

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Ecole doctorale sciences chimiques et biologiques pour la santé (CBS2)

Discipline : Biologie-Santé

Formation Doctorale : Immunologie

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Formation doctorale : Biologie Santé

Spécialité : Immunologie

Par

Souleymane DOUCOURÉ

**Interactions homme-vecteur, études des protéines salivaires
immunogéniques d'*Aedes*, vers un bio-marqueur d'exposition spécifique à
*Aedes albopictus***

Soutenue Publiquement le 07 Décembre devant le jury composé de :

M.Gérard Lefranc, Professeur, Université Montpellier II	Président
Mme Nathalie Boulanger, MC, Faculté de pharmacie Strasbourg	Rapporteur
Mme Anna-Bella Failloux, Chef de laboratoire, Institut Pasteur Paris	Rapporteur
M. Lionel Almeras, CR, IMTSSA Marseille	Examineur
M. Franck Remoué, CR1 IRD, Bénin	Examineur
M. Vincent Robert, DR1, IRD Montpellier	Directeur de thèse

Remerciements

Monsieur le professeur Gérard Lefranc, pour toutes ces années pendant lesquelles vous vous êtes intéressés à mon travail et avez suivi mon évolution de près. Je vous remercie d'avoir répondu à chacune de mes sollicitations.

Madame Nathalie Boulanger, qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse.

Madame Anna-Bella Failloux, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse.

Monsieur Lionel Almeiras, pour avoir accepté de faire partie de mon jury, merci de ton soutien et de m'avoir accueilli dans ton laboratoire.

Monsieur Vincent Robert qui a spontanément accepté de prendre la direction de cette thèse. Je te remercie pour tous tes conseils au cours de ces trois années.

Monsieur Franck Remoué, pour m'avoir d'abord accueilli dans ton équipe, aidé à progresser pendant ces sept années et surtout de m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse. Je te suis reconnaissant pour ta confiance et ton amitié

Les travaux présentés dans ce mémoire n'auraient pu être réalisés sans le soutien de nombreuses personnes que je souhaite tout particulièrement remercier.

Mrs Didier Fontenille et François Simondon pour m'avoir accueilli au sein de vos équipes au cours de ces trois années.

Monsieur François Mouchet, ce fût un plaisir d'avoir travaillé avec toi, partager tous ces moments surtout à La Réunion, merci de m'avoir fait profiter de ta culture.

Madame Sylvie Cornélie, pour tout ton soutien pendant toutes ces longues années. Je te suis reconnaissant de ton implication dans toutes les étapes de ce travail. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour de m'avoir transmis un peu de ton dynamisme.

Monsieur le professeur Philippe Gasque de m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Ile de La Réunion, ainsi qu'à toute l'équipe de la LAV notamment à Mrs Jean Sébastien DeHecq, Abdul et Samuel.

Je tiens à remercier tous les membres du groupe Epivect ; Pape pour ton soutien et ton amitié pendant toutes ces années, Anne pour tes conseils et ta disponibilité, Jean Biram, Marie, Françoise pour vos encouragements.

Je remercie également Dorothée Missée ainsi que toute son équipe : Sirila, Noon, Rodolphe, pour leur parfaite collaboration.

J'ai une pensée particulière pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé ce bureau pendant ces trois années, Caroline, Geoffrey, Greg, Anne, Majo, Alex la râleuse, Fano, Elodie, Mabel Martin, Emilie, Emmanuel, Marie.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance à tous les membres de l'unité MIVEGEC pour votre accueil et pour m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Massila le phleb, pour tes enseignements sur les phlebo.

Je remercie particulièrement Nadine et Ibrahima pour m'avoir encouragé lors de mes tout premiers pas dans la recherche.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble du personnel de l'IRD Dakar pour leur soutien pendant tout le temps que j'ai eu à passer parmi eux, notamment Elhadj, Tonio et Cheikh.

Je remercie particulièrement toute ma famille, notamment mes parents pour votre dévouement et votre patience.

Je te remercie toi aussi, Khady, d'avoir été patiente pendant toutes ces années.

Souleymane DOUCOURÉ

Date de naissance: 22/11/1978 à Dakar

Nationalité: Sénégalaise

e-mail: souleymane.doucoure@ird.fr

Diplômes

2007: Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE, Paris) Sciences de la vie et de la Terre. Mention Très bien

2005: Certificat de capacité de recherche (EPHE)

2000: Diplôme de Technicien Supérieur. Ecole Supérieure Polytechnique (ESP, Université Cheikh Anta Diop Dakar, Sénégal)

1998: Baccalauréat S2

Expériences Professionnelles

Doctorant

Octobre 2008- 2011 Interactions homme-vecteur, études des protéines salivaires immunogéniques d'*Aedes*, vers un bio-marqueur d'exposition spécifique à *Aedes albopictus*

Assistant de recherche IRD-Dakar

2004 - 2007: Etude de la réponse anticorps de l'homme contre les protéines salivaires du moustique, développement d'un bio-marqueur d'exposition aux piqûres d'*Anopheles gambiae*. (UR 24 Epidémiologie et Prévention IRD).

2001 - 2004: Etude des mécanismes immunologiques anti *Plasmodium falciparum* pendant la grossesse. (UR010 Santé de la Mère et de l'Enfant-IRD).

Stagiaire Institut Pasteur Dakar

2001: stage en laboratoire d'analyses biologiques.

Techniques de laboratoire maîtrisées

Culture cellulaire : culture cellules immunitaires, parasites (*Plasmodium falciparum*)

Cytométrie en flux : dosage cytokines chez la femme enceinte.

ELISA : dosage des anticorps anti protéines salivaires de moustique.

Protéomique : étude profils et identification de protéines salivaires.

Gestion insectarium : élevage de moustique, dissection glandes salivaires, salivation des moustiques.

Listes de publications

Brevet

Remoue F., Ponsignon A., Cornélie S., Drame P.M., **Doucoure S.**, Mouchet F., Rossignol M., et Corbel V. Méthodes pour évaluer l'efficacité de stratégie de lutte anti-vectorielle dans le contrôle du paludisme et des arboviroses. Brevet n° FR10/00172.

Articles publiés

Souleymane Doucoure, F. Mouchet, S. Cornélie, Jean Sébastien DeHecq, Abdul Hamid Rutee, Yelin Roca, Annie Walter, Jean Pierre Hervé, Dorothée Misse, François Favier, Philippe Gasque, Franck Remoue. **Evaluation of human IgG antibody response to *Ae. albopictus* saliva as a new specific biomarker of exposure to vector bites.**(Plos Neglected Tropical Diseases, 10.1371/journal.pntd.0001487)

Denis Boulanger, **Souleymane Doucoure**, Lise Grout, Abdoulaye Ngom, François Rogerie, Sylvie Cornélie, Cheikh Sokhna, François Mouchet, Gilles Riveau, François Simondon & Franck J. Remoué. **IgG antibody profiles against *Anopheles* salivary proteins in domestic animals in Senegal.** *Journal of Medical Entomology*, 2011, May, 458 (3): 691-3.

Poinsignon A, Samb B, **Doucoure S**, Drame PM, Sarr JB, Sow C, Cornélie S, Maiga S, Thiam C, Rogerie F, Guindo S, Hermann E, Simondon F, Dia I, Riveau G, Konate L, Remoue F. **First attempt to validate the Gsg6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites.** *Trop Med Int Health*. 2010 Oct;15z:1198-203.

Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, **Doucoure S**, Mouchet F, Séveno M, Remoue F, Demettré E, Brizard JP, Jouin P, Biron DG, Thomas F, Missé D. **Blood feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins.** *Proteomics*. 2010 May;10(10):1906-16.

Ndao CT, Dumont A, Fievet N, **Doucoure S**, Gaye A, Lehesran JY. **Placental Malaria Infection as a risk factor for hypertensive disorder during pregnancy in Africa, a case-**

control study in an urban area Sénégal in West Africa. Am J Epidemiol. 2009 Oct 1;170(7):847-53. Epub 2009 Aug 13.

Sylvie Cornélie, Franck Remoue, **Souleymane Doucouré**, Tofène Ndiaye, François Xavier Sauvage, Denis Boulanger, François Simondon. **An insight into immunogenic salivary proteins of Anopheles gambiae in African children.** Malar J. 2007 5; 6:75.

Franck Remoue, Eric Alix, Cornélie Sylvie, Cheikh Sokhna, Badara Cisse, **Souleymane Doucouré**, François Mouchet, Denis Boulanger, François Simondon. **IgE and IgG4 antibody responses to Aedes saliva in African children.** Acta Trop. 2007 Nov-Dec; 104(2-3):108-15. Epub 2007 Aug 6.

Ibrahima Diouf, Nadine Fievet, **Souleymane Doucouré**, Mamadou Ngom, Muriel Andrieu, Jean-François Mathieu, Alioune Gaye, Omar Thiom Thiaw, Philippe Deloron, **IL-12 producing monocytes and IFN- and TNF- α producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by Plasmodium falciparum.** J. Reprod. Immunol. 2006; doi:10.1016/j.jri.2006.10.001

Nadine Fievet, Jean Yves Le Hesran, Gilles Cottrell, **Souleymane Doucouré**, Ibrahima Diouf, Jean Louis Ndiaye, Gwladys Bertin, Oumar Gaye, Sokhna Sow, Philippe Deloron. **Acquisition of antibodies to variant antigens on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes during pregnancy.** Infection. Genetics and Evolution 2006; 6: 459–463

Ibrahima Diouf, Nadine Fievet, **Souleymane Doucouré**, Mamadou Ngom, Alioune Gaye, Alexandre Dumont, Cheikh Tidiane Ndao, Jean-Yves Le Hesran, Gérard Chaouat, Philippe Deloron. **Monocyte Activation and T Cell Inhibition in Plasmodium falciparum-Infected Placenta.** The Journal of Infectious Diseases 2004; 189:2235–42.

- Articles soumis:

Souleymane Doucoure, François Mouchet, Amandine Cournil, Gilbert Le Goff, Sylvie Cornelie, Yelin Roca, Mabel Guerra Giraldez., Zaira Barja Simon, Roxanna Loayza, Dorothée Misse, Jorge Vargas Flores, Annie Walter, Christophe Rogier, Jean Pierre Herve and Franck Remoue Human antibody response to *Ae. aegypti* saliva in Bolivian urban population toward a new biomarker of exposure to dengue vector bites (American Journal of Tropical Journal of Tropical Medicine and Hygiene).

- Articles en préparation:

Souleymane Doucoure, Sylvie Cornelie, François Mouchet, Jean S. DeHecq, Abdul H. Rutee, Yelin Roca, Annie Walter, Jean P. Herve, Sirilakassana Patramool, Dorothée Misse, François Favier, Philippe Gasque, Franck Remoue. First 2D screening of *Aedes albopictus* immunogenic salivary proteins

Souleymane Doucoure, François Mouchet, Sylvie Cornelie, Papa M. Drame, Eric D'Ortenzio, Jean S. DeHecq, Franck Remoue. **Human antibody response to *Ae. albopictus* salivary proteins, a new biomarker to evaluate the efficacy of vector control strategies in area of chikungunya virus transmission.**

Revue: **Souleymane Doucoure**, Sylvie Cornelie, Pape M. Drame, François Mouchet, Anne Poinsignon, Franck Remoue. **Arthropod immunogenic salivary proteins in vector-borne diseases control.**

Participations à des manifestations scientifiques (congrès, séminaires)

Oral

9^{ème} Congrès de l'Ecole Doctorale CBS2: Specific biomarker of exposure to *Ae. albopictus* bites. Juin 2011, Montpellier, France.

Young Investigator Award, 59th ASTMH annual meeting: Specific biomarker of exposure to *Ae. albopictus* bites. Novembre 2010, Atlanta, USA.

3^{ème} Réunion Vectors Saliva Network 2010: biomarqueur d'exposition à *Ae. albopictus* versus *Ae. aegypti*. Mars 2010, Montpellier, France.

12th days of West African Society of Parasitology 2008: Immunology of Human/Vector during malaria: study of *Anopheles gambiae* immunogenic salivary proteins

Posters

1^{ère} Assemblée générale MIVEGEC : Specific biomarker of exposure to *Ae. albopictus* bites.
Juin 2011, Montpellier, France.

59th ASTMH annual meeting: Specific biomarker of exposure to *Ae. albopictus* bites.
Novembre 2010, Atlanta, USA.

16^{ème} Colloque Biologie de l’Insecte 2010: Biomarqueur d’exposition spécifique aux piqûres
d’*Ae. albopictus*. Octobre 2010, Lyon, France.

International conference EDEN 2010: Validation of an immuno-epidemiological tool
assessing human exposure to *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* bites. Mai 2010,
Montpellier, France.

2^{ème} Congrès Infectiopole Sud Validation of an immuno-epidemiological tool assessing
human exposure to *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* bites. Octobre 2009, Marseille,
France.

Prix distinctions

poster congrès Mivegec 2011

Présentation orale 9^{ème} Congrès de l'Ecole Doctorale CBS2

Table des matières

Table des matières	1
Cadre du travail	3
Introduction	6
1- Aedes albopictus, vecteur d'arbovirus	6
2. Dengue et chikungunya, deux arboviroses émergentes	8
A. Les virus de la dengue et du chikungunya	8
B. Dengue et chikungunya, situation d'émergence	9
C. Dengue et Chikungunya dans l'Océan Indien : exemple de l'Île de La Réunion	13
D. Les causes de l'émergence	14
3 Aedes albopictus : répartition géographique, dynamique de colonisation et bio-écologie	16
A. Répartition géographique et dynamique de colonisation	16
B. Bio-écologie d'Ae. albopictus	17
4-Lutte contre la dengue et le chikungunya et ses limites	21
A. Lutte contre les virus	21
B. Lutte contre le vecteur Aedes albopictus	26
5. Evaluation de l'exposition aux piqûres d'Ae. albopictus	31
A. Piège pondoir ou ovitrap	31
B. La collection d'adultes	32
C. indices larvaires et nymphaux	33
6. Etude des interactions homme/vecteur et protéines salivaires de l'arthropode	35
A. Inhibition de la réaction hémostatique de l'homme	35
B. Rôles des protéines salivaires dans le contrôle de la réponse immunitaire du vertébré et de l'infection. De la modulation de la réponse immunitaire du vertébré à l'infection par le pathogène : rôle de protéines salivaires des arthropodes	41
C. Réponse anticorps contre les protéines salivaires des arthropodes : un nouvel outil d'évaluation de l'exposition aux piqûres des vecteurs et du risque de transmission des pathogènes	51
7- Description du sialome d'Ae. albopictus.	71
Objectifs	75
Objectif général	75
Objectifs spécifiques	75
RESULTATS	77

1- Etude de la réponse IgG spécifiques aux protéines salivaires : indicateur d'exposition aux piqûres des Aedes ?	78
2- Réponse IgG spécifique à la salive d'Ae. albopictus et spécificité de la réponse anticorps	102
3 Identification de candidats salivaires biomarqueurs spécifiques à Ae. albopictus	121
4- Utilisation de la réponse Ac anti-salive comme indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle contre Aedes albopictus à La Réunion	143
Discussion	165
Conclusions et Perspectives	183
Bibliographie	194

Cadre du travail

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'une thèse scientifique de la formation doctorale « Biologie Santé » de l'Ecole Doctorale « Sciences Chimiques et Biologique pour la Santé » de l'Université des Sciences et Techniques, Montpellier 2. Cette thèse s'inscrit dans la thématique de la lutte contre les arboviroses transmises par les *Aedes* à travers les travaux réalisés sur le développement d'un biomarqueur immuno-épidémiologique d'exposition à *Aedes albopictus*. La thématique principale de cette thèse concerne donc l'étude des relations immunologiques homme-vecteur au cours des maladies transmises par des moustiques.

Les travaux de cette thèse ont été effectués dans des zones d'études complémentaires qui nous ont permis de nous imprégner du contexte épidémiologique actuel des arboviroses transmises par les *Aedes* :

- L'Amérique Latine, et plus particulièrement la Bolivie, zone où la dengue est endémique avec *Ae. aegypti* comme unique vecteur a permis dans le cadre du projet EpiDengue, d'initier les études sur le développement d'un biomarqueur d'exposition aux *Aedes*.
- Le Sud-Ouest de l'Océan Indien, à La Réunion et aux Comores, marqué par une émergence de la dengue et du chikungunya avec *Ae. albopictus* comme unique vecteur, a permis de définir un biomarqueur spécifique à l'exposition humaine à *Ae. albopictus* (projet ExpAedes) et de tester son application dans la lutte anti-vectorielle contre ce vecteur *Aedes* (projet LAV-Albo).
- La France, à Montpellier, à travers l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) qui a servi de structure d'accueil de cette thèse pour une partie des activités de laboratoire.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été intégrés dans l'équipe EPIVECT (Epidémiologie des Vecteurs) dirigée par le Dr Franck REMOUE CR1-IRD. Actuellement le programme EPIVECT est intégré au sein de l'équipe VECOPS (Stratégies de lutte et prévention du contact homme-vecteurs ; responsable : Dr Fabrice CHANDRE) de l'UMR-MIVEGEC (Maladie Infectieuse et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle) dirigée par le Dr Didier FONTENILLE et dont l'implantation principale est le Centre IRD de Montpellier.

Le programme EPIVECT a pour objectif essentiel de lutter contre les maladies tropicales infectieuses transmises par les arthropodes par, notamment le développement de biomarqueurs immunologiques permettant de mieux étudier les interactions de l'homme avec

les vecteurs. Le développement de ces bio-marqueurs est basé sur la réponse anticorps de l'homme contre les protéines salivaires du vecteur.

Les projets d'EPIVECT concernent quatre thématiques :

- 1) Exp-Aedes : identification et validation de biomarqueurs d'exposition à *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* et applications à la Lutte anti-vectorielle et aux risques de transmission des arboviroses. Terrain : La Réunion, Les Comores, Bolivie, Cameroun. Les travaux développés au cours de cette thèse sont intégrés dans cette thématique.
- 2) Exp-Anopheles: développement d'un biomarqueur d'exposition à *Anopheles*- applications à la lutte anti-vectorielle et à l'évaluation des faibles niveaux d'exposition. Terrain : Bénin, Sénégal, Angola, Mali.
- 3) ImmunoModul : influence des piqûres (salive) d'*Anopheles* sur la réponse immune anti-*Plasmodium*. Terrain : Sénégal.
- 4) EntomoMark : étude de l'expression des protéines salivaires comme indicateur entomologique pour l'étude des vecteurs, de leur comportement et des interactions vecteur-pathogène.

L'envergure et la réalisation de tous ces projets impliquent forcément la participation de partenaires extérieurs. Ainsi, parmi les principaux organismes collaborateurs qui ont participé à ces travaux de thèse nous pouvons citer :

- Groupe de Recherche « Immuno-pathologies et maladies infectieuses », GRI- Université de La Réunion dirigé par le Pr Philippe GASQUE. Grâce à cette collaboration, il a été possible, sept mois durant, d'effectuer des activités de laboratoire au niveau de la plateforme technique du CYROI (Cyclotron Océan Indien) sur l'Ile de La Réunion. Ce fut également l'occasion de transférer la technique de l'immuno-protéomique 2D.
- Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique- La Réunion dirigé par le Dr François FAVIER. Cette collaboration a permis de réaliser l'étude de terrain et du recrutement des sujets d'études à La Réunion, pour le projet ExpAedes.
- Université de Comores (Pr Amhed OULEDI) a été à la base de l'inclusion des sujets Comérais dans le projet ExpAedes.
- Agence Régionale de Santé (ARS) Océan Indien : section lutte anti-vectorielle dirigée par Jean Sébastien DeHecq. La contribution de cette agence a permis de disposer des

moustiques *Ae. albopictus* et était responsable des volets entomologiques et de lutte anti-vectorielle dans le projet LAV-Albo.

- Centro Nacional de Enfermedades, Santa Cruz, Bolivie. Ce centre de référence Bolivien a permis de disposer des prélèvements sanguins du projet EpiDengue.
- L'équipe des Drs Christophe ROGIER et Lionel ALMERAS de l'UMR-MITE de l'IRD, accueillie au sein de L'Institut de Médecine tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA), à Marseille. La collaboration avec cette équipe a été déterminante pour l'obtention d'une bourse de thèse de la Fondation InfectioPôle Sud et pour la production de peptides salivaires. Cette collaboration a aussi permis des échanges techniques entre les différentes équipes impliquées sur le développement du biomarqueur *Aedes*. Grâce à cette collaboration, pendant trois semaines j'ai pu être initié à la technique du Luminex.

La réalisation de ces travaux a bénéficié de différentes sources de financement. Le projet ExpAedes en Océan Indien a été financé par l'intermédiaire du CRVOI (Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes de l'Océan Indien). L'étude menée en Bolivie a été réalisée grâce au fonds provenant du projet EpiDengue (ANR). La Direction Générale de la Santé (DGS) était le bailleur de fonds du projet LAV-Albo à La Réunion. La bourse de thèse (Octobre 2008-2011) qui a permis la réalisation des travaux m'a été attribuée par la fondation Infectiopole Sud (Marseille, directeur : Prof. Didier RAOULT). Une partie de ces travaux, concernant la lutte anti-vectorielle, a également été financée par le DEV/DVS de l'IRD dans le cadre de l'appel à projet « Maturation de Projet Innovant ». Ce travail s'inscrit dans la validation du brevet IRD n° FR10/00172, élaboré par le groupe EPIVECT, déposé le 18 janvier 2010 en France, puis à l'international PCT en janvier 2011, et intitulé : « Méthodes pour évaluer l'efficacité de stratégie de lutte anti-vectorielle dans le contrôle du paludisme et des arboviroses ». Inventeur : Remoue F. ; co-inventeurs: Poinçon A., Cornélie S. Drame PM, Doucoure S., Mouchet F, Rossignol M et Corbel V.

Introduction

1- *Aedes albopictus*, vecteur d'arbovirus

Les arthropodes hématophages sont à l'origine de la transmission de divers agents infectieux, éventuellement pathogènes. Le spectre des pathogènes transmis est très large et inclut trois grandes familles des pathogènes : parasites eucaryotes, bactéries et virus. Parmi les maladies parasitaires dont les agents sont transmis par des arthropodes, on peut citer notamment le paludisme qui constitue un problème majeur en santé publique dans la zone tropicale (WHO, 2010). Certaines bactéries du genre *Borrelia*, responsables de la maladie de Lyme dont l'importance médicale est grandissante, sont également transmises par la piqure des arthropodes hématophages (Marques, 2010). Tous les virus dont la transmission d'un hôte vertébré à un autre est assurée par les arthropodes hématophages sont regroupés sous la dénomination « arthropod-borne virus » ou « arbovirus ». La classification des arbovirus n'a aucune signification taxonomique et constitue un assemblage très hétérogène de différentes familles de virus partageant le même mode de transmission. Mis à part le virus de grippe porcine africaine qui est un virus à ADN (acide désoxyribonucléique), tous les arbovirus décrits jusqu'à ce jour sont des virus à ARN (acide ribonucléique). Les arbovirus à ARN se répartissent dans six familles de virus : *Bunyviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* et *Togaviridae* (Weaver & Reisen, 2010). Aujourd'hui, 534 arbovirus sont répertoriés dans le Catalogue International des Arbovirus, 134 sont décrits comme pathogènes pour l'espèce humaine (Karabatos, 1985, 2001 update) et ces derniers se retrouvent essentiellement au sein de trois familles : *Flaviviridae*, *Togaviridae* and *Bunyaviridae* (Gubler & LeDuc, 1998). Les moustiques et les tiques sont les principaux vecteurs d'arbovirus. Parmi les moustiques, il a été rapporté qu'*Aedes albopictus*, communément appelé moustique tigre, est capable de transmettre une vingtaine d'arbovirus à l'homme (Gratz, 2004). L'importance médicale des arbovirus véhiculés par *Ae. albopictus* dépend du cycle de transmission du pathogène. Ce cycle de transmission est très complexe et est fonction de plusieurs facteurs comme de la réceptivité des hôtes vertébrés à l'infection virale. Ce facteur va définir le caractère zoonotique de l'infection puis de la pathologie. La majorité des arbovirus transmis par *Ae. albopictus* sont des zoonoses maintenues à l'état sauvage grâce à leurs réservoirs naturels constitués essentiellement d'oiseaux et de

mammifères (primates, rongeurs...). Dans ce cas, les réservoirs non humains ne sont pas affectés par l'infection, raison pour laquelle les épidémies qui en découlent peuvent passer inaperçues. Ces arbovirus peuvent sortir du cycle de transmission sauvage et contaminer l'homme ou les animaux domestiques. Dans la plupart des cas, l'infection de l'homme constitue une impasse pour la transmission du virus. Le niveau de répllication virale chez l'homme n'étant pas suffisant pour infecter *Ae. albopictus* au cours du repas sanguin. Ce type de transmission animal sauvage-*Ae. albopictus*-homme ne pouvant pas déboucher sur une infection interhumaine est dit selvatique et concerne la plupart des arbovirus véhiculés par *Ae.*

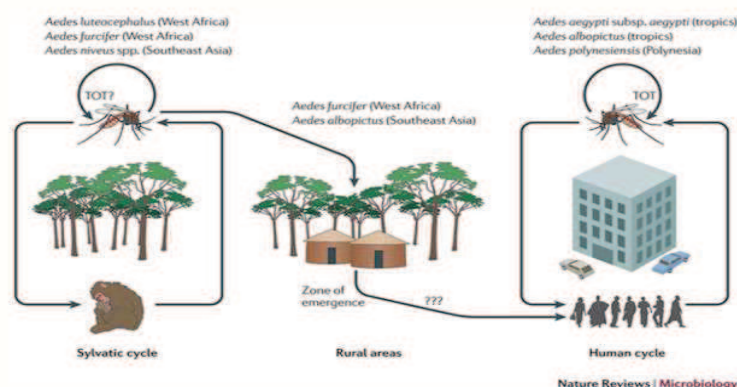


Figure1. Cycles de transmission selvatique et urbain des arbovirus par *Ae. albopictus*, exemple du virus de la dengue.

Ici représentées, les origines selvatiques du virus de la dengue et les "zones d'émergence" où le cycle selvatique entre en contact avec les populations humaines en zones rurales (en Afrique de l'Ouest et Asie du Sud Est). De plus, le virus de la Dengue peut persister dans certaines populations de moustiques par transmission verticale (TOT) où le moustique infecté transfère le virus à ses oeufs.

albopictus (Figure 1).

En exemple, nous pouvons citer la Fièvre de la Vallée du Rift. Cet arbovirus de la famille des *Bunyaviridae*, genre *Phlebovirus*, a été isolé pour la première fois en 1930 dans la Vallée du Rift au Kenya. Il est connu pour être largement

distribué en Afrique sub-saharienne. Dans certaines zones de transmission, la fréquence des épidémies est déterminée par la pluviométrie. Les animaux domestiques jouent en général le rôle d'hôtes amplificateurs du virus, servant du coup à infecter un nombre important de vecteurs dans l'environnement péri-domestique. Chez l'homme, seul 1 à 2% des infections aboutissent à la forme sévère de la maladie dont les symptômes se manifestent généralement par une hépatite, encéphalite, rétinite ou même par une fièvre hémorragique. Cette dernière décennie est marquée par une tendance à l'émergence de cette maladie. En effet, de nouvelles zones géographiques comme le proche- et moyen-orient ont connu des épidémies et épidémies. Le risque d'introduction et d'une installation durable de cet arbovirus à transmission selvatique en Amérique du Nord et en Europe est non négligeable au vu des conditions socio-environnementales actuelles (Weaver & Reisen, 2010). Ce risque d'émergence semble bien plus important avec d'autres arboviroses transmises par *Ae. albopictus* comme le virus de l'encéphalite équine Vénézuélienne (Beaman & Turell, 1991)

ou la fièvre jaune (Reiter, 2010). En effet, certains arbovirus, bien que répondant à une transmission selvatique, engendrent de fortes virémies chez l'homme, permettant de contaminer de façon conséquente le vecteur au cours du repas sanguin. Cette importante contamination du vecteur favorisera la circulation des pathogènes dans la population humaine et l'établissement d'un cycle de transmission inter-humaine (Figure 1).

Ce type de transmission, homme-vecteur-homme, se réalisant à l'exclusion d'hôtes vertébrés sauvages, est généralement observé en milieu urbain, d'où l'appellation de « cycle urbain » et fait intervenir des vecteurs plus ou moins adaptés à l'environnement urbain. L'importance en santé publique de certaines arboviroses est déterminée par ce caractère particulier, à savoir la capacité de transmission inter-humaine. Le moustique *Ae. albopictus* est actuellement capable de transmettre deux arbovirus qui répondent à ce dernier critère : les virus de la dengue et du chikungunya. En plus de leur particularité d'être transmis d'homme à homme, ces deux arbovirus présentent une dynamique d'émergence qui coïncide avec la dissémination mondiale d'*Ae. albopictus*.

2. Dengue et chikungunya, deux arboviroses émergentes

A. Les virus de la dengue et du chikungunya

Les virus responsables de la dengue et du chikungunya sont des virus à ARN simple brin. Les virus de la dengue appartiennent à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus*. Il existe quatre sérotypes de virus de la dengue : DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 avec différentes lignées pour chaque sérotype. Ces quatre sérotypes sont tous capables d'infecter l'homme. La symptomatologie se manifeste par une fièvre de la dengue (DF) à déclenchement brutal, accompagnée de céphalées, arthralgies, myalgie. L'évolution de la maladie est parfois marquée par l'apparition de formes cliniques plus sévères, à savoir la dengue hémorragique (DHF) ou à syndrome shock (DSS). En début de maladie, il est difficile de différencier une DF d'une DHF qui se manifeste par des fuites plasmatique, ascites, thrombocytopénie... Les mécanismes conduisant à une DHF ne sont pas clairement élucidés. La sévérité de ces syndromes est surtout notée chez de jeunes enfants immunisés passivement lors de la grossesse ou bien suite à une réponse à une infection secondaire. Il est supposé que les anticorps spécifiques dit « facilitant », déjà présents, facilitent l'infection de cellules cibles. La destruction de ces dernières serait à l'origine de la libération d'éléments vasoactifs ou de facteurs de la coagulation provoquant ainsi un syndrome hémorragique (Jain & Chaturvedi, 2010). Cependant, des observations contredisent cette théorie (Murgue, 2010) D'autres

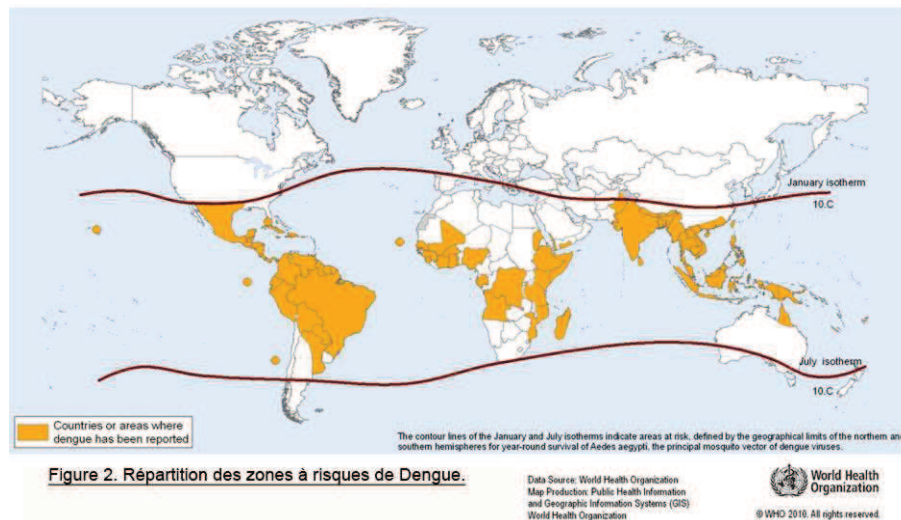
hypothèses sont aussi avancées pour expliquer la sévérité de l'infection notamment les facteurs génétiques de l'hôte et la virulence de certains sérotypes (Kouri *et al.*, 1987; Appanna *et al.*, 2010).

Le chikungunya est causé par un virus de la famille des *Togaviridae*, genre *Alphavirus*. Les virus chikungunya se répartissent en trois sérotypes : Ouest Africain, Est/Sud/Central Africain et Asiatique (Volk *et al.*, 2010). Cette appellation souligne l'origine géographique des premiers isolats du virus. C'est uniquement en Afrique où l'on observe un réservoir animal du virus d'où la déduction de l'origine africaine du virus du chikungunya. Pendant longtemps, cette maladie a été mal diagnostiquée et son importance médicale négligée. Les symptômes de cette maladie sont presque identiques à ceux de la DF. Les arthralgies sévères qui en découlent sont la plupart du temps débilitantes et peuvent durer des semaines, des mois ou parfois même des années.

B. Dengue et chikungunya, situation d'émergence

Ces dernières décennies sont marquées par une incidence croissante de la dengue et du chikungunya. Leur impact en santé publique internationale est non négligeable notamment pour la dengue.

La dengue est l'exemple type de l'arbovirose en émergence constante. A travers le monde, les virus sont essentiellement transmis par *Ae. aegypti*. Cependant, au cours de ces dernières décennies, *Ae. albopictus* a acquis un important potentiel de transmission du virus de la dengue (Paupy *et al.*, 2009; Paupy *et al.*, 2010). Au cours de ces cinquante dernières années, l'incidence de la dengue s'est accrue de trente fois. Cette maladie sévit dans plus de cent pays. Il est estimé qu'environ 2,5 milliards d'individus, soit 40% de la population mondiale, vivent dans des zones à risque (Figure 2).



Chaque année, 50 millions de cas d'infections sont enregistrés à travers le monde et le nombre de pays déclarant des cas de dengue ne cesse d'augmenter (Figure 3).

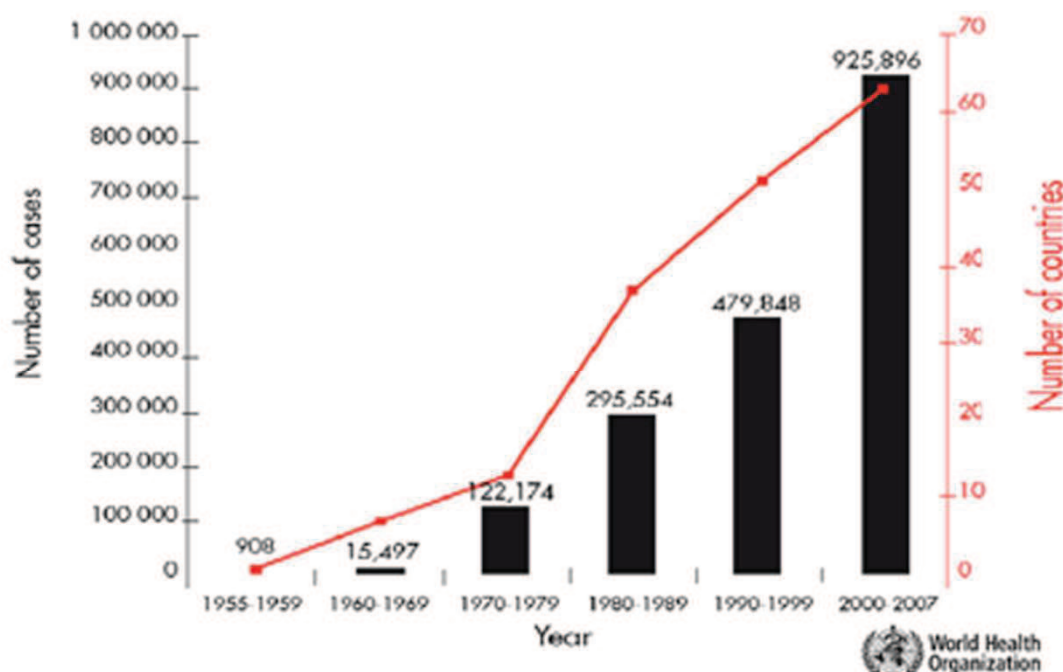


Figure 3. Augmentation des cas de dengue dans le monde entre 1955 et 2007.

La présence de la Dengue dans les zones endémiques a été renforcée, comme en Asie du Sud Est, qui à elle seule concentre 70% des individus à risque. La Thaïlande, le Vietnam et les Philippines enregistrent la majorité des cas avec la circulation des quatre sérotypes. Dans cette partie du monde la dengue est en situation d'hyperendémicité, par exemple en Thaïlande, avec 87% des cas enregistrés qui sont des réinfections. Dans le même temps, une expansion géographique assez importante de cette maladie se manifeste dans le Pacifique-Ouest qui est en proie à des épidémies depuis 2008. L'arrêt de la lutte contre *Ae. aegypti*, en Amérique

Centrale et du Sud a permis son émergence dans cette partie du monde avec la circulation des quatre sérotypes. La transmission en Amérique latine est marquée par une saisonnalité et a considérablement augmentée au cours de ces trente dernières années. Dans cette zone, les symptômes hémorragiques (DHF) sont de plus en plus notés. La situation de certains pays semble très critique, le Brésil enregistre 54% des cas de dengue du continent alors que le Vénézuëla est en proie à un nombre croissant de DHF. Tous les sérotypes du virus sont également retrouvés en Afrique où une augmentation significative des cas a été notée depuis les années 80. Ce caractère résurgent de la maladie dans cette partie du monde est marqué par les récentes épidémies qui ont touché l'Afrique Occidentale et Centrale (WHO, 2009a; Franco *et al.*, 2011).

A l'image de la dengue, le chikungunya est aussi en train de gagner de nouvelles aires géographiques. Ce virus qui s'inscrit dans une dynamique de ré-émergence n'est pas aussi bien documenté que la dengue. Le virus du chikungunya a été isolé pour la première fois au cours d'une épidémie en Tanzanie (Ross, 1956; Atkins *et al.*, 1997). Ce pathogène est essentiellement connu pour circuler de façon selvatique en Afrique (Diallo *et al.*, 1999; Thonnon *et al.*, 1999). Il peut être véhiculé par des vecteurs du genre *Aedes* tels que *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus* et *Ae. taylori* en Afrique de l'Ouest (Diallo *et al.*, 1999) et par *Ae. furcifer* et *Ae. cordellieri* en Afrique du Sud (Jupp & Kemp, 1996). Cependant, des épidémies ayant pour cadre l'environnement urbain ont été notées en Afrique Centrale (Peyrefitte *et al.*, 2008). Les moustiques *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* étaient les vecteurs responsables de ces épidémies. Ces deux vecteurs sont également incriminés sur le continent Asiatique où la circulation du virus du chikungunya est essentiellement urbaine (Powers *et al.*, 2000). Cette partie du monde, notamment l'Asie du Sud-Est a connu d'importantes épidémies urbaines au cours des années 1960 et 1970 (Rao, 1971; Padbidri & Gnaneswar, 1979). Cette vague épidémique s'est estompée pendant de longues décennies pour reprendre en 2004.



Figure 4. Scénario de prédiction de dispersion du virus Chikungunya du continent Africain vers l'Océan Indien et l'Europe depuis les 50 dernières années, d'après de Lamballerie *et al.*, 2008.

(de Lamballerie *et al.*, 2008)

Ces épidémies ont débuté en Afrique de l'Est, au Kenya, avec probablement une lignée virale Est/Sud/Central Africain (Schuffenecker *et al.*, 2006; Chretien *et al.*, 2007). Elles se sont répandues durant les deux années qui suivirent dans toutes les Îles de l'Océan Indien avant d'atteindre le sous continent Indien (Pialoux *et al.*, 2007) (Figure 4). L'épidémie Indienne a permis d'introduire ce virus en zone tempérée Européenne, et notamment en Italie. Au cours de cette épidémie en 2007, 205 cas d'infection furent détectés dans la province de Ravenna au nord de l'Italie (Rezza *et al.*, 2007).

