. *PLoS One.* 10: e0121755.
- Ditzen, M., M. Pellegrino, and L. B. Vosshall. 2008.** Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science (80-.)*. 319: 1838–1843.
- Dogan, E. B., J. W. Ayres, and P. A. Rossignol. 1999.** Behavioural mode of action of deet : inhibition of lactic acid attraction. *Med. Vet. Entomol.* 13: 97–100.
- Dsikowitzky, L., E. Heruwati, F. Ariyani, H. E. Irianto, and J. Schwarzbauer. 2014.** Exceptionally high concentrations of the insect repellent N,N -diethyl-m-toluamide (DEET) in surface waters from Jakarta, Indonesia. *Environ. Chem. Lett.* 12: 407–411.
- Dye, C., and G. Hasibeder. 1986.** Population dynamics of mosquito-borne disease: effects of flies which bite some people more frequently than others. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 69–77.
- Ebi, K. L., and J. Nealon. 2016.** Dengue in a changing climate. *Environ. Res.* 151: 115–123.
- EPA. 2010.** Product Performance Test Guidelines. OPPTS 810.3700: Insect Repellents to be Applied to Human Skin.
- Faraji, A., A. Egizi, D. M. Fonseca, I. Unlu, T. Crepeau, S. P. Healy, and R. Gaugler. 2014.** Comparative host feeding patterns of the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in urban and suburban Northeastern USA and implications for disease transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e3037.
- Faulde, M. K., G. Albiez, and O. Nehring. 2010.** Insecticidal , acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. *Parasitology.* 106: 957–965.
- Fernández-Grandon, G. M., S. a. Gezan, J. a. L. Armour, J. a. Pickett, and J. G. Logan. 2015.** Heritability of attractiveness to mosquitoes. *PLoS One.* 10: e0122716.

- Fernando, S. D., C. Rodrigo, and S. Rajapakse. 2010.** The “hidden” burden of malaria : cognitive impairment following infection. *Malar. J.* 9: 366.
- Fischer, D., M. S. Thomas, F. Niemitz, B. Reineking, and C. Beierkuhnlein. 2011.** Projection of climatic suitability for *Aedes albopictus* Skuse (Culicidae) in Europe under climate change conditions. *Glob. Planet. Change.* 78: 54–64.
- Fournet, N., F. Franke, P. Chaud, M.-E. Raguenaud, C. Calba, A. Septfons, N. Vincent, G. Terpant, A. Bernadou, O. Broustal, G. Heuzé, A. Guinard, A.-H. Liebert, J. Stoll, M. Galla, J. D. Poveda, G. Chyderiotis, E. Cart-Tanneur, S. Brichler, L. Ninove, A. Nisavanh, J. Durand, H. de Valk, M.-C. Paty, and H. Noël. 2018.** Surveillance du chikungunya, de la dengue et des infections à virus Zika en France métropolitaine, 2017. France.
- Fradin, M. S., and J. F. Day. 2002.** Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N. Engl. J. Med.* 347: 13–18.
- Frances, S. P., R. Sithiprasasna, and K. J. Linthicum. 2011.** Laboratory evaluation of the response of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* uninfected and infected with dengue virus to Deet. *Vector Control. pest Manag. Resist. repellents.* 48: 334–336.
- Gachelin, G. 2018.** Paludisme: découverte du parasite. *Encycl. Universalis.* (<https://www.universalis.fr/encyclopedie/paludisme-decouverte-du-parasite/>).
- Geier, M., O. J. Bosch, and J. Boeckh. 1999.** Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chem. Senses.* 24: 647–653.
- Geiger, F., J. Bengtsson, F. Berendse, W. W. Weisser, M. Emmerson, M. B. Morales, P. Ceryngier, J. Liira, R. Bommarco, V. Bretagnolle, M. Plantegenest, L. W. Clement, C. Dennis, C. Palmer, J. O. Juan, C. Fischer, P. W. Goedhart, and P. Inchausti. 2010.** Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl. Ecol.* 11: 97–105.
- Gibbs, K. E., R. L. Mackey, and D. J. Currie. 2009.** Human land use, agriculture, pesticides and losses of imperiled species. *Divers. Distrib.* 15: 242–253.
- Gillies, M. 1964.** Selection for host preference in *Anopheles gambiae*. *Nature.* 203: 852–854.
- Gillies, M. T. 1980.** The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera : Culicidae): a review. *Bull. Entomol. Res.* 70: 525–532.
- Glunt, K. D., M. B. Thomas, and A. F. Read. 2011.** The effects of age , exposure history and malaria infection on the susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to low concentrations of pyrethroid. *PLoS One.* 6: e24968.
- Goindin, D., C. Delannay, C. Ramdini, and J. Gustave. 2015.** Parity and longevity of *Aedes aegypti* according to temperatures in controlled conditions and consequences on dengue transmission risks. *PLoS One.* 10: 1–21.
- Gould, F., Z. S. Brown, and J. Kuzma. 2018.** Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? *Science (80-.).* 360: 728–732.
- Gubler, D. J. 2002.** Epidemic dengue / dengue hemorrhagic fever as a public health , social and economic problem in the 21st century. *TRENDS Microbiol.* 10: 100–103.
- Gubler, D. J. 2012.** The Economic burden of dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86: 743–744.
- Halasa, Y. A., D. S. Shepard, and W. Zeng. 2012.** Economic cost of dengue in Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86: 745–752.
- Hao, H., J. Wei, and J. Dai. 2008.** Host-seeking and blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*

- (Diptera : Culicidae) exposed to vapors of geraniol, citral, citronellal, eugenol, or anisaldehyde. *J. Med. Entomol.* 45: 533–539.
- Harrington, L. C., J. D. Edman, T. W. Scott, L. C. Harrington, J. D. Edman, and T. W. Scott. 2001.** Why do female *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood ? *J. Med. Entomol.* 38: 411–422.
- Hawkes, F., and G. Gibson. 2016.** Seeing is believing : the nocturnal malarial mosquito *Anopheles coluzzii* responds to visual host-cues when odour indicates a host is nearby. *Parasit. Vectors.* 8.
- Hii, J. L. K., M. Chew, V. Y. Sang, L. E. Munstermann, S. G. Tan, S. Panyim, and S. Yasothornsrikul. 1991.** Population genetic analysis of host seeking and resting behaviors in the malaria vector *Anopheles balabacensis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 28: 675–684.
- Hill, S. R., and J. J. B. Smith. 2000.** Consistent pattern in the placement of taste sensilla on the labellar lobes of *Aedes aegypti*. *Int. J. insect Morphol. Embryol.* 28: 281–290.
- Hillyer, J. F., S. L. Schmidt, J. F. Fuchs, J. P. Boyle, and B. M. Christensen. 2005.** Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell. Microbiol.* 7: 39–51.
- Hodjati, M. H., and C. F. Curtis. 1999.** Evaluation of the effect of mosquito age and prior exposure to insecticide on pyrethroid tolerance in *Anopheles* mosquitoes (Diptera : Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 89: 329–337.
- Institut Pasteur. 2016.** ZIKA. (<https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/zika>).
- Iturbe-ormaeche, I., T. Walker, and S. L. O'Neill. 2011.** *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep.* 12: 508–518.
- Jones, B. Y. M. D. R., C. M. Cubbin, and D. Marsh. 1972.** The circadian rhythm of flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae*: the light-response rhythm. *J. Exp. Biol.* 57.
- Jones, C. M., A. Sanou, W. M. Guelbeogo, N. F. Sagnon, P. C. D. Johnson, and H. Ranson. 2012.** Aging partially restores the efficacy of malaria vector control in insecticide-resistant populations of *Anopheles gambiae s. l.* from Burkina Faso. *Malar. J.* 11: 1–11.
- Jones, M. D. R., and S. J. Gubbins. 1977.** Modification of circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae* after insemination. *Nature.* 268: 731–732.
- Jones, M. D. R., and S. J. Gubbins. 1978.** Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiol. Entomol.* 3: 213–220.
- Kelly, A. H., H. N. B. Koudakossi, and S. J. Moore. 2017.** Repellents and new “spaces of concern” in global health. *Med. Anthropol.* 36: 464–478.
- Kessler, S., M. Vlimant, and P. M. Guerin. 2012.** The sugar meal of the African malaria mosquito *Anopheles gambiae* (Giles) and how deterrent compounds interfere with it: a behavioural and neurophysiological study. *J. Exp. Biol.* 216: 1292–1306.
- Kitau, J., R. Oxborough, J. Matowo, F. Mosha, S. M. Magesa, and M. Rowland. 2014.** Indoor residual spraying with microencapsulated DEET repellent (N , N-diethyl-m-toluamide) for control of *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus*. *Parasit. Vectors.* 7.
- Klun, J. A., and A. Khrimian. 2006.** Repellent and deterrent effects of SS220, Picaridin, and Deet suppress human blood feeding by *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and

- Phlebotomus papatasi*. J. Med. Entomol. 43: 34–39.
- Knoess, H. P., and E. G. Neeland. 1998.** A modified synthesis of the insect repellent DEET. J. Chem. Educ. 75: 1267–1268.
- Koella, J. C., P. A. Lynch, M. B. Thomas, and A. F. Read. 2009.** Towards evolution-proof malaria control with insecticides. Evol. Appl. 2: 469–480.
- Koella, J. C., F. L. Sørensen, and R. A. Anderson. 1998.** The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. Proc. Biol. Sci. 265: 763–8.
- Kulma, K., A. Saddler, and J. C. Koella. 2013.** Effects of age and larval nutrition on phenotypic expression of insecticide-resistance in *Anopheles* mosquitoes. PLoS One. 8: 8–11.
- Kwon, H., T. Lu, M. Rützler, and L. J. Zwiebel. 2006.** Olfactory responses in a gustatory organ of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. PNAS. 103.
- Labbé, P., H. Alout, L. Djogbénu, N. Pasteur, and M. Weill. 2011.** Evolution of resistance to insecticide in disease vectors, pp. 363–409. In Michel Tibayrenc (ed.), Genet. Evol. Infect. Dis. Elsevier Publishing Company, London, U.K.
- Leal, W. S. 2015.** The enigmatic reception of DEET - the gold standard of insect repellents. Curr. Opin. Insect Sci. 1: 93–98.
- Leal, W. S., R. M. R. Barbosa, F. Zeng, G. B. Faierstein, K. Tan, M. H. S. Paiva, D. R. D. Guedes, M. M. Crespo, and C. F. J. Ayres. 2017.** Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents? Sci. Rep. 7: 1–9.
- Lee, J., D. B. Choi, F. Liu, J. P. Grieco, and N. L. Achee. 2018.** Effect of the topical repellent para-Menthane-3,8-diol on blood feeding behavior and fecundity of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. Insects. 9.
- Lee, Y., S. H. Kim, and C. Montell. 2010.** Avoiding DEET through insect gustatory receptors. Neuron. 67: 555–561.
- Lees, R. S., J. R. L. Gilles, J. Hendrichs, M. J. B. Vreysen, and K. Bourtzis. 2015.** Back to the future : the sterile insect technique against mosquito disease vectors. Curr. Opin. Insect Sci. 10: 156–162.
- Lefèvre, T., L.-C. Gouagna, K. R. Dabire, E. Elguero, D. Fontenille, F. Renaud, C. Costantini, and F. Thomas. 2010.** Beer consumption increases human attractiveness to malaria mosquitoes. PLoS One. 5: 1–8.
- Legeay, S., N. Clere, V. Apaire-marchais, S. Faure, and B. Lapied. 2018.** Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. Eur. J. Pharmacol. 825: 92–98.
- Li, M. I., P. Sze, J. Wong, L. C. Ng, and C. H. Tan. 2012.** Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. PLoS One. 6: e1792.
- Licciardi, S., J. Herve, F. Darriet, J.-M. Hougard, and V. Corbel. 2006.** Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays. Med. Vet. Entomol. 20: 288–293.
- Lima-camara, T. N., R. V Bruno, P. M. Luz, G. Castro, R. Lourenço-de-Oliveira, M. H. F. Sorgine, and A. A. Peixoto. 2011.** Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. PLoS One. 6: 1–5.
- Lindsay, S., J. Ansell, C. Selman, V. Cox, K. Hamilton, and G. Walraven. 2000.** Effect of

- pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet*. 355.
- Lindsay, S. W., P. M. Emerson, and J. D. Charlwood. 2002.** Reducing malaria by mosquito-proofing houses. *Trends Parasitol.* 18: 510–514.
- Lindsay, S. W., M. Jawara, K. Paine, M. Pinder, G. E. L. Walraven, and P. M. Emerson. 2003.** Changes in house design reduce exposure to malaria mosquitoes. *Trop. Med. Int. Heal.* 8: 512–517.
- Lines, J. D., and N. S. Nasser. 1991.** DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. *Med. Vet. Entomol.* 5: 261–265.
- Livadas, G. A., and G. Georgopoulos. 1953.** Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. *Bull. World Health Organ.* 8: 497–511.
- Lorenz, L. M., and J. C. Koella. 2011.** The microsporidian parasite *Vavraia culicis* as a potential late life – acting control agent of malaria. *Evol. Appl.* 783–790.
- De Luca, D., and C. Lazzari. 2017.** Le pouvoir des répulsifs face aux moustiques : Comment ça marche ? Rapport de stage de seconde année de master. Laboratoire de l’Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte; Université de Tours.
- Lucas, J. R., Y. Shono, T. Iwasaki, T. Ishiwatari, N. Spero, and G. Benzon. 2007.** U.S. Laboratory and field trials of metofluthrin (Sumione®) emanators for reducing mosquito biting outdoors. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23: 47–54.
- Lundwall, E., C. Pennetier, V. Corbel, L. De Gentile, and F. Legros. 2005.** Paludisme : se protéger des piqûres d’anophèles. *Rev. Prat.* 55: 841–848.
- Maciel-de-freitas, R., G. Sylvestre, M. Gandini, and J. C. Koella. 2013.** The influence of dengue virus serotype-2 infection on *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) motivation and avidity to blood feed. *PLoS One.* 8: 6–10.
- Maia, M. F., K. Kreppel, E. Mbeyela, D. Roman, V. Mayagaya, N. F. Lobo, A. Ross, and S. J. Moore. 2016.** A crossover study to evaluate the diversion of malaria vectors in a community with incomplete coverage of spatial repellents in the Kilombero Valley , Tanzania. *Parasit. Vectors.* 9.
- Maia, M. F., S. P. Onyango, M. Thele, E. T. Simfukwe, L. Turner, and S. J. Moore. 2013.** Do topical repellents divert mosquitoes within a community ? – health equity implications of topical repellents as a mosquito bite prevention tool. *PLoS One.* 8: e84875.
- Manica, M., G. Guzzetta, P. Poletti, F. Filipponi, A. Solimini, B. Caputo, R. Rosà, S. Merler, E. Molecolare, C. Ricerca, F. E. Mach, and S. Michele. 2017.** Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy : from coastal areas to the metropolitan city of Rome , summer 2017. *EuroSurveillance.* 22.
- Masetti, A., and S. Maini. 2006.** Arm in cage tests to compare skin repellents against bites of *Aedes albopictus*. *Bull. Insectology.* 59: 157–160.
- McCall, P. J., and G. Eaton. 2001.** Olfactory memory in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.* 15: 197–203.
- McCall, P. J., F. W. Mosha, K. J. Njunwa, and K. Sherlock. 2001.** Evidence for memorized site-fidelity in *Anopheles arabiensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 587–590.
- McCann, S., F. Day, Jonathan, S. Allan, and C. Lord, Cynthia. 2010.** Age modifies the effect of body size on fecundity in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* 34: 174–181.
- McIver, S., and R. Siemicki. 1978.** Fine structure of tarsal sensilla of *Aedes aegypti* (L.)

- (Diptera : Culicidae). *J. Morphol.* 155: 137–156.
- Le Médecin Généraliste. 2014.** La fièvre jaune, malédiction des tropiques. (https://www.legeneraliste.fr/actualites/article/2014/08/02/la-fievre-jaune-malediction-des-tropiques_248456).
- Menda, G., J. H. Uhr, R. A. Wyttenbach, F. M. Vermeulen, D. M. Smith, L. C. Harrington, and R. R. Hoy. 2013.** Associative learning in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: avoidance of a previously attractive odor or surface color that is paired with an aversive stimulus. *J. Exp. Biol.* 216: 218–23.
- Menger, D. J., B. Otieno, M. De Rijk, W. R. Mukabana, J. J. A. Van Loon, and W. Takken. 2014.** A push-pull system to reduce house entry of malaria mosquitoes. *Malar. J.* 13.
- Michael, E., K. D. Ramaiah, S. L. Hoti, G. Barker, M. R. Paul, J. Yuvaraj, P. K. Das, B. T. Grenfell, and D. A. P. Bundy. 2001.** Quantifying mosquito biting patterns on humans by DNA fingerprinting of bloodmeals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 722–728.
- Min, K. T., and S. Benzer. 1997.** *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 10792–10796.
- Minard, G., P. Mavingui, and C. V. Moro. 2013.** Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit. Vectors.* 6.
- Mita, T., and K. Tanabe. 2012.** Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance : implications for the development and containment of artemisinin resistance. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 465–475.
- Mng'ong'o, F. C., J. J. Sambali, E. Sabas, J. Rubanga, J. Magoma, A. J. Ntamatungiro, E. L. Turner, D. Nyogea, J. H. J. Ensink, and S. J. Moore. 2011.** Repellent plants provide affordable natural screening to prevent mosquito house entry in tropical rural settings — Results from a pilot efficacy study. *PLoS One.* 6: e25927.
- Moore, S. J., C. R. Davies, N. Hill, and M. M. Cameron. 2007.** Are mosquitoes diverted from repellent-using individuals to non-users ? Results of a field study in Bolivia. *Trop. Med. Int. Heal.* 12: 532–539.
- Murray, N. E. Y., M. B. Quam, and A. Wilder-Smith. 2013.** Epidemiology of dengue : past , present and future prospects. *Clin. Epidemiol.* 5: 299–309.
- Mwandawiro, C., M. Boots, N. Tuno, W. Suwonkerd, Y. Tsuda, and M. Takagi. 2000.** Heterogeneity in the host preference of Japanese encephalitis vectors in Chiang Mai, northern Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 238–242.
- N'Guessan, R., B. G. J. Knols, C. Penetier, and M. Rowland. 2007.** DEET microencapsulation : a slow-release formulation enhancing the residual efficacy of bed nets against malaria vectors. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 259–262.
- N'Guessan, R., M. Rowland, T. Moumouni, N. Bli, and P. Carnevale. 2006.** Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100: 1091–1097.
- Nájera, J. A., M. González-Silva, and P. L. Alonso. 2011.** Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Med.* 8.
- Nam, V. u S., N. T. H. I. Yen, B. H. Kay, G. G. Marten, and J. W. Reid. 1998.** Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam, using copepods and community participation. *Am.*

- J. Trop. Med. Hyg. 59: 657–660.
- Naucke, T., R. Kröpke, G. Benner, J. Schulz, K. Wittern, A. Rose, U. Kröckel, and H. Grünewald. 2007.** Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535 ® and Picaridin against *Aedes aegypti*. Parasitol. Res. 101: 169–177.
- Noegrohati, S., K. Untung, and W. E. Hammers. 1992.** Impact of DDT spraying on the residue levels in soil, chicken, fish-pond water, carp, and human milk samples from malaria infested villages in central Java. Toxicol. Environ. Chem. 34: 237–251.
- Ohm, J. R., F. Baldini, P. Barreaux, T. Lefevre, P. A. Lynch, E. Suh, S. A. Whitehead, and M. B. Thomas. 2018.** Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. Parasit. Vectors. 11: 1–9.
- Osimitz, T. G., J. V Murphy, L. A. Fell, and B. Page. 2010.** Adverse events associated with the use of insect repellents containing N,N -diethyl-m-toluamide (DEET). Regul. Toxicol. Pharmacol. 56: 93–99.
- Owusu, H. F., N. Chitnis, and P. Müller. 2017.** Insecticide susceptibility of *Anopheles* mosquitoes changes in response to variations in the larval environment. Sci. Rep. 7.
- Paluch, G., L. Bartholomay, and J. Coats. 2010.** Mosquito repellents : a review of chemical structure diversity and olfaction. Pest Manag. Sci. 66: 925–935.
- PAN. 2010.** Pesticides and the loss of biodiversity. Pesticide Action Network Europe, London.
- Pellegrino, M., N. Steinbach, M. C. Stensmyr, B. S. Hansson, and L. B. Vosshall. 2011.** A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor. Nature. 478: 511–514.
- Pennetier, C., V. Corbel, P. Boko, A. Odjo, R. N'Guessan, B. Lapied, and J. Hougard. 2007.** Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. Malar. J. 6: 1–7.
- Pennetier, C., C. Costantini, V. Corbel, S. Licciardi, R. K. Dabiré, and B. Lapied. 2008.** Mixture for controlling insecticide- resistant malaria vectors. Emerg. Infect. Dis. 14: 1707–1714.
- Pennetier, C., C. Costantini, V. Corbel, S. Licciardi, R. K. Dabiré, B. Lapied, F. Chandre, and J. Hougard. 2009.** Synergy between repellents and organophosphates on bed nets : efficacy and behavioural response of natural free-flying *An. gambiae* mosquitoes. PLoS One. 4.
- Perfect, J. 1980.** The environmental impact of DDT in a tropical agro-ecosystem. Ambio. 9: 16–21.
- Pinder, M., M. Jawara, L. B. S. Jarju, K. Salami, D. Jeff, M. Adiamoh, K. Bojang, S. Correa, B. Kandeh, H. Kaur, D. J. Conway, U. D. Alessandro, and S. W. Lindsay. 2015.** Efficacy of indoor residual spraying with dichlorodiphenyltrichloroethane against malaria in Gambian communities with high usage of long-lasting insecticidal mosquito nets : a cluster-randomised controlled trial. Lancet. 385: 1436–1446.
- Pitts, R. J., S. L. Derryberry, Z. Zhang, and L. J. Zwiebel. 2017.** Variant ionotropic receptors in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* tuned to amines and carboxylic acids. Sci. Rep. 7.
- Ponlawat, A., and L. C. Harrington. 2005.** Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. J. Med. Entomol. 42: 844–849.
- Pridgeon, J. W., U. R. Bernier, and J. J. Becnel. 2009.** Toxicity comparison of eight repellents

- against four species of female mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25: 168–174.
- Puri, S. N., M. J. Mendki, D. Sukumaran, K. Ganesan, S. Prakash, and K. Sekhar. 2006.** Electroantennogram and behavioral responses of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) females to chemicals found in human skin emanations. *J. Med. Entomol.* 43: 207–213.
- Qualls, W. A., J. F. Day, R. Xue, and D. F. Bowers. 2012.** Altered behavioral responses of Sindbis virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera :Culicidae) to DEET and non-DEET based insect repellents. *Acta Trop.* 122: 284–290.
- Rani, A., A. Sharma, R. Rajagopal, T. Adak, and R. K. Bhatnagar. 2009.** Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* - an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* 9.
- Ranson, H., and N. Lissenden. 2016.** Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes : a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol.* 32: 187–196.
- Ray, A. 2015.** Reception of odors and repellents in mosquitoes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34: 158–164.
- Read, A. F., P. A. Lynch, and M. B. Thomas. 2009.** How to make evolution-proof insecticides for malaria control. *PLoS Biol.* 7: 1–10.
- Regis, L., S. B. da Silva, and M. A. V Melo-santos. 2000.** The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95: 207–210.
- Ren, X., and J. L. Rasgon. 2010.** Potential for the *Anopheles gambiae* densovirus to act as an “evolution-proof” biopesticide. *J. Virol.* 84: 7726–7729.
- Riabinina, O., D. Task, E. Marr, C. Lin, R. Alford, D. A. O. Brochta, and C. J. Potter. 2016.** Organization of olfactory centres in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nat. Commun.* 7.
- Richardson, J. R., A. Roy, S. L. Shalat, R. T. Von Stein, M. M. Hossain, B. Buckley, M. Gearing, A. I. Levey, and D. C. German. 2014.** Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 71: 284–290.
- Robert, L. L., I. Schneider, and R. A. Wirtz. 1991.** DEET and permethrin as protectants against malaria-infected and uninfected *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7: 304–306.
- Roberts, M. 2010.** “Malaria and weak bones” may have killed Tutankhamun. BBC. (<http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/8516425.stm>).
- Roche, B., L. Léger, G. L. Ambert, and G. Lacour. 2015.** The spread of *Aedes albopictus* in metropolitan France: contribution of environmental drivers and human activities and predictions for a near future. *PLoS One.* 10: e0125600.
- Rossignol, P. A., J. M. C. Ribeiro, and A. Spielman. 1984.** Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 17–20.
- Rossignol, P. A., J. M. C. Ribeiro, and A. Spielman. 1986.** Increased biting rate and reduced fertility in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 277–279.
- Roundy, C. M., S. R. Azar, S. L. Rossi, J. H. Huang, G. Leal, R. Yun, I. Fernandez-salas, C. J. Vitek, I. A. D. Paploski, U. Kitron, G. S. Ribeiro, K. A. Hanley, S. C. Weaver, and N.**

- Vasilakis. 2017.** Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for Zika virus transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 23: 625–632.
- Rowland, M., and J. Hemingway. 1987.** Changes in malathion resistance with age in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28: 239–247.
- Rowley, A. 1968.** The effect of age on the flight performance of female *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 14: 719–728.
- Ruktanonchai, N. W., L. P. Lounibos, D. L. Smith, and S. A. Allan. 2015.** Experience- and age-mediated oviposition behaviour in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Med. Vet. Entomol.* 29: 255–262.
- Ryan, S. J., T. Ben-Horin, and L. R. Johnson. 2015.** Malaria control and senescence: the importance of accounting for the pace and shape of ageing in wild mosquitoes. *Ecosphere.* 6(9): 1–272.
- Sanford, J. L., V. D. C. Shields, and J. C. Dickens. 2013.** Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Naturwissenschaften.* 100: 269–273.
- Sangare, I., R. Dabire, B. Yameogo, D. F. Da, Y. Michalakis, and A. Cohuet. 2014.** Stress dependent infection cost of the human malaria agent *Plasmodium falciparum* on its natural vector *Anopheles coluzzii*. *Infect. Genet. Evol.* 25: 57–65.
- Sathantriphop, S., S. A. White, N. L. Achee, U. Sanguanpong, and T. Chareonviriyaphap. 2014.** Behavioral responses of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles minimus* against various synthetic and natural repellent compounds. *J. Vector Ecol.* 39: 328–339.
- Savage, H. M., M. L. Niebylski, G. C. Smith, C. J. Mitchell, and G. B. Craig. 1993.** Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) at a temperate North American site. *J. Med. Entomol.* 30: 27–34.
- Scott, T. W., E. Chow, D. Strickman, R. A. Wirtz, L. H. Lorenz, and J. D. Edman. 1993.** Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) collected in a rural Thai village. *J. Med. Entomol.* 30: 922–927.
- Seng, C. M., T. Setha, J. Nealon, D. Socheat, N. Chantha, B. Michael, C. M. Seng, T. Setha, J. Nealon, D. Socheat, N. Chantha, and M. B. Nathan. 2008.** Community-based use of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* to control the dengue vector *Aedes aegypti* in domestic water storage containers in rural Cambodia. *J. Vector Ecol.* 33.
- Shepard, D. S., E. A. Undurraga, Y. A. Halasa, and J. D. Stanaway. 2016.** The global economic burden of dengue : a systematic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 3099: 146–148.
- Sinha, C., A. K. Agrawal, F. Islam, K. Seth, R. K. Chaturvedi, S. Shukla, and P. K. Seth. 2004.** Mosquito repellent (pyrethroid-based) induced dysfunction of blood – brain barrier permeability in developing brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22: 31–37.
- Smallegange, R. C., G.-J. Van-Gemert, M. Van-de-Vegte-Bolmer, S. Gezan, W. Takken, R. W. Sauerwein, J. G. Logan, and J. G. Logan. 2013.** Malaria infected mosquitoes express enhanced attraction to human odor. *PLoS One.* 8: e63602.
- Soderlund, D. M., and R. Bloomquist. 1989.** Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 77–96.
- Sorensen, J. P. R., D. J. Lapworth, D. C. W. Nkhuwa, M. E. Stuart, D. C. Gooddy, R. A. Bell, M. Chirwa, J. Kabika, M. Liemisa, M. Chibesa, and S. Pedley. 2015.** Emerging

- contaminants in urban groundwater sources in Africa. *Water Res.* 72: 51–63.
- Sparks, J. T., B. T. Vinyard, and J. C. Dickens. 2013.** Gustatory receptor expression in the labella and tarsi of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 1161–1171.
- Stanczyk, N. M., J. F. Y. Brookfield, L. M. Field, and J. G. Logan. 2013.** *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. *PLoS One.* 8: e54438.
- Stanczyk, N. M., J. F. Y. Brookfield, R. Ignell, J. G. Logan, and L. M. Field. 2010.** Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. *PNAS.* 107: 8575–8580.
- Steib, B. M., M. Geier, and J. Boeckh. 2001.** The effect of lactic acid on odour-related host preference of yellow fever mosquitoes. *Chem. Senses.* 26: 523–528.
- Stone, C., and K. Gross. 2018.** Evolution of host preference in anthropophilic mosquitoes. *Malar. J.* 17.
- Strode, C., S. Donegan, P. Garner, A. A. Enayati, and J. Hemingway. 2014.** The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African Anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 11: e1001619.
- Swale, D. R., B. Sun, F. Tong, and J. R. Bloomquist. 2014.** Neurotoxicity and mode of action of N , N-Diethyl-Meta-Toluamide (DEET). *PLoS One.* 9: e103713.
- Syafruddin, D., M. J. Bangs, D. Sidik, I. Elyazar, P. B. S. Asih, K. Chan, S. Nurleila, C. Nixon, J. Hendarto, I. Wahid, H. Ishak, C. Bogh, J. P. Grieco, N. L. Achee, and K. Baird. 2014.** Impact of a spatial repellent on malaria incidence in two villages in Sumba , Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91: 1079–1087.
- Syed, Z., and W. S. Leal. 2008.** Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *PNAS.* 2008: 1–6.
- Takken, W., and N. O. Verhulst. 2013.** Host Preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 433–453.
- Thiévent, K., L. Hofer, E. Rapp, M. M. Tambwe, S. Moore, and J. C. Koella. 2018.** Malaria infection in mosquitoes decreases the personal protection offered by permethrin-treated bednets. *Parasit. Vectors.* 11: 1–10.
- Thonneau, P. 2016.** Exposition environnementale et conséquences sur la santé humaine (DDT et cancer du sein - Bisphénol A et fausses couches).
- Thuilliez, J., M. S. Sissoko, O. B. Toure, P. Kamate, J. Berthelemy, and O. K. Doumbo. 2011.** Malaria and primary education in Mali: a longitudinal study in the village of Donéguébougou. *Soc. Sci. Med.* 71: 324–334.
- Tikar, S. N., R. Yadav, M. J. Mendki, and A. N. Rao. 2014.** Oviposition deterrent activity of three mosquito repellents diethyl phenyl acetamide (DEPA), diethyl m toluamide (DEET), and diethyl benzamide (DEB) on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology.* 113: 101–106.
- Tomberlin, J. K., G. C. Rains, S. A. Allan, M. R. Sanford, and W. J. Lewis. 2006.** Associative learning of odor with food- or blood-meal by *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: *Culicidae*). *Naturwissenschaften.* 93: 551–556.
- Trigg, J. K. 1996.** Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Anopheles spp.* in Tanzania. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12: 243–246.
- Tsitoura, P., K. Koussis, and K. Iatrou. 2015.** Inhibition of *Anopheles gambiae* odorant