Cette situation reflète le potentiel épidémique de cette maladie dans certaines parties du continent Européen notamment l'Italie et le Sud de la France (Gould *et al.*, 2010; Moro *et al.*, 2010). Si nous prenons l'exemple de la France, certains facteurs semblent favorables à son émergence notamment la présence et le développement d'*Ae. albopictus*, maintenant très bien implanté dans le Sud-Est de la France (La Ruche *et al.*, 2010). De même, le risque de contact des populations européennes, immunologiquement naïves, avec le virus est de plus en plus élevé du fait de l'introduction du pathogène via les touristes en provenance des zones endémiques (Receveur *et al.*, 2010) Cette situation implique que le Sud-Est de la France

pourrait se retrouver en situation épidémique comme ce fut le cas en Italie (Vazeille *et al.*, 2008). L'installation du CHIKV en Amérique du Nord est aussi à prendre en considération du fait de la présence d'*Ae. albopictus* et du risque d'introduction du virus comme ce fut le cas en Italie.

C. Dengue et Chikungunya dans l'Océan Indien : exemple de l'Île de La Réunion

La zone de l'Océan Indien se caractérise par d'importants flux migratoires et commerciaux. Cette situation facilite la circulation d'agents pathogènes engendrant ainsi un risque épidémique relativement élevé. En effet, dans cette partie du monde, d'importantes épidémies de dengue et de chikungunya y ont été observées, depuis 1873 à nos jours (Zeller, 1998). L'exemple de l'Île de La Réunion illustre l'histoire épidémiologique de ces deux maladies dans la zone Sud-ouest de l'Océan Indien. La Réunion, île volcanique de 2511 km² au climat tropical a connu un peuplement récent qui remonte au 17^{ème} siècle. C'est en 1873 que les premières épidémies de dengue y ont été enregistrées. A cette époque, la maladie était communément appelée « fièvre rouge » (Aubry & Gaüzère, 2008). Une deuxième vague épidémique, causée par le sérotype DENV2, toucha l'île dans les années 70 causant ainsi la contamination de 30% de la population, environ 170 000 individus. La dernière épidémie, due au sérotype DENV1, remonte à 2004 et a été moins importante, ne touchant que 228 individus au total (Pierre *et al.*, 2007). De nos jours, les cas recensés de dengue sur l'île sont sporadiques et certains sont importés de la zone de l'Océan Indien.

A l'image de toute la zone de l'Océan Indien, c'est en 2005-2006 que La Réunion a connu sa première épidémie majeure de chikungunya. Le génotype Est/Sud/Central Africain a été à l'origine de cette épidémie. Une mutation du gène de l'enveloppe du virus (E1-A226V) a permis d'optimiser la transmission de la souche virale Réunionnaise par *Ae. albopictus* (Schuffenecker *et al.*, 2006). Cette épidémie Réunionnaise s'est déroulée en deux temps: d'abord entre mars et juillet 2005, 3000 cas ont été enregistrés par la Cellule de l'Institut de veille sanitaire en région, la CIRE (Gerardin *et al.*, 2008), puis très peu de cas ont été recensés jusqu'à décembre 2005. S'en est suivi alors une seconde vague épidémique avec un pic au mois de février 2006 (Renault *et al.*, 2007). Au mois de juillet 2006, la prévalence sérologique dans la population réunionnaise s'éleva à 34,3% soit environ 266000 individus infectés (INVS, 2006). Au cours de l'infection de cette population naïve, en plus des symptômes habituels de la maladie, de nouvelles observations cliniques ont été décrites pour la première fois telles que

la transmission de la mère à l'enfant (Ramful *et al.*, 2007), des arthralgies persistantes chez l'adulte (Hoarau *et al.*, 2010), des syndromes neurologiques (Das *et al.*, 2010). En 2009, des cas sporadiques ont été signalé sur l'île (D'Ortenzio *et al.*, 2009), alors qu'en 2010 une épidémie de moindre envergure a été enregistrée (Dehecq *et al.*, 2010). Ces deux dernières épidémies sont causées par la souche E1-A226V (Schuffenecker *et al.*, 2006). En 2011, l'Île de La Réunion est en situation inter-épidémique aussi bien pour la dengue que pour le chikungunya.

D. Les causes de l'émergence

Plusieurs facteurs sont évoqués pour expliquer la recrudescence de ces infections. L'impuissance de l'arsenal prophylactique et thérapeutique ne permet pas de circonscrire ces pathologies. Dans cette partie, nous évoquerons les causes qui sont en rapport direct avec l'activité humaine mais aussi l'influence environnementale sur le développement de ces pathologies.

Influence de facteurs climatiques

Les changements climatiques observés ces dernières décennies (élévation globale des températures, variations positives de la pluviométrie) sont souvent mis en cause pour expliquer l'apparition ou la persistance de certaines maladies à transmission vectorielle (Gould & Higgs, 2009). En effet, ces conditions climatiques influent beaucoup sur l'abondance des arthropodes et la durée de leur cycle de développement (Focks *et al.*, 1994; Abramides *et al.*, 2011) et de ce fait sur leur capacité vectorielle, donc potentiellement sur leur rôle dans l'émergence et la ré-émergence de maladies. Dans les zones tropicales où les vecteurs comme *Ae. albopictus* sont présents de façon endémique, ces changements climatiques favorisent bien évidemment l'augmentation du nombre de gîtes pour le vecteur et par la même occasion l'accroissement du contact avec les populations humaines, d'où l'augmentation du risque d'infection. Par exemple, la résurgence du chikungunya dans la zone de l'Océan Indien a coïncidé avec une période de réchauffement dans cette partie du monde (Chretien *et al.*, 2007). Dans une moindre mesure, ces conditions climatiques peuvent aussi favoriser la colonisation, définitive ou temporaire, des milieux tempérés par les vecteurs. Par contre, ces changements climatiques, bien que pouvant être très favorables au développement des vecteurs, à eux seuls, ne sont pas suffisants pour expliquer l'émergence de ces pathologies aussi bien en milieu tropical que tempéré.

Les facteurs socio-économiques

Les modifications environnementales du cadre de vie de l'homme ont un impact considérable sur l'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs et ainsi sur l'apparition et la persistance de la dengue et du chikungunya. Parmi ces modifications, nous pouvons notamment citer l'urbanisation galopante et anarchique dans des pays tropicaux émergents (Frankie, 1978). Cette urbanisation se traduit généralement par le développement de villes densément peuplées et présentant une déficience en termes d'aménagement urbain. Par exemple, l'absence de service régulier et efficace de collecte de déchets ménagers favorise le développement des moustiques par la formation de gîtes larvaires (Hii, 1977; Service, 1990). Pour pallier le problème d'adduction d'eau courante, la majorité des habitations dispose de réservoirs de stockage qui favorisent la formation de gîtes larvaires. Par exemple, au Vénézuéla, la fréquence des coupures en eau courante est corrélée aux densités larvaires des moustiques (Barrera *et al.*, 1993). En ce qui concerne l'émergence du chikungunya, les premières épidémies au Kenya sont apparues suite à une période de forte sécheresse. Durant cette période, le stockage d'eau à usage domestique a été associé à l'émergence du chikungunya au niveau de la région côtière.

Le déplacement passif des vecteurs

Le développement des transports internationaux, aussi bien aériens que maritimes, a incontestablement joué un rôle sur l'émergence de la dengue et du chikungunya. La densification du réseau des transports, en facilitant les déplacements des hommes et l'échange de biens à l'échelle planétaire, a par la même occasion favorisé la dispersion à travers le monde des arthropodes et des pathogènes qu'ils transmettent. Ces déplacements s'effectuent pour la plupart du temps sur de très longues distances en un temps relativement court. Par exemple, l'expansion géographique d'*Ae. albopictus* est associée au commerce intercontinental de pneus d'occasion et de plantes (Gould & Higgs, 2009; Scholte *et al.*, 2010). Les voyages touristiques de même que le commerce de bétail peuvent aussi être à l'origine de l'introduction de pathogènes exotiques. La combinaison de ces facteurs, déplacement de vecteurs et hôtes vertébrés infectés, peut favoriser l'émergence de ces maladies arbovirales dans des zones « vierges ». L'épidémie de chikungunya en Italie en 2007, qui est partie d'un seul touriste infecté, en est une parfaite illustration (Rezza *et al.*, 2007). Cette expansion mondiale et rapide d'*Ae. albopictus* à travers les transports maritimes et routiers modifie profondément la cartographie de la distribution mondiale de ce vecteur.

3 *Aedes albopictus* : répartition géographique, dynamique de colonisation et bio-écologie***A. Répartition géographique et dynamique de colonisation***

Ae. albopictus est originaire des forêts de l'Asie du Sud-Est d'où il est parti pour s'implanter dans de nombreuses parties du monde (Figure 5). Cette expansion s'est faite en deux temps. Dans un premier temps, à partir du 19^{ème} et jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle cette espèce a envahi les îles de l'Océan Pacifique et Indien, donc de part et d'autre de l'Asie du Sud-est. A partir de 1962, cette espèce est présente à La Réunion, Madagascar, Maurice, Hawaii, et au Japon (Knudsen, 1995).

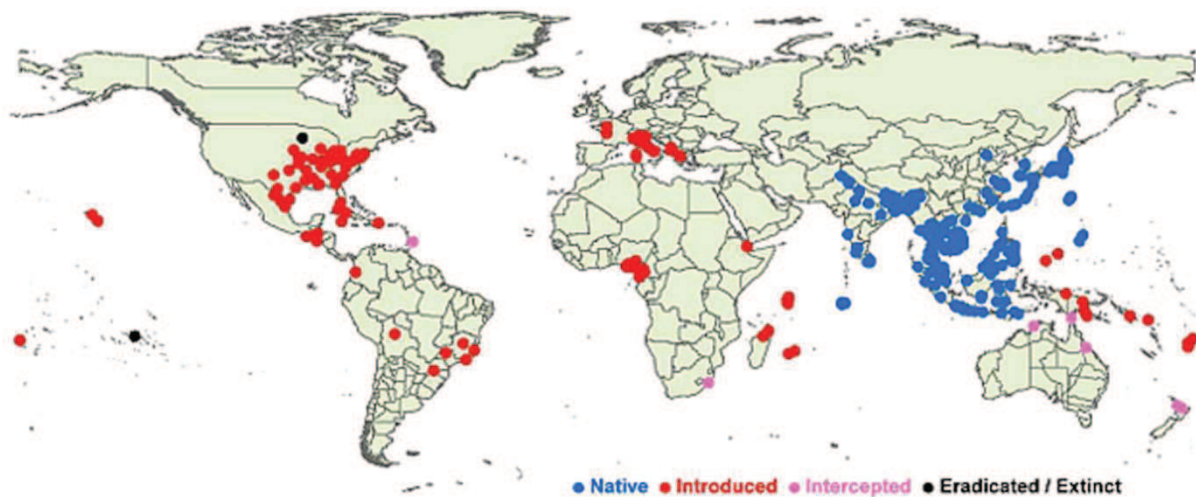


Figure 5. Distribution actuelle d'*Aedes albopictus* dans le monde.

Source: <http://www.landcare-research.co.nz>

La deuxième vague de colonisation s'est faite au cours de ces trois dernières décennies et continue jusqu'à nos jours. Son envergure n'a de limite que l'importance du commerce des pneus d'occasion, de plantes exotiques ou du transport routier, à l'origine de l'introduction d'*Ae. albopictus* dans de nouvelles contrées. Sur le continent Européen, la présence d'*Ae. albopictus* a été signalée pour la première fois en Albanie en 1979 (Adhami & Reiter, 1998). Actuellement, il est présent dans une douzaine de pays et s'implante durablement dans la partie sud de l'Europe. La dynamique de colonisation du pourtour méditerranéen est fulgurante (La Ruche *et al.*, 2010) et avec une présence importante en milieu urbain (Valerio *et al.*, 2010). L'infestation de l'Italie par ce moustique est probablement due à l'importation de pneus usés en provenance des Etats-Unis. Les Etats-Unis semblent être le premier territoire des Amériques où *Ae. albopictus* a été introduit. Sa présence notée au Texas depuis 1986 a été

certainement à l'origine de son introduction au Mexique (Moore, 1986). Cette période a aussi vu la colonisation de l'Amérique latine *via* le Brésil (Knudsen, 1995). En 1993, sa présence dans les Caraïbes est définitivement établie (PAHO, 1993). Aujourd'hui, *Ae. albopictus* est présent sur presque tout le continent Américain allant des Etats-Unis jusqu'en Argentine. Le continent Africain n'est pas en reste, la colonisation de sa zone équatoriale se fait petit à petit. Après le Nigeria, le Cameroun, La Guinée Equatoriale et le Gabon (Paupy *et al.*, 2009), sa présence vient récemment d'être signalée en République Centrafricaine (Diallo *et al.*, 2010). De même, cette dynamique de colonisation s'étend vers le nord du continent avec la présence du moustique sur le sol Algérien (Izri *et al.*, 2011).

Les déplacements passifs à l'échelle internationale ont contribué à l'expansion géographique d'*Ae. albopictus*, mais cela n'a été possible que grâce à la biologie particulière de ce vecteur qui lui permet de supporter les conditions particulières de voyage et grâce à sa plasticité qui

lui permet de coloniser des milieux très différents de son origine.

B. Bio-écologie d'Ae. albopictus

Le moustique tigre a été décrit pour la première fois en 1894 par Skuse. Ce moustique (Diptère, Nématocère) relève de la famille des *Culicidae*, sous-famille des *Culicinae*, genre *Aedes* sous-genre *Stegomyia*. Le cycle de vie d'*Ae. albopictus*, comme tous les moustiques, comprend deux phases : une phase aquatique et une phase aérienne.

La phase aquatique correspond au développement de stades immatures du moustique qui comprend les œufs, les quatre stades larvaires et le stade nymphal (Figure 6). Sur l'île de La Réunion, ce cycle aquatique d'*Ae. albopictus* peut avoir lieu dans des gîtes domestiques comme les soucoupes de pot de fleurs. Au sein de l'espace péri-domestique, les gîtes sont constitués le plus souvent de pneus usés ou de larges amas de déchets. Ces types de gîtes se trouvant dans l'environnement domestique et péri-domestique résultent de l'activité de l'homme d'où l'appellation de gîtes artificiels. A La



Figure 6. Stades de développement d'*Aedes albopictus*.

De haut en bas : les œufs, la larve, la nymphe, l'adulte femelle (DRASS, Servie de Lutte Anti Vectorielle)...

Réunion, il existe aussi des gîtes dits naturels retrouvés au niveau des ravines, trous de rochers ou d'arbres (Figure 7).

Ce stade immature débute avec la ponte des œufs. Après cette ponte, si les conditions



Figure 7. Gîtes de développement d'*Ae. albopictus*.

De haut en bas, gîte domestique, peridemoestique, naturel (DRASS).

Sur l'île de La Réunion, le taux intrinsèque de croissance optimale de l'adulte se situe entre 25 et 30°C. Le taux de croissance étant négatif à 35°C, cela signifie que la population d'*Ae. albopictus* décline à cette température. La durée de vie de la femelle adulte est inversement corrélée à l'élévation de la température, elle est de 38,5 et 19,86 jours à 15 et 35°C, respectivement. La durée de vie des femelles *Ae. albopictus* est en moyenne plus importante que celle de mâles. Les femelles sont capables de produire en moyenne 151 œufs à 25°C. Ceci démontre que cette souche d'*Ae. albopictus* semble très adaptée aux conditions climatiques de l'Île de La Réunion où les écarts de températures sont très importants (Delatte *et al.*, 2009). Cela explique aussi son implantation, apparemment facile et rapide dans les milieux nouvellement colonisés, que ce soit en zone tropicale ou tempérée. Les indices de développement expérimental en basses températures, aussi bien pour les stades immatures que pour la longévité des femelles adultes, sont en accord avec le comportement de ce vecteur

environnementales sont défavorables, ces œufs ont la capacité de rester à l'état quiescent pendant plusieurs mois. En milieu favorable, ces œufs se dispersent en surface du milieu aquatique pour entamer leur développement et donner des larves en 48 heures. Au bout de 5 à 6 jours, les larves passeront du stade 1 au stade 4 avant de se transformer en nymphe dont le développement se déroule en 48 heures. Bien évidemment, la durée de ces stades est très liée aux conditions environnementales telles que la température et la pluviométrie. Pour les *Ae. albopictus* collectés sur l'Île de la Réunion, il a été montré, en conditions expérimentales, que la température minimale pour le développement des stades immatures est de 10,4°C ; ce développement est optimal à 29,7°C. Le temps d'accomplissement minimum pour cette phase immature est de 8,8 jours à 30°C (Delatte *et al.*, 2009). Au bout du cycle aquatique, débute le cycle aérien marqué par l'émergence de moustiques adultes.

dans la nature. En effet, *Ae. albopictus* est trouvé à plus de 1200 m pendant l'hiver austral sur l'île de La Réunion. Ceci expliquerait aussi son adaptation rapide dans les territoires tempérés récemment colonisés.

Seules les adultes femelles sont hématophages donc susceptibles de piquer l'homme. Le repas de sang est nécessaire pour assurer la maturation de leurs œufs. *Ae. albopictus* a une activité diurne avec un pic d'agressivité matinal et crépusculaire. Ce vecteur a une grande plasticité écologique qui lui permet de se nourrir sur différents hôtes vertébrés en fonction de leur disponibilité et d'occuper différents types d'habitat. A La Réunion, ce moustique présente une forte exophagie et exophilie. Des investigations expérimentales ont montré sa préférence pour l'homme par rapport à d'autres vertébrés tels que le chien, le poulet, le veau et la chèvre (Delatte *et al.*, 2010). En conditions naturelles, en zone tempérée urbaine et rurale, cette plasticité écologique a également été observée. En effet, en milieu urbain, *Ae. albopictus* se nourrit essentiellement sur l'homme alors que l'inverse est observé en milieu rural où les chevaux et les bovins sont majoritairement piqués (Valerio *et al.*, 2010).

Il a été montré expérimentalement à La Réunion que le premier repas sanguin a lieu deux jours après l'émergence des adultes, si les conditions sont favorables (température entre 20°C et 30°C). Ce premier repas sanguin est retardé dans les conditions de température extrême: à 15 ou 35°C, les femelles prennent leur premier repas sanguin à 15 et 10,83 jours, respectivement (Delatte *et al.*, 2009). Cette première prise de sang marque le début du cycle gonotrophique du moustique qui est l'intervalle de temps entre deux repas sanguins. Grâce à son apport en nutriments notamment en protéines, le repas de sang permet la maturation des œufs qui est la deuxième phase de ce cycle. La ponte de ces œufs constitue la dernière phase de ce cycle gonotrophique. Chez *Ae. albopictus*, la durée de ce cycle est variable en fonction de la température. Expérimentalement, ce cycle est de 3,5 jours à 30°C.

Les femelles adultes se contaminent au moment du repas sanguin effectué chez un hôte vertébré infecté. Une fois que le repas de sang contaminé est ingéré, les particules virales franchissent la paroi stomacale du vecteur avant de se multiplier dans tous les organes y compris les ovaires. L'arrivée des particules virales dans les glandes salivaires n'est pas forcément synonyme de transmission lors d'une prochaine piqûre. La traversée des tissus épithéliaux des glandes salivaires permet aux particules virales de se retrouver dans la salive du vecteur lui conférant ainsi un potentiel contaminant (Degallier *et al.*, 1988). Cette phase de réplication du virus au sein du moustique est correspond à la période d'incubation extrinsèque et dépend du cycle gonotrophique. *Ae. albopictus* est capable de transmettre de nombreux virus. Cette compétence vectorielle est très variable en fonction des virus et souches. Par

exemple, *Ae. albopictus* est considéré comme un vecteur secondaire du virus de la dengue comparé à la capacité de transmission du moustique *Ae. aegypti*. Par contre, il peut être considéré comme un vecteur majeur du virus du chikungunya. Il a été montré à La Réunion qu'*Ae. albopictus* permettait une réplication un peu plus intense de la souche virale mutée E-A226V comparé à *Ae. aegypti* (Martin *et al.*, 2010). Chez *Ae. albopictus*, les phénomènes de co-infections sont aussi à prendre en considération pour évaluer pleinement sa capacité de transmission. En effet, contrairement à *Ae. aegypti*, des expérimentations ont montré qu'il est tout à fait possible d'infecter simultanément *Ae. albopictus* par les virus de la dengue et du chikungunya. En plus d'aboutir à l'infection des glandes salivaires, les particules virales sont aussi retrouvées dans la salive du vecteur. Il a été montré que suite à une première infection par le virus de la dengue, *Ae. albopictus* est capable de se contaminer au cours du cycle gonotrophique suivant par le virus du chikungunya (Vazeille *et al.*, 2010). Ainsi, l'importance de la capacité vectorielle de ce moustique ne se limite pas uniquement à la réceptivité dont il fait preuve par rapport à une souche virale particulière. En effet, il serait capable de transmettre au cours de sa vie les virus de la dengue et du chikungunya mais plus encore de délivrer une piqûre doublement infectante pouvant aboutir chez l'homme à une double contamination, par les virus du chikungunya et de la dengue. De fait, il a été retrouvé chez un même homme des infections concomitantes par le virus de la dengue et le virus du chikungunya (Congpuong *et al.*, 2010). La dissémination des particules virales dans l'ensemble des organes du moustique, jusque dans les ovaires, est aussi un moyen de renforcer et de maintenir son potentiel de transmission. En effet, la contamination des ovaires permet le passage des virus dans les œufs du vecteur. Les moustiques adultes issus des ces œufs infectés pourraient se retrouver être directement contaminant pour l'homme. Cette transmission verticale est à prendre en considération car elle pourrait jouer un rôle déterminant dans le maintien de la circulation du virus en milieu naturel en période inter épidémique (Delatte *et al.*, 2008; Ratsitorahina *et al.*, 2008) même si expérimentalement elle semble négligeable (Vazeille *et al.*, 2009).

De même, le potentiel de transmission pourrait être influencé par des facteurs inhérents au vecteur. Comme beaucoup d'arthropodes, *Ae. albopictus* est susceptible d'abriter des endosymbiontes comme la bactérie *Wolbachia*. En considérant toutes les espèces d'insectes, la fréquence de cette infection bactérienne est de 20 à 76% (Werren & Windsor, 2000). Toutes les lignées naturelles connues d'*Ae. albopictus* sont porteuses de cette bactérie et elles sont couramment infectées par les souches wAlbA et wAlbB de *Wolbachia* (Stouthamer *et al.*, 1993; Werren *et al.*, 1995). Grâce à cette contamination, la bactérie arrive à manipuler les

mécanismes physiologiques du moustique. Cette manipulation aboutit le plus souvent à une féminisation des mâles, à la parthénogenèse, la mort des mâles ou au phénomène d'incompatibilité cytoplasmique. L'ensemble de ces actions conduit à une modification du sex-ratio en faveur des moustiques femelles infectées par *Wolbachia* (Saridaki & Bourtzis, 2010). Il a été montré que l'infection par *Wolbachia* est sans conséquence sur certains traits de vie du moustique comme la ponte et l'éclosion des œufs (Wiwatanaratnabutr *et al.*, 2010). De même, il ne serait pas nécessaire au développement du virus du chikungunya au sein du moustique (Vazeille *et al.*, 2010). Ces paramètres laissent donc penser que l'infection de *Wolbachia* n'a pas d'impact sur la capacité de transmission du moustique. Mais d'un autre côté, il est tout à fait possible que cette bactérie joue un rôle dans la transmission des pathogènes. La bactérie pourrait agir de façon indirecte du moment qu'elle est capable d'optimiser le développement du virus au sein du moustique (Mousson *et al.*, 2010). De même, il a été montré que le succès de l'accouplement chez les moustiques est variable en fonction de l'infection ou non des mâles par *Wolbachia*. Des taux élevés d'accouplement ont été notés avec des mâles infectés en comparaison avec des non-infectés et cela quelque soit le statut des femelles (Wiwatanaratnabutr *et al.*, 2010). De ce fait, le rôle de cette bactérie dans la transmission doit être reconsidéré et étudié de façon beaucoup plus approfondie.

4-Lutte contre la dengue et le chikungunya et ses limites

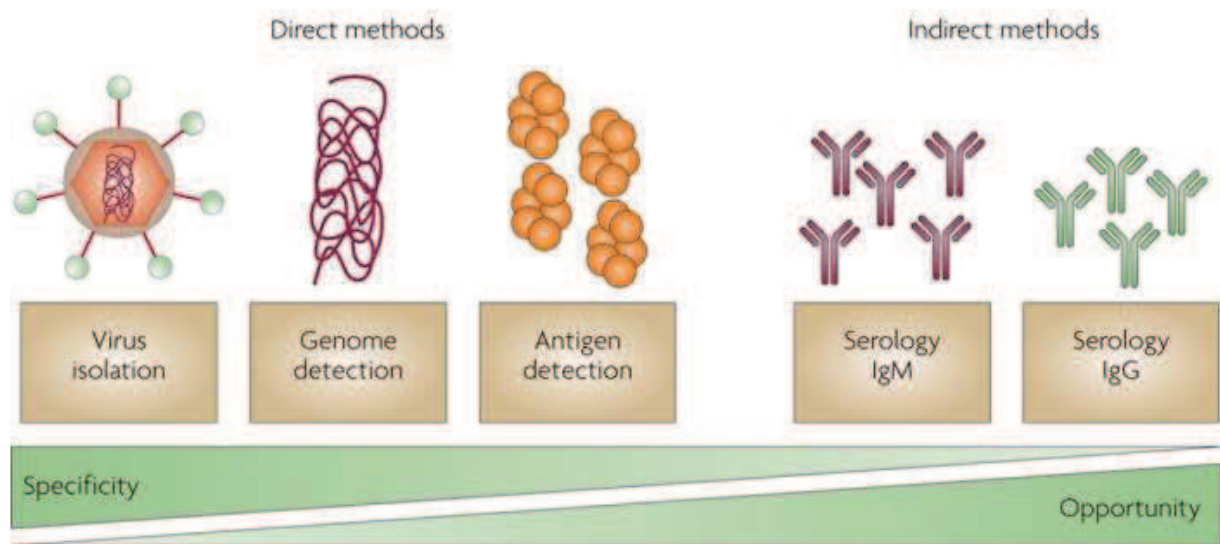
L'émergence de la dengue et du chikungunya se fait dans un contexte particulier faisant intervenir plusieurs facteurs biologiques, sociaux et environnementaux. De ce fait, pour lutter efficacement contre ces pathologies, il est nécessaire de développer une lutte intégrée, prenant en compte ces facteurs et une intervention au niveau des 3 protagonistes : homme, vecteur et pathogène. Dans cette partie, nous évoquerons les stratégies de lutte concernant les vecteurs *Ae. albopictus* et les virus transmis.

A. Lutte contre les virus

La lutte contre les virus de la dengue et du chikungunya se fait essentiellement à deux niveaux : le diagnostic et le développement de thérapies prophylactiques.

A.1. Diagnostic

Le diagnostic de ces maladies constitue un élément clé dans la lutte contre l'émergence de la dengue et du chikungunya. Le premier diagnostic repose sur la symptomatologie. Cependant, ce diagnostic clinique peut se révéler très peu fiable. Les symptômes notés au cours d'une infection par le virus de la dengue et du chikungunya sont la plupart du temps identiques à d'autres maladies fébriles retrouvées notamment en zones tropicales (paludisme par exemple). De même, il est parfois difficile de faire un diagnostic différentiel entre la dengue et le chikungunya en se basant uniquement sur les manifestations cliniques. Le diagnostic biologique est beaucoup plus pertinent. Il existe différents types de diagnostic biologique, direct ou indirect, mais présentant certaines limites quant à la détection efficace et spécifique de l'infection (Figure 8).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 8. Techniques de diagnostic biologique de la dengue et du chikungunya. d'après Poltkin et al., 2010.

"Opportunity" fait référence au fait que les tests de détection des anticorps sont généralement les techniques diagnostics les plus pratiques et simples à mettre en oeuvre.

A.1.1. Diagnostic direct

Le diagnostic direct repose sur la mise en évidence soit du virus soit des composants viraux. Il existe différents types de diagnostics directs dont le principe est identique pour l'identification des virus de la dengue et du chikungunya.

-Culture virale

Cette technique d'isolation virale consiste à cultiver l'échantillon biologique à tester au sein de cellules de moustique type C6/36 ou dans des cellules de mammifère. L'utilisation de technique de coloration ou d'immuno-détection permettra de mettre en évidence les cellules

infectées (Davis *et al.*, 1971; Klungthong *et al.*, 2007). Elle présente l'avantage de pouvoir confirmer l'infection de façon spécifique et d'identifier en même temps le sérotype (Abramides *et al.*, 2011) ou lignée (chikungunya) virale. L'inconvénient de cette technique est qu'elle est difficilement applicable comme méthode de diagnostic en zone endémique du fait de la lourdeur des manipulations et de l'expertise requise mais aussi de son coût élevé. En plus, le prélèvement des échantillons doit se faire pendant la phase virémique.

-Détection de l'ARN viral

Cette technique est basée sur l'amplification de l'acide nucléique viral à partir d'échantillons de tissu, sang total ou sérum prélevés en phase virémique (Lanciotti *et al.*, 1992; Niyas *et al.*, 2010). L'emploi de la NESTED PCR (PCR « nichée ») permet de gagner en spécificité. Cette technique très sensible permet de confirmer l'infection en 48 h tout au plus et d'identifier les sérotypes ou lignées responsables de l'infection. Comme la méthode de culture virale, cette technique n'est pas applicable en routine et est susceptible de générer des résultats faussement positifs.

-Détection de l'antigène viral

Cette technique est basée sur la mise en évidence des antigènes viraux. Parmi des antigènes, la détection des protéines non structurales est plus fréquente (Hasebe *et al.*, 2002; Dussart *et al.*, 2006). Elle peut se faire par la technique ELISA qui permet de détecter la présence des Ac monoclonaux. Cette approche est moins lourde que les deux précédemment citées et est facilement applicable en zone endémique. Tout de même, elle présente l'inconvénient d'être moins sensible.

En zone d'endémie, les ré-infections peuvent être fréquentes, l'utilisation de ces méthodes de diagnostics directs ne permet pas de renseigner s'il s'agit d'infection secondaire ou pas.

A.1.2. Diagnostic indirect

Cette technique est essentiellement basée sur la sérologie par l'évaluation des réponses IgG et IgM dirigées contre les protéines de l'enveloppe virale (Kuno *et al.*, 1991; Grivard *et al.*, 2007). L'intensité de ces réponses anticorps est dépendante du nombre d'infections (Figure 9) : par exemple pour une infection primaire le taux IgM est très élevé alors que ce n'est pas le cas au cours d'une infection de rang ≥ 2 alors que l'inverse est observé pour la réponse IgG. Cette cinétique de la réponse Ac présente une grande utilité quand il s'agit de diagnostiquer la maladie en zone endémique.

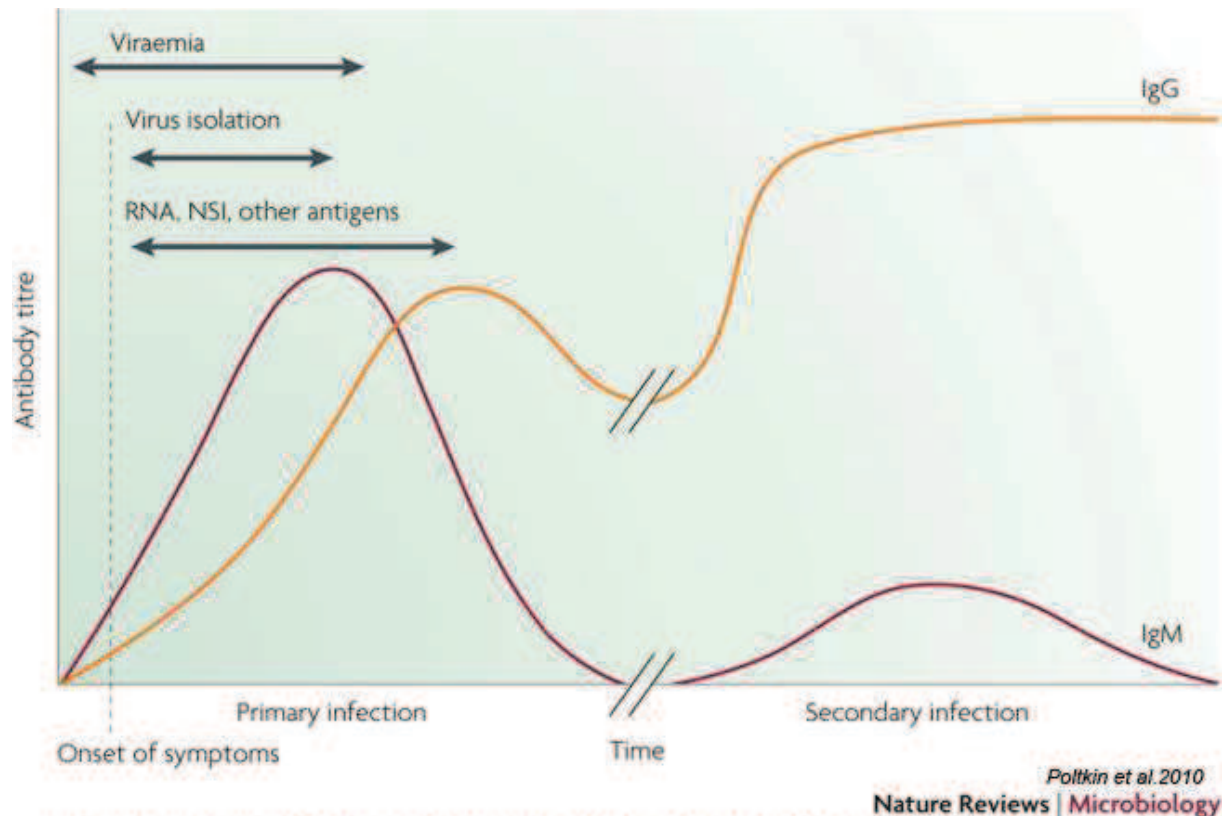


Figure 9 .Cinétique de la réponse Anticorps contre la dengue et le chikungunya.

Les titres d'Ig M et d'Ig G varient en fonction de l'infection; Lors d'une primo infection les Ig M sont très élevées et la réponse IgG est moindre, en revanche lors d'une infection secondaire ce sont essentiellement les Ig G qui sont détectables.

Par exemple le dosage des IgM pourrait servir à établir le diagnostic quand il s'agit d'une première infection du fait de la forte prévalence de cet isotype et de sa spécificité. Par contre, il devient difficile de poser un diagnostic quand il s'agit d'une seconde infection où leur niveau peut être très bas. De ce fait, en zone d'endémie, le dosage des IgM est souvent peu pertinent pour détecter une infection en cours du fait que les réinfections peuvent être fréquentes. Dans ces zones, l'étude de la séroconversion IgG est nécessaire pour apporter une indication supplémentaire quant à l'état de l'infection. Ces techniques sérologiques présentent l'avantage d'être facilement utilisable en zone endémique mais requiert une certaine prudence quant à leur interprétation. Il n'est pas rare de noter des différences de sensibilité et de spécificité en fonction des kits de diagnostic utilisés (Blacksell *et al.*, 2006; Wiwatanaratnabutr *et al.*, 2010). Souvent, l'association de techniques de détection directe pourrait aider à poser le diagnostic de la maladie. Cet état de fait reflète les difficultés rencontrées pour diagnostiquer ces maladies. Actuellement beaucoup d'efforts sont consentis pour améliorer et rendre plus accessibles ces techniques de détection. Par exemple, l'utilisation de la salive de l'homme, comme échantillon biologique dans le diagnostic de la

dengue a montré des résultats prometteurs et il a été récemment développé un peptide viral qui pourrait faciliter le diagnostic du chikungunya (Morey *et al.*, 2010; Yap *et al.*, 2011).

A.2 Thérapies et vaccins

L'absence de thérapie médicamenteuse et de vaccin est une des principales limitations de la lutte contre la dengue et le chikungunya. La prise en charge médicale de ces deux maladies repose uniquement sur le traitement des symptômes. Le développement de thérapies curatives reste toujours à l'état embryonnaire malgré quelques avancées notées ces dernières années. Par exemple pour la dengue des stratégies sont en cours afin de bloquer la réplication virale au sein de l'hôte vertébré. Ces stratégies se basent sur l'inhibition de l'activité des protéases du virus telles que NS2B/NS3 (Yang *et al.*, 2011). Certaines substances comme l'arbidol utilisée pour combattre l'influenza ont montré une capacité à empêcher la propagation du virus du chikungunya dans des cellules Vero immortalisées ou dans des culture primaires de fibroblastes humains (Delogu *et al.*, 2011). Le développement de ces stratégies est limité par l'indisponibilité de modèles animaux primate non humain qui développent les mêmes symptômes que l'homme (Cassetti *et al.*, 2010). L'emploi de petits mammifères pose aussi problème du fait des faibles taux de réplication virale après infection. Une alternative pourrait être l'utilisation de modèle de rongeur « humanisé » qui a montré des résultats probants en développant certains symptômes similaires à ceux notés chez l'homme au cours d'une infection par la dengue (Mota & Rico-Hesse, 2011). Tout récemment, il a été possible d'induire chez une souris sauvage le syndrome d'arthrite provoqué par l'infection du virus du chikungunya (Gardner *et al.*, 2010).

Le développement de vaccins reste le plus grand défi dans la lutte contre ces arboviroses. Actuellement beaucoup d'efforts sont consentis pour arriver à maîtriser l'expansion de ces maladies par l'emploi de la stratégie vaccinale. Les stratégies vaccinales sont de quatre types : vaccin vivant atténué, vaccin recombinant, vaccin inactivé et vaccin à ADN. Cependant, le développement de ces stratégies est confronté à divers écueils biologiques. Par exemple, pour le chikungunya, une dizaine d'essais vaccinaux ont été réalisés mais les résultats restent mitigés quant à leur future application. Dans certains cas, on se retrouve dans l'impossibilité de supporter une production conséquente d'agent vaccinal comme ce fut le cas avec la « Formalin-killed CHIKV » qui a été montré immunogénique chez l'homme et certains primates (Hu *et al.*, 2011). Certains essais vaccinaux ont montré une capacité à induire une protection mais leur utilisation réelle est contrariée par la nécessité de recourir à plusieurs doses pour obtenir cet effet (Akahata *et al.*, 2010). Ces deux facteurs, quantité de production

et répétition des doses, constituent des facteurs limitant pour le développement de ces vaccins. La rentabilité de tels vaccins pose problème, le plus gros des marchés est constitué par des populations à faible pouvoir d'achat dans les pays en voie de développement. Ou bien, dans certains cas, leur utilisation est remise en cause par l'apparition d'effets secondaires chez l'homme comme ce fut le cas avec le vaccin atténué TSI-GSD-218 contre le chikungunya (Edelman *et al.*, 2000). De plus, la conception même de certains vaccins peut présenter des risques potentiels chez les populations car il n'est pas exclu d'induire des recombinaisons génétiques entre différents virus constituant des vaccins chimériques qui pourraient mettre en danger les populations vaccinées. Il en est de même des vaccins vivants atténués qui ne doivent pas induire des niveaux de répllication pouvant aboutir à l'infection des moustiques vecteurs donc augmenter le risque de transmission. L'existence de différents sérotypes viraux pose aussi problème dans le développement de ces vaccins. Un vaccin efficace contre la dengue devrait induire une protection contre les quatre sérotypes. Le vaccin chimérique « ChimeriVax-Dengue » est ainsi l'un des candidats le plus prometteur (Guy *et al.*, 2011).

Vaccine approach	Developer	Status
Live attenuated tetravalent chimeric YF-DEN vaccine	Sanofi Pasteur	Phase II
Live attenuated tetravalent viral isolate vaccine	WRAIR and GSK	Phase II
Live attenuated chimeric DEN2-DEN vaccine	CDC and Inviragen	Phase I
Recombinant E subunit vaccine	Merck	Phase I
Live attenuated tetravalent vaccine comprising 3' deletion mutations and DEN-DEN chimeras	US NIH LID and NIAID	Phase I
Subunit recombinant antigen (domain III) vaccine	IPK/CIGB	Preclinical
Live attenuated chimeric YF-DEN vaccine	Oswaldo Cruz Foundation	Preclinical
Tetravalent DNA vaccine	US NMRC and GenPhar	Preclinical
Purified inactivated tetravalent vaccine	WRAIR and GSK	Preclinical

CDC, Centers for Disease Control and Prevention; CIGB, Center for Genetic Engineering and Biotechnology; GSK, GlaxoSmithKline; IPK, Pedro Kouri Tropical Medicine Institute; NIAID, National Institute for Allergy and Infectious Diseases; US NIH LID, United States National Institutes of Health Laboratory of Infectious Diseases; US NMRC, United States Naval Medical Research Center; WRAIR, Walter Reed Army Institute of Research; YF, yellow fever.

Figure 10. Candidats vaccins contre la Dengue. d'après Guzman *et al.*, 2010, *nature reviews microbiology*.

L'aboutissement de ces stratégies vaccinales ou thérapeutiques constituerait une avancée certaine dans la lutte contre ces maladies. Mais face à la situation actuelle, le meilleur moyen disponible pour lutter contre l'émergence de la dengue et du chikungunya reste, aujourd'hui, la lutte contre les moustiques vecteurs.

B. Lutte contre le vecteur *Aedes albopictus*

Comme pour tous les moustiques, plusieurs moyens de lutte peuvent être mis en œuvre pour empêcher le développement d'*Ae. albopictus*. A moins d'une lutte 100% efficace (ce qui n'est pas le cas), cette lutte doit être coordonnée de telle sorte que tous les stades du moustique

(aquatique et adulte) seront ciblés pour en assurer une meilleure efficacité. En fonction de la biologie du vecteur, elle se fera par des techniques plus ou moins sophistiquées.

Aménagement de l'environnement.

En zone habitée, l'aménagement du cadre de vie est souvent un élément clé dans la lutte contre *Ae. albopictus*. Un aménagement adéquat permettrait de réduire significativement le nombre des gîtes à proximité ou au sein même des habitations (WHO, 2009b). Cette technique est érigée en première ligne de défense. Elle se fait par la destruction et l'élimination des gîtes larvaires potentiels, naturels ou artificiels, les plus productifs. Dans la plupart des cas, l'objectif de cette stratégie de lutte est de mettre en place un système d'approvisionnement d'eau potable correct et efficace afin de lutter contre le stockage de l'eau qui est souvent source de production de moustiques dans l'environnement domestique. Le cas échéant, assurer un nettoyage approprié des réservoirs peut être déterminant dans la réduction des gîtes. La gestion des déchets, surtout en milieu urbain, est aussi capitale dans la réduction du développement de gîtes et la réduction des populations de vecteurs. Par exemple, les pneus usés trouvés au niveau de l'espace péri-domestique constituent une source importante de production d'*Aedes* en zone urbaine. Un autre aspect à ne pas négliger consiste dans le nettoyage de certains gîtes artificiels tels que les soucoupes et pots de fleurs. Cet aspect semble très important si nous considérons certaines zones à risque comme La Réunion où la population dispose d'un réseau d'approvisionnement en eau potable correcte et un système de gestion de déchets performant.

Dans la mesure où ces moyens d'aménagement sont insuffisants pour éliminer certains gîtes, on peut recourir à des larvicides comme le téméphos ou le *Bacillus thuringiensis var israeliensis* (Bti). L'utilisation des larvicides dépendra aussi des conditions climatiques ; par exemple à La Réunion, les fortes pluviométries peuvent limiter l'efficacité de leur emploi au niveau des ravines. La durée de leur efficacité déterminera aussi la répétition de leur application au niveau des gîtes larvaires. Le faciès de transmission des maladies reste l'élément déterminant dans la fréquence d'utilisation des larvicides, en zone de transmission pérenne, leur application peut se faire de façon routinière. Cependant, ces méthodes (aménagement environnemental et utilisation de larvicides) peinent souvent à impacter la densité de moustiques adultes. Dans la majorité des cas, il est nécessaire de recourir à des pulvérisations d'insecticides adulticide pour arriver à une réduction conséquente de la densité des *Ae. albopictus*. Cette pulvérisation peut se faire en péricentral ou en pulvérisation spatiale. En mode péricentral (application directe sur les gîtes), l'emploi des insecticides présente

l'avantage d'avoir un effet aussi bien sur les stades immatures que sur les adultes se trouvant au sein des gîtes. La pulvérisation spatiale constitue un moyen d'élimination massive et rapide des adultes et constitue une solution d'urgence afin de contrôler la propagation des épidémies. Pour qu'elle soit efficace, il est recommandé d'effectuer des traitements tous les 2-3 jours sur 10 jours. L'efficacité de cette pulvérisation spatiale dépend notamment des conditions climatiques, de l'étendue de la zone à traiter mais surtout de la capacité à toucher les moustiques se trouvant au sein des habitations.

En zone d'endémie, la combinaison de ces techniques (aménagement environnemental, utilisation de larvicides et pulvérisation d'insecticides) est nécessaire au succès de la lutte anti-vectorielle. A La Réunion, en plus de ces techniques, la lutte contre *Ae. albopictus* et la transmission de pathogène s'adosent à un système d'information géographique et, de plus, elle s'appuie sur un système dynamique de recherche de cas d'infection chez l'homme, pour mener des opérations préventives dans les zones prioritaires (Dehecq *et al.*, 2011). Cependant l'impact de ces stratégies est de plus en plus limité notamment du fait de l'apparition de résistances aux insecticides chez le vecteur. De plus en plus, il est noté une diminution de la susceptibilité des vecteurs aux insecticides. Dans certaines parties du monde comme la Thaïlande où le risque de transmission de la dengue et du chikungunya est élevé, *Ae. albopictus* a réussi à développer des résistances contre la majorité des insecticides utilisés (Jirakanjanakit *et al.*, 2007; Pethuan *et al.*, 2007). Tout récemment, dans cette partie de l'Asie du Sud Est, la mutation *kdr* qui confère une résistance aux pyréthroides a été mise en évidence chez *Ae. albopictus* (Sawabe *et al.*, 2010). Ce phénomène de résistance se retrouve un peu partout à travers le monde : aux Etats-Unis (Liu *et al.*, 2004) et tout récemment en Afrique Centrale (Paupy *et al.*, 2010). Cette situation entrave essentielle la lutte anti-vectorielle d'autant plus que les résistances sont observées contre plusieurs classes d'insecticides. Cette situation réduit considérablement le panel d'insecticides utilisables d'autant plus que le développement de nouveaux produits a connu un frein depuis plusieurs décennies. L'impact de ces deux facteurs dans le succès de la lutte anti-vectorielle est considérable. Cette situation a conduit à l'exploration d'autres pistes pouvant permettre de combattre efficacement les vecteurs. La manipulation génétique des vecteurs peut constituer une alternative pour lutter efficacement contre *Ae. albopictus*. L'impact de ces stratégies génétiques se situe à deux niveaux :

Réduction de la population de vecteurs

La faisabilité et le succès de ces méthodes complémentaires de lutte dépendent de plusieurs facteurs qu'il est nécessaire de maîtriser avant le démarrage de toute opération.

Technique de l'insecte stérile (TIS). Cette technique de contrôle biologique repose sur la rupture du processus naturel de reproduction des vecteurs par l'introduction en masse dans le milieu naturel d'individus mâles ou femelles stérilisés à l'aide d'agents mutagènes. La copulation entre la population sauvage et la souche stérile aboutit à la production d'œufs dont le développement n'arrive pas au stade d'éclosion. A la longue, ce processus aboutira à l'extinction de la population sauvage (Thome *et al.*, 2010).

Par exemple, la technique de l'insecte stérile (TIS) pourrait être une stratégie performante, et particulièrement en zone faiblement ou récemment colonisées par *Ae. albopictus*. Par exemple, dans le bassin Méditerranéen (Urbanelli *et al.*, 2000) ou le milieu insulaire, il est en effet probable que le vecteur présente une faible variabilité génétique, ce qui pourrait faciliter son contrôle. L'application de la TIS à *Ae. albopictus* trouve aussi son intérêt du fait que ce moustique a une propension à coloniser les zones urbaines où il présente une faible dispersion (Focks *et al.*, 1994) limitant ainsi la zone à traiter. De même, la mise en place de cette technique ne peut se faire qu'accompagnée d'une capacité énorme de production de mâles stériles en insectarium. Cette capacité de production ne devrait pas être une entrave pour *Ae. albopictus* dont la facilité de production en laboratoire est bien connue (Calvitti *et al.*, 2010). Le succès d'une telle mesure devrait aboutir à une diminution de la population de vecteurs et potentiellement d'une rupture de la transmission.

Grâce aux endosymbiontes bactériens, il est aussi possible d'élaborer des stratégies conduisant à une réduction de la population vectorielle. A cet effet, la bactérie *Wolbachia* pourrait servir d'alternative dans la lutte contre le développement des populations d'*Ae. albopictus*. Par exemple, chez *Ae. aegypti*, qui n'est pas naturellement infecté par *Wolbachia*, des expérimentations de transinfection ont montré que cette bactérie était capable de réduire la durée de vie de ce moustique (McMeniman *et al.*, 2009). Aussi, il a été montré chez *Ae. aegypti* que cette infection bactérienne avait tendance à altérer la prise du repas sanguin chez les femelles âgées (Turley *et al.*, 2009). A partir de là, il est possible d'imaginer d'effectuer des lâchés d'*Ae. albopictus* portant une souche de *Wolbachia* incompatible avec celle retrouvée chez la population sauvage, et ainsi de réduire la densité de vecteurs. Une telle perspective chez le moustique *Ae. albopictus* serait d'une extrême utilité sur un plan épidémiologique, vu que l'essentiel de la transmission des pathogènes est assurée par les femelles âgées.

Empêcher la transmission :

Une autre voie consiste à empêcher la transmission de façon directe en introduisant une population de vecteurs génétiquement réfractaire à l'infection. Dans cas, il n'est pas nécessaire de faire baisser les densités de populations vectorielles. Des expérimentations ont montré qu'il est possible de modifier génétiquement des *Aedes* afin de neutraliser leur infection par le virus de la dengue (Mathur *et al.*, 2010) . Il serait envisageable de développer une stratégie consistant à induire la mort de la femelle une fois que celle-ci est infectée par le pathogène, empêchant ainsi sa transmission (Xi *et al.*, 2008). Dans la majorité des cas, des résultats concluants ont été obtenus en laboratoire pour l'ensemble de ces stratégies visant à modifier les mécanismes physiologiques du vecteur. Cependant, il est tout à fait impossible de s'avancer sur leurs réussites en milieu naturel. Ces stratégies peuvent être confrontées à l'absence de moyen financier pour leur mise en place à grande échelle ainsi qu'à des problèmes d'éthique et d'acceptabilité de la part des populations concernées.

Face à cette situation, et pour freiner l'émergence de la dengue et du chikungunya, il existe très peu d'alternatives génétiques dans l'immédiat. Face à l'urgence à laquelle nous sommes confrontés, la lutte anti-vectorielle, malgré ses limites d'efficacité et de mise en place, demeure l'unique moyen, aujourd'hui disponible pour lutter contre l'expansion de ces arboviroses.

5. Evaluation de l'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus*

Les techniques entomologiques actuelles permettent d'évaluer la densité de vecteurs présents dans une zone déterminée. Elles sont ainsi indispensables pour estimer le risque de transmission des arbovirus tels que la dengue et le chikungunya. Il existe différentes méthodes entomologiques permettant d'estimer l'abondance du vecteur suivant son stade de développement.

A. Piège pondoir ou ovitrap

Ce piège se caractérise par sa simplicité d'utilisation (Figure 11) : un petit seau noir rempli de diverses infusions organiques avec une tige en bois où viendront pondre les femelles (Fay & Eliason 1966; Service 1993) Cette technique d'échantillonnage est utilisée dans le but d'estimer la densité des populations d'adultes d'*Aedes* en fonction de la quantité d'œufs pondus. Ces paramètres permettront de déterminer la dispersion spatiale et temporelle des adultes (Focks, 2003). Leur utilisation a aussi été élargie à l'étude des paramètres bio-écologiques des *Aedes* en fonction des conditions écologiques et climatiques (Mercado-Hernandez *et al.*, 2006) et à évaluer l'efficacité de la lutte anti-vectorielle (Vezzani *et al.*, 2004).

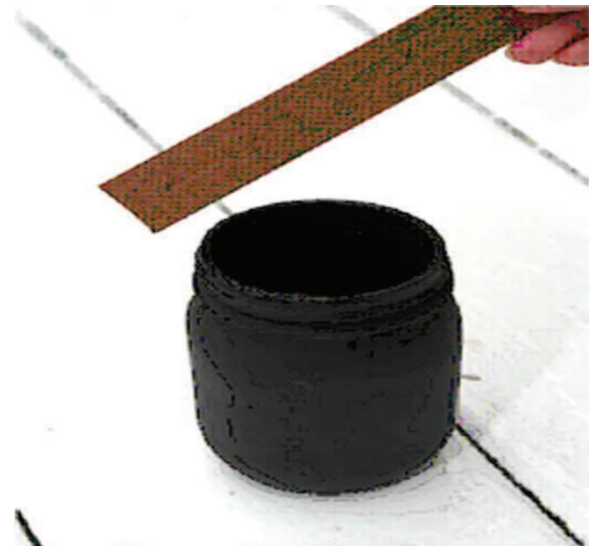


Figure 11. Piège pondoir
(www.aegyptiblog.info)

Son faible coût d'utilisation a certainement favorisé son emploi en zone d'endémie.



Figure 12. Vues extérieures et intérieures d'un sticky ovitrap.
la vue intérieure montre les deux bandes adhésives clippées contre la surface du container rouge (D'après L.Y Zhang *et al.*, 2008) .

L'utilisation de l'ovitrap trouve certainement son intérêt quand il s'agit de renseigner de la présence ou non du vecteur. Leur utilisation permet aussi de mesurer l'efficacité de la lutte anti-vectorielle et cette

technique semble idéale pour évaluer les variations saisonnières de l'abondance des adultes. Cependant, cette technique manque de précision quand il s'agit de comparer les densités vectorielles entre différentes zones à la même période et pour évaluer correctement le risque de transmission d'arbovirus (Focks, 2003). Ces raisons ont certainement poussé à son amélioration. Son optimisation par l'ajout d'une bande adhésive qui permet de piéger les femelles au moment de la ponte, d'où le nom de sticky ovitrap (Figure 12). Cette amélioration permet d'évaluer en même temps la densité des adultes et d'identifier directement l'espèce concernée en zone de sympatrie. Afin de le rendre encore plus performant, le sticky ovitrap se décline en plusieurs variantes comme le double sticky trap (Chadee & Ritchie, 2010) celui produisant un fort stimulus visuel aux moustiques (Facchinelli *et al.*, 2007).

B. La collection d'adultes

La collecte d'adultes est indispensable pour évaluer le risque de transmission des pathogènes ainsi que l'efficacité des moyens de lutte. Il existe plusieurs techniques de collecte d'adultes.

-Les techniques d'aspiration. Elles apportent des informations supplémentaires par rapport à la biologie et au comportement des vecteurs. Elles sont surtout utilisées pour étudier la présence du vecteur au sein des habitations. A ce titre, elles constituent un apport considérable dans la lutte anti-vectorielle, notamment pour déterminer les quantités d'insecticide à pulvériser (Focks, 2003).

- L'estimation des populations d'adultes peut aussi se faire grâce à des pièges.

L'efficacité de ces pièges est variable d'un modèle à un autre. Par exemple, l'utilisation de pièges lumineux est d'une utilité limitée pour la capture de moustiques diurnes tels qu'*Ae. albopictus* (Service, 1993) A cet effet, il est préférable d'utiliser les pièges comme « Fay et Prince », « CDC Wilton » ou le « BG-Sentinel trap



Figure 13. Piège BG sentinel (Biogents)[®] et mosquito magnet[®].

(Figure 13). Ces pièges comportent un stimulus visuel (Fay et Prince, CDC Wilton, BG-

Sentinel trap) ou chimique (BG-Sentinel trap) renforçant leur attractivité par rapport aux *Aedes*. L'utilisation d'une source d'énergie nécessaire à leur fonctionnement constitue une limitation pour leur utilisation (Facchinelli *et al.*, 2007). Dans le but d'optimiser leur utilisation, d'autres modèles ont été développés (Hoel *et al.*, 2009). Ces techniques de capture par piège sont mieux indiquées que l'utilisation d'appât humain qui pose des problèmes d'éthique et présente un coût relativement élevé. L'utilité des indices générés par ces techniques de capture est parfois controversée dans l'évaluation du risque de transmission des arbovirus. En effet, il peut s'avérer difficile de corréliser les résultats issus de la capture à la densité absolue de vecteurs présents dans une zone donnée (Focks, 2003).

C. indices larvaires et nymphaux

La détermination de l'abondance des stades immatures d'*Aedes* constitue l'élément charnière pour évaluer les densités d'adultes. En effet, le décompte des larves et nymphes permet d'établir les indices suivants: Indice Maison (House Index, HI) et Indice Réservoir (Container Index, CI), correspondant au pourcentage de maison/réservoir infesté par des larves et/ou nymphes. L'indice de Breteau (Breteau Index, BI), le nombre de réservoirs positifs pour cent maisons, est plus utilisé pour évaluer la densité vectorielle et l'exposition de l'homme aux piqûres d'*Aedes*. Ces indices sont couramment utilisés pour évaluer l'efficacité des stratégies de lutte anti-vectorielle mais également sont incontournables pour estimer le risque de transmission des arbovirus. Cependant, la fiabilité de ces estimations peut être remise en cause du fait des importantes limitations notées avec l'emploi de ces indices. En effet, l'estimation obtenue par ces indices est approximative ; par exemple, l'information apportée par le CI ne porte que sur la proportion de réservoirs avec des stades immatures. Cette mesure n'indique en rien le nombre de réservoirs par maison. Pour le HI, on ne peut déterminer le nombre de réservoirs positifs au sein d'une habitation alors qu'avec l'IB aucune observation n'est faite par rapport à la productivité des réservoirs (Focks, 2003). Ce type de mesure basé sur les stades immatures est imprécis quand il s'agit de renseigner de l'hétérogénéité de la densité vectorielle au sein d'une zone d'étude. La source de toutes ces limitations provient du fait que ces techniques se basent sur des stades immatures à partir desquels il est difficile d'extrapoler sur la densité des populations adultes. De ce fait, leur pertinence à évaluer les populations d'*Ae. albopictus* ainsi que l'efficacité des stratégies de lutte et le risque de transmission d'arbovirus, reste très controversées. Par exemple, des cas de transmission de dengue par *Ae. aegypti* ont été notés alors que l'emploi de ces indices semblait minimiser ce risque (Focks & Chadee, 1997). Dès lors, il semble nécessaire d'améliorer ces techniques de

mesure. Pour plus de fiabilité, les tentatives d'amélioration sont basées essentiellement sur le décompte des nymphes qui constitue la phase immature qui précède le stade adulte. L'utilisation de la population nymphale qui a une mortalité moins importante que les larves, permet d'avoir une plus grande représentativité de la productivité des gîtes et donc de la population d'*Aedes* susceptible d'être en contact avec les populations humaines (Focks & Chadee, 1997; Focks *et al.*, 2000). De plus, elle présente l'avantage de faire des échantillonnages plus complets autour de l'environnement domestique et une identification plus fine des différentes espèces. Cette technique d'amélioration a l'avantage d'ajuster le décompte des nymphes à la superficie étudiée permettant ainsi d'avoir une meilleure représentation de la population d'*Aedes* dans la zone d'étude. De plus, cette méthode, en estimant le nombre de nymphe par individu, permet d'obtenir une notion beaucoup plus précise de la potentialité de l'exposition aux piqûres des vecteurs. Par rapport à la lutte anti-vectorielle, il est montré que le décompte des nymphes permet d'identifier les gîtes les plus productifs en adultes (Focks, 2003). Cette connaissance permettrait de cibler les stratégies de lutte prioritairement vers certains gîtes afin d'obtenir une réduction conséquente de la population d'*Ae. albopictus*. Aussi, des études de modélisation prenant en compte divers aspects liés à la transmission des arbovirus, ont montré que le décompte des nymphes serait plus indiqué pour évaluer le risque de transmission d'arbovirus comme la dengue (Focks *et al.*, 2000).

Même si le stade nymphal apporte plus de précisions dans la mesure des densités des vecteurs, la pertinence, de façon générale, de ces techniques entomologiques se basant sur les stades immatures est très limitée pour évaluer l'exposition de l'homme aux piqûres d'*Ae. albopictus* et par conséquent au risque de transmission d'arbovirus. Ces techniques constituent des méthodes indirectes qui ne peuvent évaluer, de façon certaine, le contact entre l'homme et le vecteur *Ae. albopictus*. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influer sur la fiabilité de ces mesures. Les conditions climatiques sont des facteurs importants pour la survie des stades immatures. Des variations de température et de pluviométrie, sont connues pour déterminer la croissance et la durée de vie des stades immatures. De même, ces mesures ne tiennent pas compte des facteurs anthropogéniques. Il est bien évident que le contact entre le moustique *Ae. albopictus* et l'homme dépendra du comportement de ce dernier, ceci est d'autant plus important que *Ae. albopictus* est un moustique diurne, sa période d'activité coïncidant avec celle de l'homme. Au sein d'une zone d'étude, les individus ont différents comportements ce qui induit des différences de contact homme-*Ae. albopictus*. Ces différences d'exposition peuvent aussi être influencées par l'utilisation de protections

individuelles telles les moustiquaires, les bombes aérosol, les lotions crèmes répulsives ou par les systèmes d'air conditionné.

A partir de ce constat, il est nécessaire d'améliorer ces méthodes de mesure ou d'en développer de nouvelles. Leur perfectionnement doit aller dans le sens d'une évaluation précise de l'exposition et renseigner les différents niveaux d'exposition aux piqûres du vecteur afin d'améliorer l'estimation du risque de transmission. Cette amélioration doit aussi s'inscrire dans la dynamique des stratégies de lutte anti-vectorielle. Ceci implique de développer des alternatives hautement sensibles permettant de détecter de faibles variations de densité du vecteur. L'utilisation des stades immatures ne peut pas apporter cette information. Les méthodes directes semblent être plus indiquées mais l'utilisation d'appât humain ne semble pas non plus être indiqué au regard de ces nombreuses limites éthiques et d'évaluation. Dès lors, il est important d'élaborer des techniques capables d'apporter, au moins, les mêmes informations que les techniques d'évaluation directe, mais en plus d'être utilisables à large échelle sur le terrain. Le développement de tels outils nécessite forcément d'explorer les interactions entre l'homme et le vecteur, autrement dit d'étudier le contact homme-moustique. Ce contact entre ces différents protagonistes est symbolisé par la prise du repas sanguin. L'étude détaillée de cette prise de sang repose sur la prise en compte des interactions qui permettent aux vecteurs de se nourrir correctement, ouvrant ainsi la voie pour le développement de nouveaux outils d'évaluation de l'exposition et de lutte.

6. Etude des interactions homme/vecteur et protéines salivaires de l'arthropode

La salive des arthropodes est un fluide biologique qui permet l'interaction physiologique avec l'hôte vertébré (homme ou animal) au cours de la piqûre. Cette interaction fait intervenir des mécanismes complexes aboutissant à la prise du repas de sang mais aussi facilitant la transmission à l'homme d'un agent infectieux qui s'séjournerait dans la salive. Le succès de la prise du repas sanguin et du passage des pathogènes dépendra de l'équilibre des réactions établies entre le vecteur et l'homme à l'instant précis du repas sanguin. Les composants de la salive se situent donc au cœur de cette interface hôte vertébré/ vecteur et jouent un rôle déterminant au moment de la piqûre. Ces composants salivaires jouent ainsi différents rôles décrits ci-dessous.

A. Inhibition de la réaction hémostatique de l'homme

Au cours du contact avec l'hôte humain pour la recherche du repas sanguin, le moustique procède dans un premier temps à une phase exploratoire dite de « probing » qui varie en fonction des insectes. i) Les insectes telmophages comme le ceratopogonidé et le taon procèdent à une lacération du derme qui leur permet de créer un micro-hématome. L'insecte aspire alors un « lac sanguin » au moment de son repas sur le vertébré. ii) Les insectes solénophages tels les moustiques et les punaises procèdent en perforant le derme. Cette action leur permettra de prendre leur repas sanguin grâce à la micro hémorragie qui sera provoquée au niveau d'un capillaire, d'une artériole ou d'une veinule (Ribeiro, 1987). Mais pour ce faire, le vecteur devra faire face à la réaction hémostatique du vertébré tendant à arrêter l'hémorragie. A cette fin, la femelle injectera au même moment dans la peau de l'homme les molécules contenues dans sa salive. Certaines molécules permettent de maintenir l'hémorragie en inhibant deux fonctions essentielles

Anti- agrégation plaquettaire

La lésion provoquée par la piqûre entraîne la libération d'Adénosine Di Phosphate (ADP) par les cellules endothéliales et de collagène par les cellules sous-endothéliales. La libération de ces facteurs entraîne l'activation des plaquettes qui constitue la première ligne de défense de l'organisme en cas d'infraction de l'épithélium. L'activation des plaquettes aboutit à une libération d'ADP, de sérotonine et de thromboxane A2 (TXA2). L'ADP renforce l'agrégation de plaquettes tandis que la sérotonine et le TXA2 favorisent la vasoconstriction. Ces mécanismes entraînent la formation d'un thrombus blanc qui a pour conséquence de diminuer le flux sanguin au niveau de la blessure (Figure 14).

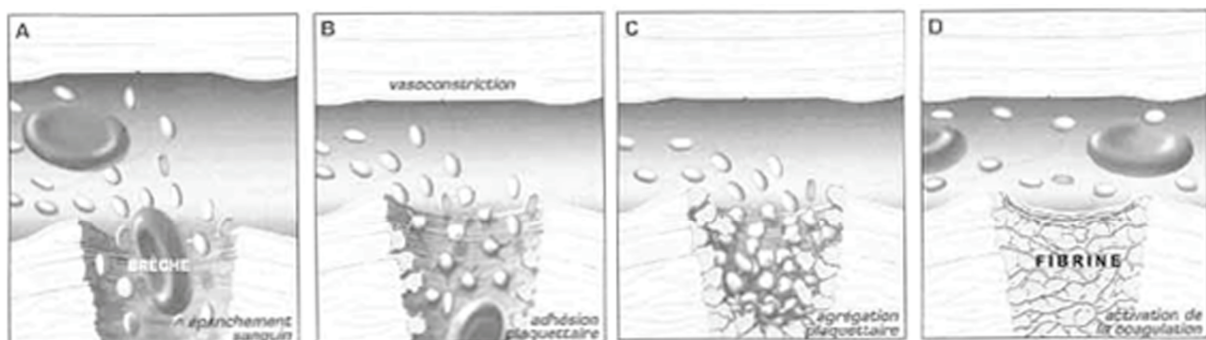


Figure 14. Mécanismes de l'agrégation plaquettaire menant à la formation du thrombus blanc.
(Introduction à l'étude de l'Hémostase et de la thrombose – B. Boneu, J-P. Cazenave – 1997)

Les arthropodes ont développé dans leur salive certains constituants qui leur permettent d'éviter cette agrégation plaquettaire afin de maintenir un flux sanguin au niveau de la blessure. Le constituant anti-plaquettaire le plus connu chez les arthropodes est l'apyrase, qui appartient à la famille des 5' nucléosidase. Cette protéine agit au niveau de la « blessure » en

hydrolysant l'ADP en AMP (Adénosine Mono Phosphate) inhibant ainsi l'agrégation des plaquettes (Champagne *et al.*, 1995) (Figure 16). Chez les arthropodes, on retrouve différentes familles de molécules d'apyrases. Celles de la famille 5' nucleosidase constituent les anti-plaquettaires les plus connus chez les moustiques. Chez *Ae. albopictus*, cette protéine a un poids moléculaire de 60 kDa et est localisée majoritairement au niveau des lobes distaux latéraux mais aussi dans la partie médiane des glandes salivaires (Marinotti *et al.*, 1996). Le rôle anti-plaquettaire joué par cette molécule est primordial pour la prise du repas de sang. Il a été montré que l'apyrase d'*Ae. aegypti* a un effet dose-dépendant sur l'inhibition de l'agrégation des plaquettes. Des apyrases sont également retrouvées chez d'autres vecteurs tels les *Triatomés*. Une autre famille de protéines anti-plaquettaire, Cimex apyrase, a été retrouvée chez les phlébotomes (Valenzuela *et al.*, 2001) et les punaises de lit (Valenzuela *et al.*, 1998). A part les apyrases, on trouve d'autres molécules qui peuvent inhiber l'agrégation des plaquettes notamment l'aegyptine d'*Ae. aegypti* (Calvo *et al.*, 2007) et l'anophelin d'*Anopheles stephensi* (Yoshida *et al.*, 2008).

Anti-coagulation

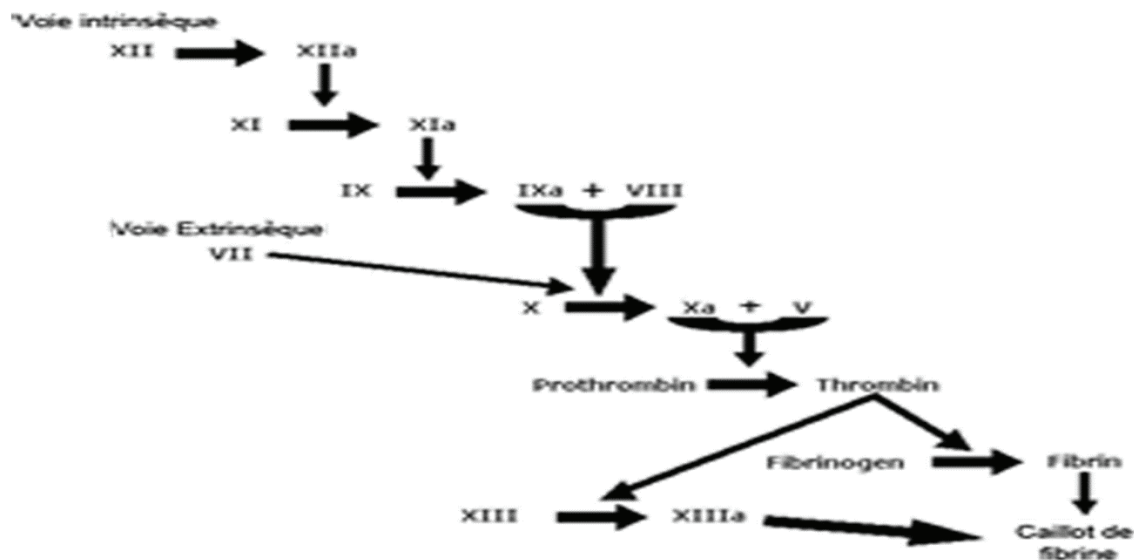


Figure 15. Les différentes voies de la Coagulation (D'après Andrade *et al.*, 2005).

Parallèlement à la formation d'un agrégat plaquettaire, le mécanisme de coagulation va aussi se mettre en place après les lésions provoquées par la piqûre. Le fibrinogène du plasma va être transformé en un réseau de fibrine qui va consolider le caillot plaquettaire et donner un caillot qui retient les globules rouges. La formation de ce caillot fait intervenir une cascade d'activation de précurseurs circulants inactifs qui doivent être clivés pour être actifs. La coagulation engendrée par la piqûre est un écueil majeur au cours de l'alimentation des

arthropodes, mais ces derniers parviennent à contourner cet obstacle. En effet, une activité contre les sérines protéases, comme la thrombine et le facteur Xa, a été décrite respectivement chez *Anopheles* et *Aedes* (Stark & James, 1998). Chez *An. stephensi*, une protéine présentant une activité anti-thrombine, l'hamadarine, a été identifiée (Waidhet-Kouadio *et al.*, 1998) et intervient dans l'inhibition de la voie intrinsèque de la coagulation. Cette protéine appartient à la famille D7 et est très abondante dans la salive d'*An. stephensi* (Sawabe *et al.*, 2010). Chez *Ae. aegypti*, l'inhibiteur du facteur Xa est capable aussi bien de bloquer les voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation (Figure 17). Tout récemment, il a été montré que l'alboserpin, une protéine de 45 kDa de la salive d'*Ae. albopictus*, est capable d'inhiber l'activité du facteur Xa et a une activité anti-thrombine (Calvo *et al.*, 2011).

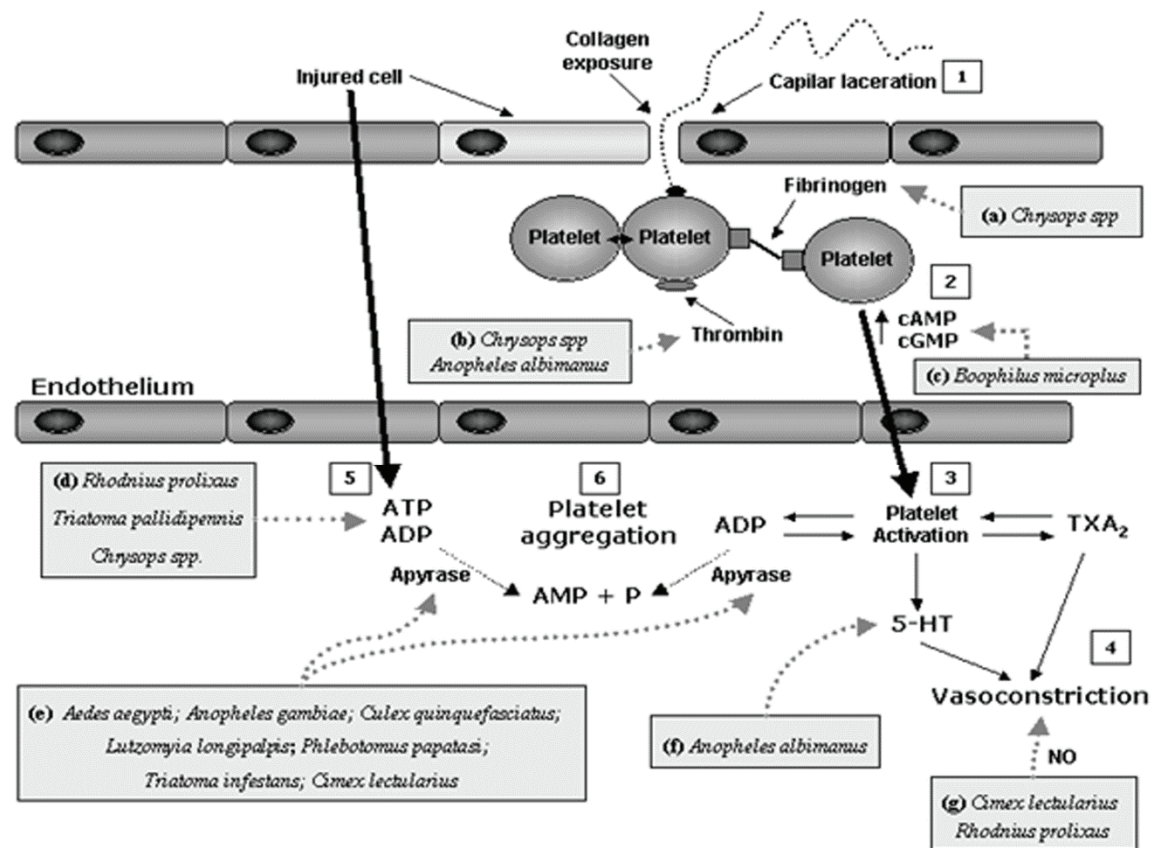


Figure 16: Action de la salive des vecteurs sur l'agrégation plaquettaire et la coagulation.

(1) Les vecteurs hématophages induisent

Un lacération des vaisseaux et des tissus impliquant une exposition du collagène pendant la phase de sondage/probing

(2) Ainsi

Les plaquettes s'agrègent, formant le caillot et induisant le relargage de vasoconstricteurs favorisant l'hémostase. Les arthropodes hématophages peuvent inhiber l'agrégation plaquettaire en bloquant l'activation du fibrinogène et de la thrombine (*Anopheles albimanus* et *Chrysops* spp.) ou la stimulation AMPc/GMPc (*Boophilus microplus*).

(3) Activation plaquettaire et dégranulation

sont également induites par le thromboxane A2 qui entraîne une réponse de vasoconstriction

(4) Le monoxyde d'azote (NO) présent dans la salive des arthropodes

peut bloquer cet effet hémostatique (*Cimex lectularius* et *Rhodnius prolixus*).

(5) La salive des vecteurs peut lier l'ADP (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma pallidipennis* et *Chrysops* spp.) ou

(6) Prévenir l'action de l'ADP par l'apyrase

salivaire qui inhibe l'agrégation plaquettaire (*Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus*, *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus papatasi*, *Triatoma infestans* et *Cimex lectularius*). D'après Andrade et al., 2005)

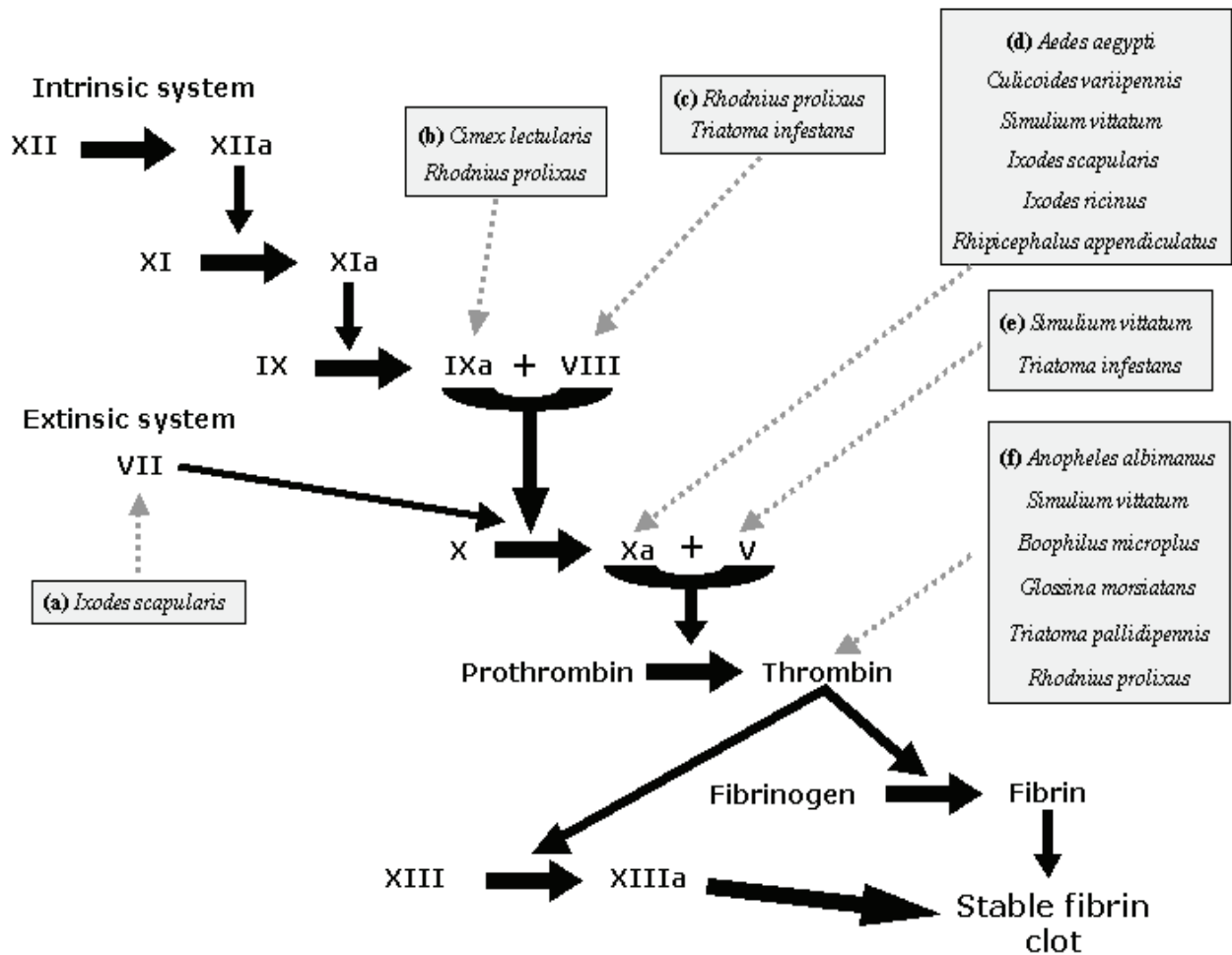


Figure 17. La cascade de coagulation (voie intrinsèque et extrinsèque) activée en réponse à une blessure tissulaire est aussi bloquée par les molécules de la salive. La cascade de la coagulation est activée lors d'une perforation de vaisseaux sanguins résultant à la production de thrombine active qui clive le fibrinogène en fibrine qui polymérise pour former un caillot stable qui bloque les fuites sanguines. Les anti-coagulants salivaires produits par les arthropodes inhibent des cibles spécifiques de cette cascade. Par exemple, le facteur IXa (*Cimex lectularius* et *Rhodnius prolixus*); VIII (*Rhodnius prolixus* et *Triatoma infestans*); Xa (*Ae. aegypti*, *Culicoides variipennis*, *Simulium vittatum*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus* et *Rhipicephalus appendiculatus*); V (*Simulium vittatum* et *Triatoma infestans*), VII (*Ixodes scapularis*) et la thrombine (*An. albimanus*, *Simulium vittatum*, *Boophilus microplus*, *Glossina morsitans*, *Triatoma pallidipennis* et *Rhodnius prolixus*). Du blocage de ces cibles résulte une inhibition ou un retard de l'activation de la thrombine (*An. albimanus*, *Simulium vittatum*, *Boophilus microplus*, *Glossina morsitans*, *Triatoma pallidipennis* et *Rhodnius prolixus*) et de la coagulation. (D'après Andrade et al., 2005).