- receptor function by mosquito repellents. *J. Biol. Chem.* 290: 7961–7972.
- Vanderberg, J. P., and M. Yoeli. 2016.** Effects of temperature on sporogonic development of *Plasmodium beirghei*. *J. Parasitol.* 52: 559–564.
- Vantaux, A., T. Lefèvre, K. R. Dabiré, and A. Cohuet. 2014.** Individual experience affects host choice in malaria vector mosquitoes. *Parasit. Vectors.* 7: 249.
- Vatandoost, H. 1999.** An enhanced tolerance to permethrin in *Anopheles stephensi* with permethrin and other enzyme inducers. *Acta Med. Iran.* 37.
- Vaughan, J., L. Hensley, and J. Beier. 2016.** Sporogonic development of *Plasmodium yoelii* in five Anopheline species. *J. Parasitol.* 80: 674–681.
- Vaughan, J., B. Noden, and J. Beier. 2016.** Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *J. Parasitol.* 78: 716–724.
- Vazeille, M., L. Mousson, and A. Failloux. 2009.** Failure to demonstrate experimental vertical transmission of the epidemic strain of Chikungunya virus in *Aedes albopictus* from La Réunion Island, Indian Ocean. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 632–635.
- Versteirt, V., E. De Clercq, D. Fonseca, J. Pecor, F. Schaffner, M. Coosemans, and W. Van Bortel. 2012.** Bionomics of the established exotic mosquito species *Aedes koreicus* in Belgium, Europe. *J. Med. Entomol.* 49: 1226–1232.
- Viana, M., A. Hughes, J. Matthiopoulos, H. Ranson, and H. Ferguson. 2016.** Delayed mortality effects cut the malaria transmission potential of insecticide-resistant mosquitoes. *PNAS.* 1–6.
- Vinauger, C., E. K. Lutz, and J. A. Riffell. 2014.** Olfactory learning and memory in the disease vector mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 2321–2330.
- Walker, T. W., L. L. Robert, R. A. Copeland, A. K. Githeko, and R. A. Wirtz. 1996.** Field evaluation of arthropod repellents, DEET and a piperidine compound, AI3-37220, against *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in western Kenya. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12: 172–176.
- Weeks, J. A., P. D. Guiney, and A. I. Nikiforov. 2011.** Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8: 120–134.
- Weiss, B., and S. Aksoy. 2011.** Microbiome influences on insect vector host competence. *Trends Parasitol.* 27: 514–522.
- Wekesa, J. W., R. S. Copeland, and R. W. Mwangi. 1992.** Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding behavior of naturally infected *Anopheles mosquitoes* in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 484–488.
- West, P. A., N. Protopopoff, A. Wright, Z. Kivaju, R. Tigererwa, F. W. Mosha, W. Kisinza, M. Rowland, and I. Kleinschmidt. 2014.** Indoor residual spraying in combination with insecticide-treated nets compared to insecticide-treated nets alone for protection against malaria: a cluster randomised trial in Tanzania. *PLoS One.* 11: e1001630.
- WHO. 2007.** Long-lasting insecticidal nets for malaria prevention. Geneva.
- WHO. 2009a.** Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva.
- WHO. 2009b.** Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. Geneva.
- WHO. 2010.** Economic costs of malaria. Roll Back Malaria, Geneva.
- WHO. 2012.** Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. Geneva.
- WHO. 2017a.** Chikungunya. Principaux repères. (<http://www.who.int/fr/news-room/fact->

sheets/detail/chikungunya).

- WHO. 2017b.** Global vector control response 2017-2030. Geneva.
- WHO. 2017c.** World malaria report 2017. WHO, Geneva.
- WHO. 2018a.** Maladie à virus Zika. Principaux repères. (<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>).
- WHO. 2018b.** Dengue et dengue sévère. Principaux repères. (<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>).
- WHO. 2018c.** Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva.
- WHO. 2018d.** Maladies transmises par les moustiques. (http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/fr/).
- Wong, P. J., M. I. Li, C. Chong, L. Ng, and C. Tan. 2013.** *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) : a potential vector of Zika virus in Singapore. PLoS One. 7: e2348.
- Xia, Y., G. Wang, D. Buscariollo, R. J. Pitts, H. Wenger, and L. J. Zwiebel. 2008.** The molecular and cellular basis of olfactory-driven behavior in *Anopheles gambiae* larvae. PNAS. 105.
- Xiang, H., G. Wei, S. Jia, J. Huang, X. Miao, Z. Zhou, L.-P. Zhao, and Y.-P. Huang. 2006.** Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). Can. J. Microbiol. 52: 1085–1092.
- Xu, P., Y. Choo, A. D. La Rosa, and W. S. Leal. 2014.** Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. PNAS. 111: 16592–16597.
- Xue, R., A. Ali, and D. R. Barnard. 2003.** Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in aerosol sprays to adult mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 19: 271–274.
- Xue, R., D. R. Barnard, and A. Ali. 2000.** Laboratory toxicity of three mosquito oviposition repellents to six nontarget aquatic invertebrates. Environ. Entomol. 29: 437–441.
- Xue, R., D. R. Barnard, and C. E. Schreck. 1995.** Influence of body size and age of *Aedes albopictus* on human host attack rates and the repellency of DEET. J. Am. Mosq. Control Assoc. 11: 50–53.
- Yamana, T. K., and E. A. B. Eltahir. 2013.** Incorporating the effects of humidity in a mechanistic model of *Anopheles gambiae* mosquito population dynamics in the Sahel region of Africa. Parasit. Vectors. 6: 1–10.
- Yaya, S. 2013.** Le paludisme : repères historiques, climatiques et anthropiques. Univ. Ottawa.
- Zermoglio, P. F., H. Martin-herrou, Y. Bignon, and C. R. Lazzari. 2015.** *Rhodnius prolixus* smells repellents : Behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in Chagas disease vectors. J. Insect Physiol. 81: 137–144.

Annexes

1 Human skin odors associated with transmission stages of malaria parasites

2

3 M. Mulatier^{1,2*}, N. Joffard², R.S. Yerbanga^{3,4}, E. Guissou³, B. Lapeyre², A. Valente¹, J.-M. Bessière⁵,

4 D. Carrasco¹, T. Lefèvre^{1,3}, A. Cohuet^{1¶}, L. Dormont^{2¶}

5 ¹ MIVEGEC, IRD, CNRS, Univ. Montpellier, Montpellier, France.

6 ² CEFE, CNRS, Univ. Montpellier, Univ. Paul Valery, EPHE, IRD, Montpellier, France.

7 ³ IRSS, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

8 ⁴ Institut des Sciences et Techniques, INSTech Bobo Dioulasso, Burkina Faso

9 ⁵ Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Laboratoire de Chimie Appliquée,
10 Montpellier, France

11

12

13 * Corresponding author

14 E-mail: margaux.mulatier@ird.fr

15 ¶: these authors contributed equally to this work.

16 Abstract

17 Vector-borne pathogens such as malaria parasites are thought to alter traits of their hosts in ways that
18 increase the frequency of host-parasite contacts and the probability of transmission. Previous work has
19 reported that people carrying infectious forms of *Plasmodium falciparum* were more attractive to the
20 vector *Anopheles gambiae* than non-infected people or people infected with non-infectious stages of
21 the parasite. It was hypothesized that it may be due to a modification of the host body odor, however
22 the mechanisms underlying this potential parasitic manipulation have not yet been elucidated. In this
23 study, skin odors were collected from asymptomatic volunteers naturally infected by different

24 developmental stages of *P. falciparum* and from uninfected control individuals in Burkina Faso, an
25 endemic area of malaria. The volatile organic compounds (VOCs) identified revealed differential
26 abundance and diversity according to the stages of infection. Unusual skin compounds, terpenes, were
27 present at higher relative quantities in individuals carrying gametocytes, the parasite transmissible
28 stage, compared to control uninfected and individuals carrying the non-infectious asexual stages of the
29 parasite. Electroantennography assays revealed that the mosquito vector, *An. gambiae*, had the ability
30 to detect these compounds at a biologically-relevant concentration. Behavioral assays, however, did
31 not evidence behavioral changes of the malaria mosquito induced by one of the terpenes specific to
32 infectious individuals. These findings provide insights into the mechanisms that might mediate
33 attractiveness of infectious people to mosquito vectors, and could have future implications for
34 improving the understanding of malaria epidemiology.

35 **Author summary**

36 Malaria is a disease caused by parasites of the genus *Plasmodium*, and is considered as one of the
37 deadliest parasitosis in the world causing more than 400 000 deaths per year, mainly in sub-Saharan
38 Africa. Malaria parasites are transmitted to humans through the bite of infected mosquitoes. Previous
39 studies have reported that people infected with malaria parasites are more attractive to mosquito
40 vectors when parasites are at the infectious stages for mosquitoes than when they are not infected or
41 infected with the non-infectious asexual stages of the parasite. This could enhance parasite
42 transmission and reduce the efforts made in the fight against the disease. However to date, the
43 mechanisms underlying this phenomenon are not well understood. In the present study we analyzed
44 body odors from malaria-infected and non-infected children and evidenced that the composition of the
45 odor bouquet is related to parasite developmental stage, some volatiles being more abundant when the
46 patient is infectious. We also determined that the volatiles constituting the odor bouquet of infected
47 children can be detected by the mosquito nervous system. We then tried to examine whether these
48 volatiles were responsible for the increased attractiveness to mosquitoes by performing behavioral
49 assays. These assays however did not show behavioral modifications induced by these compounds.

50 Our study provides new insights into the comprehension of parasite-human-mosquito interactions, and
51 contribute to improve our understanding of malaria epidemiology.

52

53 **Introduction**

54 Host manipulation by parasites, the strategy by which some parasites alter the phenotype of their hosts
55 in ways that increase transmission, has been described in a large number of host-parasite systems [1].
56 Because of their epidemiological importance, manipulation of vector insects by human or veterinary
57 pathogens has received particular attention [2–4]. Among them, malaria parasites are suspected to
58 induce behavioral changes in their hosts in two different and complementary ways to favor their
59 transmission: by increasing the number of bites of infectious vectors - carrying sporozoites in their
60 salivary glands - to the vertebrate host, or by enhancing the attractiveness of infectious vertebrate hosts
61 - carrying circulating mature gametocytes in the blood - to the mosquito vector.

62 Host manipulation by *Plasmodium* through phenotypical changes in the vertebrate host is supported by
63 multiple evidences [5]. Avian and murine malaria parasites were shown to induce an increased
64 attractiveness of vertebrate hosts [6–8 but see 9]. In humans, people carrying infectious stages of *P.*
65 *falciparum* or *Plasmodium vivax* appeared to be more attractive to the mosquito vectors than non-
66 infected people or people harboring non-infectious stages [10–12]. In these studies, the temporal
67 congruence between parasite transmissible stages and phenotypic changes in the host suggests an
68 adaptive value for the parasite. The phenotypic changes in hosts affecting mosquito behavior are
69 expected to be mediated by volatile compounds [8,13,14]. In mice, host odor changes were associated
70 to infectious stages of *Plasmodium chabaudi* [8]. In human, odor extracts from people infected by *P.*
71 *falciparum* asexual stages revealed quantitative and qualitative variations compared to non-infected
72 people [13,15], sometimes affecting mosquito behavior [15]. Recently, studies showed that blood
73 inhabiting *P. falciparum* parasites emit specific odor profiles [14,16,17]. Moreover, an isoprenoid
74 precursor contained in parasite-infected red blood cells not only increased mosquito motivation to
75 blood feed, but also enhanced their susceptibility to infection, suggesting an additional potential
76 impact on malaria transmission [14]. Therefore, behavioral changes in mosquito vectors were

77 observed according to human infectious status but the emitted volatiles related to infectious parasite
78 stages were only investigated in parasite cultures. Then, consecutive changes in odor profiles of
79 human hosts in nature in regards to infectiousness of parasites remains to be explored.

80 In the present study, we investigated potential odor changes in regards to malaria infection status in
81 naturally-infected volunteers and their potential effect on human attractiveness to mosquito vectors.
82 We collected and analyzed skin odors from volunteers infected by *P. falciparum* at non-infectious and
83 infectious stages, as well as from non-infected counterparts. Odors were collected from each group
84 both before and after antimalarial treatment. We also investigated the electrophysiological and
85 behavioral responses of mosquito vectors to relevant identified volatile organic compounds.

86 **Results**

87 **Chemical composition of foot volatiles**

88 Foot odors were collected among 41 volunteer children after determination of the malaria infection
89 status. Infection status was determined by microscopical observation of blood smears and
90 infectiousness to mosquitoes was measured by DMFA (Direct Membrane Feeding Assays).
91 Confrontation of microscopy and DMFA results revealed discrepancy for one donor: a blood smear
92 identified as non-infected by microscopy corresponded to infectious blood. Indeed, mosquitoes that
93 ingested that blood were dissected seven days post exposure and revealed an infection rate of 50% and
94 a mean infection load of 7.5 oocysts per mosquito. The corresponding odor profile was therefore
95 considered as from an infectious donor. Volunteers were then classified as followed: non-infected (NI,
96 N=7), infected with non-transmissible stages of the parasite (INI, N=8), and infected with infectious
97 stages of the parasite (I, N=26).

98 A total of 39 different volatiles (23 major + 16 minor) was detected and identified among human foot
99 volatiles of the young volunteers included in the study (Table 1). In most samples, the volatile profile
100 was dominated by the presence of two aldehydes: nonanal and octanal, representing respectively
101 44.7% and 9.5% of the total peak area among the odor profiles of volunteers before antimalarial
102 treatment. Some alkanes, dodecane and tetradecane, were found in nearly all samples. Other

103 compounds such as 6-methyl-5-hepten-2-one, octanal, undecanal, geranylacetone and carboxylic acids
 104 (octanoic and nonanoic acids) were also observed. Terpenes, including sesquiterpenes and
 105 monoterpenes, were observed in part of the samples, sometimes representing the main compounds of
 106 the profiles (S1 Fig). Odor collection from empty bags used as control of the ambient air identified
 107 some pollutants which were excluded from analysis. Terpenes were never observed in any of the
 108 control odor collections.

109

110 **Table 1: Main skin volatiles detected among human samples based on their relative proportion**
 111 **in odor profiles.**

Compound	RI ^a	Chemical family ^b	Mean in NI ± SE ^c	Mean in INI ± SE ^c	Mean in I ± SE ^c
sabinene	975	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	1.05 ± 0.53
β-pinene	979	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	0.46 ± 0.29
6-methyl-5-hepten-2-one	982	Terpenes	5.91 ± 1.26	3.12 ± 0.87	2.38 ± 0.89
octanal	1006	Aldehydes	16.03 ± 0.74	11.81 ± 1.91	6.65 ± 1.85
1,8- cineole	1034	Terpenes	6.70 ± 6.70	8.53 ± 5.71	19.03 ± 3.89
terpinolene	1087	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	2.80 ± 1.33
linalool	1102	Terpenes	0.64 ± 0.64	0 ± 0	0 ± 0
nonanal	1104	Aldehydes	47.88 ± 4.58	49.45 ± 5.14	42.22 ± 4.43
dodecane	1200	Alkanes	8.13 ± 1.93	10.12 ± 1.64	2.33 ± 0.92
decanal	1205	Aldehydes	7.60 ± 1.27	8.93 ± 0.63	7.55 ± 1.61
nonanoic acid	1274	Carboxylic acids	0 ± 0	0 ± 0	0.38 ± 0.38
undecanal	1308	Aldehydes	2.94 ± 0.78	2.72 ± 1.28	1.84 ± 0.93
unidentified	1378	NI	0 ± 0	0 ± 0	0.30 ± 0.30
β-bourbonene	1388	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	0.037 ± 0.037
β-elemene	1390	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	0.76 ± 0.37
tetradecane	1400	Alkanes	1.38 ± 0.54	1.79 ± 0.62	0 ± 0
iso-caryophyllene (Z)	1406	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	0.11 ± 0.055
dodecanal	1407	Aldehydes	0.68 ± 0.33	0.71 ± 0.24	0 ± 0
β-caryophyllene (E)	1422	Terpenes	0.70 ± 0.63	0.95 ± 0.38	8.07 ± 2.73
trans-α-bergamotene	1433	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	0.28 ± 0.11
geranylacetone	1448	Terpenes	1.49 ± 0.25	1.88 ± 0.22	2.73 ± 1.45
α-humulene	1459	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	0.35 ± 0.12
bicyclo-germacrene	1499	Terpenes	0 ± 0	0 ± 0	0.68 ± 0.35

112

113 ^a RI= retention index, ^b All non-terpenic compounds are fatty acids derivatives. ^c Values are expressed
 114 as a mean percentage of the peak surfaces relative to total peak surfaces for non-infected (NI, N=7)
 115 infected but non-infectious (INI, N=8) and infectious (I, N=26) volunteers before treatment. SE=
 116 standard error. Volatiles occurring in only one donor and/or volatiles representing less than 1% of the

117 relative proportion of each group were not considered for statistical analyses, and are not presented in
118 this table. This included hexanal, (E)-2-heptanal, benzaldehyde, limonene, decanoic acid, tridecanal,
119 decane, undecane, octanoic acid, (E,E)- 2,4-nonadienal, benzothiazole, (E)-decen-2-al, (E)-undecen-2-
120 ol, dodecanol, pentadecene and pentadecane.

121 **Unpaired analysis of odor profiles before antimalarial treatment**

122 Volatile emissions showed both quantitative and qualitative variation among groups (Table 1). This
123 included 41 unpaired odor profiles. Variations in foot odor blends were investigated according to the
124 infection status of the donors before antimalarial treatment using a partial least squares-discriminant
125 analysis (PLS-DA). Statistical comparisons of the odor profiles of the three groups of donors (NI, INI,
126 I), before treatment showed no significant differences between odor profiles from NI, INI and I
127 volunteers ($p = 0.15$, classification error rate = 37.5%, $N = 41$). However, the PLS-DA representation
128 of these blends revealed a clear overlap between the profiles of NI and INI volunteers (Fig 1A). We
129 therefore tested the correlation between blood infectiousness and donor odor profiles by comparing the
130 profiles from I donors *versus* NI+INI donors. This two categories PLS-DA revealed a significant
131 difference between these profiles ($p = 0.001$, classification error rate = 18.3%, $N = 41$) (Fig 1B).
132 Interestingly, the correlation circle revealed volatile organic compound (VOC) families specific to the
133 two groups of volunteers, with fatty acid derivatives, including aldehydes and alkanes, being more
134 represented in NI+INI and terpenes highly related to odor profiles from I donors (Fig 1C). Wilcoxon
135 tests confirmed the visual representation, showing that relative proportions of aldehydes (undecanal,
136 octanal and dodecanal), alkanes (dodecane and tetradecane) and one C5-terpene (6-methyl-5-hepten-2-
137 one) were significantly higher for non-infectious (NI+INI) donors whereas terpenes (β -caryophyllene,
138 β -elemene, α -humulene, bicylogermacrene, 1,8-cineole and α -bergamotene) were significantly more
139 abundant in samples from infectious (I) donors. We observed that β -caryophyllene was sometimes the
140 main VOC in odor profiles, representing up to 62.85% of the total peak area of an infectious donor.
141 Among I donors, β -caryophyllene was prevalent in 22 out of 26 profiles. Among NI and INI donors,
142 β -caryophyllene was present in 6 out of 15 profiles, with a maximum proportion in the profile of
143 2.63%.

144 We also tested if the composition of the odor bouquet emitted by infectious volunteers was related to
145 both the density of gametocytes in blood and infectivity to mosquitoes. We thus compared odor
146 profiles in regards to the density of gametocytes (i.e. gametocytemia) in blood, the prevalence (i.e.
147 proportion of infected mosquitoes after membrane feeding) and the intensity of infection (i.e. mean
148 number of oocysts per mosquito after membrane feeding) separated into two classes defined by the
149 median of gametocyte densities, prevalences of infection and oocyst loads among exposed mosquitoes.
150 Our data revealed no effect of either gametocytemia ($p = 0.44$, classification error rate = 49.2%),
151 prevalence ($p = 0.94$, classification error rate = 67.7%), or intensity of infection ($p = 0.32$,
152 classification error rate = 49.2%) on volatile emission ($N = 26$).

153 **Paired analysis of odor profiles before/after treatment**

154 In addition to odor profiles before treatment, we obtained the odor profile after antimalarial treatment
155 for a subset of the volunteers. The clearance of gametocytes and non-infectiousness to mosquitoes was
156 verified by DMFA and only individuals that revealed no parasites on blood smears and entailed no
157 infection in mosquitoes were considered as cleared from infection. We then carried paired analysis of
158 odor blends before and after treatment, after parasites have been cleared, using a multilevel PLS-DA
159 (NI, $N=5$; INI, $N=5$; I, $N=13$). When comparing the I chemical profiles before and after successful
160 parasite clearance, the multilevel PLS-DA showed significantly distinct odor profiles ($p = 0.009$,
161 classification error rate = 58%, $N = 13$) (Fig 2A). Although none of the VOCs individually showed
162 significant differences of peak areas before and after antimalarial treatment, the correlation circle
163 showed again that terpenes were more present in odor profiles of infectious donors, whereas the
164 quantities of alkanes and aldehydes were higher after infection clearance (Fig 2B).

165 Odor profiles from non-infectious donors were then compared before/after treatment to test for time
166 and drug effects. As we did not evidence any statistical difference between the non-infected (NI) and
167 infected non-infectious (INI) donors before antimalarial treatment, they were grouped together for
168 performing the paired comparisons before and after antimalarial treatment. Pooling NI and INI
169 together allowed to both increase the size of the sample and compare odor profiles from non-infectious
170 donors which remained non-infectious. Comparisons of chemical profiles from NI+INI donors before

171 and after anti-malarial treatment did not evidence significant differences of volatiles emissions ($p =$
172 0.09, classification error rate = 30%, $N = 10$).

173 **Antennal detection of human skin volatiles**

174 Mosquito antennae were tested for detection of the main compounds identified in the human skin
175 odors by using gas chromatography-electroantennographic detection method (GC-EAD). Synthetic
176 compounds and compounds from skin extracts were respectively tested as odor stimuli by EAG and
177 GC-EAD. When using the synthetic compounds at 0.1% v/v, nonanal, decanal, undecanal, 6-methyl-5-
178 hepten-2-one and geranylacetone and the positive control, lactic acid, all elicited strong EAG
179 responses ($p < 0.0001$). Octanal elicited a marginally significant EAG response ($p = 0.04$). Some of
180 the terpenes typically observed in the skin odor profiles of I group, i.e. β -caryophyllene, β -elemene, α -
181 humulene and β -pinene were also tested. These compounds induced a significant response from the
182 antenna (β -caryophyllene $p < 0.0001$, β -elemene $p = 0.009$, α -humulene $p = 0.002$, β -pinene $p =$
183 0.005) (S2 Fig).

184 As β -caryophyllene appeared to be dominant in some naturally occurring odor profiles of infectious
185 individuals, we used this compound as representative of the terpene compounds. Natural foot odors
186 were then collected from non-infected donors and complemented with synthetic β -caryophyllene at
187 concentrations corresponding to the natural profiles when β -caryophyllene is the dominant volatile.
188 Skin odors extracts with complemented β -caryophyllene were tested for mosquito antennae detection
189 in GC-EAD. This revealed a detection for methyl-heptenone ($p = 0.02$), nonanal ($p = 0.02$), decanal (p
190 $= 0.006$), geranylacetone ($p = 0.005$) and the added β -caryophyllene ($p = 0.004$). Octanal from the skin
191 odor extract was observed on the chromatogram but did not induce any significant detection by the
192 antenna ($p = 0.1$). These results indicate the ability of mosquito antenna to detect most of the VOCs
193 emitted by human skin, including the terpenes at biologically relevant concentrations.

194 **Behavioral assays**

195 Behavioral assays were performed to test whether terpenes observed in human skin odors could affect
196 attractiveness to mosquitoes. We tested the attractiveness of odors profiles of worn socks,

197 complemented or not with a biologically relevant concentration of β -caryophyllene, to *Anopheles*
198 *coluzzii* females.

199 Preliminary assays tested the attractiveness of worn socks compared to clean socks to control for the
200 validity of the experimental set up. Among 412 released mosquito females in 8 cages over 2 days, 91
201 were collected in traps the day after, including 62 in traps containing worn socks and 29 in traps
202 containing clean socks (Fig 3A). These revealed an effect of human odor on mosquito attractiveness,
203 with worn socks attracting significantly more mosquitoes than clean socks ($\chi^2_1 = 10.984$, d.f. = 1, $p =$
204 0.002). For subsequent assays, β -caryophyllene was artificially added to the odor from worn socks by
205 using VOC diffusers. A deactivated GC column, diameter of 0.1mm, allowed to release β -
206 caryophyllene quantity for which the relative peak areas of nonanal/ β -caryophyllene were similar to
207 those observed in the odor profiles of infectious volunteers (S3 Fig). Behavioral assays using worn
208 socks together with diffuser containing pure β -caryophyllene and worn socks together with empty
209 diffusers included 1237 female mosquitoes released in 24 cages over 6 days. Among them, 159 were
210 collected in the control traps and 130 in the traps containing β -caryophyllene with the worn socks.
211 This test did not reveal any significant effect of β -caryophyllene addition on worn socks attractiveness
212 to mosquitoes ($\chi^2_1 = 0.976$, d.f. = 1, $p = 0.33$) (Fig 3B).

213

214 **Discussion**

215 Several studies have recently investigated whether *Plasmodium* infection induces changes in the odor
216 bouquet emitted by the vertebrate hosts in a way that would enhance attractiveness to mosquitoes and
217 favor malaria transmission [5]. Our study investigated for the first time, to our knowledge, the
218 composition of skin volatile emissions from human subjects in relation to *P. falciparum* infection and
219 infectiousness to mosquito vectors. We identified odor profiles that differed according to the infection
220 status, with specific VOCs being significantly more present among gametocyte carriers that were
221 infectious to mosquitoes. Analysis of odor bouquets revealed a higher frequency and abundance of
222 terpenes among odor profiles from infectious donors. Particularly, monoterpenes (1,8-cineole) and

223 sesquiterpenes (β -caryophyllene, β -elemene, α -humulene, bicyclogermacrene, α -bergamotene) were
224 present in significantly higher relative amounts in these donors (I) than in non-infectious ones
225 (NI+INI). On the other hand, specific human skin volatiles such as aldehydes and alkanes showed
226 significant lower relative abundance in the infectious donors. Before/after treatment paired analysis
227 showed that infectious donors lost this characteristic emission of terpenes after they cleared the
228 infection. The strong correlation between odor profiles and infection status was however not perfect
229 with few non-infectious volunteers emitting terpenes and few odor profiles from infectious donors
230 without these compounds. Also, odor profiles did not appear to be related to gametocytemia or to
231 quantitative infectivity to mosquitoes expressed as prevalence of infection or infection load among
232 exposed mosquitoes. We showed that *An. gambiae* female antennae were able to detect most of the
233 VOCs, including terpenes, collected from human skin, at biologically relevant doses. Among the
234 terpenes identified as indicative of infectious patients, we selected β -caryophyllene to test its potential
235 to increase attractiveness of human odor to mosquitoes, but we did not find evidence for such change
236 in mosquito behavior induced by this VOC.

237 The volatile compounds emitted by skin and related to the presence of parasite infectious stages in
238 human blood were mostly terpene products, including both monoterpenes and sesquiterpenes.
239 Terpenes are very common compounds and are often found in volatile emissions from plants, both
240 monoterpenes and sesquiterpenes being often released by flowers [18]. Although terpenes are
241 sometimes cited in odors from vertebrates [19], they are not known to be naturally produced by
242 mammals, except a few particular VOCs, such as C5-terpenes, 6-methyl-5-hepten-2-one and
243 geranylacetone, or the less volatile C30 squalene, which is the main precursor of sterols [20]. Two
244 biosynthetic pathways are known to allow the production of terpene products: the mevalonate (MVA)
245 pathway from acetyl-CoA to sesquiterpenes, and the methylerythritol phosphate (MEP) pathway from
246 pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate to monoterpenes [21]. In both pathways, terpene
247 biosynthesis involves numerous specific enzymes, namely terpene synthases, which are primarily and
248 widely present in plants, fungi and bacteria [22–24]. A few monoterpene synthases have also been
249 found in social amoebae [25] and in insects [26,27]. However, terpene synthases have yet never been

250 found in mammals, which are thus not known as capable to produce mono- or sesquiterpenes
251 [19,22,28]. For these reasons, a plausible explanation for the presence of terpenes among skin
252 emanations might be that these VOCs are not produced by humans but rather by the parasite itself, and
253 would then transit to human blood and skin surface. Accordingly, a plant-like structure named
254 apicoplast and responsible for isoprenoid precursors biosynthesis has been described in *Plasmodium*
255 species and the MEP pathway has been shown to be active in all intra-erythrocytic forms of *P.*
256 *falciparum* [29–31]. Moreover, the key enzyme responsible for sesquiterpene biosynthesis, the
257 farnesyl diphosphate synthase, is also active in the parasite [32]. Therefore, these evidences support *P.*
258 *falciparum* ability to release terpenes. Isoprenoids produced by the apicoplast through the MEP are
259 necessary for the synthesis of gametocytes and their subsequent infectivity to mosquitoes, which
260 suggests that the release of monoterpenes could be linked to the production of gametocytes [33].
261 Consistently, terpenes were observed in volatile collections from *P. falciparum* parasites cultures.
262 Indeed, sesquiterpenes were observed among VOC headspace extracts of from *P. falciparum* parasites
263 cultures in human red blood cells [16]. More recently, the study from Emami and colleagues [14]
264 evidenced the presence of an isoprenoid precursor, (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
265 (HMBPP) from gametocyte-infected red blood cells, which triggered human red blood cells to release
266 monoterpenes, such as α -pinene, β -pinene, and limonene. All together, these findings support the
267 hypothesis that *P. falciparum* blood stages can release terpenes and that gametocytes may produce
268 specific profiles. In our study, we observed an association between skin odor profiles and infectious
269 status of people, with mainly monoterpenes and sesquiterpenes associated with infectious status.
270 Although the study from Emami and colleagues did not detect the presence of sesquiterpenes, the
271 observed isoprenoid precursor in gametocyte cultures, HMBPP, is the same isoprenoid precursor of
272 the two terpene building blocks (isopentenyl pyrophosphate and dimethylallyl pyro-phosphate) used
273 for the synthesis of sesquiterpenes [22,28]. The presence of isoprenoid precursor in gametocyte
274 infected red blood cells therefore consolidates our observations. If terpenes were not detected in some
275 studies on odor profiles from infected people, it might be due to the fact that infectious stages were not
276 considered [13,15,17].

277 An alternative hypothesis for the skin emanation of terpenes associated with *P. falciparum*
278 infectivity in humans may be that terpenes could be derived-products of skin microbiota.
279 Microorganisms are suspected to explain variability in skin emanations among people [34–36]. It this
280 known that bacteria are able to biosynthesize various terpenoid compounds [24,37], but whether skin
281 microbiota might be able to produce terpene products, and particularly under influence of parasite
282 infection is unknown [35,38–40].