Vasodilatation

En plus de leur impact sur les deux voies de régulation de l'hémostase (anti-agrégation plaquettaire et anti-coagulation), les protéines de la salive du vecteur sont capables d'induire une vasodilatation facilitant leur prise de sang. Le rôle de l'hamadarine ne se limite pas à une activité anti-coagulation, elle possède également une activité vasodilatatrice. Cette protéine est capable d'inhiber la libération de bradykinine dont l'activité entraîne aussi bien une

hypotension que la coagulation et l'agrégation plaquettaire (Sawabe *et al.*, 2010). On peut retrouver d'autres vasodilatateurs comme la sialokinine présente chez *Ae. aegypti*. Chez *An. albimanus*, c'est une peroxydase qui détruit les catécholamines et la sérotonine de l'hôte vertébré (Ribeiro & Nussenzveig, 1993). A ce jour, le plus puissant des vasodilatateurs connus est le maxidilan, protéine retrouvé chez *Lutzomia longipalpalis* (Lerner *et al.*, 1991). Chez les phlébotomes de l'ancien monde, cette molécule est substituée par des amines vasodilatatrices.

D'autres substances telles que les prostaglandines et l'oxyde nitrique sont aussi capables de favoriser une vasodilatation (Montfort *et al.*, 2000).

Anti-inflammatoire

Pour la réussite de la prise du repas sanguin, les vecteurs doivent aussi annihiler, dans la mesure du possible, les signaux de douleurs perçus par l'hôte vertébré au cours de la piqure. Cette action passe essentiellement par l'inhibition de la réaction inflammatoire du vertébré. Dans la salive des vecteurs, il est trouvé divers composants capables de se lier et de bloquer certains facteurs de la réponse inflammatoire de l'homme. Par exemple, il a été montré chez les triatomes l'existence de protéines salivaires capables de se lier à la sérotonine (Paesen *et al.*, 1999). Chez les moustiques, les protéines de la famille D7 sont capables de se lier aux amines biogéniques afin d'éviter la réaction inflammatoire qui fait suite à la destruction des tissus du vertébré (Calvo *et al.*, 2009). L'activité anti-inflammatoire de la salive permet également aux arthropodes de ne pas être « agressés » par le système immunitaire de l'homme au cours de la piqure qui le perçoit comme un corps étranger. Cette activité rentre dans les phénomènes d'immuno-modulation de la salive comme décrit ci-dessous.

B. Roles des protéines salivaires dans le contrôle de la réponse immunitaire du vertébré et de l'infection. De la modulation de la réponse immunitaire du vertébré à l'infection par le pathogène : rôle de protéines salivaires des arthropodes

Contrôle du système immunitaire du vertébré par les protéines salivaires.

Pour la réussite de son repas sanguin, le vecteur doit aller au-delà du contrôle de l'agrégation plaquettaire, la coagulation, la vasodilatation et la réponse inflammatoire du vertébré. En effet, le contrôle de ces différents facteurs hémostatiques par l'injection de protéines salivaires va aussi activer les mécanismes immunitaires innés et adaptatifs du vertébré (Wikel, 1981). L'activation de ces mécanismes immunitaires aura pour but essentiel

d'empêcher la piqûre, considérée par le vertébré comme une agression extérieure contre laquelle il est nécessaire de se défendre. De ce fait, le vecteur est aussi amené à contrecarrer cette action du système immunitaire du vertébré afin d'assurer le succès de son repas sanguin. La rapidité à laquelle réagit le système immunitaire du vertébré en cas stimulus implique une réaction spécifique et adaptée des vecteurs. Certains arthropodes comme les moustiques et les phlébotomes, doivent arriver à se nourrir en quelques minutes sans pour autant subir la réaction immunitaire du vertébré qui n'est à son pic qu'après l'engorgement de l'arthropode (Champagne, 2004). Ceci montre qu'il y a un contrôle rapide du système immunitaire du vertébré par le vecteur dès les premiers instants de la piqûre. Il a été avancé que ce contrôle rapide du système immunitaire du vertébré n'est possible que grâce à l'inter-connection système hémotase-inflammatoire du vertébré à son système immunitaire. Par exemple, le facteur Xa intervenant dans le processus de coagulation sert aussi à activer les défenses antimicrobiennes (Champagne, 2004). De ce fait, son inhibition par l'activité des protéines salivaires au cours de la piqûre implique des conséquences immunologiques. Ce contrôle peut s'exercer sur certains systèmes effecteurs de l'appareil immunitaire ou directement influencer le fonctionnement de ce dernier.

- Contrôle du système du complément

Le système du complément est l'une des premières lignes de défense de l'organisme en cas d'agression. Il existe différentes voies d'activation du système du complément : la voie classique nécessitant la présence d'Ac alors que la voie alterne et celle dite des lectines peuvent être activées sans la présence d'Ac. Les voies du complément comportent neuf protéines : C1, C4, C2, C3 composants la phase précoce et C5, C6, C7, C8 et C9 la phase tardive ou effectrice. Les différentes voies d'activation du système du complément aboutissent à la formation de C3 convertase point de départ de l'activité effectrice des différentes voies. L'activité de la C3 convertase aboutit à la formation du complexe C5 convertase qui initie l'activité effectrice. Cette activité effectrice se traduit par la formation d'un Complexe d'Attaque Membranaire (CAM) qui détruit les cellules cibles par la formation d'un canal transmembranaire, permettant l'entrée de molécules d'eau dans les cellules.

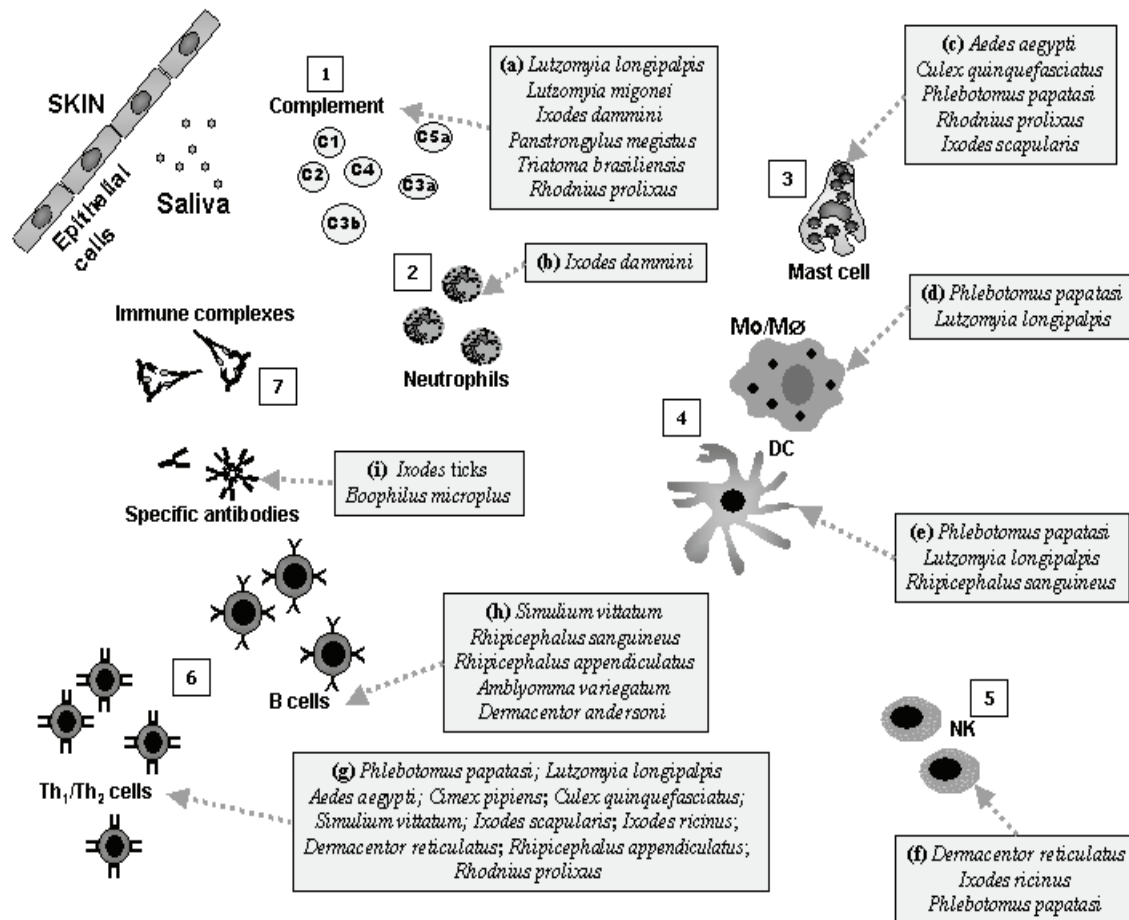


Figure 18. La réponse immune de l'hôte est modifiée par la salive des arthropodes

Les constituants salivaires peuvent agir sur les différents médiateurs et cellules effectrices du système immunitaire.

- (1) **Inhibition du complément**: par la libération de vasodilatateurs salivaires et inhibition de l'activation des deux voies du complément (*Lu. longipalpis*, *Ixodes dammini*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* et *Rhodnius prolixus*).
- (2) **Les Neutrophiles**: inhibition de la formation des neutrophiles (*Ixodes dammini*);
- (3) **Mastocytes**: réduction de la dégranulation des mastocytes et de la libération des médiateurs inflammatoires (*Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *Ph. papatasi*, *Rhodnius prolixus* et *Ixodes scapularis*)
- (4) **Cellules présentatrices d'antigènes: macrophages** inhibition de l'activation des macrophages (*Ph. papatasi* et *Lu. longipalpis*).
- Cellules dendritiques**: réduction de la différenciation des cellules dendritiques, de leur maturation et de la production de cytokines (*Ph. papatasi*, *Lu. longipalpis* et *Rhipicephalus sanguineus*)
- (5) **Cellules NK**: réduction de la cytotoxicité des cellules NK (*Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus* et *Ph. papatasi*)
- (6) **Lymphocytes B**: inhibition de la prolifération des cellules B et de la modulation de la production d'immunoglobulines (*Simulium vittatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* et *Dermacentor andersoni*)
- Et Lymphocytes T**: modulation de la production de cytokines, réponse proliférative réduite, trafficking altéré (*Ph. papatasi*, *Lu. longipalpis*, *Ae. aegypti*, *Cimex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Simulium vittatum*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus appendiculatus* et *Rhodnius prolixus*)
- (7) **Anticorps et complexes immuns**: modification du profil de la réponse anticorps (*Boophilus microplus* et *Ixodes spp.*). D'après Andrade et al., 2005.

L'inter-connection du système du complément avec le système hémostatique impactent fortement sur son fonctionnement d'où la possibilité qu'ont les arthropodes de le contrôler à travers leur activité anti hémostatique. En effet, il a été montré que l'activité anti-facteur Xa

de la salive d'*Ae. aegypti* est capable d'inhiber l'extravasation de certaines cellules inflammatoires et le fonctionnement du système du complément qui est une des premières lignes de défense de l'organisme (Stark & James, 1998). Cette inhibition de l'activité du facteur Xa se traduit au final par une absence de production de kallikreine (Stark & James, 1998). La production de la kallikreine est nécessaire au bon fonctionnement du système de coagulation aussi elle intervient dans la production de l'anaphylatoxine C5a du système du complément (Wiggins & Cochrane, 1981). Une plus faible concentration ou l'absence de cette molécule, anaphylatoxine C5a, a un effet sur le recrutement d'anticorps, l'activation des macrophages et des neutrophiles (Schneider & Higgs, 2008) et ceci serait donc capable d'induire un affaiblissement du système immunitaire du vertébré. Les arthropodes possèdent également, par leur salive, des protéines qui leur permettent d'attaquer directement le système immunitaire du vertébré (Figure 18). Par exemple, *Ixodes scapularis* vecteur de la maladie de Lyme, a une protéine salivaire qui désactive les anaphylatoxines et intervient sur la régulation de la C3-convertase (molécule du complément). Cette protéine nommée Isac (*Ixodes scapularis* salivary anti-complement activity) a une masse d'environ 18,5 kDa et est l'une des plus petites protéines connues capables de réguler le système du complément (Barral *et al.*, 2000). D'autres protéines salivaires capables d'inhiber le système du complément sont également retrouvées chez les phlébotomes. *Lutzomyia longipalpalis* est capable de bloquer aussi bien la voie classique qu'alterne du système du complément alors que les constituants salivaires de *Lu. migonei* agissent uniquement sur la voie classique (Cavalcante *et al.*, 2003).

- Contrôle de la réponse immunitaire cellulaire et humorale

De façon générale, ce contrôle se traduit par une immunosuppression ou vise à provoquer un déséquilibre de la réponse immunitaire permettant une prise adéquate du repas sanguin.

-Immunosuppression

Ainsi chez la souris, des expérimentations ont démontré que des extraits de glandes salivaires d'*Ae. aegypti* entraînent une inhibition de la prolifération lymphocytaire. Une concentration équivalente à 0.3 paire de glandes/ml est capable d'inhiber 50% de la prolifération des lymphocytes T. Ces extraits de glandes salivaires sont aussi capables d'inhiber la prolifération de cellules B suite à une co-stimulation par le lipopolysaccharide. La production des cytokines de type Th1 (IL12, IFN γ) et Th2 (IL5 IL4, IL10) était aussi considérablement réduite, de même que des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , GM-CSF) (Edelman *et al.*, 2000). Ce phénomène d'immunosuppression a aussi été observé avec la salive d'*Ixodes ricinus* qui peut provoquer une baisse de la réponse des cellules T et B. Ainsi, on note une

baisse d'expression du CD69 mais également des cytokines de type Th1 (TNF α) et Th2 (IL10) (Hannier *et al.*, 2003).

- Immunomodulation

La salive des arthropodes peut aussi entraîner une ré-orientation de la réponse immunitaire. En effet, chez la souris, la co-inoculation d'extraits de glandes salivaires d'*Ae. aegypti* et du virus sindbis entraîne une augmentation d'une réponse de type Th2 alors que la réponse de type Th1 est diminuée (Schneider *et al.*, 2004). La sialokinine, qui est une protéine présente dans la salive des moustiques du genre *Culex* et *Aedes*, bien qu'ayant un effet vasodilatateur, est aussi capable d'induire un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en favorisant une réponse de type Th2 avec la production d'IL-4 et d'IL-10 (Zeidner *et al.*, 1999). Tout récemment, il a été identifié une protéine de 20 kDa dans la salive d'*Ae. aegypti* capable d'induire une réponse Th2 par la production d'IL-4 chez des cellules CD4⁺, tout en réduisant l'expression de la réponse Th1 (baisse de la production IFN- γ). Ces travaux permettaient, pour la première fois, d'identifier chez les moustiques un facteur salivaire, le SAAG-4, capable de stimuler la différenciation des cellules CD4 (Boppana *et al.*, 2009). Chez d'autres arthropodes, qui ont un mode de gorgement différent, comme les tiques, les protéines salivaires sont aussi capables de favoriser une réponse de type Th2 (Mejri *et al.*, 2001; Schoeler & Wikel, 2001; Mejri & Brossard, 2007). L'induction d'une réponse Th1 par la salive n'est pas un phénomène couramment observé même si la production d'IFN- γ a été rapportée par l'exposition aux piqûres d'anophèles (Donovan *et al.*, 2007).

Rôle des protéines salivaires dans le développement de l'infection

Il est possible que l'immunomodulation induite par la salive des arthropodes au moment de la piqûre, stimule l'installation des pathogènes dans la peau de l'hôte ainsi que le développement de la maladie. Ceci est d'autant plus plausible que le profil de la réponse immunitaire est différent selon que le pathogène soit inoculé naturellement, par la piqûre de l'arthropode, ou de façon artificielle, par une seringue par exemple. Plusieurs modèles ont permis d'étudier ce phénomène.

Les études faites chez les tiques, ont montré l'effet de la salive sur le développement des pathogènes. Chez la souris, l'inoculation d'un mélange d'extraits de glandes salivaires *Ixodes ricinus* et de spirochètes facilite le développement de ces pathogènes dans la peau et au niveau du sang en comparaison avec des individus témoins qui ont juste reçu une inoculation du pathogène (Machackova *et al.*, 2006). Des études plus poussées ont révélé que la présence

de la salive d'*Ixodes ricinus* favoriserait l'infection des cellules dendritiques avec une diminution de la production de cytokines inflammatoires telles le TNF α et l'IL-6 (Fialova *et al.*, 2010). Cet effet de la salive tendant à installer les pathogènes dans la peau de l'hôte a pu être vérifié en traitant les cellules de Langerhans de souris avec des extraits salivaires de tiques. Ce traitement aboutit à une infection considérable par le virus de la stomatite vésiculaire de ces cellules comparées aux contrôles (Hajnicka *et al.*, 1998). Ce rôle critique des protéines salivaires des tiques a aussi été mis en évidence dans le cadre de la maladie de Lyme ; chez la souris, l'inoculation des borrelies par une seringue induit la production de peptides anti-microbiens et de TNF α alors que l'infection des souris par la piqûre des tiques reprime l'expression de gènes codants les facteurs inflammatoires (Kern *et al.*, 2011). Dès lors, il apparaît qu'il existe certains composants salivaires capable d'induire cet effet spécifique conduisant au développement du pathogène dans la peau du vertébré. C'est ainsi qu'il a été mis en évidence chez *Ixodes ricinus* une protéine, la Salp15 (Figure 19), capable d'inhiber la réponse immunitaire adaptative en bloquant l'activité des cellules dendritiques, des récepteurs Toll like et l'induction de facteur pro-inflammatoire (Hovius *et al.*, 2008) .

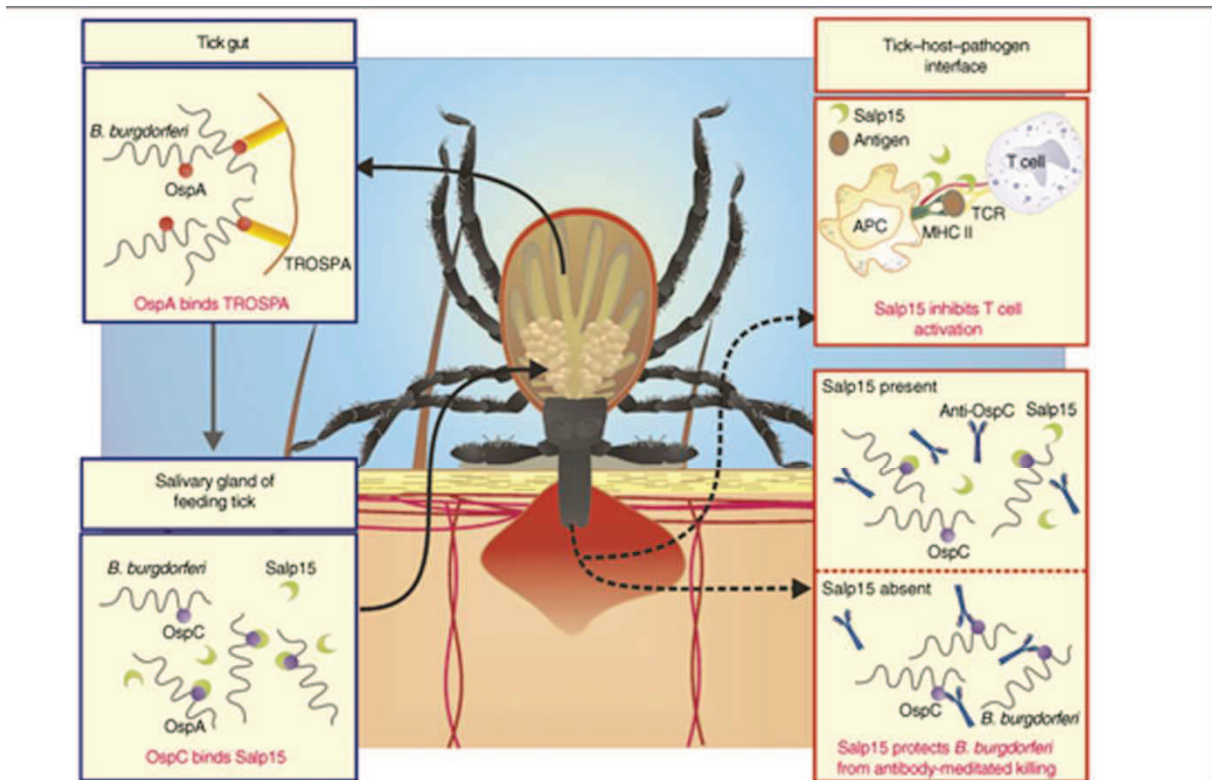


Figure 19. Schéma des interactions tique-hôte-pathogène dans le développement de la borréliose de Lyme.

Dans l'estomac de la tique *Ixodes Scapularis*, *Borrelia burgdorferi* augmente l'expression de la protéine ospA. OspA se lie sur le récepteur de la tique pour OspA (TROSPA). Pendant le repas de sang de la tique, *B. burgdorferi* inhibe ospA, induit l'expression d' ospC et migre dans les glandes salivaires. OspC se lie à une protéine de la salive de la tique, Salp15. Salp15 possède des propriétés immunosuppressives, comme l'inhibition de l'activation des cellules T-CD4+. Salp15 a des effets immunoprotecteurs pour la borrelia comme l'inhibition de la lyse médiée par les anticorps et les cellules B de l'hôte.

Les flèches pointillées représentent les processus qui se situent à l'interface tique hôte-pathogène. Abréviations: APC, cellule présentatrice d'antigène; MHC, complexe majeur d'histocompatibilité; OspA et OspC, outer surface protein A et C; TCR, récepteur de cellule T. D'après Hovius et al., 2007

Cependant, pour mieux appréhender l'effet de ces protéines salivaires sur l'installation du pathogène dans la peau du vertébré et le développement de la maladie, il est nécessaire de se placer dans des conditions plus ou moins identiques du contexte endémique. Dans cette situation, les hôtes vertébrés avant d'être infectés, sont généralement exposés essentiellement à des piqûres non infectantes. Dès lors il paraît pertinent d'investiguer l'effet de cette pré-exposition aux piqûres non infectantes.

L'exemple le plus pertinent de cette pré-exposition aux piqûres des vecteurs sur le développement de la maladie concerne sans nul doute les phlébotomes dans le modèle

expérimental de leishmaniose (Figure 20). Il a été montré que la pré-exposition aux piqûres non infectantes ou aux extraits de glandes salivaires de *P. papatasi* conférait une protection contre *Leishmania major*. Cette protection se traduit par une réduction de la sévérité des lésions provoquées par le parasite chez des souris pré-exposées. Au niveau du site de piqûre, donc d'inoculation des parasites, il a été noté une forte réaction d'hypersensibilité retardée accompagnée d'une importante production d'IFN- γ , ce qui traduit un mécanisme immunitaire protecteur contre le développement des parasites (Kamhawi *et al.*, 2000). Cette protection induite par la pré-exposition a aussi été mise en évidence chez des chiens, principal réservoir de leishmaniose viscérale (Collin *et al.*, 2009). En effet, deux protéines recombinantes, LJM₁₄₃ et LJM₁₇ issues de la salive de *L. longipalpalis*, sont capables d'induire une forte réponse cellulaire. La pré-immunisation avec ces deux protéines salivaires est à l'origine de la production d'IgG2 et d'IFN- γ . Aussi, cette pré-immunisation se traduit par l'élimination des parasites de la leishmaniose (Collin *et al.*, 2009). Cependant, chez des hamsters, la pré-immunisation par des extraits salivaires de *Lu. longipalpalis* n'induit aucune protection contre *Leishmania infantum chagasi* alors qu'une protection est observée en utilisant une protéine recombinante, le LJM₁₉, issue de la salive de ce vecteur (Gomes *et al.*, 2008). Ce résultat traduit toute la controverse liée à l'effet protecteur ou non des extraits salivaires et de la pré-exposition aux piqûres de vecteurs d'autant plus qu'il a été montré que la pré-immunisation par une souche sauvage ou récemment colonisée de *Ph. papatasi* ne confère aucune protection contre *Leishmania major* contrairement à une souche de laboratoire anciennement établie (Ben Hadj Ahmed *et al.*, 2010). Cependant, d'autres travaux montrent l'absence de protection contre *L. braziliensis* et une formation des lésions retardée après la pré-exposition des souris à la salive de *Lu. intermedia* (de Moura *et al.*, 2007).

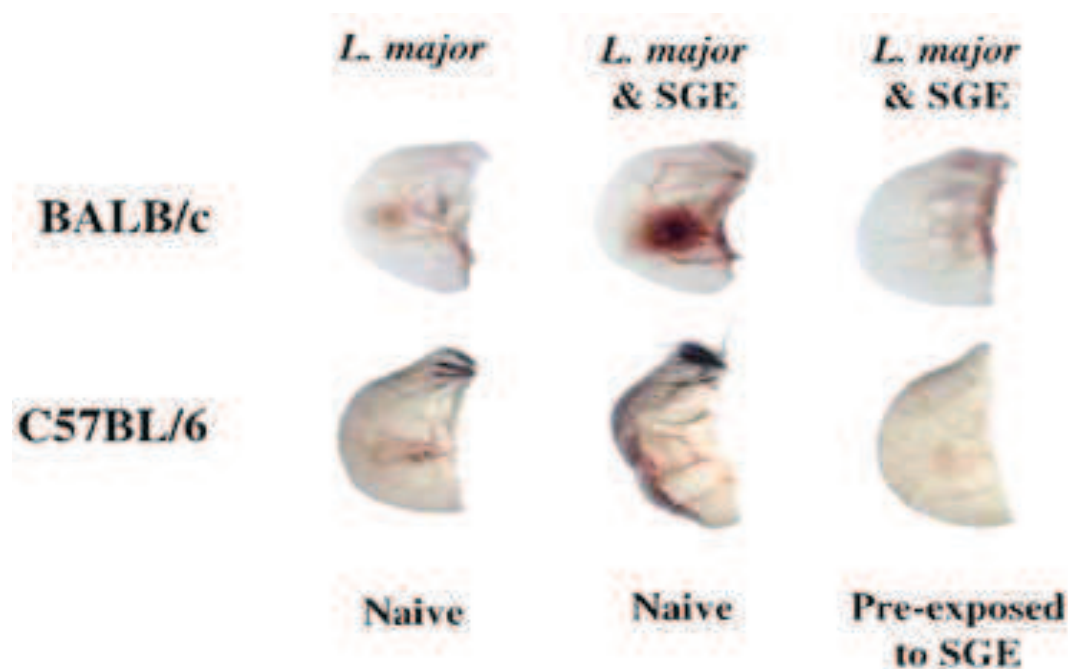


Figure 19. Immunomodulation par la salive.

Lésions cutanées sur les oreilles de souris Balb/c ou C57BL/6, 10 semaines après l'inoculation intradermique de 1 000 *L. major* (forme métacyclique) seul ou avec 0.2 paire de glande salivaire de *Ph. Papatasi*. La salive injectée simultanément avec le parasite aggrave la pathologie. En revanche la pré-exposition à la salive de phlébotome inhibe le développement du parasite. d'après Kamhawi et al., 2000

Cet effet controversé de l'effet de la salive et de la pré-exposition concerne aussi le modèle *Anopheles-Plasmodium*. Il a été montré que la pré-exposition des souris aux piqûres non infectantes d'*Anopheles* induirait un effet protecteur en cas d'infection par le *Plasmodium*. Ce mécanisme se traduirait par une importante réponse Th1 entraînant une production importante d'IL-12 et d'IFN γ (Donovan *et al.*, 2007). Tout récemment, il a été montré que l'injection de *Plasmodium* chez des souris, combinée à une exposition aux piqûres d'*An. stephensi* favoriserait le développement de la morbidité palustre (Schneider *et al.*, 2011). Par, contre certaines investigations ne trouvent aucun effet de la salive ni de l'immunité anti-salive sur le développement de la réponse anti-*Plasmodium* (Kebaier *et al.*, 2010). En ce qui concerne les arbovirus transmis par les *Aedes* et les *Culex*, l'effet de la salive sur l'installation de pathogène et le développement de la maladie ne fait l'objet d'aucun doute pour l'instant.

Les constatations indiquent que la salive des vecteurs favoriserait l'installation d'arbovirus chez le vertébré en orientant la réponse immunitaire vers le type Th2. Il a été clairement mis

en évidence que l'inoculation du virus du sindbis avec des extraits de glandes salivaires d'*Ae. aegypti* entraîne une production beaucoup plus importante des cytokines Th2 telles que IL-10 et IL-4 en comparaison au virus inoculé seul, un « terrain » immunitaire de type Th2 favorisant ainsi le développement de l'infection virale (Schneider *et al.*, 2004). Récemment, il a été montré une forte production d'IFN γ et une absence de production d'IL4 suite à une inoculation artificielle du virus du chikungunya, alors que l'infection obtenue à travers la piqûre du moustique *Ae. aegypti* est marquée par une réponse de type Th2 avec une forte production d'IL4 (Thangamani *et al.*, 2010). Cette orientation vers une réponse Th2 est très défavorable pour l'hôte vertébré. L'IL10 qui est aussi générée par l'effet de la salive est très bénéfique au développement de virus de par sa capacité à réguler la réponse immunitaire aussi bien innée qu'adaptative (Brooks *et al.*, 2006; Ejrnaes *et al.*, 2006). De même, une baisse de l'IFN- γ , cytokine déterminante contre les infections virales (Taylor *et al.*, 1980) indique que la salive des arthropodes est capable d'exacerber l'infection par les arbovirus au cours de la piqûre. Cette tendance de la salive à favoriser les infections virales a pu être vérifiée expérimentalement. Il a été montré que l'inoculation du virus du West Nile par la piqûre d'*Ae. aegypti* entraîne une progression rapide de l'infection avec de très fortes virémies et une neuro-invasion accélérée. De plus, au cours de cette expérimentation, les auteurs ont remarqué un taux de survie moins important chez les souris infectés par des piqûres infectantes, par rapport aux souris inoculées par le seul virus (Schneider *et al.*, 2006). D'autres preuves ont fini de poser clairement le rôle de la salive dans l'installation des arbovirus dans la peau du vertébré par sa propriété à diminuer le recrutement de lymphocytes T au niveau du site de la piqûre. Une étude comparative a, en effet, montré que l'inoculation artificielle du virus West Nile induit un afflux de cellules T plus important qu'une infection en présence de salive d'*Ae. aegypti*. Cette différence de réponse s'accompagne aussi d'une proportion de particules virales plus importante chez les souris infectées par des piqûres (Schneider *et al.*, 2010). De plus, l'effet de la salive peut exacerber l'infection virale. En effet, Schneider *et al.* ont montré que le fait d'être exposé à des piqûres non infectantes favoriserait seul le développement du virus West Nile (Schneider *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces études démontre toute la complexité de l'effet des protéines salivaires et de la pré-exposition sur l'acquisition de la réponse immunitaire anti-pathogènes, qu'elle soit innée ou adaptative. Ces études montrent également la nécessité d'étudier l'effet de la pré-exposition dans un contexte « naturel », à savoir sur le terrain, car nous savons qu'en zone d'endémie, l'exposition aux piqûres non infectantes est très fréquente, varie selon les saisons et est de loin beaucoup plus nombreuse que les piqûres infectantes. L'ensemble des données

collectées dans les modèles expérimentaux d'exposition chez l'animal doit donc être confronté aux observations en conditions réelles de l'exposition des populations afin de confirmer ou non le rôle de ces composants salivaires.

C. Réponse anticorps contre les protéines salivaires des arthropodes : un nouvel outil d'évaluation de l'exposition aux piqûres des vecteurs et du risque de transmission des pathogènes

Le système immunitaire de l'hôte vertébré est également capable de reconnaître spécifiquement et de développer une réponse immunitaire contre certaines protéines salivaires. Les réactions allergiques qui surviennent à la suite de piqûres de moustiques (notamment *Aedes* et *Culex*) montrent clairement l'existence d'une réponse spécifique du vertébré à la salive. Il a été mis en évidence chez des patients allergiques, la production d'IgE et d'IgG4 contre une protéine salivaire de 36 kDa commune à *Ae. communis* et *Ae. aegypti* (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994; Reunala *et al.*, 1994). Ce même type de réaction spécifique a pu être observé avec la salive d'*An. stephensi* : des anticorps humains de type IgE reconnaissent une protéine de 46 kDa (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999). La production chez la souris, d'Ac monoclonaux contre certaines protéines d'*Ae. aegypti* (Peng *et al.*, 1999) a fini de mettre en exergue la capacité du vertébré à développer une réponse adaptative à la salive des arthropodes pour contrer les protéines salivaires et par conséquent le repas sanguin. La production d'Ac anti-protéines salivaires, induits donc par la piqûre, est le reflet du contact entre l'homme et les vecteurs. Cette propriété, la production d'Ac anti protéines salivaires, pourrait servir au développement d'outils complémentaires pour la mesure de l'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs. Les techniques actuelles d'évaluation sont des méthodes indirectes ne permettant d'avoir qu'un aperçu de l'exposition aux piqûres de vecteurs. En plus, ces méthodes d'évaluation ne rendent pas compte de l'hétérogénéité de l'exposition qui peut résulter de certains facteurs anthropogéniques tels que l'âge, l'utilisation de protections individuelles ou l'activité quotidienne des populations étudiées. La mise en place régulière de ces moyens de surveillance pose aussi problème du fait de certaines lourdeurs techniques et difficultés financières. L'étude de la relation vertébré/vecteur au cours de la piqûre permet de développer de nouveaux outils qui permettent de mesurer le contact entre ces deux protagonistes. La réponse Ac du vertébré contre les protéines salivaires des arthropodes a servi à développer des bio-marqueurs permettant de mesurer l'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs et l'efficacité des

moyens de lutte anti-vectorielle. Les données existantes dans ce domaine d'étude sont présentées dans la revue ci-dessous. Dans cette revue, nous avons présenté l'ensemble de ces stratégies qui ont été développées et leur impact potentiel dans le contrôle des maladies à transmission vectorielle.

ARTHROPOD IMMUNOGENIC SALIVARY PROTEINS IN VECTOR-BORNE DISEASES CONTROL

Souleymane Doucoure^{1*}, Sylvie Cornelie¹, Pape M. Drame¹, François Mouchet¹, Anne Poinsignon¹, Franck Remoue¹.

¹Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, UMR 224 CNRS/IRD/UM1, Montpellier, France

*Corresponding author: Souleymane Doucoure.

Phone: + 33 467 416 178

Fax: + 33 467 416 330

e-mail: souleymane.doucoure@ird.fr

Abstract

Vector control is one of the most valuable strategies to fight the expanding distribution of arthropod-borne diseases (ABD). However, its implementation and monitoring are time consuming and labour intensive that may impede regular entomological survey in the field. To increase the impact of vector control strategies in fighting ABD, the current entomological methods should be improved by new complementary tools. The exploration of the close interactions between the human host and the vector through the antigenic salivary proteins of hematophagous arthropods has led to the development of new biomarkers. This review, focus on the relevance of these immunological biomarkers in assessing the human exposure to vector bites as well as the risk of pathogens transmission. The capacity of these new tools in evaluating the efficacy of vector control strategies is also discussed.

Introduction

The arthropod-borne diseases (ABD) represent a major threat and source of increasing concern in international public health (Gubler, 2009). Their transmission and worldwide dissemination are dependent on several factors, mainly the availability of treatment against etiological agent and the effectiveness of arthropod vectors control strategies. According to disease, these strategies of control present some weakness, favouring the transmission of pathogen. For example, there is no medical treatment for dengue fever, the most common arbovirus infection worldwide with 2.5 billion people at risk and with an estimated 50 million cases annually (WHO, 2009b). In another hand, there are effective drugs (e.g. to cure malaria) but we are facing difficulties to ensure their availability and their correct use by concerned populations. These reasons could partially explain the considerable burden of malaria. In 2009, 225 million of clinical cases and 781.000 deaths were reported through the world (WHO, 2010). A major source of treatment failure is triggered by the emergence of drug

resistance by the pathogens (Fukuda *et al.*, 2011). This phenomenon of resistance is widely found in most infectious agent transmitted by arthropods. The success achieved by the use of artemisinin-based combination therapy (ACTs) in the fight against malaria could be slowed by the emergence of resistance (Noedl *et al.*, 2008). This resistance is also marked in leishmaniasis which affect 12 million of people with 1.5 to 2 million cases annually (Chawla & Madhubala, 2010).

The arthropod vectors have also developed resistance against the insecticides used for vector control and to prevent contact with their vertebrate hosts. In Africa, resistance to insecticides is frequent in *Anopheles gambiae*, one of the most competent vector of *Plasmodium falciparum* (Yadouleton *et al.*, 2011) and *Aedes* mosquitoes, the vector of arbovirus, have developed resistance in important transmission foci in South America (Llinas *et al.*, 2010; Prophiro *et al.*, 2011). This situation generates more difficulties in vector control by impairing strategies targeting the reduction of vector populations.

Other factors could favor the dissemination of ABD. Genetic mutations of pathogens can be determinant in the pathogen-vector interactions by increasing their mutual adaptation that would promote the spread of pathogens. One mutation on the viral envelop of Chikungunya virus facilitates its replication and transmission by *Aedes albopictus* in an area where *Aedes aegypti*, the primary vector, is quasi absent. This has been the origin of a huge scale of Chikungunya outbreak in a naïve population in La Reunion Island (de Lamballerie *et al.*, 2008). The rapid changes in environmental and socio-economic factors are also impacting on ABD dissemination (Sutherst, 2004; Gould & Higgs, 2009). One probable consequence of the global climate change is to enhance and to maintain durably the population of vector in tropical and temperate areas. This situation is exacerbated by human activities which are pushing ABD protagonists to “meet” frequently. Human populations are more susceptible to be in contact with ABD etiological agents due to fast and uncontrolled urbanisation or the development of international travel and trade (Tatem *et al.*, 2006; Randolph & Rogers, 2010). A pertinent example is the Indian Ocean epidemic of Chikungunya which has been the origin of the outbreak noticed in Italy in 2006 (Beltrame *et al.*, 2007).

The combination of all these factors exacerbates pathogen transmission in endemic tropical areas and promotes their emergence in temperate latitudes despite many efforts devoted to fight these diseases. This situation highlights the urgent need to improve the control methods which are currently used. Among these tools, vector control program (VCP) remains one of the most valuable strategies to prevent pathogen transmission and therefore ABD dissemination. The first target of VCP is to reduce vector population density in order to

reduce the pathogens transmission level within human populations. However, its implementation and monitoring are time consuming and labour intensive that may impede regular entomological survey in the field. This survey may be also limited by some ethical considerations. For example, concerning malaria vector, the use of human landing catch represents the most accurate method to evaluate the human/vector contact, but the use of human bait is unsafe and not applicable for children. In another hand, indirect measure based on vector immature stages may not provide reliable measure for vector bites. This technique are used to evaluate human exposure to *Aedes* but failed to give correct estimation of arbovirus transmission (Pontes *et al.*, 2000).

To increase the impact of vector control strategies in fighting ABD, the current entomological methods should be improved by new complementary tools. These improvements should allow to estimate the real contact of vector with the human host, and consequently to evaluate accurately the risk of disease transmission and the efficiency of VCP. The development of such tool needs to explore the close interactions between the human host and the vector. The physical contact between these two protagonists involves physiological interactions through salivary proteins of hematophagous arthropod which are injected in human skin during the bite. Arthropod saliva is composed of bioactive molecules such as anti-clotting, anti-platelet and vasodilator factors (Ribeiro, 1995; Champagne, 2004). The finality of such injected cocktail of pharmacological substances is to inhibit human haemostatic reaction and to favor the blood meal intake. The interactions of arthropod salivary proteins with vertebrate skin and blood factors impact also on human inflammatory and immunological systems. The immuno-modulation/suppressive phenomenon noticed at the biting site are known to modulate the vertebrate infection (Billingsley *et al.*, 2006; Schneider & Higgs, 2008). Interestingly, vertebrate host are able to develop an immune response against the injected salivary proteins. This immune response could modulate or block the vertebrate infection. One promising approach is to use this immune response as an essential tool for vaccine strategies conferring protection against the pathogens (Kamhawi *et al.*, 2000). One component of this immune response is the development of antibody (Ab) response directed to arthropod salivary proteins which can be used to impair the blood intake by the arthropod and limit pathogen transmission (Wikel, 1981). Furthermore, the production of specific Ab which is induced by the contact of human host with the saliva of hematophagous arthropod has been used to develop new tool to evaluate human exposure to vectors bites, to assess the risk of diseases transmission and to evaluate the efficacy of VCP. In this review, we focused on their properties of antigenic salivary proteins and the specific Ab responses to be used as

epidemiological tool which can contribute to improve vector control strategies and to limit ABD dissemination.

1 Immunogenic salivary proteins as an epidemiological tool?

1. 1 Anti-saliva Ab and exposure to vector bites

The assessment of human specific Ab level against arthropod salivary proteins has been widely used to get an insight of the exposure to vector bites. This approach has been applied to different vectors of public health diseases. Regarding malaria, which presents different level of transmission according to epidemiological foci, this method has been used to evaluate both children and adults exposure to several *Anopheles* species. In a malaria seasonal transmission area, high level of anti-saliva Ab has been detected during the peak of exposure to *Anopheles* bites in a cohort of Senegalese children (Remoue *et al.*, 2006). Recently, exposure to *An. albimanus*, the principal vector of malaria in Haiti, has been correlated to the level of IgG against salivary proteins (Londono-Renteria *et al.*, 2010).

This approach measuring directly the human exposure to vector bites could especially be beneficial for evaluating human contact with *Aedes* mosquitoes. Actually, the current methods used to estimate human exposure to *Aedes* bites are essentially based on the mapping of breeding sites associated with larvae counting. Consequently, the larval indices (container index, house index and Breteau index) generated by these methods represent an indirect estimation of human exposure to *Aedes* bites. Interestingly, in an arbovirus transmission area, the human anti-saliva Ab response has been used to evaluate the children exposure to *Ae. aegypti* bites. It has been shown that Ab level (IgG4 and IgE) to *Ae. aegypti* total salivary extract increased during the rainy season corresponding to a high exposure to *Ae. aegypti*. (Remoue *et al.*, 2007). Another study underlined that the measure of IgG and IgM level against salivary proteins can be used to evaluate the contact with *Ae. aegypti* in population transiently exposed in tropical regions (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007). Concerning *Culex* mosquitoes, in a *Wuchereria bancrofti* endemic region, the level of human Ab specific to *Culex quinquefasciatus* saliva was highly indicative of the exposure to the bite by this mosquito species (Das *et al.*, 1991).

Beyond *Culicidae*, similar observations have been reported for other arthropod vectors of diseases with significant burden in tropical regions. In an endemic area for visceral leishmaniasis (VL), the detection of IgG response against saliva is a useful indicator of exposure to the bite of *Lutzomyia longipalpalis* in children (Barral *et al.*, 2000). Concerning

sand flies of the old world, significant difference in IgG level was observed between individual from endemic area for *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* and individual living in sand fly-free area. The exposure to *Glossina fuscipes* was also evaluated in residing individuals by assessing the level of IgG to *Glossina* saliva and specific IgG response could represent a biomarker of exposure to *Glossina* bites, whether individuals were infected or not by *Trypanosoma brucei gambiense* (Poinsignon *et al.*, 2008b). Eighty percent of the exposed individuals were “immune responders” for anti-saliva IgG. In contrast, no Ab response to *Glossina* salivary proteins was observed in the non exposed individuals. Interestingly, the diagnostic value of this specific ELISA test presented the following characteristics: sensibility = 80%, specificity = 100%. Moreover, this evaluation indicated a spatial heterogeneity of the exposure in the studied area.

For *Ixodidae*, individuals exposed to *Ixodes dammini* bites have higher Ab level to tick saliva compared with non exposed group (Lane RS, 1999). Such evidence has been also established according to the exposure to *Triatomines* bites (Nascimento *et al.*, 2001).

Interestingly, some studies clearly showed the possibility to apply this salivary approach to domestic animals which play a crucial role in ABD transmission. Experimentally, the level of anti-saliva IgG in dogs has been linked to the intensity of exposure to *L. longipalpalis* (Hostomska *et al.*, 2008). Also, the evaluation of the Ab response is a valuable approach to detect *Triatoma infestans* activity in peridomestic animals (Schwarz *et al.*, 2009b) and for *Culex tarsalis* and arboviruses in sentinel surveillance chickens in California (Trevejo & Reeves, 2005). In rural malaria transmission area, several immunogenic salivary proteins have been detected in horses exposed to *Anopheles* bites (Boulanger *et al.*, 2011). The detection of domestic animals to vector bites may help to understand the dynamic of ABD transmission. Indeed, domestic animals represent source of blood meal for arthropod, therefore could be important source of pathogen transmission and contamination of zoonotic diseases to human populations.

All these studies focused on population living or not in endemic area and have shown the feasibility of this approach to develop specific biomarker of exposure based on the evaluation of Ab response against specific salivary proteins. Therefore, it appears relevant to identify species specific immunogenic salivary proteins.

1-2 Specificity and sensitivity of anti-saliva Ab

The specificity and sensitivity of pertinent biomarker need the use of specific salivary proteins because whole saliva can not complete these requirements expected for such indicator.

Several studies have attempted to identify which salivary proteins are immunogenic in individuals exposed to vectors bites. For example, in malaria seasonal transmission area, two major proteins of *Anopheles gambiae* saliva, 72 and 175 kDa have been found antigenic in all exposed children. In addition, the Ab response to these proteins seem indicative of the exposure to bites, since a notable decrease of specific IgG levels have been observed from the peak to the end of *An. gambiae* exposure season (Cornelie *et al.*, 2007). For *An. dirus*, the evaluation of human IgG and IgM responses against salivary proteins ranging from 20 to 91 kDa, have been used to detect individuals exposed to the bite of this malaria vector in Western Thailand (Waitayakul *et al.*, 2006). The antigenicity of 36 and 22 kDa proteins from *Ae. communis* and *Ae. aegypti* has also been observed in individuals exposed to the bites of these vectors (Reunala *et al.*, 1994). However, as long as some arthropod salivary proteins are genus and species shared, the occurrence of Ab cross-reactivity is undeniably expected. For example, western blot analyses on *Aedes* mosquitoes saliva showed extensive cross reactivities and revealed common antigens between *Aedes* species (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994; Jeon *et al.*, 2001). Interestingly, an experimental investigation showed the specificity of the Ab response in mice repeatedly bitten by *P. argentipes* in comparison to the Ab developed against *P. papatasi* and *P. arabicus* salivary gland extracts (Drahota *et al.*, 2009). In addition, individuals exposed to *Phlebotomus* bites recognized any salivary protein of *L. Longipalpalis* (Rohousova *et al.*, 2005). This specificity obtained with whole salivary proteins, is an open way to identify specific proteins and therefore, specific biomarker of exposure to species bites. To achieve this goal, some studies have relied on the development of vector sialotranscriptomes (Arca *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2010a; Calvo *et al.*, 2010b). By investigating and comparing the sialotranscriptome of the major arthropod vectors, it can be useful to identify species/genus-specific salivary proteins. Based on results reporting the SG6 protein as *Anopheles* genus specific, only one peptide of this protein (gSG6-P1) has been identified as specific biomarker of exposure to *Anopheles* bites, by combining bio-informatic and immuno-epidemiological approaches. Studies have reported that the gSG6-P1 peptide is antigenic and that IgG level to this peptide is relevant to evaluate the human exposure to *An. gambiae* and *An. funestus* in children living in malaria transmission area (Poinsignon *et al.*, 2008a). (Poinsignon *et al.*, 2010). Further studies should investigate its potential to detect the exposure to *An. stephensi*, the major vector of *Plasmodium* in Asia, since transcriptome analysis revealed high similarity of this peptide sequence between *An. gambiae*, *An. funestus* and *An. Stephensi* (Calvo *et al.*, 2004)

In another hand, an immuno-proteomic study has been used to develop specific biomarker of exposure to *Lutzomyia longipalpis*. Two salivary recombinant proteins (rLJM17 and Rljm11) are highly specific for the detection of the exposure to the bites of this vector in individual residing in endemic areas (Souza *et al.*, 2010). This approach has been also used to develop the recombinant rTisP14.6 salivary protein, as promising biomarker of exposure to several species of *Triatomines* (Schwarz *et al.*, 2009a).

In the perspective to have an optimal and accurate biomarker of exposure, the level of human anti-salivary proteins Ab response should reflect the dynamic of the interactions between the vertebrate and the arthropod. Thus, the anti-saliva Ab should: i) be concurrent to the exposure to vector bites. The authors showed experimentally that the IgM responses specific to rTisP14.6 and to whole salivary proteins were detectable one day after the exposure to the bite of *Triatoma infestans*. It is indicated also that specific IgM response may be used to detect the concurrent exposure and it does not increase over the time after serial exposure to the vector bite (Schwarz *et al.*, 2009a), ii) decline rapidly with the decrease or after the cessation of exposure. The same authors showed that the Ab level to saliva decrease after the cessation of the exposure to *Triatoma infestans* (Schwarz *et al.*, 2009a). In the field, investigations have shown that the anti-saliva Ab response is very transient and characterized by a short life time. Individuals briefly exposed to *Anopheles* and *Aedes* bites, develop high level of anti-saliva Ab followed by a significant decrease in the post-exposure period (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007). In malaria transmission area, the decrease of the exposure to *Anopheles* bite which followed the use of insecticide treated net (ITN) has been detected by the use of the gSG6-P1 peptide (Drame *et al.*, 2010a), iii) reflect the intensity of the human exposure. The measure of IgG against the recombinant antigen rTisP14.6 and total salivary proteins of *Triatoma infestans* indicated that the level of Ab response depend on the intensity of exposure to the bite of *Triatoma infestans*. Ab response is the result of high exposure and the same association is also observed for low Ab levels (Schwarz *et al.*, 2009a; Schwarz *et al.*, 2009b). These studies clearly linked the level of anti-saliva Ab to the exposure of arthropod vector bites and remain highly indicative of the concurrent human-vector contact. This parameter is fundamental in the usefulness of anti-saliva Ab biomarker and particularly in endemic areas where exposure to arthropod bites is recurrent.

1-3 Anti-saliva Ab response in particular contexts of low-level exposure to vector bites.

The threshold of positive detection is essential in the aim to improve the diagnostic of the exposure to arthropod bites. The anti-saliva Ab response shows high sensitivity to detect

human-vector contact and to highlight low level of human exposure. For example, the salivary peptide gSG6-P1 and the recombinant salivary protein rTisP14.6 are highly effective to detect low level exposure to *An. gambiae* and *triatomine* bug populations, respectively (Poinsignon *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2009a). This property may constitute a particular interest in some transmission foci where vectors are found at low density like in Highlands (Kristan *et al.*, 2008). Monitoring such pattern of vector population by classical entomological tools is complex due to the difficulty to detect the vector presence. To overcome this situation early warning system has been developed on the basis of weather monitoring and disease data (Abeku *et al.*, 2004). However, this approach may be controversial (Stern *et al.*, 2011). In this context, the anti-saliva Ab response could be a pertinent tool to improve the evaluation of human exposure because of its high sensitivity.

Beyond this particular context of the highlands, low level exposure to vectors may be generalized in the urban transmission contexts, especially with the current rapid urbanization (UN, 2003) and the low density of *Anopheles* population which characterized the urban environment. This trend may be generalized for ABD since it is known that by 2030, Africa's urban population will increase by 54% (UN, 2003). Therefore, the next challenge for ABD control program will be to evaluate accurately human exposure to vector bites in urban foci.

Altogether, the ability to detect exposure and its association to the density of biting vector, establish the epidemiological interest of the human anti-saliva Ab response to be used as a tool to measure the exposure to arthropods bites. These parameters, by improving the measure of the exposure to arthropods bites should help to better understand the human interaction with vector and improve the knowledge of pathogen transmission.

2- Anti-saliva Ab response and disease transmission

The evaluation of arthropod borne diseases transmission is based on the level of exposure to vector bites (density, EIR...) and prevalence of pathogen in population. We describe above that the exposure can be assess by the evaluation of vertebrate Ab response specific to vector salivary proteins. The study of vector immunogenic salivary proteins may also give indications and contributes on the evaluation of pathogen transmission.

2-1 To differentiate the exposure between competing vectors

In endemic areas, pathogen transmission is complex with the presence of one or more biting arthropod species presenting different vectorial capacity and competence. It should be thus informative to discriminate human exposure to competent vector(s) in order to assess

accurately the risk of disease transmission. The accurate composition of arthropod salivary proteins and their interactions with vertebrate host could help to better understand pathogen transmission. For example in India, both *P. argentipes* and *P. papatasi* can bite human population but only *P. argentipes* is vector of *Leishmania Donovanii*. The measure of the level of IgG to *P. argentipes* saliva did not differentiate the exposure to the bites of this vector between populations from non endemic and leishmaniasis endemic region, because of the interference of cross-reactive antigens of *P. papatasi*. The authors used a pre-adsorption step against *P. papatasi* saliva to improve the detection of the exposure to *P. argentipes* bites. This method allowed to detect significant different level of exposure between individuals from non endemic and leishmaniasis endemic region. Therefore, the correct measure of the anti-saliva Ab can be used to differentiate exposure between competing biting arthropods presenting different vectorial capacity (Clements *et al.*, 2010). In addition, in a community of high risk of Lyme disease, the evaluation of Ab against tick saliva was used to corroborate circumstantial evidence that *I. pacificus* is the vector of *Borrelia burgdorferi*. The level of Ab to *I. pacificus* saliva is significantly associated to the seroreactivity against *B. burgdorferi* antigens whereas the Ab response to *Dermacentor occidentalis* saliva was not associated with the occurrence of Lyme disease (Lane RS, 1999).

2-3 Anti-saliva Ab response and disease status

Interestingly, studies have linked the detection of an anti-saliva Ab response and the risk of disease transmission. Indeed, it has been reported significant difference of Ab level in individuals according to their infectious status. The level of specific Ab to salivary proteins is higher when individuals have been exposed to pathogens. In a cohort of children from a VL endemic area, it has been observed that anti-saliva Ab response level is higher in individuals diagnosed positive to *Leishmania* antigens or to skin test (delayed type hypersensitivity (DHT) compared to negative individuals (Barral *et al.*, 2000). The same observation has been recently done according to the exposure to *P. papatasi* vector of *Leishmania major* in a cohort of North African children (Marzouki *et al.*, 2011a). In addition, the pattern of anti-saliva Ab response is different between individual who experienced seroconversion after being exposed to *Leishmania chagasi*. Indeed, the level of IgG1 and IgE anti *L. longipalpalis* saliva is more important in individuals with DHT induration (Gomes *et al.*, 2002).

Regarding the transmission of *B. burgdorferi*, the level of human Ab response to *I. dammini* saliva has been positively correlated with the quantitative self-reported tick bites. This IgG response was also significantly higher in seropositive than in seronegative individuals for

Lyme disease (Schwartz *et al.*, 1990). These results suggest the anti-saliva Ab response could be used as an epidemiological marker of the risk of disease transmission. Such approach could be applied to the evaluation of the risk of malaria transmission, one of the most major health problems in tropical regions. Several studies have shown that individuals with acute malaria developed higher level of IgG to *Anopheles* saliva than individuals who had not experienced malaria illness in area of seasonal malaria transmission (Remoue *et al.*, 2006). These results are particularly of interest since they were based on cohort of children with an age ranging from 2-6 months to 4-5 years, the most vulnerable population regarding malaria transmission and morbidity. Concerning malaria vectors in the Caribbeans Island and in Latina America, the same result was also observed in populations more heterogeneous in age. The level of IgG to *An. albimanus* saliva was significantly higher in malaria patients compared to negative controls (Londono-Renteria *et al.*, 2010). The epidemiological interest of this approach is undeniable since the salivary indicator could distinguish the asymptomatic and symptomatic *P. vivax* individuals. Indeed, the IgG level to *An. darlingi* saliva was higher in symptomatic individual compared to those without clinical signs (Andrade *et al.*, 2009).

These findings show that, beyond its association to the risk of diseases transmission, the measure of Ab response to salivary proteins could help to accurate the diagnosis of ABD. In this field, the limitations in diagnosis of pathogen transmission may constitute a major obstacle to successful control program. Regarding malaria, the use of rapid diagnostic test (RDT) may be an input for a simple and rapid detection of the parasite. But such methods have shown some deficiencies that could alter the relevance of the disease diagnose (Tjitra *et al.*, 2001; Ochola *et al.*, 2006; Hopkins *et al.*, 2007; WHO, 2008). ABD involves dynamic interactions between the vector, pathogen and human host. Some studies have reported changes in vector salivary protein composition after pathogen infection. For example, the expression of apyrase and the gSG6 *Anopheles* salivary protein decreased in mosquito infected by *Plasmodium* (Choumet *et al.*, 2007) and are antigenic in exposed children (Cornelie *et al.*, 2007; Poinsignon *et al.*, 2008a). This result emphasizes the opportunity to develop a biomarker of exposure which will be specific to infected bite. Such potential biomarker, associated to current method of *Plasmodium* detection, can help to target population who are most at risk of infection. This parameter is fundamental in malaria control.

This “infected biomarker” approach can be beneficial to other important diseases like dengue and chikungunya transmitted by *Aedes* mosquitoes. The entomological indices are generally associated to infection data in human populations to give insight of pathogen transmission

risk. But their reliability is limited due to the indirect and non standardized methods used to estimate the human exposure to *Aedes* bites. Moreover, the virus detection by serological analysis is most of the time challenging because of, for example, the frequent Ab cross-reactivity between *Flavivirus*, as noticed in dengue diagnosis (Calisher *et al.*, 1989; Tesh *et al.*, 2002). The detection of anti-dengue IgM and IgG generally lacks specificity and sensitivity and its association to the detection of the NS1 protein by molecular techniques may not rule out dengue diagnosis (Osorio *et al.*, 2010). The anti-saliva Ab response can be a complementary tool to improve the estimation of *Aedes*-borne diseases transmission risk. Indeed, in the context of dengue transmission, differences are noticed in the antigenicity of *Ae. aegypti* immunogenic salivary proteins between bitten non-infected individuals and patients with dengue hemorrhagic fever (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2009; Machain-Williams *et al.*, 2011). The detection of Ab level to *Ae. aegypti* immunogenic salivary proteins should therefore improve the dengue diagnosis, if associated to current methods.

Furthermore, the detection of anti-saliva Ab responses in domestic animal (Hostomska *et al.*, 2008; Boulanger *et al.*, 2011) may open new opportunity to better estimate the pathogen transmission as long as human population intersects with livestock. Indeed, the “animal” livestock may be involved in the pathogen transmission whether or not they are receptive hosts. For example, in the case of malaria, which is not a zoonotic disease, the presence of livestock in the household may influence *Anopheles* feeding behaviour, hence *Plasmodium* transmission. For some arbovirus, incidental or dead end domestic animal host are used as an early warning system of risk of infection in human population. Thus, the knowledge of the exposure of domestic animal to vector bites may be crucial to determine pathogen circulation. Its use may accurate prediction of current strategies modelling ABD transmission particularly in rural areas.

3 Anti-saliva Ab response and vector control program

Vector control program (VCP) is a cornerstone in the management of ABD control. Their implementation is as important as the assessment of their efficacy. The correct evaluation of the efficacy of control tools both is necessary at individual and community level, in order to drive VCP strategies for a better control the ABD transmission. For example in malaria, the use of insecticide treated net (ITN) is recommended to prevent *Anopheles* bites thereby to lower *Plasmodium* transmission rate. Unfortunately, *Anopheles* resistance to insecticides and socio-economic factors raise the question of their fully efficiency. Entomological surveys and the evaluation of *Plasmodium* infection are the two referent parameters for measuring the

efficacy of ITN. However, these methods present limitations when it comes to large-scale field studies, especially when transmission rates and exposure levels are low (A-Elgayoum *et al.*). It is therefore recommended to develop new indicators which can accurately evaluate the efficacy of anti-vector strategies. Since the anti-saliva Ab response reflects the *Anopheles*-human contact, this salivary tool has been used to evaluate the efficacy of ITN at a community level. Indeed, in a malaria endemic area in Angola, the level of human IgG response to *Anopheles* whole saliva seems to be a surrogate biomarker to evaluate the efficacy of ITN use (Drame *et al.*, 2010b). Individual specific IgG response was evaluated before and after the use of ITNs and a significant drop of the level of IgG response was observed only two months after the introduction of ITN, suggesting the pertinence of this approach for evaluating the efficacy of vector control program. These results obtained with whole *Anopheles* saliva has been confirmed by the use of the gSG6-P1 peptide (Drame *et al.*, 2010a). In addition, specific IgG level to gSG6-P1 was especially pertinent to evaluate a short-time period of ITNs efficacy and at individual level and to detect the loss of correct ITN use. The same approach has been applied to other vectors. The exposure to *P. argentipes* bites was investigated before and during the use of untreated nets in individual with acute VL. Significant decrease of anti-saliva Ab level was observed during the period of use, indicating the protection against the bites of *P. argentipes* conferred by the nets (Clements *et al.*, 2010). In Chagas disease transmission foci, experimental investigation in peridomestic animals has shown the usefulness of this approach to evaluate the efficacy of vector control strategies. Protected guinea pigs by deltamethrin-treated net developed lower anti-Triatomine saliva Ab than unprotected animals, indicating the effectiveness of vector control strategies (Schwarz *et al.*, 2011). This immuno-epidemiological survey is also pertinent to evaluate the efficacy of ITN over the time. Indeed, the use of defective nets or the loss of their correct use are associated with an increased level of anti-saliva Ab (Clements *et al.*, 2010; Drame *et al.*, 2010a). The assesment of anti-saliva Ab response can thus represent a pertinent indicator for evaluating vector control strategies and, by consequences, could be use to readjust VCP interventions. Such possibility should benefit in many endemic areas where insufficient financial support may impede the implementation of vector control program.

Entomological tools are the current referent methods to estimate the human exposure to vectors bites and get insight of pathogen transmission. Other techniques are also used to detect ABD outbreak. The predictive models developed for that purpose are based on climate, vector population density, epidemiological data like herd immunity. However, some parameters used to build predictive models may present substantial limitations. For example,

some authors recommend to model dengue outbreak without entomological data due to their lack of reliability and to use preferentially epidemiological data (Eisen & Lozano-Fuentes, 2009). For some diseases, it is possible to predict the abundance and the peak of vector population but it remains uncertain whether or not vectors have been in contact with human populations. Indeed, the human/vector interaction is sustained by anthropogenic factors which determine largely the recurrence and intensity of the contact. Capture strategies for collecting mosquito, such as human landing catch, can be used to measure this contact, but present considerable ethical limitations and are applied only to adult exposure. The evaluation of anti-saliva Ab seems to be a valuable alternative to get this insight and strengthen the prediction of disease outcome. The knowledge of human exposure to arthropod bites, based on salivary biomarker and associated to usual parameters, should strengthen predictive models and assess accurately the risk of diseases transmission.

Conclusion and perspectives

In this review, we underline the potential to use human anti-saliva Ab response to get insight of population exposure to arthropod vector bites and that this approach can be indicative of arthropod-borne diseases transmission to identify area or population at high risk. For future development of this tool, it appeared necessary to clearly identify species/genera specific salivary protein or peptide as it has been done for *Anopheles* and *Triatomine*.

Beyond the ability to detect human exposure to vector bites, the study of arthropod salivary proteins may open perspectives. The immuno-modulatory effects of arthropods saliva have been highlighted in many studies. It has been reported that prior exposure to uninfected bites can impact on disease outcome, protective (Donovan *et al.*, 2007) or deleterious (Schneider *et al.*, 2007). Therefore, the effect of vector saliva on human immunity should be helpful in developing new tools to combat ABD. This knowledge may have great implication in vaccine strategies as long as uninfected bites are recurrent and in large majority compared to infected bites, in endemic transmission foci. In addition to the immunomodulatory effects, it should be interesting to investigate other mechanisms facilitating the installation and transmission capacity of pathogen in human host skin through vector saliva.

The knowledge of the vector biology is crucial to a better knowledge of ABD transmission and supplemental efforts should be done to develop adequate tools for this purpose. The study of arthropod salivary proteins may lead to significant advances in this field. For example, it is reported important variation of salivary proteins composition according to vector age and diet

(Prates *et al.*, 2008). Such pattern of variation can be use to develop entomological marker for the assessment of vector biology status. Moreover, the composition of salivary protein may give an insight of evolutionary process of arthropod under selective pressure. Indeed, differential expression of salivary proteins according to the resistance status to insecticide has been noticed in *Culex* mosquito. Indeed, significant decrease of salivary protein involving in blood feeding is noticed in *Culex* resistant strain, compared to sensible one (Djegbe *et al.*, 2011). Further studies should focus on the impact of saliva composition changes on the vector biting behaviour and, by consequences, on pathogen transmission.

References

1. Gubler, D. J. Vector-borne diseases. *Rev Sci Tech* 28, 583-8 (2009).
2. WHO. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva : World Health Organization. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1 (2009).
3. WHO. World Malaria Report 2010. Geneva : World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (2010).
4. Fukuda, M. M. et al. Malaria and other vector-borne infection surveillance in the U.S. Department of Defense Armed Forces Health Surveillance Center-Global Emerging Infections Surveillance program: review of 2009 accomplishments. *BMC Public Health* 11 Suppl 2, S9 (2011).
5. Noedl, H. et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359, 2619-20 (2008).
6. Chawla, B. & Madhubala, R. Drug targets in Leishmania. *J Parasit Dis* 34, 1-13 (2010).
7. Yadouleton, A. et al. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin. *Parasit Vectors* 4, 60 (2011).
8. Llinas, G. A., Seccacini, E., Gardenal, C. N. & Licastro, S. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105, 113-6 (2010).
9. Prophiro, J. S. et al. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Rev Soc Bras Med Trop* (2011).
10. de Lamballerie, X. et al. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virol J* 5, 33 (2008).
11. Gould, E. A. & Higgs, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103, 109-21 (2009).
12. Sutherst, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev* 17, 136-73 (2004).
13. Randolph, S. E. & Rogers, D. J. The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nat Rev Microbiol* 8, 361-71 (2010).
14. Tatem, A. J., Rogers, D. J. & Hay, S. I. Global transport networks and infectious disease spread. *Adv Parasitol* 62, 293-343 (2006).
15. Beltrame, A. et al. Imported Chikungunya Infection, Italy. *Emerg Infect Dis* 13, 1264-6 (2007).
16. Pontes, R. J., Freeman, J., Oliveira-Lima, J. W., Hodgson, J. C. & Spielman, A. Vector densities that potentiate dengue outbreaks in a Brazilian city. *Am J Trop Med Hyg* 62, 378-83 (2000).
17. Champagne, D. E. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4, 375-96 (2004).
18. Ribeiro, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4, 143-52 (1995).
19. Billingsley, P. F., Baird, J., Mitchell, J. A. & Drakeley, C. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol* 28, 143-53 (2006).
20. Schneider, B. S. & Higgs, S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102, 400-8 (2008).
21. Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E. & Sacks, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351-4 (2000).
22. Wikel, S. K. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. *Am J Trop Med Hyg* 30, 284-8 (1981).
23. Remoue, F. et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 363-70 (2006).
24. Londono-Renteria, B. L., Eisele, T. P., Keating, J., James, M. A. & Wesson, D. M. Antibody response against *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) salivary protein as a measure of mosquito bite exposure in Haiti. *J Med Entomol* 47, 1156-63 (2010).
25. Remoue, F. et al. IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop* 104, 108-15 (2007).
26. Orlandi-Pradines, E. et al. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in

- travellers in tropical Africa. *Microbes Infect* 9, 1454-62 (2007).
27. Das, M. K., Mishra, A., Beuria, M. K. & Dash, A. P. Human natural antibodies to *Culex quinquefasciatus*: age-dependent occurrence. *J Am Mosq Control Assoc* 7, 319-21 (1991).
28. Barral, A. et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62, 740-5 (2000).
29. Poinsignon, A. et al. Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78, 750-3 (2008).
30. Lane RS, M. R., Hsu YP, Wei T, Mesirow ML and Kuo MM. . Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. *Am J Trop Med Hyg* 61, 850-9 (1999).
31. Nascimento, R., Santana, J., Lozzi, S., Araujo, C. & Teixeira, A. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg* 65, 219-26 (2001).
32. Hostomska, J. et al. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 443-50 (2008).
33. Schwarz, A. et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 39, 1021-9 (2009).
34. Trevejo, R. T. & Reeves, W. C. Antibody response to *Culex tarsalis* salivary gland antigens among sentinel chickens in California. *Am J Trop Med Hyg* 72, 481-7 (2005).
35. Boulanger, D. et al. Immunoglobulin G antibody profiles against *Anopheles* salivary proteins in domestic animals in Senegal. *J Med Entomol* 48, 691-3 (2011).
36. Cornelie, S. et al. An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. *Malar J* 6, 75 (2007).
37. Waitayakul, A. et al. Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Trop* 98, 66-73 (2006).
38. Reunala, T. et al. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol* 104, 366-71 (1994).
39. Brummer-Korvenkontio, H. L., P. Reunala, T. Palosuo, T. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *Allergy and Clinical Immunology* 93, 551-5 (1994).
40. Jeon, S. H., Park, J. W. & Lee, B. H. Characterization of human IgE and mouse IgG1 responses to allergens in three mosquito species by immunoblotting and ELISA. *Int Arch Allergy Immunol* 126, 206-12 (2001).
41. Drahota, J., Lipoldova, M., Volf, P. & Rohousova, I. Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunol* 31, 766-70 (2009).
42. Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y. & Volf, P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493-9 (2005).
43. Arca, B. et al. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol* 37, 107-27 (2007).
44. Calvo, E. et al. An insight into the sialotranscriptome of the West Nile mosquito vector, *Culex tarsalis*. *BMC Genomics* 11, 51 (2010).
45. Calvo, E. et al. The salivary gland transcriptome of the eastern tree hole mosquito, *Ochlerotatus triseriatus*. *J Med Entomol* 47, 376-86 (2010).
46. Ribeiro, J. M. et al. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 8, 6 (2007).
47. Poinsignon, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One* 3, e2472 (2008).
48. Poinsignon, A. et al. First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. *Trop Med Int Health* 15, 1198-203 (2010).
49. Calvo, E. et al. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Mol Biol* 13, 73-88 (2004).
50. Souza, A. P. et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e649 (2010).
51. Schwarz, A. et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of

- triatomines. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e532 (2009).
52. Drame, P. M. et al. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS One* 5, e15596 (2010).
53. Poinsignon, A. et al. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. *Malar J* 8, 198 (2009).
54. Kristan, M. et al. Variations in entomological indices in relation to weather patterns and malaria incidence in East African highlands: implications for epidemic prevention and control. *Malar J* 7, 231 (2008).
55. Abeku, T. A. et al. Malaria epidemic early warning and detection in African highlands. *Trends Parasitol* 20, 400-5 (2004).
56. Stern, D. I. et al. Temperature and malaria trends in highland East Africa. *PLoS One* 6, e24524 (2011).
57. UN. World urbanization prospects: the 2003 revision. (2003).
58. Clements, M. et al. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 82, 801-7 (2010).
59. Marzouki, S. et al. Characterization of the Antibody Response to the Saliva of *Phlebotomus papatasi* in People Living in Endemic Areas of Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 84, 653-61 (2011).
60. Gomes, R. B. et al. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186, 1530-4 (2002).
61. Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M. & Goldstein, M. D. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132, 58-66 (1990).
62. Andrade, B. B. et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J* 8, 121 (2009).
63. Hopkins, H. et al. Comparison of HRP2- and pLDH-based rapid diagnostic tests for malaria with longitudinal follow-up in Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 76, 1092-7 (2007).
64. Ochola, L. B., Vounatsou, P., Smith, T., Mabaso, M. L. & Newton, C. R. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *Lancet Infect Dis* 6, 582-8 (2006).
65. Tjitra, E., Suprianto, S., Dyer, M. E., Currie, B. J. & Anstey, N. M. Detection of histidine rich protein 2 and panmalarial ICT Malaria Pf/Pv test antigens after chloroquine treatment of uncomplicated falciparum malaria does not reliably predict treatment outcome in eastern Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 65, 593-8 (2001).
66. WHO. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1 (2008). (2008).
67. Choumet, V. et al. The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 7, 3384-94 (2007).
68. Calisher, C. H. et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70 (Pt 1), 37-43 (1989).
69. Tesh, R. B., Travassos da Rosa, A. P., Guzman, H., Araujo, T. P. & Xiao, S. Y. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* 8, 245-51 (2002).
70. Osorio, L., Ramirez, M., Bonelo, A., Villar, L. A. & Parra, B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virol J* 7, 361 (2010).
71. Machain-Williams, C. et al. Association of Human Immune Response to *Aedes aegypti* Salivary Proteins with Dengue Disease Severity. *Parasite Immunol* (2011).
72. Wasinpiyamongkol, L. et al. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 10, 1906-1916 (2009).
73. A-Elgayoum, S., El-Rayah, E. & Giha, H. In areas of low transmission, is the presumptive treatment of febrile but bloodsmear-negative patients for malaria validated by the results of PCR-based testing? *Ann Trop Med Parasitol* 104, 573-81.
74. Drame, P. M. et al. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated

- nets in malaria vector control. *Am J Trop Med Hyg* 83, 115-21 (2010).
75. Schwarz, A. et al. Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. *Int J Parasitol* (2011).
76. Eisen, L. & Lozano-Fuentes, S. Use of mapping and spatial and space-time modeling approaches in operational control of *Aedes aegypti* and dengue. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e411 (2009).
77. Donovan, M. J. et al. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infect Immun* 75, 2523-30 (2007).
78. Schneider, B. S. et al. Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted West Nile virus infection. *PLoS One* 2, e1171 (2007).
79. Prates, D. B. et al. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol* 45, 409-13 (2008).
80. Djegbe, I. et al. Differential Expression of Salivary Proteins between Susceptible and Insecticide-Resistant Mosquitoes of *Culex quinquefasciatus*. *PLoS One* 6, e17496 (2011).

Dans cette revue, nous avons décrit le développement de certains biomarqueurs salivaires et l'intérêt de leur utilisation dans la lutte contre les maladies à transmission vectorielle. Nous avons aussi discuté de la nécessité d'amélioration afin d'affiner la spécificité de détection, de quantifier l'exposition aux piqûres de vecteurs et de permettre l'évaluation du risque de transmission. Cette amélioration passe nécessairement par une meilleure connaissance des constituants protéiques de la salive des vecteurs.

7- Description du sialome d'*Ae. albopictus*.



Figure 21. Electrophorèse 1D et coloration au bleu de Comassie d'extraits de glandes salivaires d'*Ae. albopictus* (Arca et al. 2007)

L'association des techniques du SDS-PAGE (1D) et de la dégradation d'Edman a permis d'identifier et de caractériser les protéines les plus abondantes des glandes salivaires d'*Ae. albopictus* (Figure 21). Les protéines salivaires les plus fortement exprimées sont celles de la famille des D7 (formes courtes et longues), l'aprase et l'antigène 5 (Arca *et al.*, 2007).

Ces dernières années ont vu l'essor de l'étude et de la description des sialomes de plusieurs vecteurs notamment celui d'*Ae. albopictus*. L'étude transcriptomique des glandes salivaires d'*Ae. albopictus* montre l'expression de trois catégories de gènes : 61% des séquences codent pour des protéines putatives secrétées (potentiellement retrouvées donc dans la salive), les protéines de ménage représentent 21% de la totalité des séquences et 18% des séquences n'ont pu être assignées. Les protéines de ménage ont été regroupées en 16 sous-groupes dont

les plus importants en termes de nombre de séquences sont celles impliquées dans le processus de la synthèse des protéines (44,8 % des séquences) et du métabolisme énergétique (20,8%) (Tableau1).

Types of transcripts	Clusters	Sequences	Sequences/cluster	% Cluster	% Sequence
Protein synthesis machinery	44	95	2.2	31.9	44.8
Metabolism, energy	25	44	1.8	18.1	20.8
Conserved Protein modification	17	17	1.0	12.3	8.0
Transporters	10	10	1.0	7.2	4.7
Protein export machinery	8	9	1.1	5.8	4.2
Signal transduction	8	8	1.0	5.8	3.8
Cytoskeletal	6	6	1.0	4.3	2.8
Metabolism, lipid	4	5	1.3	2.9	2.4
Transcription machinery	3	3	1.0	2.2	1.4
Proteosome machinery	3	3	1.0	2.2	1.4
Metabolism, oxidant	2	3	1.5	1.4	1.4
Transcription factors	2	2	1.0	1.4	0.9
Metabolism, amino acid	1	2	2.0	0.7	0.9
Metabolism, carbohydrate	1	1	1.0	0.7	0.5
Metabolism, nucleotide	1	1	1.0	0.7	0.5
Total	138	212			

Tableau 1: classification fonctionnelle des protéines de ménage exprimées dans les glandes salivaires d'*Ae. albopictus* (Arca *et al.*, 2007).

Les protéines des glandes salivaires potentiellement sécrétées, peuvent se révéler d'une importance capitale dans l'étude de l'interaction du moustique *Ae. albopictus* avec son environnement notamment i) pour la prise du repas sanguin sur le vertébré et ii) avec le monde végétal lors de la recherche du repas sucré. Ces protéines sécrétées peuvent être classées en deux groupes selon leur fonction connue ou présumée:

- **Les protéines de la famille D7** retrouvées dans les sialotranscriptomes de tous les moustiques mais aussi chez les phlébotomes et les Culicoides. Ces protéines sont connues pour se lier aux amines biogéniques, la sérotonine, l'histamine et à la norpinephrine. Chez *Ae. albopictus*, il est retrouvé deux formes longues et quatre formes courtes de la D7. Les protéines de la D7 sont exprimées exclusivement dans les glandes salivaires des femelles *Ae. albopictus* et ont un rôle très important dans le contrôle de l'hémostase du vertébré (Partie 4-1 Inhibition de la réaction hémostatique de l'homme).
- **Les serpinines (serine protease inhibitor)** : trois membres de cette famille de protéines sont retrouvés dans la salive d'*Ae. albopictus*. Tout comme les D7, les serpinines sont uniquement exprimées dans les glandes salivaires de femelles suggérant ainsi leur implication dans le repas sanguin. En effet, ces protéines sont connues pour leur activité anti-coagulante.
- **Les mucines** : chez *Ae. albopictus*, quatre protéines ont été identifiées dans cette famille. Ces protéines interviennent dans la lubrification des pièces buccales et sont aussi bien exprimées dans les glandes salivaires femelles que mâles.
- **Des enzymes** telles que l'apyrase, l'adénosine déaminase et la purine nucléosidase sont aussi retrouvées dans les glandes salivaires d'*Ae. albopictus*. Ces enzymes interviennent dans la prise du repas sanguin en dégradant les médiateurs de l'hémostase et de l'inflammation. Ces enzymes ne sont pas exclusives des glandes salivaires des femelles.
- **Les protéines anti-microbiennes** sont aussi retrouvées dans les glandes salivaires des femelles et adultes d'*Ae. albopictus*. Ces protéines empêcheraient le développement des microbes ingérés au cours du repas sanguin ou sucré.