283 Another explanation for the presence of terpene products in skin odors might be that terpenes
284 originate from plants ingested by human subjects following malaria disease symptoms. A specific diet
285 or traditional remedies taken by infected people might both result in skin terpene emanations and
286 stimulate gametocyte production. Indeed, traditional medicinal plants ingested for their potential anti-
287 malarial properties may result in the presence of numerous phytochemicals in human blood, such as
288 terpenoid compounds [41,42]. If they affect malaria parasite, they may also favor gametocytogenesis
289 as it was already showed for some antimalarial drugs [43–46]. The chemical composition of natural
290 plant extracts and their antimalarial activity have been investigated in many studies [47–49], but little
291 is known about their potential effect on gametocytogenesis. Moreover, the influence of diet on the
292 composition of human skin odors has received very little attention, except a few studies that reported
293 modification of human volatiles following a particular diet [50–52]. Therefore, few clues are available
294 so far to estimate the plausibility of these different hypotheses, and further investigations are needed to
295 test them.

296 The observed human odors associated with *P. falciparum* infection appear to be timely consistent with
297 parasite transmission stage, given that we observed more frequent and abundant terpenes emissions for
298 gametocyte carriers actually infectious to mosquitoes. This congruence between phenotypic changes in
299 the host and the transmissions stages of the parasite favors the hypothesis that parasite may manipulate
300 host odor, increasing attractiveness to vectors and favoring its transmission. Accordingly, we
301 demonstrated the ability of mosquito antennae to detect the VOCs associated to infectious stages.
302 Terpenes are involved in numerous olfactory interactions between insects and other organisms.
303 Mosquitoes, are regular plant visitors, looking for floral nectar or other plant sugar sources [53,54].

304 Sugar feeding on plants play a crucial role in mosquito fitness [55–57], and host plant location and
305 selection by mosquitoes have been shown to be mediated by olfactory cues [58–60]. It is therefore
306 expected that adult mosquitoes are capable to detect plant compounds. Among them, β -caryophyllene,
307 is a common constituent of many plant essential oils, and has been reported to occur in the floral
308 scents of 52% of plant families [18]. Interestingly, β -caryophyllene is often one of the main volatile
309 released by herbivore-damaged plants to attract natural enemies of the pest and mitigating the effects
310 of herbivory [61–63]. In plant-pathogen systems, similar odor modifications following infection have
311 been observed. For instance, some authors observed that blueberry infected leaves mimic floral scents
312 produced by flowers, which increases the attractiveness to the pollinators responsible for the
313 transmission and thus may favor pathogen circulation [64]. Taken together, these results highlight the
314 importance of terpenes, and particularly β -caryophyllene, in communication within insect-pathogen
315 systems. In the present study, we tested the effect of β -caryophyllene added to attractive human odor
316 extracts on mosquito attractiveness and we did not detect any increase in attractiveness to mosquitoes.
317 This does not support the hypothesis of parasite manipulation by host odor changes. However, it is
318 likely that the addition of β -caryophyllene only to human odor extract did not catch the natural odor
319 changes, consisting of a mix of multiple compounds possibly interacting with each other, and missed
320 to induce the behavioral changes in mosquitoes that may actually happen when facing infectious
321 humans. It is known that odor bouquets may induce various behavior changes in insects, depending on
322 dose, ratio and composition for multiple compounds [65,66]. Further studies will thus have to examine
323 the relative importance of different compounds (and not only the dominant β -caryophyllene) found in
324 skin odors of infectious subjects to precisely evaluate the effects of observed terpenes on human odor
325 attractiveness to mosquito.

326 Our study revealed odor profiles associated to infectious status in people infected by *P. falciparum*,
327 with predominance of terpenes among the characteristic compounds. Although we did not evidence
328 the effect of terpenes on odor attractiveness to mosquitoes, our study strengthens previous
329 observations that *P. falciparum* transmissible stages can alter the odor profile of human hosts, and that
330 terpenes could play a role in manipulation by malaria parasites. Because such parasitic manipulation

331 may have major impact on transmission of the deadliest parasitic disease for human being, deciphering
332 further its importance and mechanisms is of crucial interest.

333

334 **Material and methods**

335 **Ethics statement**

336 Ethical approval was obtained from the Centre Muraz institutional ethics committee under the ethical
337 clearance number A003-2009/CE-CM. All human volunteers were enrolled after written informed
338 consent from the participant and/or their legal guardians.

339 **Human volunteers**

340 Volunteers were recruited among asymptomatic children in villages in the vicinity of Bobo-Dioulasso,
341 Burkina Faso. Because children are usually more likely to be infected with malaria parasites than
342 adults, 5 to 12 year-old school pupils were recruited. Thick blood smears were carried out from each
343 volunteer and examined by light microscopy for the presence of *P. falciparum*. Parasites were counted
344 against 200 leucocytes for the trophozoite parasite stages, and against 1000 leucocytes for
345 gametocytes. Parasite densities were estimated on the basis of 8000 leucocytes/ μ L. Forty one
346 volunteers were included according to their infection status determined from thick blood smears. At
347 the time of inclusion, 7 volunteers were identified as non-infected, 8 carried *P. falciparum*
348 trophozoites only and 26 carried gametocytes, most of the time in co-occurrence with trophozoites. A
349 first venous blood sampling was performed to test infectivity to mosquitoes and odor collection was
350 carried out in the laboratory for 2 or 3 volunteers at a time, the day after first blood smear. Anti-
351 malarial artesunate-amodiaquine treatments were then administered by the medical team in the village
352 health center. According to the decision of the local medical doctor, all volunteers received this
353 treatment regardless on their infection status. All volunteers were driven again to the laboratory 7 days
354 after the first sample collection, and infection status was again tested on blood smear. If parasites
355 clearance was not observed, the volunteer was tested again seven days to one month later until being

356 found as non-infected. At that time, skin odors were collected and venous blood was withdrawn from
357 the volunteer to test again infectivity to mosquitoes. For electrophysiology and behavioral assays, skin
358 odor samples were collected from adult volunteers that were not infected by malaria parasites.

359 **Skin odor collection and GC-MS analysis**

360 Collection of volatile organic compounds (VOC) from skin were performed on feet, based on the
361 observations that *An. gambiae* mosquitoes preferentially feed on this area of the body [67,68]. Before
362 sampling, one foot of each subject was washed with tap water and left to air dry for 10 minutes. The
363 foot was enclosed in a Nalophan bag, closed at the two sides by using elastic bracelets. Volatile
364 compounds were collected by a ChromatoProbe using a dynamic headspace collection method, as
365 previously described [69]. ChromatoProbes are quartz micro-vials (Varian Inc.; length: 15mm; inner
366 diameter: 2 mm), cut at the closed end, and filled with 1.5 mg Carbotrap B (mesh 20–40, Supelco,
367 Bellefonte, USA) and 1.5 mg Tenax-TA (mesh 60–80; Supelco, Bellefonte, USA). For each volatile
368 collection, a ChromatoProbe connected to a pipe was inserted in the Nalophan bag through a small
369 hole. The pipe was linked to flowmeters and to a suction pump, and the air inside the bag was
370 withdrawn at the flow rate of 300 ml min⁻¹ for 20 minutes. To control for the ambient air, a control bag
371 was simultaneously sampled using the same parameters by collecting volatiles from an empty
372 Nalophan bag during the same time. A subset of odor collection was carried out in parallel by using
373 solid phase micro extraction (SPME) and showed similar results [69]. ChromatoProbes were
374 processed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), trapping tubes being loaded into a
375 ChromatoProbe transferline which allowed direct thermal desorption into the GC injector. Analyses
376 were conducted using electronic impact ionization mode on a Varian Saturn 2000 ion trap
377 spectrometer, interfaced with a Varian GC CP-3800 apparatus. The Varian CP-3800 was equipped
378 with a 1079PTV injector (Programmed temperature Vaporizator) with the ChromatoProbe transferline
379 (Varian, Walnut Creek, USA), and a 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness ID WCOT CPSil 8CB
380 fused silica capillary column (Chrompack®, Bergen op Zoom, The Netherlands), with helium as
381 carrier gas (1 ml min⁻¹), and programmed 2 min isothermal at 50 °C, then 50 °C to 250 °C at 5 °C
382 min⁻¹. Mass spectra were recorded in electronic impact (EI) at 70 eV, and identified by matching the

383 mass spectra with data of the NIST 98 MS software library (Adams 2007) and personal laboratory
384 bank. Compound identification was confirmed by comparison of retention index (RI) with data from
385 libraries and published data (Adams 2007). Peak areas were measured using Star Chromatography
386 Software. The relative proportion of each compound in the odor bouquet was expressed as the
387 percentage of its peak areas to the total peak areas for each sample. Volatiles occurring in only one
388 donor and those representing less than 1% of the relative proportion of each group were discarded
389 from statistical analysis.

390 **Infectiousness of human volunteers to mosquitoes**

391 Submicroscopic parasitemia are known to play a role in malaria transmission [70]. In order to avoid
392 potential bias of parasite detection by blood smear, all children included for odor collection were also
393 tested for infectiousness to mosquitoes. For each of them and at each session of odor collection,
394 venous blood was collected and tested for its infectiousness to malaria vectors by direct membrane
395 feeding assay (DMFA) [71]. Venous blood was collected into heparinized tubes. Starved three to four
396 day old *An. coluzzi* females were distributed in 2 paper cups at a density of 50 mosquitoes per cup and
397 were allowed to feed on this blood through a membrane for one hour. Non-fed or partially fed females
398 were removed and discarded, while the remaining fully-engorged mosquitoes were placed in 30 cm ×
399 30 cm × 30 cm mesh-covered cages and maintained under the standard conditions of 27 ± 2°C, 70 ±
400 5% relative humidity for 7 days. Mosquitoes were then dissected and their midgut stained by using
401 mercurochrome 0.5%, oocysts were detected and numbered by using light microscopy. Blood samples
402 that entailed infection in at least one mosquito was considered as infectious.

403 **Electroantennography assays**

404 Electroantennography assays were performed using *An. gambiae* s.s. females of the Kisumu strain.
405 Mosquitoes were reared at 27°C with 80% of relative humidity. Female mosquitoes were used 7 days
406 after emergence, without prior access to blood. Each female mosquito was immobilized 5 minutes at
407 3°C. The head was cut and separated from the thorax, and put into a glass capillary (L: 76 mm, Ø: 1.12
408 mm) (World Precision Instrument, Sarasota, USA) pulled and cut using a vertical micropipette-puller

409 (P-30 model, World Precision Instruments, Hertfordshire, United Kingdom). The capillary was
410 previously filled with an electrolytic solution of ringer ($8.0 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$, $0.4 \text{ g l}^{-1} \text{ KCl}$, $0.4 \text{ g l}^{-1} \text{ CaCl}_2$) and
411 connected to a reference electrode. The tip of one antenna was placed into the recording electrode, also
412 filled with the electrolytic solution, at the opposite side of the reference electrode. A stimulus
413 controller (CS-55 Syntech, Hilversum, The Netherlands) was set to provide a continuous flow of
414 purified and humidified air, passing through a glass tube to the antenna at a flow rate of 330 ml min^{-1} .
415 Electroantennography assays were performed using the coupled gas chromatography-
416 electroantennographic detection method (GC-EAD).

417 Two series of electroantennography assays were carried out. In a first experiment, synthetic volatile
418 compounds were used. They were selected among volatiles identified previously by GC-MS from skin
419 odor samples. Among these compounds, we made a selection of volatiles that appeared discriminant
420 between groups of volunteers and that were available as pure synthetic compounds. Although lactic
421 acid was not detected among skin odor samples in our experiments, this compound was included as a
422 positive control [72]. A mix of lactic acid, nonanal, octanal, decanal, undecanal, geranylacetone, 6-
423 methyl-5-hepten-2-one, β -elemene, β -caryophyllene, β -pinene, and 1,8-cineole (Sigma Aldrich) was
424 made at 0.1% v/v in dichloromethane. A volume of $4 \mu\text{l}$ of the solution was injected in a gas
425 chromatograph (CP-3800, Varian INC., Palo Alto, USA) equipped with a flame ionization detector
426 (FID), a split/splitless injector 1079 (200°C) and a $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ film thickness Optima
427 5-MS fused silica capillary column (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Helium was used as carrier
428 gas (1 ml min^{-1}), and the oven temperature was programmed from 70°C to 100°C at 3°C min^{-1} , then
429 from 100°C to 180°C at 7°C min^{-1} . Antennal electrical responses to volatile compounds were
430 measured for 11 female mosquitoes and digitized using an IDAC board (acquisition controller IDAC-
431 2; Syntech, Hilversum, the Netherlands) and data was processed with a PC-based interface and
432 software package (GcEad 1.2.5, Syntech).

433 The second series of electroantennography assays were carried out in order to determine whether β -
434 caryophyllene was detected by mosquitoes at biologically relevant concentrations. Because terpenes
435 appeared significantly more present in skin odors from infectious volunteers, and because β -

436 caryophyllene showed high peak areas, being the dominant volatile in profiles of several gametocyte
437 carriers, we selected this compound to test its detection by mosquitoes. We mimicked a natural
438 concentration of β -caryophyllene in an extract of natural skin odor by injecting synthetic β -
439 caryophyllene within a ChromatoProbe microvial following an odor capture of volunteers that were
440 never exposed to malaria infection. Skin odors were collected by a ChromatoProbe using a dynamic
441 headspace collection method as described above. To determine the quantity of β -caryophyllene
442 relevant to add within the chromatoprobe microvial, we used the ratio of peak areas [nonanal/ β -
443 caryophyllene] in the chromatogram from infectious volunteers. Nonanal was used as a reference, as it
444 occurs as a major compound in human skin odor profiles. Among all infectious volunteers, the ratio of
445 peak areas ranged from 0.1 to 140, with a mean ratio of 4. By injecting 720ng of β -caryophyllene in
446 chromatoprobe microvials obtained from non-infected people, we were able to recreate a nonanal/ β -
447 caryophyllene ratio of 0.8, corresponding to the lowest ratios observed among infectious children
448 (5/26 children had a ratio below 1), and so to mimic odor profiles of children who emitted the highest
449 quantities of β -caryophyllene. Antennal electrical responses from 8 female mosquitoes to volatile
450 compounds from chromatoprobe microvials were recorded by GC-EAD using the same device and
451 program as previously described above for synthetic compounds.