Parmi les protéines sécrétées mais dont la fonction reste à ce jour inconnue, nous pouvons citer les protéines spécifiques aux culicines telles celles de la famille de la 62 kDa, 41,9 kDa, 34 kDa, 27 kD. Le tableau 2 présente ces protéines probablement sécrétées et leur abondance en termes de séquences.

Tableau 2. Classification des transcrits codant des protéines salivaires sécrétées d'*Ae. albopictus* (Arca *et al.*, 2007).

<i>Types of transcripts</i>	<i>Clusters</i>	<i>Sequences</i>	<i>% Sequences</i>
D7	24	105	16.8
30-kDa allergen	8	61	9.7
Maltase, glucosidase	10	57	9.1
56-kDa mosquito family	7	47	7.5
8.3-kDa secreted protein	1	44	7.0
poly His peptide	1	33	5.3
Antigen 5	4	26	4.2
Mucins	5	24	3.8
Apyrase	6	21	3.4
34-kDa mosquito family	3	17	2.7
C-type lectin	3	13	2.1
Serpins	9	13	2.1
Angiopoietins	6	11	1.8
Peptide 4.2k-1	1	11	1.8
58 kDa Aedes family	6	10	1.6
Serine proteases	6	19	3.0
Purine nucleosidase	2	8	1.3
Adenosine deaminase	1	4	0.6
Others	47	102	16.3
Total	150	626	

Objectifs

Objectif général

Précédemment, il a été démontré que l'étude de la réponse humorale des vertébrés contre les protéines salivaires des arthropodes représenterait un indicateur pertinent pour évaluer l'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs. Cet indicateur a aussi été utilisé pour évaluer l'efficacité des moyens de lutte qui sont mis en œuvre contre les Phlébotomes (Clements *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2011) et les *Anopheles* (Drame *et al.*, 2010a; Drame *et al.*, 2010b). L'application d'un tel outil à la lutte contre les arboviroses pourrait être une approche essentielle pour limiter l'émergence de maladies comme la dengue et le chikungunya. Le contrôle des populations de vecteurs demeure l'unique moyen de prévention contre ces maladies. Nous avons montré l'importance de l'évaluation du contact homme-*Ae. albopictus* dans l'estimation du risque de transmission de ces maladies et de la nécessité d'améliorer les méthodes d'évaluation actuelles. L'étude de la réponse Ac de l'homme dirigée contre les protéines salivaires du vecteur présente, de plus, les avantages 1) d'être une méthode directe d'évaluation de l'exposition, 2) de potentiellement aboutir à un bio-marqueur individuel d'exposition et 3) d'être d'une grande sensibilité pour mesurer la très faible exposition aux piqûres.

Ainsi, l'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer si la réponse Ac IgG spécifique aux protéines salivaires d'*Ae. albopictus* peut être utilisée comme bio-marqueur d'exposition aux piqûres de ce vecteur. Ce travail combine l'approche immuno-épidémiologique et l'utilisation de l'outil protéomique pour l'identification des candidats bio-marqueurs potentiels.

Objectifs spécifiques

Pour atteindre cet objectif général, notre travail cible des objectifs spécifiques :

1) *Validation du concept « réponse Ac anti salive totale » comme bio-marqueur d'exposition aux piqûres des Aedes.*

Cette validation de la réponse IgG anti-salive d'*Aedes* a pris en compte deux paramètres essentiels : i) la mesure des données d'exposition aux *Aedes* par les méthodes entomologiques

classiques et ii) l'hétérogénéité d'âge de la population d'étude. Cette validation s'est appuyée sur une étude (EpiDengue) réalisée dans la ville de Santa Cruz en Bolivie où *Ae. aegypti* est l'unique espèce d'*Aedes* anthropophile. Les épidémies de dengue sont assez fréquentes dans cette zone.

2) Evaluation de la spécificité d'espèce de la réponse IgG anti-salive d'Aedes

En plus de la population Bolivienne, nous avons inclus dans nos travaux des individus de La Réunion (étude ExpAedes) exclusivement exposés à *Ae. albopictus* chez qui nous avons mesuré la réponse IgG dirigée contre les protéines salivaires de ce vecteur. L'évaluation des réactions croisées par des ELISA hétérologues au sein de ces deux populations a permis de mieux cerner la spécificité de la réponse IgG anti-salive d'*Aedes*.

3) Identification de protéines salivaires immunogéniques comme candidats bio-marqueur d'exposition spécifique.

En nous basant sur les deux populations précédemment citées, nous avons utilisé une approche immuno-protéomique en vue d'identifier les protéines immunogéniques de la salive d'*Ae. albopictus*. Cette étude a été couplée à une identification au spectromètre de masse afin d'évaluer la spécificité des protéines antigéniques d'*Ae. albopictus*.

4) Application à l'évaluation de la lutte anti-vecteur contre Ae. albopictus

Grâce à une étude (Lavalbo) menée à La Réunion, nous avons évalué la capacité de ce potentiel bio-marqueur à mesurer l'efficacité de la lutte anti *Ae. albopictus* basée sur la réduction des stades adultes et une élimination des gîtes larvaires de ce moustique.

RÉSULTATS

Présentation des travaux :

Afin de développer un biomarqueur, une étape intermédiaire est d'identifier et de valider une protéine salivaire pour l'élaboration d'un indicateur immunologique spécifique de l'exposition d'*Ae. albopictus*. Bien évidemment, les candidats protéines ou peptides doivent être spécifiques à *Ae. albopictus* afin d'éviter toute réaction croisée avec les autres *Aedes* ou *Culicidae*. Ces candidats bio-marqueurs doivent être facilement productibles afin de faciliter leur utilisation et garantir la reproductibilité des tests en ELISA. Il est aussi nécessaire que ce potentiel bio-marqueur reflète l'intensité d'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus*.

La première étape de cette approche est de valider le concept, à savoir que la réponse Ac spécifiques aux protéines salivaires d'*Aedes* pourrait être associée au niveau d'exposition des individus aux piqûres du vecteur. Pour cela, nous avons tout d'abord évalué la réponse IgG contre les protéines de la salive totale d'*Aedes*. Cette évaluation a pris en compte l'hétérogénéité de l'âge de la population d'étude et des paramètres d'exposition aux piqûres des *Aedes*. Ceci a été réalisé pour l'exposition au vecteur *Ae. aegypti* dans le cadre d'une vaste étude EPIDENGUE (financement ANR) qui permettait la mise à disposition de nombreuses données épidémiologiques et entomologiques en Bolivie. Par la suite, il nous a fallu démontrer l'existence d'une réponse Ac spécifique à la salive d'*Ae. albopictus* chez des individus exposés uniquement à cette espèce d'*Aedes* à La Réunion et vérifier la spécificité de cette réponse IgG en considérant deux groupes de population exclusivement exposés à *Ae. albopictus* ou à *Ae. aegypti*. Nous avons également pris soin d'évaluer cette réponse IgG chez une population non exposée (Lille, projet Bilhvax). Dans la troisième partie de notre travail, nous avons combiné l'approche immuno-protéomique à la bio-informatique afin d'identifier une protéine ou peptide salivaire pouvant servir de bio-marqueur d'exposition spécifique à la piqûre d'*Ae. albopictus* à La Réunion. La quatrième partie de notre travail portait sur une application potentielle d'un tel biomarqueur alors identifié, à savoir l'utilisation de la réponse IgG anti-protéines salivaires comme critère d'efficacité de la lutte anti-vectorielle contre *Ae. albopictus* à La Réunion (projet LavAlbo, financement DGS).

1- Etude de la réponse IgG spécifiques aux protéines salivaires : indicateur d'exposition aux piqûres des *Aedes* ?

Présentation de l'étude

Le projet EpiDengue est une étude multidisciplinaire visant à modéliser les risques d'émergence et de transmission de la dengue. Il s'appuie sur la confrontation des résultats issus de deux zones géographiques : la Bolivie qui connaît des manifestations épidémiques et le Cameroun où la dengue est en risque d'émergence. Ce projet a duré 3 ans (janvier 2005 à décembre 2008) et l'un de ses objectifs était d'identifier les facteurs déterminant la transmission des virus Dengue en s'appuyant sur des enquêtes sérologiques et épidémiologiques. Nos travaux de thèse n'ont concerné que la partie Bolivienne de l'étude EpiDengue. Du fait de son contexte particulier, le terrain Bolivien nous a donné l'occasion de valider notre concept de l'utilisation de la réponse Ac anti salive totale comme indicateur d'exposition aux *Aedes*. En effet, *Ae. aegypti* est l'unique vecteur de la dengue en Bolivie où cette maladie sévit de façon épidémique, particulièrement en zone urbaine. Afin de mieux évaluer le risque épidémique de la dengue, au cours de l'étude EpiDengue il a été nécessaire de mesurer correctement l'exposition aux piqûres d'*Ae. aegypti* en relevant notamment les indices larvaires. Dans la mesure où il a été montré que la réponse Ac anti-salive pouvait représenter un indicateur d'exposition dans d'autres modèles, nous avons évalué si cet indicateur pourrait servir à mesurer l'exposition à *Ae. aegypti* en tenant en compte de l'âge des sujets de l'étude et de leur degré d'exposition aux piqûres d'*Ae. aegypti*. Cette étude nous permettait donc d'évaluer les réponses IgG spécifiques en fonction des données entomologiques, utilisées comme critères de références pour mesurer l'exposition potentielle des populations aux piqûres d'*Ae. aegypti*. La population d'étude a été divisée en six groupes d'âge : < 14, [15-25[, [25-35[, [35-45[, [45-55[et ≥ 55 ans. Le niveau d'exposition a été défini selon deux paramètres entomologiques :

- i) Le risque d'exposition immédiate aux *Ae. aegypti* adultes. Ce paramètre d'Exposition 1 a été évalué en fonction du nombre de larve L3 + L4 + Pupae (P) dans les sites prospectés.
- ii) La présence de gîtes positifs permanents à *Ae. aegypti*. Le paramètre d'Exposition 2 a été défini en fonction du nombre de site de reproduction à longue durée contenant tout type de stades préimaginaux (L1 ou L2 et L4 ou P).

Chaque paramètre d'exposition a été subdivisé en cinq groupes d'intensité croissante, définis arbitrairement selon les données observées.

Article 1

Human Antibody Response to *Aedes aegypti* Saliva in a Bolivian Urban Population: Towards a New Biomarker of Exposure to Dengue Vector Bites.

Authors:

Souleymane Doucoure *♦, François Mouchet *, Amandine Cournil, Gilbert Le Goff, Sylvie Cornélie, Yelin Roca, Mabel Guerra Giraldez., Zaira Barja Simon, Roxanna Loayza, Dorothée Misse, Jorge Vargas Flores, Annie Walter, Christophe Rogier, Jean Pierre Herve and Franck Remoue

Author affiliations : *Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Maladie Infectieuse et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), UMI-CNRS 5290-IRD, Centre IRD de Montpellier, CP 34394, Montpellier, France; Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMI 233, IRD/UMI, Centre IRD de Montpellier, CP 34394, Montpellier, France; Centro Nacional de Enfermedades Tropicales (CENETROP), CP 2974, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia; URBEP, IMTSSA, Le Pharo, Marseille, France*

* These authors contributed equally to this work.

♦ Corresponding author ; Souleymane Doucoure

Authors addresses: François Mouchet, Souleymane Doucoure, Gilbert Le Goff, Sylvie Cornélie, Mabel Guerra Giraldez., Dorothée Misse, Annie Walter, Jean Pierre Herve and Franck Remoue, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Maladie Infectieuse et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), UMI-CNRS 5290-IRD, Centre IRD de Montpellier, CP 34394, Montpellier, France,

E-mails : francois.mouchet@ird.fr, souleymane.doucoure@ird.fr, gilbert.legoff@ird.fr, sylvie.cornelie@ird.fr, mabel.guerra@ird.fr, dorothee.misse@ird.fr, annie.walter@ird.fr, hervejp_ird@yahoo.fr, franck.remoue@ird.fr. Amandine Cournil, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMI 233, IRD/UMI, Centre IRD de Montpellier, CP 34394, E-mail : amandine.cournil@ird.fr. Yelin Roca, Zaira Barja Simon, Roxanna Loayza and Jorge Vargas Flores, Centro Nacional de Enfermedades Tropicales (CENETROP), CP 2974, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, E-mails: yelin_roca@yahoo.com.mx, zairabarjasimon@hotmail.com, roxloayza@hispavista.com, drjvargasf@hotmail.com. Christophe Rogier, URBEP, IMTSSA, Le Pharo, Marseille, France, E-mail : christophe.rogier@gmail.com

Abstract

Aedes mosquitoes are important vectors of (re)-emerging diseases in developing countries and rising exposure to *Aedes* in the developed world is currently a source of concern. Given the limitations of current entomological methods, there is a need for a new effective way for evaluating *Aedes* exposure. Our objective was to evaluate specific antibody responses to *Aedes aegypti* saliva as a biomarker for vector exposure in a dengue-endemic urban area. Anti-saliva IgG responses were strong in young children and steadily waned with age. Specific IgG levels were significantly higher in individuals living in sites with higher *Ae. aegypti* density, as measured using entomological parameters. Logistic regression showed a significant correlation between anti saliva IgG and exposure level, independently of either age or gender. These results suggest that anti-saliva Ab responses could be used to monitor human exposure to *Aedes* bites and the risk of arbovirus infection.

Background

Aedes mosquitoes are major vectors of (re)-emerging diseases including arbovirus infections (dengue, chikungunya, yellow fever). In Asia, Africa and South America, arthropod-borne diseases are major health problems while some are viewed as re-emerging diseases. In addition, several diseases threaten to emerge in the developed world as a result of increasing exchanges with developing countries. Chikungunya broke out in 2005-2006 in Reunion Island (Renault *et al.*, 2007; Paupy *et al.*, 2009) and in 2007 in Italy (Rezza *et al.*, 2007). Dengue—dengue fever (DF) and more severe forms of the disease—are also a major, re-emerging, infectious disease, and may well represent a risk in developed countries. The World Health Organization estimates that 50 million dengue infections occur every year worldwide. In South America, Dengue infection is epidemic especially in Bolivian urban areas where *Ae. aegypti* is the only known vector (Roca *et al.*, 2009).

This has prompted the development of surveillance systems, including networks to monitor *Aedes* populations in order to identify the risks of transmission of dengue and other arboviruses (Mackenzie *et al.*, 2004; Ligon, 2006). Epidemiological tools for evaluating exposure to *Aedes* bites are thus urgently needed in both developing and developed countries. The epidemiological evaluation of *Aedes*-borne diseases is currently based on pathogen detection in human populations and on entomological methods which indicate risks of transmission (Mackenzie *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2006). Pathogen detection is based on the presence of anti-DENV IgM antibody (Ab) but this is only relevant in an epidemic situation and cannot be used to estimate the risk of DENV transmission. The level of exposure of human populations to *Aedes* bites is mainly evaluated by identification of breeding sites, the capture of mosquitoes in traps, aspirators, indoor spraying and human landing catches. Some studies indicated that pupal monitoring could be useful for the epidemiological surveillance of *Ae. aegypti* exposure (Focks & Chadee, 1997; Barbazan *et al.*, 2008). The indices of Breteau, Adult Productivity, House and Adult density are the best current indicators for evaluating the abundance of adult *Aedes* (Tun-Lin *et al.*, 1996). However, these entomological methods have major limitations. Breeding site counting is long and difficult and measurements are only really accurate for dense populations. The current methods are mainly applicable at the population level and cannot evaluate the heterogeneity of individual exposure to *Aedes* bites. In addition to their significant limitations when it comes to large-scale measurements in the field, there are ethical concerns, especially for human landing catches. These limitations are

all the more important in the context of urban DENV exposure. Much effort is being devoted to developing new, simple, rapid and sensitive complementary indicators to evaluate exposure to *Aedes* bites and estimate the potential risk of arbovirus transmission in exposed populations.

Exposure to arthropod vector bites can be assessed by monitoring human-vector contact. It has been previously demonstrated that human antibody (Ab) response to arthropod salivary proteins could correlate with exposure (Remoue, 2005; Billingsley *et al.*, 2006). At the time of biting, the female mosquito injects saliva containing bioactive molecules, including vasodilators and anticoagulants which promote blood feeding (Ribeiro, 1995; Ribeiro & Francischetti, 2003). Human Ab responses to the saliva of *Triatoma*, the vectors of Chagas disease (Nascimento *et al.*, 2001), *Ixodes* ticks vectors of *Borrelia burgdorferi* (Schwartz *et al.*, 1990), have been shown to be reliable immunological markers for vector exposure and our team has shown that Ab responses to *Glossina* saliva could be a useful indicator of exposure with high diagnostic value (sensitivity=80% and specificity=100%) (Poinsignon *et al.*, 2008b). Anti-saliva Ab responses can give also a measure of exposure to mosquitoes like *Culex* (Das *et al.*, 1991; Trevejo & Reeves, 2005). Recently, it has been demonstrated that the IgG response to whole saliva from *An. gambiae* is a reliable biomarker for exposure and the risk of developing malaria (Remoue *et al.*, 2006). This association has been also observed for *An. dirus* (Waitayakul *et al.*, 2006) and *An. darlingi* (Andrade *et al.*, 2009).

Most studies of Ab response to *Aedes* saliva have focussed on allergic reactions with a view to identifying the allergenic salivary proteins (Peng & Simons, 2004) and developing new diagnostic tests for *Aedes*-dependent allergy in the developed world (Finland, Canada). These pioneer studies demonstrated that the quantitative evaluation of anti-saliva Ab responses (ELISA) could be a useful biomarker for human exposure to *Aedes* bites (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2002) with IgG4 Ab to *Aedes aegypti* saliva being associated with intense exposure to *Aedes* bites (Reunala *et al.*, 1994).

Recently, IgM and IgG responses to *Ae. aegypti* saliva were also considered to be a surrogate biomarker for exposure in travellers suggesting that Ab testing could be relevant to short-term exposure (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007). Finally, our team established that IgG responses to *Aedes* saliva could reflect the exposure of human populations in the developing world (Remoue *et al.*, 2007): IgE and IgG4 responses to *Ae. aegypti* saliva were detected in young Senegalese children living in an arbovirus-endemic area (dengue, yellow fever, chikungunya). The intensity of the responses rose during the rainy season and varied from village to village.

However, no entomological data were available in this study and no association could be made with anti-saliva Ab responses.

The objective of the present study was to evaluate the specific IgG response to whole *Ae. aegypti* saliva in individuals living in an urban setting in Bolivia where this species is the only vector of dengue and epidemics break out every year (Roca *et al.*, 2009). Immunological results were analysed according to: i) age (children and adults) and ii) current and reference entomological data which estimate exposure levels to adult *Aedes*.

Methods

Study population

The present study was conducted in an urban area in the city of Santa Cruz de la Sierra, Bolivia and was part of a large multidisciplinary study. *Ae. aegypti* is found in this area and several outbreaks of Dengue epidemic had occurred in previous years. These outbreaks were due to Dengue virus serotype 3 (DENV-3) in 2003-2004 and DENV-1 in 2008 (Roca *et al.*, 2009). During the period of the present study, a large dengue epidemic (DENV-2 and -3) occurred in 2007 in Santa Cruz city. Households were selected by cluster survey. From maps and the last population census (2001), 100 city blocks (= cluster) were chosen using a selection probability proportional to population. In each cluster, a household was randomly chosen as a starting point using an azimuth. Households were then sampled until 10 blood samples were obtained from residents. All the residents from each selected house were invited to participate. When 10 serum samples were not directly obtained in the first house, the residents of the house on the left were also solicited. If a household refused to participate in the survey, the house on the left was solicited. Standardized questionnaires were given to the head of each household and an individual questionnaire was given to each resident who gave a blood sample. Sera were collected in April-May 2007 from 1049 individuals aged from 3 to 94 years of age, as described in Table 1.

The study adhered to the ethical principles stipulated in the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration, and was approved by the Bolivian Committee of Bioethics (September 2006). Informed consent was obtained from all adult participants and from the parents or legal guardians of minor subjects.

Entomological assessment

Each household selected for the epidemiological study was visited at the same time by two entomological teams. Entomological measurements were made every day for 5 weeks (23 April to 30 May 2007), morning (08-12) and afternoon (14-18). A total of 896 “Prospection Units” (that is to say households) were visited. In each “Prospection Unit”, all sites containing *Ae. aegypti* larvae and pupae were identified and characterized. All aquatic stages (L1 to L4 larvae stage and pupae) were collected and counted.

According to the count of larvae (L) and pupae (P), two entomological parameters (“Exposure 1” and “Exposure 2”) were defined to assess the level of exposure to *Ae. aegypti*. These entomological parameters were defined according to previous studies (Tun-Lin *et al.*, 1996; Focks & Chadee, 1997; Barbazan *et al.*, 2008; Barrera, 2009). Briefly, the ‘Exposure 1’

parameter gives a measure of the risk of “immediate exposure to adult *Ae. aegypti*”. It is defined as the number of L3 + L4 larvae + pupae (P) counted in the “Prospection Units” of a given cluster divided by the number of inhabitants in the cluster. This parameter, based on older immature stages, was used as a proxy of the adult mosquito density in the next few days. The ‘Exposure 2’ parameter represents the number of “long lasting breeding sites”. It corresponded to the number of breeding sites containing both L1 or L2 and L4 or P counted in a given cluster divided by the number of inhabitants in the cluster.

Collection of *Aedes* salivary extracts

Salivary Gland Extracts (SGE) were obtained from 10-day-old uninfected females *Ae. aegypti*, bred in an insectary (IRD, Montpellier, France). Briefly, mosquitoes were sedated with CO₂ and the salivary glands were dissected and transferred into tube containing 20 µl of Hepes-NaCl buffer. Dissected glands were then pooled and frozen at -80°C, before extraction. Soluble proteins were then extracted by centrifugation 30 min at 20 000 g at +4°C and the supernatant was collected. The protein concentration was assayed using the Bradford method (Pierce, Rockford, IL, USA) after pooling and mixing of the various gland batches to generate the SGE for immunological testing. Its concentration was 870 µg/ml salivary proteins. This SGE was then stored frozen at -80°C before use.

Evaluation of human IgG Ab levels

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out using SGE from uninfected *Ae. aegypti* and sera were tested for IgG antibodies. SGE (1 µg/ml in carbonate/bicarbonate buffer – 100 µl) was coated on 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) for 150 min at 37°C. Plates were blocked using 200 µl of Blocking-Buffer (Biorad, Marnes-la -Coquette, France) for 1h at room temperature. Individual sera were incubated at 4°C overnight at a 1/100 dilution in PBS-Tween 1%. Optimal ELISA conditions had been determined in preliminary experiments. Mouse biotinylated mAbs to human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA) were incubated at a 1/1000 dilution (90 min at 37°C). Peroxidase-conjugated streptavidin (Amersham, Les Ulis, France) were then added (1/1000; 60 min at 37°C). Colorimetric development was carried out using ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium; Sigma, St Louis, MO, USA) in 50 mM citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H₂O₂, and absorbance (OD) was measured at 405 nm. Identical ELISAs were performed, in parallel, on a negative pool of sera from Europeans (n=30) with no known

exposure to *Ae. aegypti* mosquito bites and positive control sera were used to validate each ELISA plate. Each sera sample was assessed in duplicate wells and, in a blank well containing no antigen (OD_n) to control for non-specific reactions between the serum and the reagents. Individual results were expressed as ΔOD value calculated according to the formula $\Delta OD = OD_x - OD_n$, where OD_x represents the mean of individual OD in both antigen wells. The reproducibility of OD-positive values from responders in the children studied was verified later in a random plate. An individual was considered as an “immune responder” if his/her ΔOD was higher than the mean $\Delta OD + (3 \times SD)$ for unexposed individual (negative control). The threshold of positivity was $\Delta OD = 0.290$ for IgG specific to *Ae. aegypti* SGE.

Statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism software[®] (San Diego, CA, USA) and SAS statistical package software version 8.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The distribution of ΔOD was not normally distributed. Thus, non-parametric tests (Wilcoxon and Kruskal-Wallis) were used to compare ΔOD between genders, groups of age and groups of exposure. Both exposure parameters were categorized in five groups: the first three groups corresponded to the first three quartiles of the distribution; the last quartile was cut in half in order to assess for the effect of different levels of high exposure. Six age groups were defined: < 14, [15-25[, [25-35[, [35-45[, [45-55[and ≥ 55 years. Mixed logistic regressions (NLMIXED procedure) were used for modeling the probability of being an “immune responder” according to exposure groups, with adjustment for age and gender. The cluster unit was added in the model as a random effect to account for cluster sampling. After Box-Cox transformation of ΔOD , mixed linear regressions (MIXED procedure) were used to model the level of Ab response according to exposure with adjustment for age and gender. Similarly to logistic regressions, cluster unit was added as random effect

Results

Ab response and age

The prevalence of immune responders decreased with age (Table 1): 84.4 % of children (<14 years old) were responders whereas only 40 -50% of adults (>25 years old) were carrying specific IgG Ab. The level of anti-saliva IgG Ab was similarly age-dependent (Figure 1) ($P<0.0001$). Despite considerable inter-individual variation within the same age group, the highest median specific IgG level was observed in children (< 14 years old) and IgG responsiveness decreased progressively with age. After 25 years of age, Ab responses were similar.

Logistic regression analysis indicated that these differences between children and adults still pertained after adjustment for exposure to *Aedes* (Table 2): the percentages of responders were significantly higher ($P<0.0001$) in the <14 and the 15-24 groups than in the >55 group. It was still significant when both entomological parameters had been taken into account (Exposure 1 and 2). These statistical results indicated that the age-related waning of responsiveness was not dependent on the level of *Aedes* exposure. Additional analysis indicated that the age-dependent difference in specific Ab was also not dependent on a cluster effect (data not shown). A similar age effect was also observed when the specific Ab level used as a variable (a continuous variable) was taken into account ($P<0.0001$ for both Exposure 1 and 2).

Ab response and exposure to Ae. aegypti

The strength of the IgG response was evaluated according to the intensity of exposure to *Ae. aegypti* vector as defined by two complementary entomological parameters (Fig. 2, Table 1). The Exposure 1 parameter represents a global picture of the risk to “immediate exposure to *Ae. aegypti* adult” and the Exposure 2 parameter represents a picture of the “long-lasting breeding site”. “Exposure 1” is evaluated by the number of L3 + L4 larvae (L) + Pupa (P) per individual resident of the studied household and the “Exposure 2” was calculated by the number of breeding site containing L1 or L2 + L4 larvae or Pupa per resident. The percentage of immune responders (Table 1) and the strength of the anti-saliva IgG response (Fig. 2) were evaluated according to the level of exposure categorized in five arbitrary groups (1 to 5 – Table 1). For the whole population, 59 % of individuals were immune responders. According to entomological exposure, no variation in percentage was observed between the first 4 exposure groups, whichever exposure parameter was used (Exposure 1 or 2). However, a

higher percentage of immune responders was observed in the highest exposure level group (group 5) than in the other groups (68.6 % and 72.6 % were immune responders in group 5 using Exposure 1 and Exposure 2 parameters respectively). This trend was confirmed by the results on the level of anti-saliva IgG Abs according to exposure to *Ae. aegypti* (Fig. 2). The median value of specific IgG level increased with exposure to *Ae. aegypti*. Anti-saliva IgG levels were significantly different according to exposure level for both the “immediate adult exposure” (Fig. 2A) and “long-lasting breeding site” (Fig. 2B) parameters. The median specific IgG level was higher in group 5 than in the other exposure groups for both entomological parameters (Exposure 1 and 2).

Multivariate analysis of Ab response

To assess the association between the probability of being an immune responder and *Aedes* exposure level, independently of potential confounders, mixed logistic regressions were run for the two exposure parameters (Table 2). Although the probability of being a immune responder increased with exposure (from group 1 to 5), the global effect of exposure was statistically significant only for the “Exposure 2” parameter (“long lasting breeding site”). The risk of being an immune responder increased with an odds-ratio (OR) of 2.6 between the highest exposure group (group 5) and the lowest one (group 1).

In both models, the effect of age and gender were highly significant (Table 2). Individuals <14 years of age had a much higher risk of being immune responders than subjects >55 years (OR: 9.1; 95% CI: 5.4-15.6; $P < 0.0001$ and OR: 9.7; 95% CI: 5.7-16.7; $P < 0.0001$ for Exposure 1 and Exposure 2 parameters, respectively). Finally, the random effect for cluster sampling was weak and insignificant (data not shown).

When using anti-saliva Ab level as continuous variable, similar trends were found, but the global effect of exposure was not statistically significant for either exposure parameter.

Nevertheless, two-by-two comparisons between exposure group 1 *versus* group 5 were significant for both exposure indicators (β (\pm SD): -0.32 (\pm 0.15), $P = 0.03$ and β (\pm SD): -0.40 (\pm 0.15), $P = 0.01$ for Exposure parameters 1 and 2, respectively). Similar results were found for comparisons of group 2 *versus* group 5 (β (\pm SD): -0.33(\pm 0.15), $P = 0.02$ and β (\pm SD): -0.37(\pm 0.15), $P = 0.02$ for Exposure parameters 1 and 2, respectively). In these models, the cluster effect was weak but significant and accounting for about 5% of the residual variance.

Taken together, these results indicated that the anti-saliva IgG response increased with the level of *Aedes* exposure and was higher in group 5 (higher exposure) than in the other

entomological groups. This association was not dependent on age and gender and appeared particularly strong when the “long lasting breeding site” method (Exposure 2 parameter) was used to determine the potential exposure level.

A large dengue epidemic (DENV-2 and -3) occurred in 2007 in Santa Cruz city. In April-May 2007, the prevalence of positive anti-dengue IgM and IgG was 11.2 % and 52.7 %, respectively. The association between anti-saliva Ab response and the seropositivity of individuals against DENV has been evaluated by comparing anti-saliva IgG levels with the percentage of responders, either for IgM (recent infection) or IgG (previous infection). No significant difference was observed (data not shown).

Discussion

This study presents the results of a first large-scale epidemiological study of anti-saliva Ab responses combined with solid entomological data on *Ae. aegypti* exposure. The results showed that IgG responses to *Ae. aegypti* saliva were detected in many individuals living in a Bolivian urban area where *Ae. aegypti* is found. Despite disparate OD values, the anti-saliva IgG response appeared clearly age-dependent with a maximum of responders in the youngest age group. Responsiveness then decreased with age, stabilizing after 35 years of age. This study demonstrated a positive association between the anti-saliva IgG response and the level of exposure to *Ae. aegypti* measured by the two entomological parameters (“immediate exposure to *Ae. aegypti* adult” and “long-lasting breeding site”). Logistic regression confirmed that these associations were not dependent on age or gender. Age did not appear as a confounding factor for the association between IgG response to saliva and the level of human exposure to the mosquito vector.

The influence of age on the development of the anti-saliva Ab response has been previously described. IgE and IgG4 against *Aedes* saliva were higher in the youngest children exposed to *Ae. aegypti* (Remoue et al., 2007). The same results have been obtained for children exposed to *Anopheles gambiae* bites (Remoue et al., 2006). However, no previous study has investigated the anti-saliva Ab response in both children and adults and this present study showed that the anti-saliva IgG response was higher in children. The adults and children in our study lived in the same households so their exposure to *Ae. aegypti* could be assumed to be similar and three hypotheses could be proposed to explain these results: 1) the anti-saliva Ab response correlates with the number of bites received, which implies that children are bitten more than adults in this area; 2) children react more strongly to *Aedes* bites than adults;

3) adults could develop a form of desensitization to saliva proteins and become immune tolerant to saliva antigens after long-term exposure.

Concerning the first point, it is generally accepted that *Ae. aegypti* is aggressive during all day with peaks early in the morning and at the start of the evening. At these times, children and adults probably experienced the same exposure to mosquitoes. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that children may be more attractive to *Aedes* than adults. A study which analyzed the blood meal of females *Ae. aegypti* by DNA fingerprinting indicated that young adults are bitten more often than children (De Benedictis *et al.*, 2003). However, another study using the same method showed an association between the biting rate and the age of women (women >15 years-old received more bites) (Michael *et al.*, 2001). The second hypothesis is that a child's immune system would be more sensitive to antigenic stimulation than an adult's. It is known that *Aedes* saliva is highly allergenic and induces a strong, specific Ab response, explaining why children could develop higher anti-saliva Ab responses than adults (Peng & Simons, 2004). The third hypothesis involves the potential natural desensitization which occurs in adults with time (McKiel & West, 1961). A shift to the production of IgG4 and IgE could be driven by chronic antigenic stimulation (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994). This work evaluated only IgG responses to *Ae. aegypti* saliva because previous studies have demonstrated that the IgG response is a useful biomarker for exposure to mosquito bites (Poinsignon *et al.*, 2008b; Poinsignon *et al.*, 2009; Clements *et al.*, 2010). Further investigations are therefore needed to establish whether or not the anti-saliva Ab response is age-dependent.

The major result of this study is that the strength of the IgG response against *Ae. aegypti* saliva is positively associated with exposure to the vector, as confirmed by logistic regression analysis. Based on immature stage counts, two entomological parameters were defined to evaluate exposure: "immediate exposure to *Ae. aegypti* adult" and "long-lasting breeding sites". The population was then classified in five arbitrary classes according to both parameters of exposure. We demonstrated that the percentage of IgG responders differed significantly between exposure groups. This difference was especially pronounced between the highest and the lowest groups. This suggests that the evaluation of anti-saliva IgG responses could distinguish high-level exposure to *Aedes* bites. However, our study did not show a linear progression of anti-saliva Ab response according to exposure. The reference entomological methods measuring exposure in this study failed to distinguish such progression. This lack of discrimination between low and high exposure represents a

limitation but this study clearly showed an increase in IgG responsiveness against *Ae. aegypti* saliva linked to both entomological exposure parameters. Logistic regression analysis suggests that this association is especially significant for the “long-lasting breeding site” parameter. Other factors (human genetic background, concomitant infection, nutritional status...) could probably have an effect but the results of this study suggest that the anti-saliva Ab response could be a useful complementary tool in the evaluation of human exposure to *Aedes*. In this study, no correlation between anti-saliva IgG response and Dengue transmission was observed, probably because the rate of dengue seroconversion (IgM) was very low. Further work should be carried out to address this specific point and define whether anti-saliva Ab responses could be used to assess the risk of dengue transmission.

We cannot exclude the possibility of cross-reactivity with other arthropod salivary proteins. Previous results evaluating the cross-reactivity between different *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* species have identified species-shared and species-specific antigens (Peng *et al.*, 1998). Preliminary data on rabbits experimentally exposed to single species of mosquito have shown minor cross-reactivity between *Ae. aegypti*, *An. gambiae* and *Culex quinquesfasciatus* (F. Mouchet, personal communication). Saliva composition depends on age, feeding and infection (Choumet *et al.*, 2007). A biomarker for exposure therefore needs to be based on purified *Aedes*-specific immunogenic protein, as has been developed for *An. Gambiae* (Poinsignon *et al.*, 2008a; Poinsignon *et al.*, 2009). The transcriptome and the sialome of *Ae. aegypti* are currently being explored to define antigenic candidates for a specific, sensitive and reproducible biomarker of exposure to *Ae. aegypti*. For this purpose, an immuno-proteomic approach is currently under investigation, since the recent sequencing of *Ae. aegypti* salivary glands .

Conclusion

The present study is a first step toward being able to use human IgG responses to *Aedes* salivary proteins as a biomarker of exposure to bites. This could provide a reliable measurement of human-vector contact in epidemic settings where *Ae. Aegypti*-borne disease are emerging or re-emerging. Further studies need to be carried out to design a sensitive biomarker for *Aedes* exposure and the present study indicates that this salivary approach could lead to a useful tool. In addition, such an indicator could be also useful for monitoring the efficacy of vector control strategies.

Competing interests

The authors declared no conflict of interest concerning the work in this paper.

Authors' contributions

FM, FR, SD, SC conceived and designed the study. JPH, AW, CR, JVF, YR, RL designed and realized the epidemiological survey. JPH, GLG, MGG, ZBS designed and performed the entomological survey. AC, FM analyzed the data. FR, FM, SC, SD, DM wrote and revised the article.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the population of Santa Cruz de la Sierra area for their participation in this study and the team of the "EpiDengue" project for their field support. **We** are most **grateful** to MM Roman Callata, Norman Valdez Zamorano, Antonio Arias, Sergio Arteaga, Juan-Carlos Orellana and Santos Rodas for help in entomological collecting. We thank A. Molloy for reviewing the draft of the manuscript and the English language.

Souleymane Doucoure was supported by a fellowship provided by the "Infectiopole Sud" Foundation (Marseille, France). This research was supported by the French Agency of National Research grant (ANR - Epi-Dengue project), IRD, the CGG-Veritas Company and a "CNRS Interdisciplinaire MIE" grant.

References

1. Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V. & Fontenille, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11, 1177-85 (2009).
2. Renault, P. et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg* 77, 727-31 (2007).
3. Rezza, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370, 1840-6 (2007).
4. Roca, Y. et al. Molecular epidemiological analysis of dengue fever in Bolivia from 1998 to 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9, 337-44 (2009).
5. Ligon, B. L. Infectious diseases that pose specific challenges after natural disasters: a review. *Semin Pediatr Infect Dis* 17, 36-45 (2006).
6. Mackenzie, J. S., Gubler, D. J. & Petersen, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10, S98-109 (2004).
7. Reiter, P., Fontenille, D. & Paupy, C. *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Infect Dis* 6, 463-4 (2006).
8. Barbazan, P. et al. Assessment of a new strategy, based on *Aedes aegypti* (L.) pupal productivity, for the surveillance and control of dengue transmission in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 102, 161-71 (2008).
9. Focks, D. A. & Chadee, D. D. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. *Am J Trop Med Hyg* 56, 159-67 (1997).
10. Tun-Lin, W., Kay, B. H., Barnes, A. & Forsyth, S. Critical examination of *Aedes aegypti* indices: correlations with abundance. *Am J Trop Med Hyg* 54, 543-7 (1996).
11. Billingsley, P. F., Baird, J., Mitchell, J. A. & Drakeley, C. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol* 28, 143-53 (2006).
12. Remoue, F. C., S. Ngom, A. Boulager, D. and Simondon, F. Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. In *Update in tropical immunology* Edited by Garraud O. Fort PO. Tivandrum, Herala, India: Transworld research Network 2005:377-400 (2005).
13. Ribeiro, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4, 143-52 (1995).
14. Ribeiro, J. M. & Francischetti, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48, 73-88 (2003).
15. Nascimento, R., Santana, J., Lozzi, S., Araujo, C. & Teixeira, A. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg* 65, 219-26 (2001).
16. Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M. & Goldstein, M. D. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132, 58-66 (1990).
17. Poinsignon, A. et al. Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78, 750-3 (2008).
18. Das, M. K., Mishra, A., Beuria, M. K. & Dash, A. P. Human natural antibodies to *Culex quinquefasciatus*: age-dependent occurrence. *J Am Mosq Control Assoc* 7, 319-21 (1991).
19. Trevejo, R. T. & Reeves, W. C. Antibody response to *Culex tarsalis* salivary gland antigens among sentinel chickens in California. *Am J Trop Med Hyg* 72, 481-7 (2005).
20. Remoue, F. et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 363-70 (2006).
21. Waitayakul, A. et al. Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Trop* 98, 66-73 (2006).
22. Andrade, B. B. et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J* 8, 121 (2009).
23. Peng, Z. & Simons, F. E. Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 133, 198-209 (2004).
24. Brummer-Korvenkontio, H. et al. Detection of mosquito saliva-specific IgE

- antibodies by capture ELISA. *Allergy* 52, 342-5 (1997).
25. Peng, Z., Rasic, N., Liu, Y. & Simons, F. E. Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors. *J Allergy Clin Immunol* 110, 816-7 (2002).
26. Reunala, T. et al. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol* 104, 366-71 (1994).
27. Orlandi-Pradines, E. et al. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect* 9, 1454-62 (2007).
28. Remoue, F. et al. IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop* 104, 108-15 (2007).
29. Barrera, R. Simplified pupal surveys of *Aedes aegypti* (L.) for entomologic surveillance and dengue control. *Am J Trop Med Hyg* 81, 100-7 (2009).
30. De Benedictis, J. et al. Identification of the people from whom engorged *Aedes aegypti* took blood meals in Florida, Puerto Rico, using polymerase chain reaction-based DNA profiling. *Am J Trop Med Hyg* 68, 437-46 (2003).
31. Michael, E. et al. Quantifying mosquito biting patterns on humans by DNA fingerprinting of bloodmeals. *Am J Trop Med Hyg* 65, 722-8 (2001).
32. McKiel, J. A. & West, A. S. Nature and causation of insect bites reactions. *Pediatr Clin North Am* 8, 795-815 (1961).
33. Brummer-Korvenkontio, H. L., P. Reunala, T. Palosuo, T. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *Allergy and Clinical Immunology* 93, 551-5 (1994).
34. Clements, M. et al. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 82, 801-7 (2010).
35. Poinsignon, A. et al. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. *Malar J* 8, 198 (2009).
36. Peng, Z., Li, H. & Simons, F. E. Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. *J Allergy Clin Immunol* 101, 498-505 (1998).
37. Choumet, V. et al. The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 7, 3384-94 (2007).
38. Poinsignon, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One* 3, e2472 (2008).

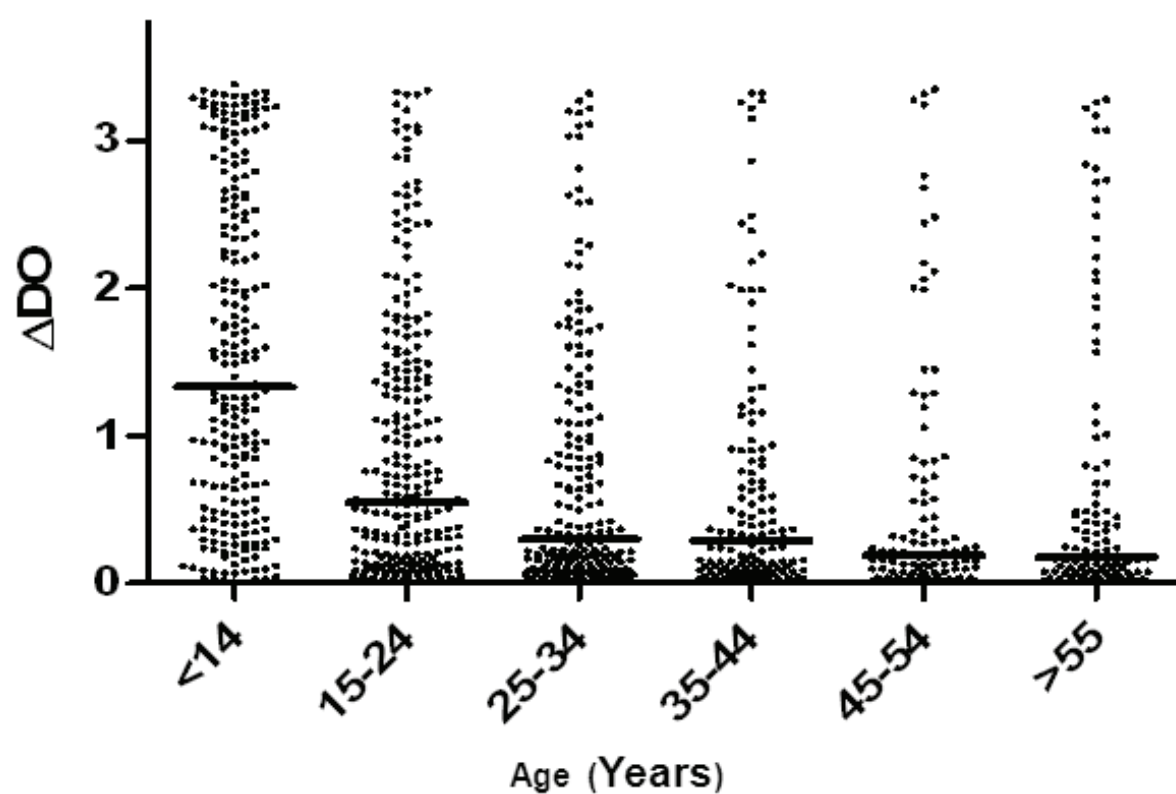


Figure 1. Anti-saliva IgG antibodies level according to age.
Individual ΔOD results are presented according to 6 age groups. Bars indicate the median value for each age group.

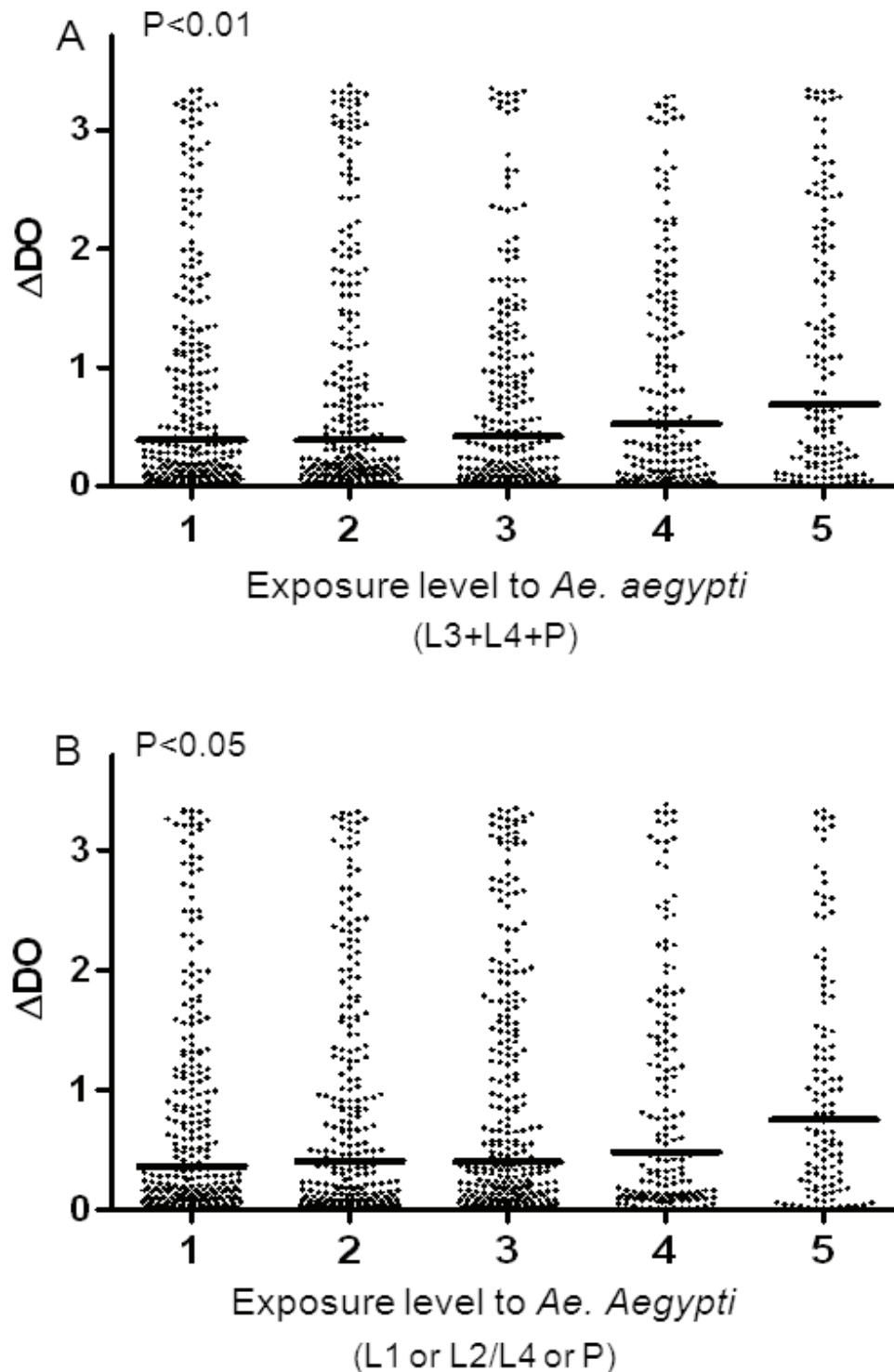


Figure 2. Anti-saliva IgG antibodies levels according to *Aedes aegypti* exposure classes.

The specific IgG levels are presented according to entomological evaluation of exposure to Aedes bites, defined by two complementary parameters: Exposure 1 as "immediate adult exposure" (A) and Exposure 2 as "long lasting breeding site" (B), as described in Materials and Methods. Individual ΔOD results are presented according to 5 groups with growing level of bites exposure. Bars indicate the median value for each exposure group.

Table 1. Characteristics of the studied population according to age and entomological data.

Age group (years)	Male	Female	Total	Responders (%)
< 14	115	110	225	190 (84.4)
15 -24	114	145	259	159 (65.2)
25-34	66	139	205	104 (50.7)
35-44	46	94	140	71 (50.7)
45-54	41	65	106	40 (37.7)
≥ 55	38	76	114	48 (42.1)

Exposure level to *Ae. aegypti*

Exposure 1 : “immediate adult exposure”

(L3+L4+P / number of inhabitants)*

Exposure group (n)	Cluster (n)	Individual (n)	Age (mean - range)	Responders (%)
1 ([0-5])	25	256	30.8 [3-83]	147 (57.4)
2 ([5-9])	24	252	31.1 [4-94]	148 (58.7)
3 ([9-14])	23	235	28.9 [4-87]	138 (58.7)
4 ([14-21])	15	170	28.6 [6-75]	170 (61.8)
5 (≥21)	15	137	29.7 [4-79]	94 (68.1)

Exposure 2 : “long lasting breeding site”

(Breeding sites with L1 or L2 and L4 or P / number of inhabitants)*

1 ([0-0.057])	25	258	29.6 [3-78]	141 (54.6)
2 ([0.057-0.105])	23	252	31.1 [4-87]	143 (56.7)
3 ([0.105-0.138])	27	272	28.8 [4-87]	163 (59.9)
4 ([0.138-0.200])	14	155	30.4 [4-94]	93 (60.0)
5 (≥0.200)	11	113	30.4 [5-79]	82 (72.6)

* As indicated in Materials and Methods

Table 2. Probability of an “immune response” according to exposure to *Aedes* with adjustment for age and gender

Variables	Odd-Ratios	95% CI	P
Exposure 1 : “immediate adult exposure” (L3+L4+P / number of inhabitants)*			
Exposure group			Global : 0.11
Group 2 vs 1	0.9	0.6-1.3	0.62
Group 3 vs 1	1.0	0.7-1.6	0.63
Group 4 vs 1	1.3	0.8-2.0	0.23
Group 5 vs 1	1.6	1.0-2.6	0.04
Age (years)			
			Global : <0.0001
<14 vs ≥55	9.1	5.4-15.6	< 0.0001
15-24 vs ≥55	2.8	1.8-4.5	< 0.0001
25-34 vs ≥55	1.4	0.9-2.3	0.12
35-44 vs ≥55	1.4	0.8-2.3	0.21
45-54 vs ≥55	0.8	0.5-1.5	0.55
Sexe (F vs M)			
	1.8	1.3-2.3	<0.0001

Variables	Odd-Ratios	95% CI	P
Exposure 2 : “long lasting breeding site” (Breeding sites with L1 or L2 and L4 or P / number of inhabitants)*			
Exposure group			Global : 0.009
Group 2 vs 1	1.2	0.8-1.7	0.37
Group 3 vs 1	1.3	0.9-1.8	0.20
Group 4 vs 1	1.3	0.9-2.1	0.19
Group 5 vs 1	2.6	1.5-4.3	0.0003
Age (years)			Global : <0.0001
<14 vs ≥55	9.7	5.7-16.7	< 0.0001
15-24 vs ≥55	3.0	1.9-4.7	< 0.0001
25-34 vs ≥55	1.5	0.9-2.4	0.08
35-44 vs ≥55	1.4	0.9-2.4	0.17
45-54 vs ≥55	0.9	0.5-1.5	0.68
Sexe (F vs M)	1.8	1.3-2.3	< 0.0001

* As indicated in Materials and Methods

Résumé des principaux résultats.

Réponse Ac anti -alive d'*Ae. aegypti* et âge

Les réponses IgG spécifiques sont les plus élevées chez les enfants <14 ans. La prévalence de répondeurs diminue en fonction de l'âge. Chez les enfants de <14 ans, la prévalence de la réponse IgG spécifique est de 84.4% alors que le pourcentage de répondeurs varie entre 40 et 50% chez les adultes. Le même profil est aussi observé en ce qui concerne les intensités de réponse Ac IgG anti-salive qui sont plus élevées chez les enfants de >14 ans. A partir de 25 ans, les intensités de réponse IgG anti-salive sont similaires entre les différents groupes d'âge. Après ajustement avec les différents paramètres entomologiques, l'analyse de régression montre également une différence de réponse IgG entre les enfants et les adultes. Cette analyse indique aussi que la décroissance de la réponse Ac en fonction de l'âge est indépendante du niveau d'exposition à *Ae. aegypti*.

Réponse Ac anti-salive et exposition à *Ae. aegypti*

L'évaluation de la réponse IgG spécifique en fonction des paramètres d'exposition indique que 59% des individus exposés développent une réponse IgG anti-salive d'*Ae. aegypti* et que cette réponse Ac varie selon l'intensité d'exposition. En effet, alors qu'aucune différence n'est observée entre les 4 premiers groupes d'intensité des paramètres d'Exposition 1 et 2, une augmentation du pourcentage de répondeurs et du niveau médian des IgG anti-salive est observée dans le groupe d'intensité d'exposition la plus haute (groupe 5) en comparaison aux autres groupes d'intensité. Ceci est valable quelque soit les 2 paramètres d'exposition entomologique considérés.

Analyse multivariée de la réponse IgG anti-salive

Cette analyse indique que la corrélation significative entre la réponse IgG anti-salive et le niveau d'exposition entomologique n'est ni l'âge, ni le sexe-dépendant.

Conclusion

Cette étude est la première comparant la réponse Ac anti-salive en fonction de l'âge et des données entomologiques mesurant l'exposition au vecteur. Il a été montré que la réponse IgG anti-salive d'*Ae. aegypti* est âge-dépendante, et que la réponse IgG est corrélée positivement au niveau d'exposition quelque soit le paramètre entomologique utilisé. Les niveaux très élevés de réponse IgG et l'important pourcentage de répondeurs observés chez les enfants, en comparaison aux adultes, laissent présager que les enfants soit son plus exposés aux piqûres d'*Ae. aegypti*, soit développent une réponse Ac spécifique plus importante après piqûres. Cette dernière hypothèse semble la plus plausible. Quoiqu'il en soit, cette étude met en avant

la potentialité d'utiliser la réponse Ac IgG spécifiques aux protéines salivaires pour évaluer l'exposition de l'homme aux piqûres des *Aedes*. Cependant, ces résultats soulignent la nécessité d'améliorer cet outil en procédant à des dosages d'autres isotypes mais surtout d'en améliorer la spécificité afin d'amoindrir les éventuelles réactions croisées.

2- Réponse IgG spécifique à la salive d'*Ae. albopictus* et spécificité de la réponse anticorps

Présentation de l'étude.

Cette seconde étude utilise le projet ExpAedes qui a eu pour cadre la zone Sud Ouest de l'Océan Indien (La Réunion et La Grande Comore). Ce projet a été financé par le CRVOI (Centre de Recherche et de Veille sur les maladies Emergentes dans l'Océan Indien) dans le but de renforcer le dispositif de surveillance de l'émergence des maladies au lendemain de l'épidémie de chikungunya qui a sévi dans cette zone entre 2005 et 2006. Le projet ExpAedes a été réalisé en partenariat avec les équipes du Centre d'Investigation Clinique, Epidemiologie Clinique de La Réunion (CIC-EC), du Groupe de Recherche Maladies Infectieuses Inflammatoires (GRII, Université de la Réunion et de la Faculté des Sciences de l'Université des Comores. L'objectif principal de ce projet a été de développer un bio-marqueur pour évaluer l'efficacité du dispositif de lutte anti vectorielle et de mesurer le risque de transmission d'arbovirus dans la sous région de l'Océan Indien.

Au cours de notre première étude, nous avons montré la possibilité de détecter l'exposition aux piqûres des *Aedes* en utilisant la réponse Ac IgG dirigée contre les protéines salivaires d'*Ae. aegypti*. Cependant, l'emploi d'extraits totaux salivaires ne permet pas d'exclure l'existence de réactions croisées lors de la mesure de cette réponse. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que certaines protéines salivaires sont partagées entre espèces ou genres de moustiques. Afin d'optimiser l'utilisation de ce potentiel bio-marqueur, il est nécessaire d'élucider ces phénomènes de réactions croisées qui peuvent porter sur des protéines salivaires d'espèces de vecteurs très proches. Comme second objectif, cette deuxième étude a porté sur deux populations qui ont une exposition particulière aux *Aedes*: la population Bolivienne précédemment décrite, exposée uniquement à *Ae. aegypti* et une population provenant de l'Île de La Réunion où *Ae. albopictus* est l'unique espèce d'*Aedes* anthropophile. Au sein de chaque population, nous avons évalué le niveau de réponse Ac IgG contre les protéines salivaires de l'espèce d'*Aedes* à laquelle elle est exposée mais aussi nous avons effectué des ELISA hétérologues afin de mesurer le degré de réaction croisée entre les protéines salivaires d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti*. En plus, nous avons intégré dans cette étude une population Européenne non exposée ni à *Ae. albopictus* ni à *Ae. aegypti* dans le but de mesurer la spécificité d'un potentiel bio-marqueur. Néanmoins, le premier

objectif de cette étude restait de mettre en évidence, pour la première fois, le niveau d'une réponse Ac IgG spécifique à *Ae. albopictus* chez des individus exposés à *Ae. albopictus*.

Article 2

Evaluation of the Human IgG Antibody Response to *Aedes albopictus* Saliva as a New Specific Biomarker of Exposure to Vector Bites.

Souleymane Doucoure^{1*}, François Mouchet¹, Sylvie Cornélie¹, Jean Sébastien Dehecq², Abdul Hamid Rutee², Yelin Roca³, Annie Walter¹, Jean Pierre Hervé¹, Dorothée Misse¹, François Favier⁴, Philippe Gasque⁵, Franck Remoue¹.

¹Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, UMR 224 CNRS/IRD/UM1, Montpellier, France

²Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales, Saint Denis, La Réunion.

³Centro Nacional de Enfermedades, Santa Cruz, Bolivia.

⁴Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique, Saint Pierre, La Réunion.

⁵Groupe de Recherche Immunopathologie et Maladie Infectieuses, Saint Denis, La Réunion.

* Corresponding author: Souleymane Doucoure.

Phone: + 33 467 416 178

Fax: + 33 467 416 330

e-mail: souleymane.doucoure@ird.fr

Abstract

Background: The spread of *Aedes albopictus*, a vector for re-emergent arbovirus diseases like chikungunya and dengue, points up the need for better control strategies and new tools to evaluate transmission risk. Human antibody (Ab) responses to mosquito salivary proteins could represent a reliable biomarker for evaluating human-vector contact and the efficacy of control programs.

Methodology/Principal findings: We used ELISA tests to evaluate specific immunoglobulin G (IgG) responses to salivary gland extracts (SGE) in adults exposed to *Aedes albopictus* in Reunion Island. The percentage of immune responders (88%) and levels of anti-SGE IgG Abs were high in exposed individuals. At an individual level, our results indicate heterogeneity of the exposure to *Aedes albopictus* bites. In addition, low-level immune cross-reactivity between *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* SGEs was observed, mainly in the highest responders.

Conclusion/Significance: Ab responses to saliva could be used as an immuno-epidemiological tool for evaluating exposure to *Aedes albopictus* bites. Combined with entomological and epidemiological methods, a “salivary” biomarker of exposure to *Aedes albopictus* could enhance surveillance of its spread and the risk of arbovirus transmission, and could be used as a direct tool for the evaluation of *Aedes albopictus* control strategies.

Author Summary:

Aedes-borne viruses like dengue and chikungunya are a major problem in Reunion Island. Assessing exposure to *Aedes* bites is crucial to estimating the risk of pathogen transmission. Currently, the exposure of populations to *Aedes albopictus* bites is mainly evaluated by entomological methods which are indirect and difficult to apply on a large scale. Recent findings suggest that evaluation of human antibody responses against arthropod salivary proteins could be useful in assessing exposure to mosquito bites. The results indicate that 88% of the studied population produce IgG to *Ae. albopictus* saliva antigens in Reunion Island and show that this biomarker can detect different levels of individual exposure. In addition, little cross-reactivity is observed with *Aedes aegypti* saliva, suggesting that this could be a specific marker for exposure to *Aedes albopictus* bites. Taken together, these results suggest that antibody responses to saliva could constitute a powerful immuno-epidemiological tool for evaluating exposure to *Aedes albopictus* and therefore the risk of arbovirus infection.

Introduction

The incidence of arthropod-borne disease is on the rise and mosquito-borne diseases in particular constitute a world-wide threat (Weaver & Reisen, 2010). In Asia, Africa and South America, arbovirus diseases are re-emerging, notably dengue and chikungunya. According to the World Health Organization, there are 50 million cases of dengue fever every year and the number of countries declaring cases is increasing (2009). Chikungunya is an emerging arbovirus (Staples *et al.*, 2009) and several outbreaks have been recorded, such as the 2006 epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean (Paupy *et al.*, 2009). The threat of these diseases in the developed world is real with, in addition to the chikungunya outbreak in Italy in 2007 (Rezza *et al.*, 2007), sporadic autochthonous cases of dengue and chikungunya recently reported in Southern France (Gould *et al.*). Therefore, epidemiological tools for evaluating such risks are urgently needed in both developing and developed countries. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are both vectors of the dengue and chikungunya viruses, and *Ae. albopictus* populations are dramatically expanding worldwide. Epidemiological evaluation of *Aedes*-borne diseases is currently based on pathogen detection in human populations and entomological methods. The exposure of human populations to *Aedes* is currently evaluated by mapping breeding sites and using mosquito-capture strategies. But these methods have substantial limitations when it comes to large-scale studies in the field, e.g. vector density and transmission risk are estimated by counting immature *Aedes* in breeding sites to derive House and Breteau Indices, a process which is too demanding for regular implementation in the field (Focks, 2003), especially in the urban setting. In addition, current methods for evaluating *Aedes* exposure are mainly applicable at the population level and cannot be used to gauge the heterogeneity of individual exposure. In order to improve vector control and follow the risk of arbovirus transmission, much effort is being devoted to developing new, simple, rapid and sensitive indicators to evaluate human exposure to *Aedes* bites and thus the risk of arbovirus transmission in exposed populations. One promising approach is based on the idea that exposure could be directly assessed by measuring human-vector contact as reflected by the human antibody (Ab) response to arthropod salivary proteins (Billingsley *et al.*, 2006). At the time of biting, the female mosquito injects saliva containing biologically active molecules to favour feeding and some of these are highly immunogenic (Ribeiro & Francischetti, 2003). Human Ab responses to the saliva of a number of vectors, including *Triatoma* (Chagas disease) (Nascimento *et al.*, 2001) and *Phlebotomus* (Leishmaniasis) (Rohousova *et al.*, 2005), have been identified as promising biomarkers for

vector exposure. Ab responses to the saliva of *Glossina* (the vector of Human African Trypanosomiasis) have been shown to have high diagnostic value (Poinsignon *et al.*, 2008b). For mosquitoes, Ab responses to whole saliva have been correlated to human exposure to *Culex* mosquitoes (Das *et al.*, 1991), and *Anopheles gambiae* (Remoue *et al.*, 2006), *Anopheles dirus* (Waitayakul *et al.*, 2006) and *Anopheles darling* (Andrade *et al.*, 2009), vectors of *Plasmodium*. Recently, it has been shown that the IgG response to whole *An. gambiae* saliva could be a useful biomarker for evaluating the efficacy of malaria vector control (Drame *et al.*, 2010b). Studies on Ab responses to *Aedes* saliva have tended to focus on human allergic reactions (Peng & Simons, 2004) and the identification of the immunogenic proteins (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2009) although they have shown that quantitative evaluation of anti-saliva Ab responses (IgG and specific isotypes) could give a measure of human exposure to biting *Aedes* (Reunala *et al.*, 1994; Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997). It was recently demonstrated that IgM and IgG responses to *Ae. aegypti* saliva could be used to estimate exposure in transiently exposed populations (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007). Finally, recent data showed that IgE and IgG4 responses to *Ae. aegypti* saliva could be detected in young Senegalese children during the exposure season (Remoue *et al.*, 2007). The present study addresses one important application of this salivary biomarker as a tool to evaluate the specific exposure of individuals to *Ae. albopictus* bites. Human IgG responses to *Ae. albopictus* saliva (salivary gland extracts; SGE) were measured in adults living on Reunion Island. In this area, *Ae. albopictus* represents the only *Aedes* species which is known to bite humans and is the unique vector of chikungunya. *Ae. aegypti*, which is non anthropophilic in Reunion Island is totally absent from the study area (Bagny *et al.*, 2009). To check the specificity of this biomarker for *Ae. albopictus*, cross-reactivity was tested by comparing IgG Ab levels i) to *Ae. aegypti* SGE in individuals from Reunion Island and ii) in sera from Bolivian subjects who had only ever been exposed to *Ae. aegypti* species.

Materials and methods

Ethics statement

All studies followed ethical principles as stipulated in the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration. The studies in La Reunion and the North of France were approved by a French Ethics Committee (the *Sud Ouest ,Outre Mer* Ethics Committee, 25/02/2009) and authorized by the French Drug Agency (AFFSAPS, Ministry of Health; 12/01/2009). The study in Bolivia was approved by the Bolivian Committee of Bioethics (September 2006) and the

Institut de Recherche pour le Développement(IRD) “*Comité Consultatif de Déontologie et d’Ethique*” (July 2006). Written informed consent was obtained from every subject.

Study population

The study populations were from two different areas, namely Reunion Island and Bolivia, for specific exposure to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti*, respectively.

In the south of Reunion Island (Le Tampon), *Ae. albopictus* is abundant and is found up to 1200 meters in winter. Chikungunya transmission was high during the 2006 epidemic (Delatte *et al.*, 2008). Blood samples were collected in May-June 2009 during the seasonal peak of *Ae. albopictus* exposure, from adults of between 18 and 30 years of age (n=110). Subjects exposed only to *Ae. aegypti* were randomly selected from a large study conducted in the city of Santa Cruz de la Sierra, Bolivia (n=104) and pair-matched for age with the Reunion Island subjects. Sera from unexposed individuals (n=18) in a region free of either *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* (North of France) were used as a negative control.

Collection of *Aedes* salivary gland extracts

Salivary Gland Extracts (SGE) were obtained from 10 day-old uninfected females reared in insectaries. *Ae. albopictus* was bred from larvae collected in the field in Reunion Island (Direction Regionale des Affaires Sanitaires et Sociales, Saint Denis, Reunion Island) and the Bora-Bora strain of *Ae. aegypti* was used (IRD, Montpellier, France). Briefly, two days after a blood meal, the mosquitoes were sedated with CO₂ and then their salivary glands were dissected out and transferred into a tube containing 30 µl of phosphate buffered saline (PBS). The dissected glands were then pooled in 30 or 60 pairs per batch and frozen at -80°C before extraction. A simple technique consisting of 3 successive freeze-thaw cycles in liquid nitrogen was used to disrupt the membranes. The soluble SGE fraction was then separated by centrifugation for 20 minutes at 30,000g at +4°C. The concentration of protein was evaluated by the Bradford method (OZ Biosciences) after pooling of the different batches to generate a homogenous SGE for immunological assessment. SGEs were then stored at -80°C before use.

Evaluation of human IgG Ab levels

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out on Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) coated with *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* SGE, (0.8µg/ml PBS) at 37°C for 150 min. Plates were blocked using 250 µl of protein free Blocking-Buffer (Pierce,

Thermo Fisher, France) for 60 minutes at room temperature. Individual sera were incubated in duplicate at a 1/100 dilution in PBS-Tween 1%, 4°C overnight. Monoclonal mouse biotinylated Ab against human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA) was incubated at a 1/1000 dilution for 90 minutes at 37°C. Peroxidase-conjugated streptavidin (GE healthcare, Orsay, France) was added at 1/1000 for 60 minutes at 37°C. Colorimetric development was carried out using ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium, Pierce) in 50 mM citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H₂O₂, and absorbance was measured at 405 nm. Each test sample was assessed in duplicate wells and in a blank well containing no antigen (ODn) to measure non-specific reactions, as previously described (Remoue *et al.*, 2007; Poinsignon *et al.*, 2008a; Drame *et al.*, 2010b). Individual results were expressed as the ΔOD value calculated using the equation $\Delta OD = OD_x - OD_n$, where OD_x represents the mean of the OD readings in the two antigen wells. A subject was considered as an “immune responder” if the ΔOD result was higher than the mean $\Delta OD + (3 \text{ SD})$ for unexposed individuals (negative control). The threshold of positivity was 0.271 for IgG against *Ae. albopictus* and 0.161 for IgG against *Ae. aegypti*.

Statistical analysis

Graph Pad Prism Software (San Diego, CA USA) was used to analyse the data. After confirmation of non-normal distribution, a non-parametric Mann-Whitney test was used to compare Ab levels between two independent groups, and a non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparisons between more than two groups. A Spearman test was used to assess the correlation between IgG levels against *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* SGEs. All differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

IgG response to *Ae. albopictus* to SGE.

IgG responses to *Ae. albopictus* SGE were evaluated in individuals from Reunion Island and North of France (Figure 1). In the unexposed group, one individual IgG response was slightly above the cut-off value ($\Delta OD = 0.297$) (Figure 1). In contrast, a very high percentage of responders (88%) with high levels of anti-SGE IgG Ab were observed in the exposed group from Reunion Island. Although considerable differences in specific Ab level were observed between exposed individuals (ΔOD from 0.034 to 3.308), a significant difference in specific IgG level was observed between the exposed group (median = 1.067) and the unexposed

group (median = 0.015) ($p < 0.0001$, Mann-Whitney test). In addition, 48% of immune responders showed an IgG response above the value of the mean ($\Delta OD = 1.417$)

Evaluation of IgG cross-reactivity with *Ae. aegypti* SGE

Cross-reactivity between *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* SGEs was evaluated by two complementary approaches. First, the specific IgG response to both SGEs (Figure 2) was evaluated in individuals only exposed to *Ae. albopictus* (from Reunion Island); in parallel, IgG responses to both SGEs were assessed in individuals only exposed to *Ae. aegypti* (from Bolivia). In the Bolivian group, 16% showed a positive IgG response against *Ae. albopictus* SGE with only one strong response ($\Delta OD > 1$). The median (0.107) level of IgG against *Ae. albopictus* SGE was significantly lower in the Bolivians than in the Reunion Island group (1.067) ($P < 0.0001$, Mann-Whitney test). The IgG response to *Ae. aegypti* SGE was also evaluated in both groups of subjects. As expected, the Bolivian group (exposed only to *Ae. aegypti*) presented high levels of IgG against *Ae. aegypti* SGE with 76% of immune responders. In contrast, only 19% of the subjects from Reunion Island were responders to *Ae. aegypti* SGE and the median (0.068) IgG level was very low compared with the Bolivian group (0.991) ($p < 0.0001$, Mann Whitney test). Only one individual from Reunion presented very high level of IgG to *Ae. aegypti* SGE ($\Delta OD > 3$). In addition, in 58% of double immune responders from Reunion Island, the level of IgG against *Ae. albopictus* SGE was above the 75% percentile value ($\Delta OD = 2.426$; data not shown). In the Bolivian double immune responders, the corresponding figure for *Ae. aegypti* SGE was 50% (ΔOD value of 75% percentile = 2.341). These results indicate that IgG to *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* SGE are cross reactive, particularly in individuals presenting a very high level of IgG.

Secondly, the level of specific IgG Ab against both SGEs was compared by a statistical correlation analysis (Figure 3). High positive correlation between IgG against *Ae. albopictus* SGE and *Ae. aegypti* SGE was observed for both the Reunion Island group ($r = +0.445$; $P < 0.0001$, Spearman test) and the Bolivian group ($r = +0.617$; $P < 0.0001$, Spearman test). For each population, IgG cross-reactivity was low with few individuals responding to both *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* SGEs. For the Reunion Island group, only 5 individuals showed a strong IgG response to *Ae. aegypti* SGE. These correlations indicate that cross-reactivity between the two *Aedes* species may depend on IgG level. In the Bolivian group, the same trend is observed with only 8 individuals showing a strong IgG response to *Ae. albopictus* SGE.

Discussion

In this study, we investigated IgG responses to *Ae. albopictus* SGE in exposed adults from Reunion Island where *Ae. albopictus*—the only anthropophilic *Aedes* species—transmits chikungunya. First, specific IgG responses were high in the exposed group and significantly different to those observed in an unexposed population from Europe: 88% of exposed individuals developed IgG against *Ae. albopictus* SGE. In addition, specific IgG Ab levels showed considerable inter-individual variations. Since the intensity of exposure in a given population living in the same area can obviously vary between individuals, these results suggest that the anti-SGE IgG response is a reliable biomarker for exposure to *Ae. albopictus* bites. Furthermore, the significant difference in Ab levels between unexposed and exposed individuals shows that this biomarker could distinguish individuals exposed to *Ae. albopictus* bites. A useful biomarker for *Ae. albopictus* bites needs to be highly specific and devoid of immune cross-reactivity with other *Aedes* species. We evaluated the cross-reactivity between two species using complementary approaches, i.e. in individuals only ever exposed to *Ae. aegypti* and by analysing IgG levels against both SGEs. In the Bolivian group only exposed to *Ae. aegypti*, 16% of individuals responded to *Ae. albopictus* SGE (heterologous ELISA). The ΔOD values for these “cross-reactive” individuals are characterised by very low IgG levels whereas a high percentage (88%) and high IgG levels (homologous ELISA) were observed in subjects from Reunion Island. In addition, IgG responses against *Ae. aegypti* SGE are significantly different: 76% of immune responders in Bolivia compared with 19% in Reunion Island. Interestingly, we observed that IgG cross-reactivity was mainly detected in high immune responders. In Reunion Island, in 58% of double immune responders, the level of IgG against *Ae. albopictus* SGE was above the third quartile. In parallel, in Bolivia, the level of IgG against *Ae. aegypti* SGE of 50% of double immune responders was above the third quartile. Taken together, these results suggest that there is cross-reactivity between *Ae. albopictus* SGE and *Ae. aegypti* SGE, especially in high immune responders. Further investigations would be required to identify species-specific salivary antigens.

An association has been shown between the level of anti-SGE IgG and exposure to *Ae. albopictus* (Konishi, 1990). It can be hypothesised that, in Reunion Island, the observed specific IgG responses were elicited as a result of antigenic stimulation following biting by *Ae. albopictus*. In the urban area of Reunion Island, *Ae. albopictus* is highly anthropophilic (Delatte *et al.*, 2010) and characterised by numerous “artificial” breeding sites (Delatte *et al.*,

2008) which could explain the high percentage (88%) of specific responders to *Ae. albopictus* SGE. These results point up the relevance of this approach to developing a specific biomarker for exposure to *Ae. albopictus*. However epidemiological factors—history of exposure, genetic background, immune tolerance, etc.—have to be taken into account when explaining variations in responsiveness. Further longitudinal studies could focus on this. To our knowledge, measuring IgGs against *Ae. albopictus* SGE represents the first direct method for evaluating human exposure to *Ae. albopictus* and this parameter probably represents the first genuine biomarker for man-vector contact. This method could help overcome the shortcomings of the current methods which only give indirect measurements of exposure to *Ae. albopictus* and therefore have considerable limitations for evaluating the risk of arbovirus transmission (Focks, 2003). The current standard methods—immature stage counting and trapping techniques—are both “static” and mainly target “household exposure”, ignoring all the anthropogenic factors that can affect exposure (e.g. water storage practices). *Aedes* are diurnal mosquitoes, biting both indoors and outdoors, and these characteristics may complicate the assessment of exposure using conventional methods. Using anti-SGE IgG responses to evaluate exposure to *Ae. albopictus*, highly heterogeneous Ab levels were observed between exposed individuals, as previously reported for another vector (Poinsignon *et al.*, 2008a). It could be hypothesized that different levels could reflect the intensity of exposure to biting vectors, e.g. the experimental results indicate that a high Ab response is the result of high exposure and the same association is also observed for low Ab levels (Schwarz *et al.*, 2009b). This has also been observed in human populations in the field where arthropods vectors are endemic. In exposed individuals from endemic areas, it has been shown that the level of anti-saliva Ab was closely associated with the intensity of exposure to vector bites (Remoue *et al.*, 2007; Poinsignon *et al.*, 2008a; Poinsignon *et al.*, 2008b; Poinsignon *et al.*, 2010). Therefore, this could be a useful tool for comparing the exposure to *Ae. albopictus* at different sites in a given study area or between different areas, and could be useful for evaluating the efficacy of vector control. In addition, recent findings in the malaria field have shown that Ab responses to saliva antigens are useful in the assessment of low-level exposure to *Anopheles* bites (Poinsignon *et al.*, 2009). Detection of low level exposure in newly colonized areas is of particular interest for *Ae. albopictus* due to its ongoing worldwide spread, especially in urban contexts. Moreover, a clear correlation between larval indices and pathogen transmission is difficult to establish when the level of exposure is low (Sulaiman *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 2010). In both cases, evaluation of the anti-saliva IgG response

could complement entomological methods. However, several validation steps (e.g. seasonal variation and correlation with entomological measurements) will have to be checked.

In this study, we measured the Ab response to whole SGE. As long as any salivary proteins are shared with other species or genera, the degree of cross-reactivity with major other *Aedes* vectors will have to be assessed. Thus, cross-reactivity was investigated between *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*, closely related species with shared salivary proteins (Arca *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). Only weak cross-reactivity was detected between *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* SGEs, mainly observed in high immune responders. This may suggest that species-specific proteins are more immunogenic than genus-shared proteins. Species-specificity has been already reported with several *Aedes* species (Peng *et al.*, 1995; Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997; Remoue *et al.*, 2007) and for a broad range of vectors (Poinsignon *et al.*, 2008b; Schwarz *et al.*, 2009b; Clements *et al.*). In contrast, western-blot analysis reveals extensive cross-reactivity and shows that some antigens are common to all *Aedes* species (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994; Reunala *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 2006). This low level of cross-reactivity also raises the roles of intensity and history of exposure in determining the acquired IgG response against SGE. Individuals from Reunion Island are unlikely to have been exposed to *Ae. aegypti* because this mosquito is not found in town and its breeding sites are restricted to natural habitats (Bagny *et al.*, 2009). Cross-reactivity between salivary proteins common to all members of the *Aedes* genus seems therefore to be the most likely explanation of the observed IgG responsiveness to *Ae. aegypti* SGE in Reunion Island. Travelling could also lead to contact with *Ae. aegypti* which is present in most of the islands of the Indian Ocean.

To enhance the usefulness of this biomarker for large-scale applications and to exclude cross-reactivity, an *Ae. albopictus*-specific salivary antigen needs to be identified. In malaria, only one peptide in whole *Anopheles* salivary antigen is an efficient biomarker for exposure to *Anopheles* bites (Poinsignon *et al.*, 2010). To improve the sensitivity and the specificity of detection, an immuno-proteomic study is currently underway to identify *Ae. albopictus*-specific proteins and peptides.