452 **Behavioral assays**

453 Behavioral assays were conducted to test the effect of β -caryophyllene, identified as significantly
454 associated with *P.falciparum* infectious stages, on attractiveness to mosquito vectors. As described
455 above, we added β -caryophyllene to natural human odor extracts and compared the behavioral
456 responses of female mosquitoes to odors of non-infected volunteers with *versus* without the addition
457 of β -caryophyllene. The odor samples, consisting of worn socks, were placed into traps, each of them
458 made of a 15×15×15 cm mesh-covered cage for which the net was raised 3 cm above the ground to
459 allow mosquitoes to enter. Four traps were placed into a large 100×100×100 cm releasing cage fully
460 covered by mesh. Attraction was tested by releasing starved 3-5 days *An. coluzzi* females in the
461 releasing cage in the evening and counting the number of female mosquitoes caught in each trap in the

462 following morning. The validity of the experimental set up was controlled by measuring attractiveness
463 of human odors to adult female mosquitoes. To do this, socks worn for 12 hours by human volunteers
464 non-infected by *P. falciparum* were placed in two out of four traps of each releasing cage, whereas
465 unworn socks were placed within the two other traps. Four large cages were used in parallel for 2
466 consecutive nights, allowing to perform 8 assays. Mosquitoes were released in the cages in groups
467 ranging from 45 to 62 individuals per assay. We then aimed to mimic the odor from *P. falciparum*
468 infectious people by adding β -caryophyllene to worn socks odor using a diffusor, i.e. a 1 ml glass vial,
469 in which a 4cm-long piece deactivated fused silica chromatography column was inserted through a
470 small hole on the lid, so that a VOC inside the vial can evaporate slowly and diffuse regularly through
471 the column. Preliminary laboratory chemical tests, which consisted of measuring the exact daily
472 quantity of evaporating compounds over a one-month period confirmed the regular evaporation of the
473 different compounds tested for several days (B. Buatois, pers. Com.). In these tests, the use of different
474 diameters of deactivated chromatography columns resulted in different evaporation rates. For our
475 study, the vials were filled with 500 μ L of pure synthetic β -caryophyllene. We carried out preliminary
476 tests to define the adequate column diameter and calculated the relative proportion of β -caryophyllene
477 compared to nonanal from worn socks depending on 3 diameters of columns (0.1, 0.25 or 0.53 mm)
478 (Agilent, USA). To do this, the diffusor containing pure β -caryophyllene was placed with a worn sock
479 in a container, and the odor was collected during 30 min by using SPME fibers (65 μ m PDMS-DVB
480 Stableflex fibers, Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA). SPME extracts were then analyzed
481 with the same GC-MS method described above for the analyses of human skin odors. β -caryophyllene
482 peak area was compared to nonanal peak area, in order to identify a column diameter that produces a
483 nonanal/ β -caryophyllene ratio (from the sock and the diffusor respectively) similar to those previously
484 observed in skin odor profiles from infectious volunteers (S3 Fig). For mosquito behavioral assays,
485 half worn socks were placed into the 4 traps in a large cage as described above. Diffusor, using 0.1mm
486 chromatography columns and containing 500 μ L of pure synthetic β -caryophyllene were placed into 2
487 of the traps and empty diffusors were used as control into the two other traps. Starved 3-5 days *An.*
488 *coluzzi* females (n= 37 to 61) were released in the large cage in the evening and the number of female

489 mosquitoes in each trap was counted in the following morning. Four large cages using odor collection
490 from 4 different odor donors were used in parallel during 6 consecutive nights, allowing 24 assays.
491 Mosquito choice was measured as the number of mosquitoes caught in each trap divided by the total
492 number of mosquitoes caught in the 4 traps.

493 **Statistical analyses**

494 Odor bouquets from human volunteers were analyzed according to their infection status. Human
495 volunteers were identified according to the blood smears and infectiousness to mosquitoes measured
496 by DMFA. When no parasite was observed on the blood smear and no mosquito was found infected,
497 the volunteer was identified as non-infected (NI). When trophozoites were observed on the blood
498 smear and no oocyst detected in exposed mosquitoes, the donor was identified as infected but non-
499 infectious even if gametocytes were observed on slides (INI). When oocysts were observed in
500 mosquitoes, the blood donor was identified as infectious (I). This includes donors carrying or not
501 trophozoites.

502 All statistical analyses were implemented using the R software (3.3.2)[73]. Odor profiles of the three
503 groups of children before antimalarial treatment were compared using a partial least squares-
504 discriminant analysis (PLS-DA, packages ade4, mixOmics, RVAideMemoire). Then, the effect of
505 infectiousness on odor profile was measured by comparing the bouquets of infectious (I) versus non-
506 infectious volunteers (INI+NI). For these analyses, each volunteer was included once. A permutation
507 test based on cross validation (M fold method) was performed to estimate the statistical significance
508 (999 permutations) of the classification error rate. The relative proportion of each volatile in the odor
509 bouquet was also compared using Wilcoxon signed-rank tests.

510 We then evaluated the effect of gametocytemia and quantitative infectivity to mosquito on volatiles
511 emission. Analyses were performed on gametocyte carriers before antimalarial treatment (N = 26). We
512 compared odor bouquets according to the number of gametocytes, the proportion of infected
513 mosquitoes (prevalence) and the mean number of oocysts (intensity of infection). For each parameter
514 measured, median was calculated and children were subsequently classified into either low or high

515 class (gametocytemia: median = 160 gametocytes/ μ L; prevalence: median = 62.6%; intensity: median
516 = 13.85 oocyst per mosquito). PLS-DA were used to compare odor profiles of the two classes for each
517 parameter, with a permutation test based on cross validation (999 permutations).

518 Paired analysis before/after antimalarial treatment for infectious and non-infectious (INI+NI) people
519 were carried out using a multilevel PLS-DA. Once again, a permutation test based on cross validation
520 (999 permutations) was performed and the relative proportion of each volatile was compared before
521 and after treatment using Wilcoxon signed-rank tests.

522 To determinate the antennal response to each VOC in electroantennography assays, we considered the
523 amplitude of depolarization induced by the stimulus compared to the corresponding baseline and
524 significance of the responses were tested by using Paired t-tests as previously described [74]. Choice
525 preference was analyzed by using Generalized Linear Mixed Models (GLMM function, binomial error
526 distribution, logit link function; lme4 package) by testing the effect of the presence/absence of β -
527 caryophyllene on mosquito attraction. The day of experiment and the identity of the odor donor was
528 included as a random effect.

529

532 **Acknowledgements**

533 The authors would like to acknowledge N. Barthes and B. Buatois from the CEFE's platform of
534 chemical analyses in ecology (PACE) for technical assistance in chemical analyses. We would like to
535 thank all volunteers for participating in this study as well as the local authorities for their support. We
536 are very grateful to the IRSS staff in Burkina Faso for technical assistance. We thank the Labex
537 CeMEB (Montpellier) for financial support. We are also grateful to M. Hervé and F. Nicolè for useful
538 suggestions about statistical analysis.

539 **References**

- 540 1. Hughes D., Brodeur J, Thomas F. Host manipulation by parasites. Oxford, UK: Oxford
541 University Press. 2012.
- 542 2. Hurd H. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu Rev*
543 *Entomol.* 2003;48: 141–161. doi:10.1146/annurev.ento.48.091801.112722
- 544 3. Lefèvre T, Thomas F. Behind the scene, something else is pulling the strings: Emphasizing
545 parasitic manipulation in vector-borne diseases. *Infect Genet Evol.* 2008;8: 504–519.
546 doi:10.1016/j.meegid.2007.05.008
- 547 4. Stanczyk NM, Mescher MC, De Moraes CM. Effects of malaria infection on mosquito
548 olfaction and behavior: extrapolating data to the field. *Curr Opin Insect Sci.* 2017;20: 7–12.
549 doi:10.1016/j.cois.2017.02.002
- 550 5. Busula AO, Verhulst NO, Bousema T, Takken W, Boer JG De. Mechanisms of *Plasmodium* -
551 Enhanced Attraction of Mosquito Vectors. *Trends Parasitol.* 2017; 1–13.
552 doi:10.1016/j.pt.2017.08.010
- 553 6. Cornet S, Nicot A, Rivero A, Gandon S. Malaria infection increases bird attractiveness to
554 uninfected mosquitoes. *Ecol Lett.* 2013;16: 323–329. doi:10.1111/ele.12041
- 555 7. Cornet S, Nicot A, Rivero A, Gandon S. Both infected and uninfected mosquitoes are attracted

- 556 toward malaria infected birds. *Malar J.* 2013;12: 179. doi:10.1186/1475-2875-12-179
- 557 8. De Moraes CM, Stanczyk NM, Betz HS, Pulido H, Sim DG, Read AF, et al. Malaria-induced
558 changes in host odors enhance mosquito attraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 1–6.
559 doi:10.1073/pnas.1405617111
- 560 9. Lalubin F, Bize P, van Rooyen J, Christe P, Glaizot O. Potential evidence of parasite avoidance
561 in an avian malarial vector. *Anim Behav.* 2012;84: 539–545.
562 doi:10.1016/j.anbehav.2012.06.004
- 563 10. Batista EP, Costa EF, Silva AA. *Anopheles darlingi* (Diptera: *Culicidae*) displays increased
564 attractiveness to infected individuals with *Plasmodium vivax* gametocytes. *Parasit Vectors.*
565 2014;7: 251. doi:10.1186/1756-3305-7-251
- 566 11. Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JC. Malaria infection increases attractiveness
567 of humans to mosquitoes. *PLoS Biol.* 2005;3: 1590–1593. doi:10.1371/journal.pbio.0030298
- 568 12. Busula AO, Bousema T, Mweresa CK, Masiga D, Logan JG, Sauerwein RW, et al.
569 Gametocytemia and Attractiveness of *Plasmodium falciparum*–Infected Kenyan Children to
570 *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *J Infect Dis.* 2017;216: 291–5. doi:10.1093/infdis/jix214
- 571 13. Berna A, McCarthy J S, Wang X R, Saliba K J, Bravo F G, Cassells J, et al. Biomarkers of
572 infection with *Plasmodium falciparum* detected in human breath. *J Infect Dis.* 2015; 1–21.
- 573 14. Emami SN, Lindberg BG, Hua S, Hill S, Mozuraitis R, Lehmann P, et al. A key malaria
574 metabolite modulates vector blood seeking, feeding, and susceptibility to infection. *Science*
575 (80-). 2017; 1076–1080. doi:10.1126/science.aah4563
- 576 15. de Boer JG, Robinson A, Powers SJ, Burgers SLGE, Caulfield JC, Birkett MA, et al. Odours of
577 *Plasmodium falciparum*-infected participants influence mosquito-host interactions. *Sci Rep.*
578 2017;7: 9283. doi:10.1038/s41598-017-08978-9
- 579 16. Kelly M, Su CY, Schaber C, Crowley JR, Hsu FF, Carlson JR, et al. Malaria parasites produce
580 volatile mosquito attractants. *MBio.* 2015;6: 1–6. doi:10.1128/mBio.00235-15

- 581 17. Correa R, Coronado LM, Garrido AC, Durant-Archibold AA, Spadafora C. Volatile organic
582 compounds associated with Plasmodium falciparum infection in vitro. *Parasit Vectors*.
583 2017;10: 215. doi:10.1186/s13071-017-2157-x
- 584 18. Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Stahl B. Diversity and Distribution of Floral Scent. *Bot*
585 *Rev*. 2006;72: 1–120. doi:10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOFS]2.0.CO;2
- 586 19. Charpentier MJE, Barthes N, Proffit M, Bessi re JM, Grison C. Critical thinking in the
587 chemical ecology of mammalian communication: Roadmap for future studies. *Funct Ecol*.
588 2012;26: 769–774. doi:10.1111/j.1365-2435.2012.01998.x
- 589 20. Bloch K. Sterol molecule : structure, biosynthesis, and function. *Steroids*. 1992;57: 378–383.
- 590 21. Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. Biochemistry of Plant Volatiles 1. *Plant Physiol*.
591 2004;135: 1893–1902. doi:10.1104/pp.104.049981.1
- 592 22. Dewick P. Medicinal natural products. *Pharm Sci*. 2002;471496405: 486.
593 doi:10.1016/j.jbiosc.2010.01.005
- 594 23. Schmidt-Dannert C. Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Adv Biochem Eng*
595 *Biotechnol*. 2014;123: 127–141. doi:10.1007/10
- 596 24. Yamada Y, Kuzuyama T, Komatsu M, Shin-Ya K, Omura S, Cane DE, et al. Terpene synthases
597 are widely distributed in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: 857–62.
598 doi:10.1073/pnas.1422108112
- 599 25. Chen X, K llner TG, Jia Q, Norris A, Santhanam B, Rabe P, et al. Terpene synthase genes in
600 eukaryotes beyond plants and fungi: Occurrence in social amoebae. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
601 2016;113: 12132–12137. doi:10.1073/pnas.1610379113
- 602 26. Gilg AB, Bearfield JC, Tittiger C, Welch WH, Blomquist GJ. Isolation and functional
603 expression of an animal geranyl diphosphate synthase and its role in bark beetle pheromone
604 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 9760–9765. doi:10.1073/pnas.0503277102
- 605 27. Beran F, Jiménez-Alem n GH, Lin M ying, Hsu YC, Mewis I, Srinivasan R, et al. The

- 606 Aggregation Pheromone of *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: *Chrysomelidae*) Revisited. J
607 Chem Ecol. 2016;42: 748–755. doi:10.1007/s10886-016-0743-6
- 608 28. McGarvey DJ, Croteau R. Terpenoid metabolism. Plant Cell. 1995;7: 1015–1026.
609 doi:10.1105/tpc.7.7.1015
- 610 29. Cassera MB, Gozzo FC, D’Alexandri FL, Merino EF, Del Portillo HA, Peres VJ, et al. The
611 methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of
612 *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem. 2004;279: 51749–51759. doi:10.1074/jbc.M408360200
- 613 30. Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. Philos Trans
614 R Soc B. 2010;365: 749–763. doi:10.1098/rstb.2009.0273
- 615 31. Guggisberg AM, Amthor RE, Odom AR. Isoprenoid biosynthesis in *Plasmodium falciparum*.
616 Eukaryot Cell. 2014;13: 1348–1359. doi:10.1128/EC.00160-14
- 617 32. Jordão FM, Gabriel HB, Alves JM, Angeli CB, Bifano TD, Breda A, et al. Cloning and
618 characterization of bifunctional enzyme farnesyl diphosphate/geranylgeranyl diphosphate
619 synthase from *Plasmodium falciparum*. Malar J. 2013;12: 184. doi:10.1186/1475-2875-12-184
- 620 33. Wiley JD, Merino EF, Krai PM, McLean KJ, Tripathi AK, Vega-Rodríguez J, et al. Isoprenoid
621 precursor biosynthesis is the essential metabolic role of the apicoplast during
622 gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. Eukaryot Cell. 2015;14: 128–139.
623 doi:10.1128/EC.00198-14.
- 624 34. Penn DJ, Oberzaucher E, Grammer K, Fischer G, Soini HA, Wiesler D, et al. Individual and
625 gender fingerprints in human body odour. J R Soc Interface. 2007;4: 331–40.
626 doi:10.1098/rsif.2006.0182
- 627 35. Verhulst NO, Qiu YT, Beijleveld H, Maliepaard C, Knights D, Schulz S, et al. Composition of
628 human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. PLoS One. 2011;6:
629 e28991. doi:10.1371/journal.pone.0028991
- 630 36. Troccaz M, Gaïa N, Beccucci S, Schrenzel J, Cayeux I, Starkenmann C, et al. Mapping axillary

- 631 microbiota responsible for body odours using a culture-independent approach. *Microbiome*.
632 2015;3: 3. doi:10.1186/s40168-014-0064-3
- 633 37. Cane DE, Ikeda H. Exploration and mining of the bacterial terpenome. *Acc Chem Res*.
634 2012;76: 211–220. doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid
- 635 38. Verhulst NO, Beijleveld H, Knols BG, Takken W, Schraa G, Bouwmeester HJ, et al. Cultured
636 skin microbiota attracts malaria mosquitoes. *Malar J*. 2009;8: 302. doi:10.1186/1475-2875-8-
637 302
- 638 39. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9: 244–253.
639 doi:10.1038/nrmicro2537.The
- 640 40. Verhulst NO, Takken W, Dicke M, Schraa G, Smallegange RC. Chemical ecology of
641 interactions between human skin microbiota and mosquitoes. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010;74:
642 1–9. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00908.x
- 643 41. Wells TN. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to
644 our roots? *Malar J*. 2011;10: S1–S3. doi:10.1186/1475-2875-10-S1-S3
- 645 42. Amoa Onguéné P, Ntie-Kang F, Lifongo L, Ndom J, Sippl W, Mbaze L, et al. The potential of
646 anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part I: a pharmacological
647 evaluation of alkaloids and terpenoids. *Malar J*. 2013;12: 4–25. doi:10.1186/1475-2875-12-449
- 648 43. Buckling AG, Taylor LH, Carlton JM, Read AF. Adaptive changes in *Plasmodium*
649 transmission strategies following chloroquine chemotherapy. *Proc Biol Sci*. 1997;264: 553–9.
650 doi:10.1098/rspb.1997.0079
- 651 44. Buckling AGJ, Read AF. The effect of chloroquine treatment on the infectivity of *Plasmodium*
652 *chabaudi* gametocytes. *Int J Parasitol*. 1999;29: 619–625. doi:10.1016/S0020-7519(98)00230-6
- 653 45. Buckling AG, Ranford-Cartwright LC, Miles A, Read AF. Chloroquine increases *Plasmodium*
654 *falciparum* gametocytogenesis in vitro. *Parasitology*. 1999; 339–346.
- 655 46. Ali E, Mackinnon MJ, Abdel-Muhsin AMA, Ahmed S, Walliker D, Babiker HA. Increased

- 656 density but not prevalence of gametocytes following drug treatment of *Plasmodium falciparum*.
657 Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100: 176–183. doi:10.1016/j.trstmh.2005.04.021
- 658 47. Titanji VPK, Zofou D, Ngemenya MN. The antimalarial potential of medicinal plants used for
659 the treatment of malaria in Cameroonian folk medicine. Afr J Tradit Complement Altern Med.
660 2008;5: 302–21.
- 661 48. Karunamoorthi K, Sabesan S, Jegajeevanram K, Vijayalakshmi J. Role of traditional
662 antimalarial plants in the battle against the global malaria burden. Vector Borne Zoonotic Dis.
663 2013;13: 521–544. doi:10.1089/vbz.2011.0946
- 664 49. Memvanga PB, Tona GL, Mesia GK, Lusakibanza MM, Cimanga RK. Antimalarial activity of
665 medicinal plants from the Democratic Republic of Congo: A review. J Ethnopharmacol.
666 Elsevier; 2015;169: 76–98. doi:10.1016/j.jep.2015.03.075
- 667 50. Havlicek J, Lenochova P. The effect of meat consumption on body odor attractiveness. Chem
668 Senses. 2006;31: 747–752. doi:10.1093/chemse/bjl017
- 669 51. Mebazaa R, Rega B, Camel V. Analysis of human male armpit sweat after fenugreek ingestion:
670 Characterisation of odour active compounds by gas chromatography coupled to mass
671 spectrometry and olfactometry. Food Chem. 2011;128: 227–235.
672 doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.063
- 673 52. Fialová J, Roberts SC, Havlíček J. Consumption of garlic positively affects hedonic perception
674 of axillary body odour. Appetite. 2016;97: 8–15. doi:10.1016/j.appet.2015.11.001
- 675 53. Müller GC, Beier JC, Traore SF, Toure MB, Traore MM, Bah S, et al. Field experiments of
676 *Anopheles gambiae* attraction to local fruits / seedpods and flowering plants in Mali to optimize
677 strategies for malaria vector control in Africa using attractive toxic sugar bait methods. Malar J.
678 2010;9: 1–11.
- 679 54. Manda H, Gouagna LC, Nyandat E, Kabiru EW, Jackson RR, Githure JJ, et al. Discriminative
680 feeding behaviour of *Anopheles gambiae s.s* on endemic plants in western Kenya. Med Vet

- 681 Entomol. 2007;21: 103–111. doi:10.1111/j.1365-2915.2007.00672.x.Discriminative
- 682 55. Foster W a. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. Annu Rev Entomol. 1995;40:
683 443–474. doi:10.1146/annurev.ento.40.1.443
- 684 56. Gary RE, Foster WA. Effects of Available Sugar on the Reproductive Fitness and Vectorial
685 Capacity of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*). Source J Med
686 Entomol J Med Entomol. 2001;38: 22–28. doi:10.1603/0022-2585-38.1.22
- 687 57. Hien DFS, Dabiré KR, Roche B, Diabaté A, Yerbanga S, Cohuet A, et al. Plant-mediated
688 effects on mosquito capacity to transmit human malaria. PLoS Pathog. 2016; 1–17.
689 doi:10.5061/dryad.9s690.Funding
- 690 58. Vargo AM, Foster WA. Responsiveness of Female *Aedes Aegypti* (Diptera: *Culicidae*) to
691 Flower Extracts. J Med Entomol. 1982;19: 710–718. doi:10.1093/jmedent/19.6.710
- 692 59. Foster WA. Phytochemicals as population sampling lures. J Am Mosq Control Assoc. 2008;24:
693 138–146. doi:10.2987/8756-971X(2008)24[138:PAPSL]2.0.CO;2
- 694 60. Nyasembe VO, Teal PE a, Mukabana WR, Tumlinson JH, Torto B. Behavioural response of
695 the malaria vector *Anopheles gambiae* to host plant volatiles and synthetic blends. Parasit
696 Vectors. 2012;5: 234. doi:10.1186/1756-3305-5-234
- 697 61. Delphia CM, Mescher MC, De Moraes CM. Induction of plant volatiles by herbivores with
698 different feeding habits and the effects of induced defenses on host-plant selection by thrips. J
699 Chem Ecol. 2007;33: 997–1012. doi:10.1007/s10886-007-9273-6
- 700 62. Rasmann S, Turlings TCJ. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores
701 attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies. Ecol Lett. 2007;10:
702 926–936. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01084.x
- 703 63. Hijaz F, El-Shesheny I, Killiny N. Herbivory by the insect *Diaphorina citri* induces greater
704 change in citrus plant volatile profile than does infection by the bacterium, *Candidatus*
705 *Liberibacter asiaticus*. Plant Signal Behav. 2013;8: e25677. doi:10.4161/psb.25677

- 706 64. McArt SH, Miles TD, Rodriguez-Saona C, Schilder A, Adler LS, Grieshop MJ. Floral scent
707 mimicry and vector-pathogen associations in a pseudoflower-inducing plant pathogen system.
708 PLoS One. 2016;11: 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0165761
- 709 65. Najar-Rodriguez AJ, Galizia CG, Stierle J, Dorn S. Behavioral and neurophysiological
710 responses of an insect to changing ratios of constituents in host plant-derived volatile mixtures.
711 J Exp Biol. 2010;213: 3388–3397. doi:10.1242/jeb.054262
- 712 66. Bruce TJA, Pickett JA. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects - Finding the
713 right mix. Phytochemistry. 2011;72: 1605–1611. doi:10.1016/j.phytochem.2011.04.011
- 714 67. De Jong R, Knols BGJ. Selection of biting sites on man by two malaria mosquito species.
715 Experientia. 1995;51: 80–84. doi:10.1007/BF01964925
- 716 68. Dekker T, Takken W, Knols BGJ, Bouman E, Van De Laak S, De Bever A, et al. Selection of
717 biting sites on a human host by *Anopheles gambiae s.s.*, *An. arabiensis* and *An.*
718 *quadriannulatus*. Entomol Exp Appl. 1998;87: 295–300. doi:10.1023/A:1003278228021
- 719 69. Dormont L, Bessiere J-M, McKey D, Cohuet A. New methods for field collection of human
720 skin volatiles and perspectives for their application in the chemical ecology of human-
721 pathogen-vector interactions. J Exp Biol. 2013;216: 2783–2788. doi:10.1242/jeb.085936
- 722 70. Ouédraogo AL, Bousema T, Schneider P, de Vlas SJ, Ilboudo-Sanogo E, Cuzin-Ouattara N, et
723 al. Substantial contribution of submicroscopical *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage
724 to the infectious reservoir in an area of seasonal transmission. PLoS One. 2009;4: 8–12.
725 doi:10.1371/journal.pone.0008410
- 726 71. Ouédraogo AL, Guelbéogo WM, Cohuet A, Morlais I, King JG, Gonçalves BP, et al. A
727 protocol for membrane feeding assays to determine the infectiousness of *P. falciparum*
728 naturally infected individuals to *Anopheles gambiae*. Malar World J. 2013;4: 17–20.
- 729 72. Cork A, Park KC. Identification of electrophysiologically-active compounds for the malaria
730 mosquito, *Anopheles gambiae*, in human sweat extracts. Med Vet Entomol. 1996;10: 269–276.

731 doi:10.1111/j.1365-2915.1996.tb00742.x

732 73. R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Found
733 Stat Comput Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0. 2008;

734 74. Vittecoq M, Djieto-Lordon C, Buatois B, Dormont L, McKey D, Blatrix R. The Evolution of
735 Communication in Two Ant-Plant Mutualisms. *Evol Biol.* 2011;38: 360–369.

736 doi:10.1007/s11692-011-9125-8

737

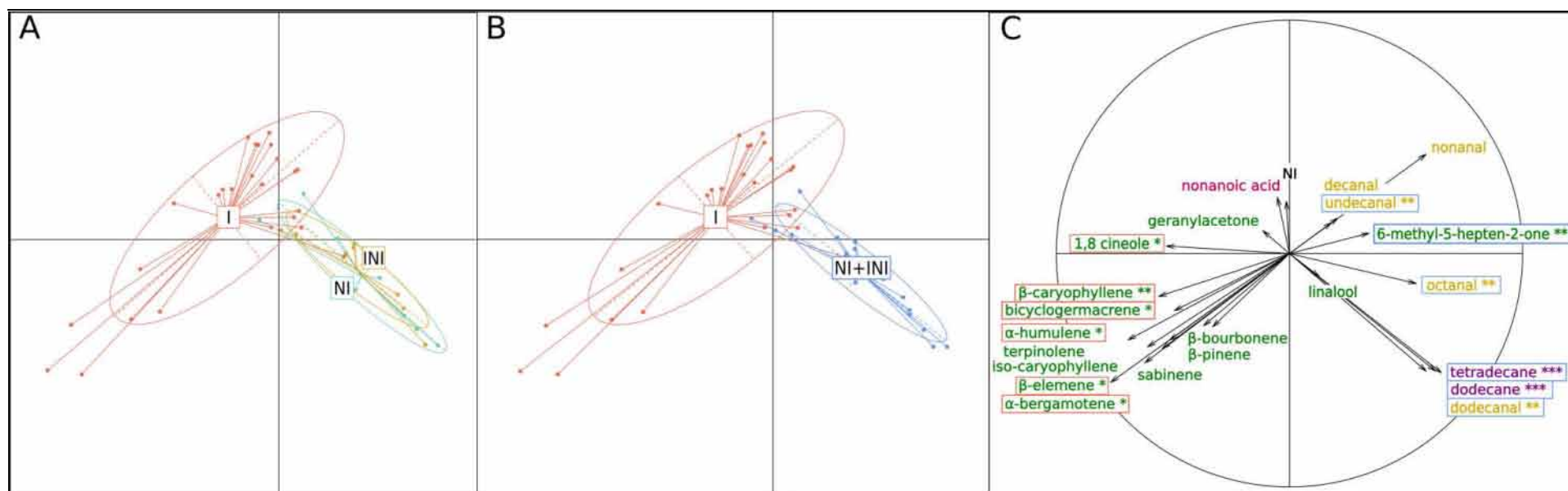


Fig 1: Partial least squares – discriminant analysis (PLS-DA) of volatile compounds detected in all the donors before antimalarial treatment. Panel A represents the PLS-DA of the three infection groups (non infected, infected-non infectious, infectious). Panel B shows the PLS-DA of the infectious *versus* non-infectious group (non infected + infected- non infectious). I = infectious, INI = infected-non infectious, NI= non infected. Panel C represents the correlation circle associated with panel B. Fatty acids derivatives are represented according to the functional groups (aldehydes, alkanes, carboxylic acids). Terpenes are represented in green, aldehydes in yellow, alkanes in purple and carboxylic acids in pink. Volatiles in boxes showed significant differences of relative peak surfaces for the compound between the two groups (Wilcoxon signed-rank test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), with red boxes if higher in I, and blue boxes if higher in INI+NI. N=41.

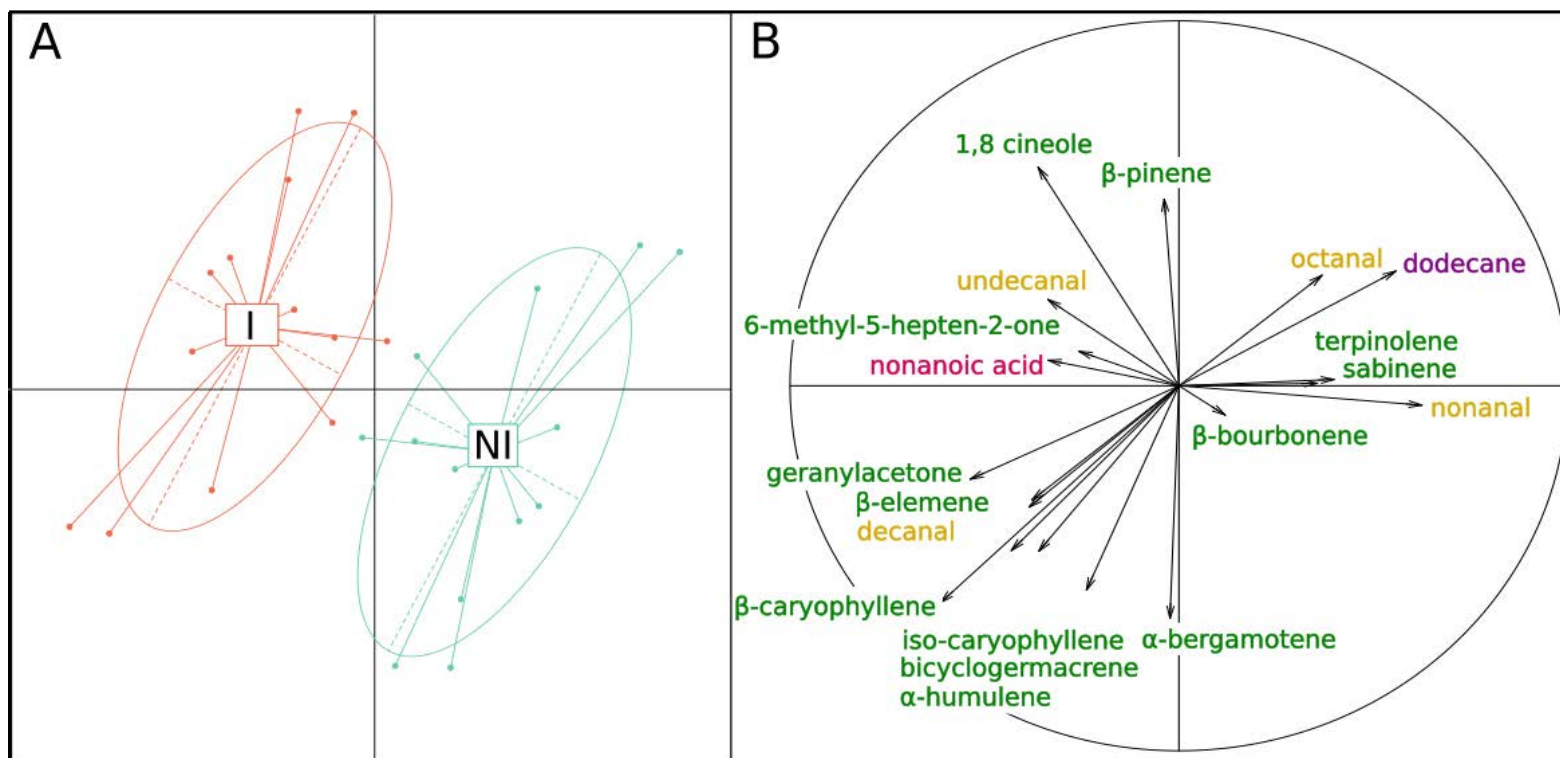


Fig 2: Multilevel PLS-DA of volatile compounds detected in the infectious donors before (I) and after antimalarial treatment (NI). Panel A represents the multilevel-PLS-DA and panel B the correlation circle associated. Fatty acids derivatives are represented according to the functional groups (aldehydes, alkanes, carboxylic acids). Terpenes are represented in green, aldehydes in yellow, alkanes in purple and carboxylic acids in pink. N=13.

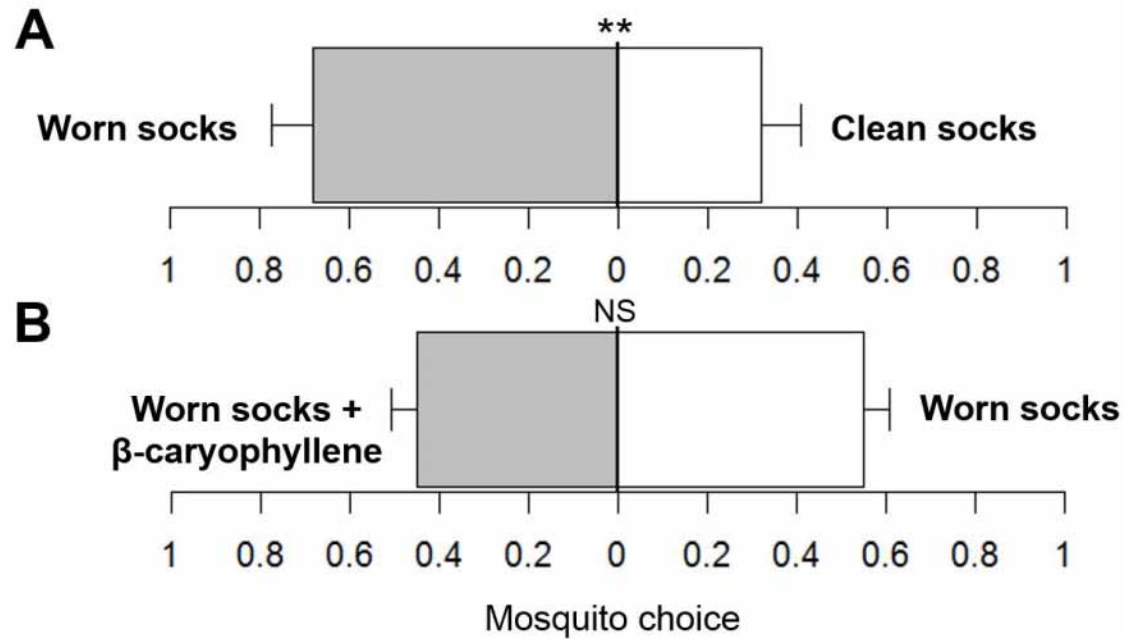
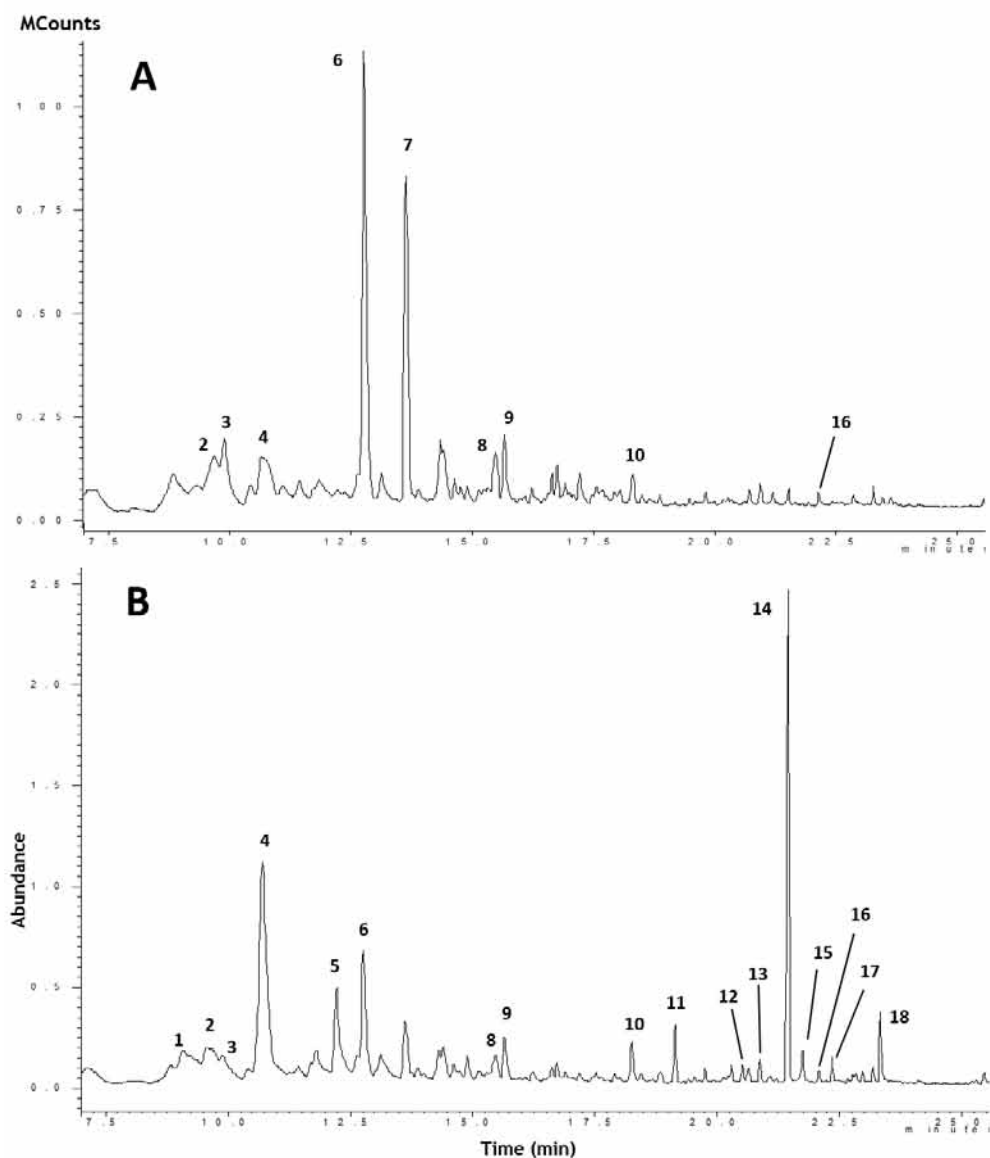
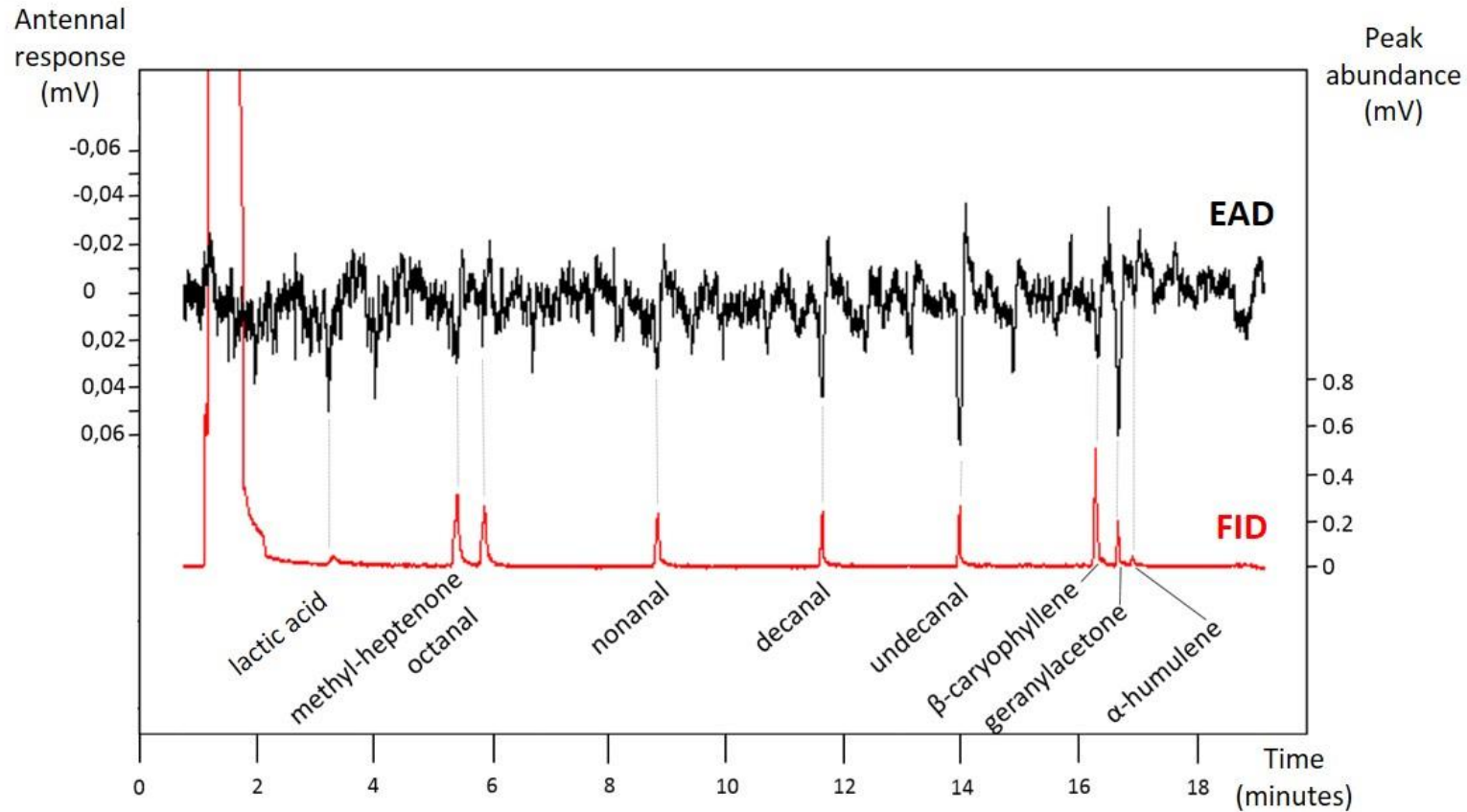


Fig 3: relative attractiveness of worn socks versus clean socks (A) and versus worn socks with added β -caryophyllene (B). N = 8 cages for a total of 412 mosquitoes released over 2 days for comparisons of worn socks versus clean socks for system validation and N = 24 cages for a total of 1237 mosquitoes released over 6 days for comparison of worn socks versus worn socks with added β -caryophyllene.

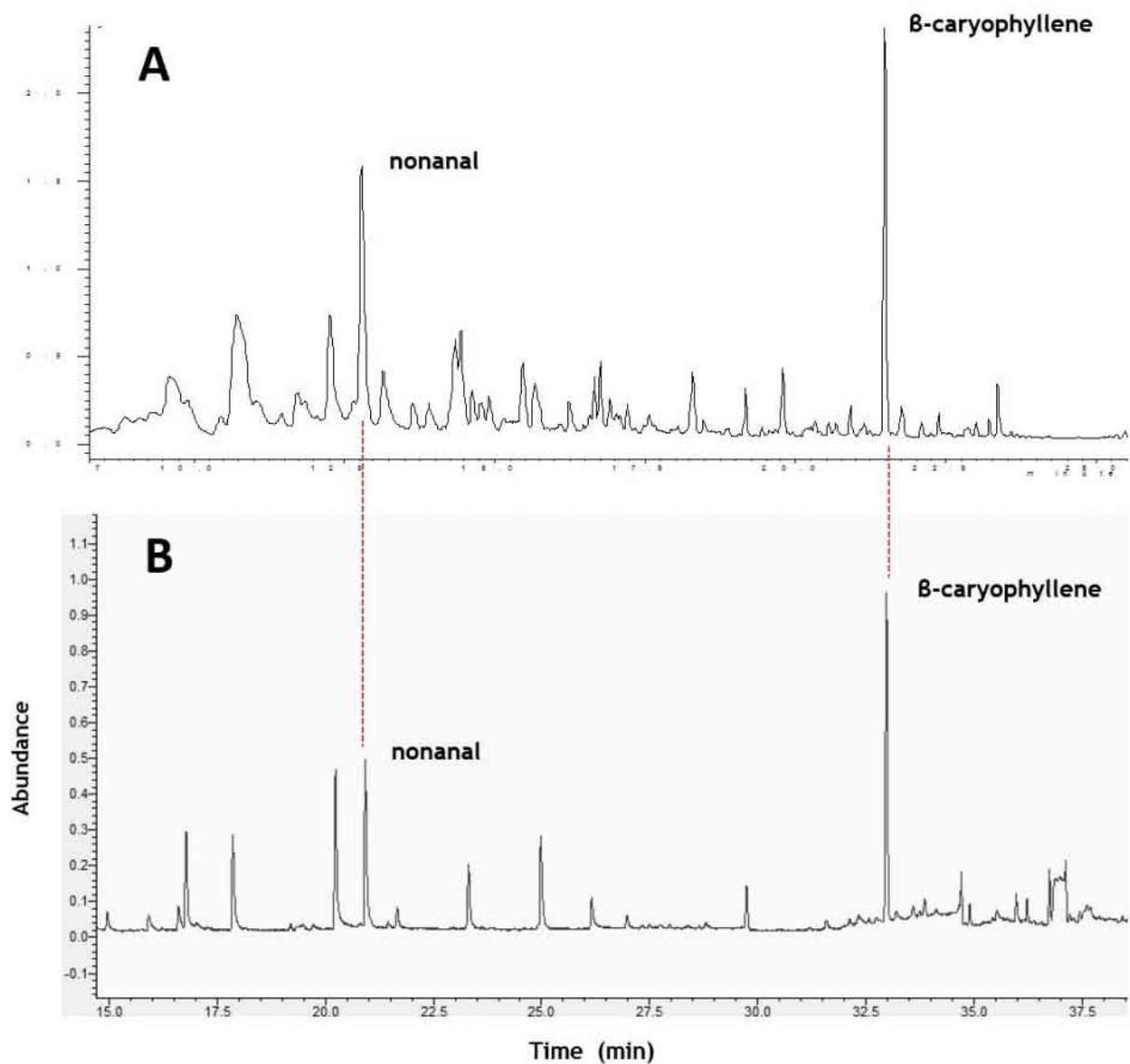
Supporting information



S1 Fig. Gas chromatograms of foot volatiles collected by ChromatoProbe in a dynamic headspace collection method. The two chromatograms show the volatile profiles of the foot from a non-infectious donor (A) and from an infectious donor (B). Peak identification: 1: β -pinene, 2: 6-methyl-5-hepten-2-one, 3: octanal, 4: 1,8-cineole, 5: terpinolene, 6: nonanal, 7: pollutant, 8: dodecane, 9: decanal, 10: undecanal, 11: β -bourbonene, 12: β -elemene, 13: iso-caryophyllene (Z) 14: β -caryophyllene (E), 15: α -bergamotene trans, 16: geranylacetone, 17: α -humulene, 18: bicylogermacrene. Other peaks are pollutants or non-natural compounds.



S2 Fig. GC-EAD responses of female *Anopheles gambiae* to a mixture of synthetic compounds. The solution included the most common compounds found in foot volatiles (nonanal, decanal, undecanal, methylheptenone and geranylacetone). Lactic acid was added as a positive control. Some of the terpenes observed in skin odor profiles of *P. falciparum* infectious donors (e.g. in this assay, β -caryophyllene, and α -humulene) were also added to the mixture tested.



S3 Fig. Gas chromatograms of foot and sock volatiles collected by solid phase micro extraction (SPME). (A) Volatile profile of the foot from an infectious donor, collected in Burkina-Faso. (B) Volatile profile of a worn sock with added synthetic β -caryophyllene, which mimic odor from *P. falciparum* infectious donor. Socks was worn for one day by human volunteers non-infected by *P. falciparum*. β -caryophyllene was added to worn sock odor by using diffusor (see text). The diffusor was designed so that the nonanal/ β -caryophyllene ratio (from the sock and the diffusor respectively) was similar to those observed in skin odor profiles from infectious donors. Retention times were not synchronous among the two chromatograms because two different temperature programs were used.