The study described here represents the first step for estimating human exposure to *Ae. albopictus* by quantifying the IgG response to vector salivary antigens. In an area of chikungunya transmission, it was shown that the level of Ab against *Ae. albopictus* SGE can be used to identify individuals who have been exposed to the bites of this important vector. Low level cross-reactivity was observed with *Ae. aegypti* SGE suggesting that it will be

possible to develop a specific biomarker for human exposure to biting *Ae. albopictus*. By combining the use of such a biomarker with classical entomological and epidemiological methods, it could enhance the assessment of human exposure to *Ae. albopictus* and therefore contribute to both accurate prediction of the risk of arbovirus transmission and evaluation of the efficacy of vector control.

Acknowledgments.

The authors gratefully acknowledge the population of La Reunion and Santa Cruz de la Sierra for their participation in this study. The authors thank also Sirilakassana Patramool, Severine Liccardi, Dr Jean-Jacques Hoarau and La Réunion DRASS-LAV team for their technical support. We thank A. Molloy for reviewing the draft of the manuscript and the English language.

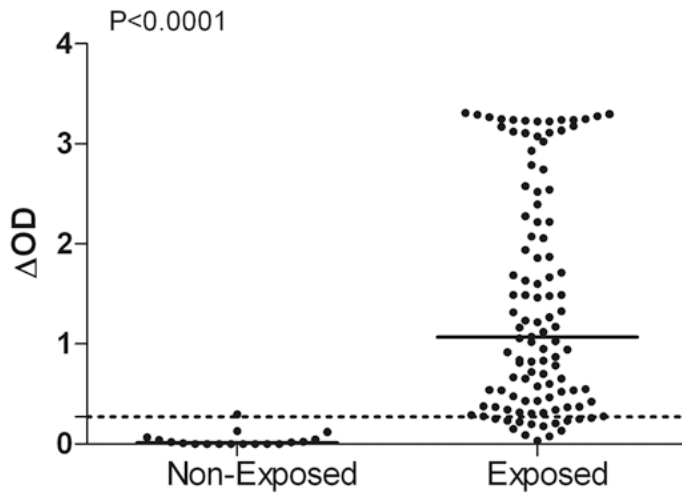


Figure 1. Individual IgG response to *Ae. albopictus* SGE in Reunion Island. Exposed (n=110, Reunion Island) and unexposed individuals (n=18, North France). Individual IgG Ab responses are represented by ΔOD. Bars indicate median value in each group and the dotted line represents the threshold of specific Ab response to *Ae. Albopictus* SGE (ΔOD=0.271).

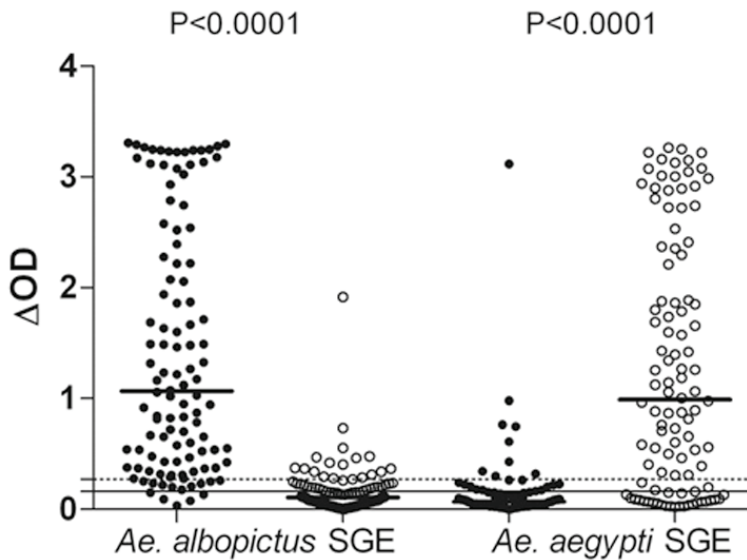


Figure 2. Individual IgG response to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* SGE in Reunion Island and Bolivia. Individual IgG responses against *Ae. albopictus* SGE and *Ae. aegypti* SGE are presented in individuals from Reunion Island (black circle) and from Bolivia (white circle). The percentage of positive responders is indicated for each group. Bars indicate median value in each group. The dotted and solid lines represent the threshold of specific Ab response to *Ae. albopictus* (ΔOD= 0.271) and *Ae. aegypti* SGE (ΔOD= 0.161), respectively.

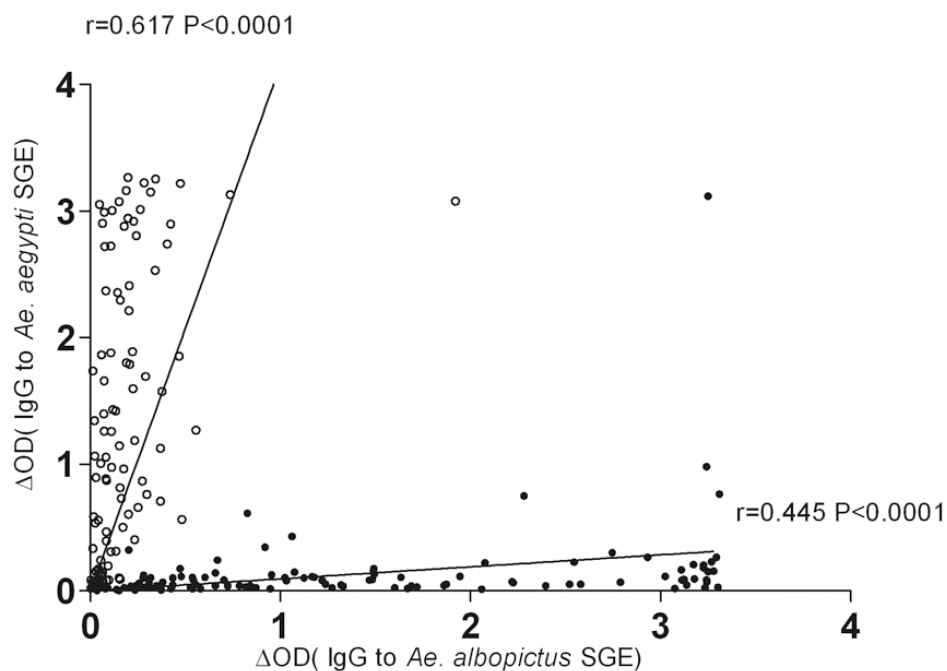


Figure 3. Individual cross-reactivity response between *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* SGE.

Correlations between IgG against *Ae. albopictus* SGE and *Ae. aegypti* SGE in Reunion Island (black circle) and Bolivia (white circle). The coefficient of correlation (r) and significance are indicated for each species SGE, black lines represent linear Spearman correlation.

References

1. Weaver, S. C. & Reisen, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85, 328-45 (2010).
2. WHO. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva : World Health Organization. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1 (2009).
3. Staples, J. E., Breiman, R. F. & Powers, A. M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 49, 942-8 (2009).
4. Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V. & Fontenille, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11, 1177-85 (2009).
5. Rezza, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370, 1840-6 (2007).
6. Gould, E. A., Gallian, P., De Lamballerie, X. & Charrel, R. N. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 16, 1702-4 (2010).
7. Focks, D. A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors. World Health Organization TDR/ IDE/Den/03.1 (2003).
8. Billingsley, P. F., Baird, J., Mitchell, J. A. & Drakeley, C. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol* 28, 143-53 (2006).
9. Ribeiro, J. M. & Francischetti, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48, 73-88 (2003).
10. Nascimento, R., Santana, J., Lozzi, S., Araujo, C. & Teixeira, A. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg* 65, 219-26 (2001).
11. Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y. & Volf, P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493-9 (2005).
12. Poinsignon, A. et al. Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78, 750-3 (2008).
13. Das, M. K., Mishra, A., Beuria, M. K. & Dash, A. P. Human natural antibodies to *Culex quinquefasciatus*: age-dependent occurrence. *J Am Mosq Control Assoc* 7, 319-21 (1991).
14. Remoue, F. et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 363-70 (2006).
15. Waitayakul, A. et al. Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Trop* 98, 66-73 (2006).
16. Andrade, B. B. et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J* 8, 121 (2009).
17. Drame, P. M. et al. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *Am J Trop Med Hyg* 83, 115-21 (2010).
18. Peng, Z. & Simons, F. E. Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 133, 198-209 (2004).
19. Wasinpiyamongkol, L. et al. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 10, 1906-1916 (2009).
20. Brummer-Korvenkontio, H. et al. Detection of mosquito saliva-specific IgE antibodies by capture ELISA. *Allergy* 52, 342-5 (1997).
21. Reunala, T. et al. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol* 104, 366-71 (1994).
22. Orlandi-Pradines, E. et al. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect* 9, 1454-62 (2007).
23. Remoue, F. et al. IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop* 104, 108-15 (2007).
24. Bagny, L., Delatte, H., Quilici, S. & Fontenille, D. Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. *J Med Entomol* 46, 1541-5 (2009).
25. Delatte, H. et al. Geographic distribution and developmental sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 25-34 (2008).

26. Poinsignon, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. *PLoS One* 3, e2472 (2008).
27. Konishi, E. Distribution of immunoglobulin G and E antibody levels to salivary gland extracts of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in several age groups of a Japanese population. *J Med Entomol* 27, 519-22 (1990).
28. Delatte, H. et al. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Reunion. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 249-58 (2010).
29. Schwarz, A. et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 39, 1021-9 (2009).
30. Poinsignon, A. et al. First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. *Trop Med Int Health* 15, 1198-203 (2010).
31. Poinsignon, A. et al. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. *Malar J* 8, 198 (2009).
32. Sanchez, L. et al. Breteau Index threshold levels indicating risk for dengue transmission in areas with low *Aedes* infestation. *Trop Med Int Health* 15, 173-5 (2010).
33. Sulaiman, S., Pawanchee, Z. A., Arifin, Z. & Wahab, A. Relationship between Breteau and House indices and cases of dengue/dengue hemorrhagic fever in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Am Mosq Control Assoc* 12, 494-6 (1996).
34. Arca, B. et al. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol* 37, 107-27 (2007).
35. Ribeiro, J. M. et al. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 8, 6 (2007).
36. Peng, Z., Yang, M. & Simons, F. E. Measurement of mosquito *Aedes vexans* salivary gland-specific IgE and IgG antibodies and the distribution of these antibodies in human sera. *Ann Allergy Asthma Immunol* 74, 259-64 (1995).
37. Clements, M. et al. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 82, 801-7 (2010).
38. Brummer-Korvenkontio, H. L., P. Reunala, T. Palosuo, T. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG₄ antibodies by immunoblotting. *Allergy and Clinical Immunology* 93, 551-5 (1994).
39. Peng, Z. et al. A new recombinant mosquito salivary allergen, rAed a 2: allergenicity, clinical relevance, and cross-reactivity. *Allergy* 61, 485-90 (2006).

Principaux résultats

Spécificité et sensibilité de la réponse IgG anti-salive d'*Aedes*

Chez la population Européenne non-exposée, nous ne détectons aucune réponse Ac IgG dirigée contre les protéines salivaires aussi bien d'*Ae. albopictus* que d'*Ae. aegypti*. Cette absence de réponse témoigne d'une bonne spécificité du test ELISA utilisé pour mettre en évidence la réponse Ac spécifique produite contre les protéines salivaires d'*Aedes*.

Hétérogénéité de la réponse IgG anti-salive d'*Aedes*.

Chez les Réunionnais, nous observons un pourcentage élevé (88%) de réponse Ac anti salive d'*Ae. albopictus*. Cette évaluation de l'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus* à travers la mesure de la réponse IgG est une première dans une zone où le risque de transmission d'arbovirus est très élevé. Chez les Boliviens, comme attendu, nous notons 76% de réponse positive contre la salive d'*Ae. aegypti*.

Nous notons une forte hétérogénéité de cette réponse IgG au sein de ces deux populations allant de la limite du seuil de détection à de très fortes réponses.

Les faibles réponses Ac observées, flirtant avec le seuil de détection, indiquent la possibilité qu'un potentiel bio-marqueur immunologique puisse détecter de très faible exposition aux piqûres des *Ae. albopictus*, témoignent aussi d'une bonne sensibilité.

Spécificité de la réponse IgG anti-salive d'*Aedes*

Par rapport à la proximité d'espèce entre *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, de faibles pourcentages de réactions croisées sont trouvées au sein de ces deux populations. Contrairement aux forts pourcentages notés avec les ELISA homologues, l'étude de la réaction croisée montre que seul 16% des Boliviens et 19% des Réunionnais ont une réponse positive sur *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, respectivement. Ces résultats sont encourageants pour la possibilité d'une spécificité de la réponse IgG chez ces deux populations exposées exclusivement à *Ae. albopictus* ou *Ae. aegypti*. Cette idée est d'autant plus renforcée que la majorité des individus positifs sur les ELISA hétérologues ne développent que de très faibles réponses Ac et sont pour la plupart de forts répondeurs sur les ELISA homologues.

Conclusion

Cette deuxième étude a permis pour la première fois de mettre en évidence une réponse Ac anti salive au sein d'une population exclusivement exposée à *Ae. albopictus* dans une zone à fort risque de transmission d'arbovirus. Elle a aussi mis en exergue l'hétérogénéité de la réponse Ac anti salive entre individus exposés aux piqûres d'*Aedes*. Les faibles niveaux de

réactions croisées laissent présager le développement d'un biomarqueur qui serait spécifique d'espèce, *Ae. albopictus* ou *Ae. aegypti*. Cette éventualité passe largement par le développement et l'identification de protéines antigéniques spécifiques à chacune des espèces.

3 Identification de candidats salivaires biomarqueurs spécifiques à Ae. albopictus

Les deux précédentes études réalisées en Bolivie et à La Réunion ont montré la possibilité d'utiliser les réponses Ac contre les extraits totaux de la salive d'*Aedes* afin d'avoir une indication sur le degré d'exposition à *Ae. albopictus* ou à *Ae. aegypti*. Cependant, plusieurs critères doivent être validés pour obtenir un bio-marqueur pertinent d'exposition de l'homme à *Ae. albopictus*: 1) spécificité au genre, voire à l'espèce du moustique, 2) l'antigénicité des candidats, 3) reproductibilité des ELISA, 4) facilité de production des candidats et 5) corrélation positive entre le niveau des Ac anti-candidats et l'intensité d'exposition aux piqures. Les extraits salivaires totaux ou la salive totale ne peuvent pas répondre aux critères n°1, 3 et 4. Afin d'affiner la détection de l'exposition de l'homme aux piqûres de ces vecteurs et de définir un bio-marqueur pertinent d'exposition à *Ae. albopictus*, il est nécessaire de sélectionner des antigènes qui permettraient de mesurer cette exposition de façon spécifique et d'exclure toute potentialité de réaction croisée avec d'autres espèces d'*Aedes* ou encore de *Culicidae*. C'est dans ce but que nous avons exploré différents processus qui permettraient d'identifier de potentiels candidats protéines/peptides bio-marqueurs spécifique d'*Ae. albopictus*. Cette partie du travail de thèse a été aussi réalisée dans le cadre de projets précédemment cités, EpiDengue et ExpAedes.

Présentation de l'étude

Au cours de cette étude, nous nous sommes attelés à identifier les protéines salivaires immunogéniques d'*Ae. albopictus*. Deux conditions essentielles ont été prises en compte pour la mise en évidence des protéines salivaires immunogéniques : l'intensité et la spécificité de l'exposition aux piqûres des *Aedes*. Ainsi, nous avons considéré nos deux populations de départ, Réunionnaise et Bolivienne. Au sein de chacune de ces populations nous avons sélectionné six individus, répartis en trois groupes de deux individus en fonction de l'intensité de l'exposition aux piqûres : faible, moyenne et forte, définie précédemment. Cette intensité d'exposition aux piqûres a été déterminée par le niveau des IgG anti-salive totale d'*Aedes* : étude Epidengue pour l'exposition spécifique à *Ae. aegypti* en Bolivie (article n°1) et étude ExpAedes pour l'exposition spécifique à *Ae. albopictus* à La Réunion (article n°2). Nous avons pris le soin de vérifier que chacune de ces populations est uniquement exposée aux piqûres d'une seule espèce d'*Aedes*, *Ae. albopictus* pour les Réunionnais et *Ae. aegypti* pour les Boliviens. L'approche immuno-protéomique combinant des immunoblots 2D individuels,

pour identifier les protéines antigéniques, suivi de la caractérisation de ces antigènes par spectrométrie de masse, nous a permis d'identifier et de caractériser les différentes protéines salivaires immunogéniques d'*Ae. albopictus*.

Article 3

First 2D screening of *Aedes albopictus* immunogenic salivary proteins

Souleymane Doucoure^{1*}, François Mouchet¹, Sylvie Cornelié¹, Jean S. DeHecq², Abdul H. Rutee², Yelin Roca³, Annie Walter¹, Jean P. Herve¹, Sirilakassana Patramool¹, Dorothée Misse¹, François Favier⁴, Philippe Gasque⁵, Franck Remoue¹.

¹Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, UMR 224 CNRS/IRD/UM1, Montpellier, France

²Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociale, Saint Denis, La Réunion.

³Centro Nacional de Enfermedades, Santa Cruz, Bolivia.

⁴Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique, Saint Pierre, La Réunion.

⁵Groupe de Recherche Immunopathologie et Maladie Infectieuses, Saint Denis, La Réunion.

* Corresponding author: Souleymane Doucoure.

Phone: + 33 467 416 178

Fax: + 33 467 416 330

Abstract

The study of human Antibody (Ab) response to *Aedes* salivary proteins has provided new tool for assessing the exposure to the vectors bites. The identification of species-specific proteins is necessary for their improvement. We compared the 2D profiles of *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins of individuals with different level of exposure to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* bites. In all individual, we detected strong antigenicity to *Ae. albopictus* salivary proteins whatever the level and the nature of exposure. Among the immunogenic salivary secreted proteins, 68% are involved in blood feeding and mainly concern D7 proteins family, adenosine deaminase, serpine and apyrase. The proteins of the 34 kDa family specific to *Aedes* have been found highly antigenic.

This study provided for the first time a databank of *Ae. albopictus* immunogenic salivary secreted proteins that can be use to design a specific biomarker of exposure to the bites of this vector.

INTRODUCTION

Last decades are marked by fast and worldwide spread of *Ae. albopictus* mosquito (Knudsen, 1995) which is competent vector of at least 23 arboviruses including dengue, yellow fever and chikungunya (Gratz, 2004). One major consequence of this expansion is the huge scale of chikungunya outbreak in Indian Ocean and in Italy (Flahault, 2007; Rezza *et al.*, 2007). This situation has prompted the need to reinforce *Ae. albopictus* surveillance system. For that purpose, the evaluation human population exposure to *Ae. albopictus* bites is fundamental in monitoring the efficacy of vector control strategies and to assess accurately the risk of *Ae. albopictus* borne virus transmission. This evaluation, currently based on entomological methods by identification of breeding sites and trapping strategies (Focks, 2003), is applicable at a population level and is inadequate to evaluate the heterogeneity of individual exposure. Moreover, the House and Bretau indices resulting from the numeration of *Aedes* immature stages are very controversial in assessing the risk of arbovirus transmission (Sulaiman *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 2010). To overcome these limitations, individual exposure can be measure by human landing catches technique, but this method is considered unsuitable and raises ethical concerns. Also, these current entomological methods are fastidious, labour intensive and costly, for these reasons, they are not applicable for large field application. Thus, it is recommended to fine new complementary tools to evaluate human exposure to *Ae. albopictus* bites. In contrast to basic entomological techniques, new tools should be easily implemented and highly sensitive to detect human exposure to *Ae. albopictus* bite both in endemic and emerging areas. So far, the study of Human/mosquito interactions through the vector salivary immunogenic proteins has opened perspectives to develop new complementary tools to entomological techniques. Indeed, during the blood feeding, arthropods, even infected, inject the pathogen in vertebrate host skin but also a mixture of salivary proteins to facilitate the blood meal. The vertebrate host antibody response induced by the injection of salivary protein had been reported to be useful immuno-epidemiological biomarker of exposure to arthropods bites. This approach has been applied for a wide range of haemathophagous arthropods: mosquitoes (Remoue *et al.*, 2006; Remoue *et al.*, 2007; Poinsignon *et al.*, 2009; Poinsignon *et al.*, 2010), ticks (Schwartz *et al.*, 1990; Schwarz *et al.*, 2009a; Schwarz *et al.*, 2009b) sand flies (Souza *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2010). However, some salivary proteins are cross-genus, genus and species shared thus enhancing the occurrence of Ab cross-reactivity and overestimating the evaluation of human exposure to given arthropod bite. This bias as well as substantial limitations like the availability of

sufficient amount and stability of SGE, may restrain large serological studies. Therefore, the use of easily synthesized and specific salivary proteins is needed to evaluate correctly human exposure to vector bites. To achieve this goal, specific peptides and/or recombinant proteins have been used to evaluate the specific exposure to *Anopheles* and *Triatomines* bites (Poinsignon *et al.*, 2008a; Poinsignon *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2009a; Teixeira *et al.*, 2010). Moreover, the salivary peptide gSG6-P1 and the recombinant salivary protein rTisP14.6 are highly effective to detect low level exposure to *An. gambiae* and triatomine bug populations, respectively (Poinsignon *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2009b). Concerning *Aedes*, some investigations attempted to identify the salivary proteins involved in human allergic reaction to the bite (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994; Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997) and salivary factors that may be involved in pathogen transmission (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2009).

In this study, we aimed to identify *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins in individuals exposed to *Aedes* bites. We used 2-D immuno-proteomic tool to map human IgG response to *Ae. albopictus* SGE in adult individuals exposed to *Ae. albopictus*, the only observed *Aedes* species which bite human population in Reunion Island. Then to check *Aedes* genera shared salivary antigens, we highlighted *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins in individuals only exposed to *Ae. aegypti* bite (Bolivia area). Additionally, we coupled our approach with MALDI/ LC MS analysis and data bank interrogation to get insights of the specificity of antigenic salivary proteins for their potential use as a specific biomarker of exposure to *Ae. albopictus* bites.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The study population was selected from two different areas: Reunion Island and Bolivia for the specific exposure to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* vector, respectively. 9 individuals were selected in each area and were categorized in three groups, low, medium and high according to the intensity of their IgG response anti *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* salivary gland extract (SGE) measured by ELISA in a previous study. There are a total of 3 individuals in each group. All individuals from La Reunion Island are IgG negative to *Ae. aegypti* SGE, conversely, Bolivian are IgG negative to *Ae. albopictus* SGE too in ELISA.

Both study followed ethical principles as stipulated in the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration; The study in La Reunion was approved by the French “Comité de Protection des

Personnes” (CCP-Sud Ouest ,Outre Mer) and AFFSAP . The study from Bolivia is derived from the large Epidengue study which was approved by the Bolivian Committee of Bioethics (September 2006) and the “Comité Consultatif de Déontologie et d ‘Ethique” (CCDE) of IRD (July 2006). Informed and written consent was obtained from both studied populations.

Collect of *Aedes* salivary extracts

Salivary Gland Extracts (SGE) were obtained from 10 day-old uninfected females reared in insectaries. *Ae. albopictus* was bred from larvae collected in the field in Reunion Island (Direction Regionale des Affaires Sanitaires et Sociales, Saint Denis, Reunion Island) and the Bora-Bora strain of *Ae. aegypti* was used (IRD, Montpellier, France). Briefly, mosquitoes were sedated with CO₂ and their legs and wings were removed and the salivary glands were dissected out and transferred into tube containing 30 µl of IEF buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 0.8% IPG buffer, 0,2% tergitol, 100 mM DTT). The dissected glands of each mosquito were then pooled to homogenise each SGE batch and batch was frozen at -80°C, before extraction. A simple technique consisting of 3 times successive freeze-thaw was used to extract the proteins from salivary glands. The soluble proteins of SGE were then extracted after centrifugation 20 min at 30 000g (at +4°C) and the supernatants were collected corresponding to the soluble salivary proteins. After pooling the different glands batch, the protein extract were then desalted using 2-D Clean-Up Kit (GE Health care, Germany). The quantity of proteins was evaluated by the Bradford method (OZ Biosciences) before resuspending the protein extract in IEF buffer for proteomic analysis or stored frozen at -80°C before use.

Protein 2D electrophoresis and western blotting

IEF was carried out using Immobiline DryStrips (11 cm, pH 3-10 NL). Strips were rehydrated for 16 h at room temperature with 8µg of *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* SGE made up to 180 µL by adding IEF buffer 2% DeStreak reagent (GE Healthcare). Strips were run at 20°C at 50µA per strip; 60V (step) for 1h, 500V (grad) for 1h, 1000V (grad) for 1h, 6000V (grad) for 2h and then 6000V steps up to 30000Vhs.

After the IEF, the strips were reduced for 10 min with 65mM DTT buffer pH 6.8 (50 mM Tris HCl pH 6.8, 6 M urea, Glycerol 30%, sodium dodecyl sulphate 2%) and 81 mM of iodoacetamide buffer pH 8.8 (50 mM Tris HCl pH 8.8, 6 M urea, Glycerol 30%, sodium dodecyl sulphate 2%) was used for alkylation for 15 min. Then the strips were equilibrated in Ph 6.8 buffer for 5 min before second dimension electrophoresis performed on 10.5-14% Tris-HCl (BioRad).The gels was run at 30V for 20 min and then 200V for 55 min.

After electrophoresis, the proteins were transferred onto a PVDF membrane (polyvinylidene difluoride, Biorad) for Western Blotting. The transfer was run at 30V for 16h at 4°C in Tris 25 mM, glycine 192 mM and 15% ethanol buffer. The PVDF membrane was then washed in Tris Buffer Saline (TBS) and blocked in TBS tween 0.05%, 5% dry milk for 1h30 min. After washing three times with TBS 0.1% tween, the membrane was incubated overnight at 4°C with serum sample diluted at 1/100 in TBS 0.05%, 2.5% dry milk. An alkaline phosphatase mouse anti-human IgG was used as a secondary antibody at a dilution of 1/5000 (Sigma, St Louis) for 2h 30 at room temperature. The membrane was revealed using the Lumi-Phos WB Chemiluminescent substrate (Pierce) and exposed to CL-Xposure film (Pierce) for 1min.

Protein identification

2D electrophoresis was coupled to mass spectrometry analysis for proteins identification. For the 2D electrophoresis, 30µg of total protein of *Ae. albopictus* SGE were used in Immobiline DryStrips (11 cm, pH 3-10 NL) and ran as described above. After the second dimension electrophoresis the gel was stained with PageBlue™ (Fermentas) protein staining solution overnight. After washes, proteins were superposed to immunogenic proteins detected by the Western Blotting using Samespot™ software. The matching proteins were then excised manually in a laminar flow hood and enzymatic in-gel digestion was performed automatically (Tecan freedom evo® proteomics). Proteins spots were digested using 150 ng of trypsin and extraction was performed using 5 sonication cycles of 2 min each and peptides were concentrated 1h at 50°C. 05 µL of sample peptide and 0.5µL of alpha-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic were deposited on a 384-wells MALDI anchoring target using the drydroplet procedure and air dried at room temperature. MALDI-TOF MS analysis was performed using UltraFlex MALDI TOF-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in the reflectron mode with a 26 kV accelerating voltage and a 50 ns delayed extraction. The AutoXecute™ module of Flexcontrol™ (Bruker Daltonics) (laser power ranged from 40 to 50%, 600 shots) was used to acquire mass spectra. Spectra were analysed using FlexAnalysis™ software (Bruker Daltonics) and calibrated internally with the autolysis peptides of trypsin (m/z: 842.51; 1045.556; 2211.10). Peptides were selected in the mass range of 900-3000 Da.

Peptide mass fingerprint identification of proteins was performed by searching against the Insecta entries of either SwissProt or TrEMBL databases (<http://www.expasy.ch>) using the

Mascot v 2.2 algorithm (<http://www.matrixscience.com>). Mascot scores higher than 65 were considered as significant ($P < 0.05$) for SwissProt and TrEMBL databases.

Protein samples that could not be identified by MALDI-TOF MS analysis were subjected to nano LC ESI MS/MS analysis with a QTOF or a LTQ Orbitrap XL. Samples were dehydrated in a vacuum centrifuge, solubilised in 1 μ L of 0.1% formic acid-2% acetonitrile and analyzed online on a ESI quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (QSTAR Pulsar-i, Applied Biosystems, Foster City, CA) or a ESI LTQ Orbitrap mass spectrometer (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fischer Scientific) respectively, coupled with an Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Amsterdam, Netherlands).

Regarding the protein identification, all MS/MS spectra were searched against Insecta entries of either SwissProt or TrEMBL databases by using the Mascot v 2.2 algorithm (MA; Matrix Science Inc.) with trypsin enzyme specificity and one missed trypsin cleavage. With nano LC ESI LTQ Orbitrap XL analysis, the data submission was performed using ProteomeDiscover v 1.0 (Thermo Fisher Scientific). Peptide with scores greater than the identity score ($P < 0.05$) were considered significant. All spectra were manually validated for proteins identified with less than three different peptides. After protein identification, NCBI blast T Non Redundant bank was run to check the protein species specificity.

Results

Aedes albopictus immunogenic proteins salivary map (Figure 1)

We evaluated the immunogenic profile of *Ae. albopictus* salivary proteins (immuno-sialome) by immunoblotting with sera of individuals exposed to increasing levels of *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* bites. Most of proteins detected display an intense signal engendering considerable overlap and were present between pH 4 and 9 and between 17 kDa and 65 kDa. The immunogenic profile appeared to be different according to each individual. No relevant difference is observed in the immunogenic profile between individuals whatever the nature of the exposure to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* and the intensity of the exposure evaluated according to their level of IgG anti whole SGE. However, the pattern of recognition appears to be identical in the majority of individuals (Supplemental figure 1 and 2). Four sets of proteins seem to be recognised by almost all individuals: between the pH 5 and 6 we have to strings of immunogenic proteins at 25-40 kDa and at 60-70 kDa and two others between pH 8 and 9: 20-40 kDa and 60-65 kDa. Between these two pH values, it is found two others sets of

immunogenic proteins: 17-20 kDa and 40-50 kDa. These two sets of salivary proteins are less antigenic. (Supplemental figures)

Characterization of *Ae. albopictus* immuno-sialome.

The second step of this study was to characterize *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins using both MALDI-TOF and LC-MS/MS mass spectrometry. A total of 73 spots derived from the immunogenic sets proteins described above were identified. Of the identified proteins, 63% were secreted and 37% intracellular. Among the secreted salivary proteins, 68% are involved in the blood feeding and mainly concern the salivary D7 proteins family, Adenosine deaminase, Serpin and Apyrase. The remaining 32% of salivary secreted proteins consist mainly of proteins of 34k and 62 k proteins family with unknown function (note, the 62 k proteins family may be involved in mosquito defence). In this set of 49 salivary secreted proteins, 46 are identified as from *Ae. albopictus* and 3 from *Ae. aegypti* (Table 1 and figure 1). The intracellular proteins which are found immunogenic are mostly involved in housekeeping function (Supplemental table).

The analysis of by the Blast T indicated that there is no species specific immunogenic salivary protein. For most of the immunogenic salivary proteins, wide homology is found with others *Culicidae*, particularly with *Ae. aegypti*.

Discussion

Ae. albopictus SGE contains proteins that can induce an antibody response in the vertebrate through the bites. In this study, by using 2D immunoblots and mass spectrometry analysis, we identified *Ae. albopictus* salivary immunogenic proteins from individual exposed to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* bites. To our knowledge, this is the first screening of *Ae. albopictus* mosquito immunogenic salivary proteins. 73 *Ae. albopictus* salivary proteins have been found immunogenic. Our results showed that all sera samples contained IgG Ab and exhibited strong reactivity against *Ae. albopictus* SGE. The detected immunogenic salivary protein ranged from 17 kDa to 65 kDa, nearly, the range of *Ae. albopictus* immunogenic salivary protein detected by 1D immunoblot in previous study (Shan et al, the journal of dermatology, 1995). The pattern of recognition is somewhat similar to that observed with *Ae. aegypti* SGE probed with a pool of sera of individual exposed to bites of this vector (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2009). The salivary secreted proteins represent more than the half of *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins. This result was expected according to that salivary secreted proteins are involved in the interaction with hosts therefore can stimulate the vertebrate

immune system and elicit an antibody response during the blood intake. This raises the question about the antigenicity of intracellular salivary proteins. As these salivary intracellular may also be present in mosquito carcass (head, body), one can speculate that individuals have been sensitized do to their frequent contact with mosquitoes. In several mosquitoes species, it is reported the antigenicity of whole body extract (Wongkamchai *et al.*, 2010) or one specific component of the mosquito body like the hemolymph (Kumari *et al.*, 2009).

In this study, the pattern of immunoblot varied individually, no common profile was found among the individuals tested. Theses heterogeneous profiles suggest variability in the immunogenicity of salivary proteins among individuals exposed to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti*. Such heterogeneity of IgG response has been previously reported for different *Aedes* species and several others vectors by using 1D immunoblot (Shen *et al.*, 1989). There is no significant difference about the expression of *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins according to the exposure to *Ae. albopictus* or *Ae. aegypti* or the intensity of the exposure. This could be explained by the use of total salivary gland extract insteadead of pure saliva. Indeed, the antigenicity of intracellular salivary proteins that may not be related to exposure to the bites could induce a bias when it comes to detect differences based on the intensity of exposure. It would be interesting to investigate individual immunogenic profile according to protein only secreted in *Ae. albopictus* saliva. However, mosquito saliva is characterized by low protein concentration and its collect is labour intensive and time consuming, thus limiting its use. However, the high variability noticed in *Ae. albopictus* may also indicate an heterogeneity to the exposure to the vector bites. Therefore, others factors should be investigated to better understand the diversity of immunogenic profile. Indeed, the occurrence of the IgG Ab may be related to several factors like age. In this study, the selected individuals belong in the same group of age. it would be appropriate to investigate the pattern of immunogenic salivary proteins according to this factor since different level of anti *Anopheles* saliva Ab were observed in different groups of age within a population (Drame *et al.*, 2010a). However, none of the salivary immunogenic protein was found specific to *Ae. albopictus* species. This indicated that almost *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins are at least genus specific. So far, all *Aedes* immunogenic salivary identified are genus specific (Peng *et al.*, 2006; Wasinpiyamongkol *et al.*, 2009). To develop a *Ae. albopictus* specific salivary biomarker, it would be useful to incorporate bio-informatics analysis to identify a specific salivary peptide as it was done for *Anopheles* (Poinsignon *et al.*, 2008a).

Such a perspective tool could provide a tool to measure the specific exposure to *Ae. albopictus* bites and evaluate the effectiveness of vector control strategies.

In this study we provide for the first time the 2D profile of *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins related to individual exposure to the bite of this vector. Further studies are needed to identify specific salivary biomarker to the bite of *Ae. albopictus*. The immunogenic salivary protein database provided in this study should facilitate this task.

References

1. Knudsen, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia* 37, 91-7 (1995).
2. Gratz, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 18, 215-27 (2004).
3. Flahault, A. [Emerging infectious diseases: the example of the Indian Ocean chikungunya outbreak (2005-2006)]. *Bull Acad Natl Med* 191, 113-24; discussion 125-8 (2007).
4. Rezza, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370, 1840-6 (2007).
5. Focks, D. A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors. World Health Organization TDR/ IDE/Den/03.1 (2003).
6. Sanchez, L. et al. Breteau Index threshold levels indicating risk for dengue transmission in areas with low *Aedes* infestation. *Trop Med Int Health* 15, 173-5 (2010).
7. Sulaiman, S., Pawanchee, Z. A., Arifin, Z. & Wahab, A. Relationship between Breteau and House indices and cases of dengue/dengue hemorrhagic fever in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Am Mosq Control Assoc* 12, 494-6 (1996).
8. Poinsignon, A. et al. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. *Malar J* 8, 198 (2009).
9. Poinsignon, A. et al. First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. *Trop Med Int Health* 15, 1198-203 (2010).
10. Remoue, F. et al. IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop* 104, 108-15 (2007).
11. Remoue, F. et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 363-70 (2006).
12. Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M. & Goldstein, M. D. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132, 58-66 (1990).
13. Schwarz, A. et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e532 (2009).
14. Schwarz, A. et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 39, 1021-9 (2009).
15. Souza, A. P. et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e649 (2010).
16. Teixeira, C. et al. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e638 (2010).
17. Poinsignon, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One* 3, e2472 (2008).
18. Brummer-Korvenkontio, H. et al. Detection of mosquito saliva-specific IgE antibodies by capture ELISA. *Allergy* 52, 342-5 (1997).

19. Brummer-Korvenkontio, H. L., P. Reunala, T. Palosuo, T. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG₄ antibodies by immunoblotting. *Allergy and Clinical Immunology* 93, 551-5 (1994).
20. Wasinpiyamongkol, L. et al. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 10, 1906-1916 (2009).
21. Wongkamchai, S. et al. Comparative identification of protein profiles and major allergens of saliva, salivary gland and whole body extracts of mosquito species in Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol* 28, 162-9 (2010).
22. Kumari, A., Gakhar, S. K. & Hooda, V. Antibodies raised against hemolymph of *Anopheles culicifacies* reduce the fecundity and malaria parasite development. *J Vector Borne Dis* 46, 255-60 (2009).
23. Shen, H. et al. Human IgE and IgG antibodies to mosquito proteins detected by the immunoblot technique. *Ann Allergy* 63, 143-6 (1989).
24. Drame, P. M. et al. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS One* 5, e15596 (2010).
25. Peng, Z. et al. A new recombinant mosquito salivary allergen, rAed a 2: allergenicity, clinical relevance, and cross-reactivity. *Allergy* 61, 485-90 (2006).

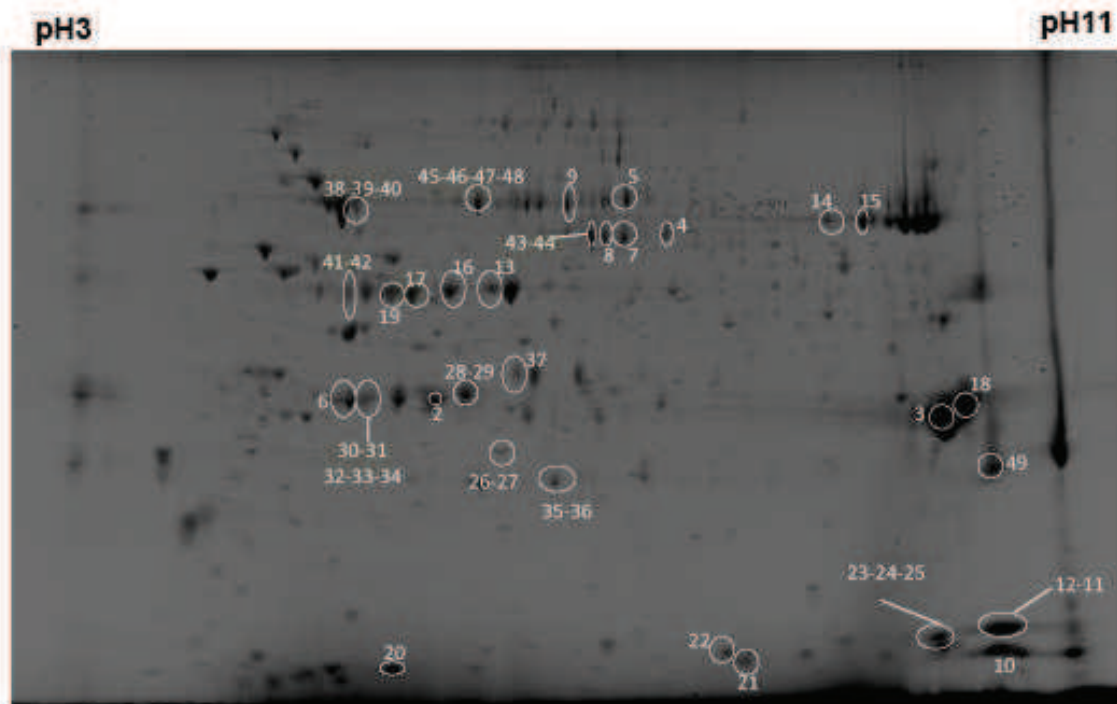
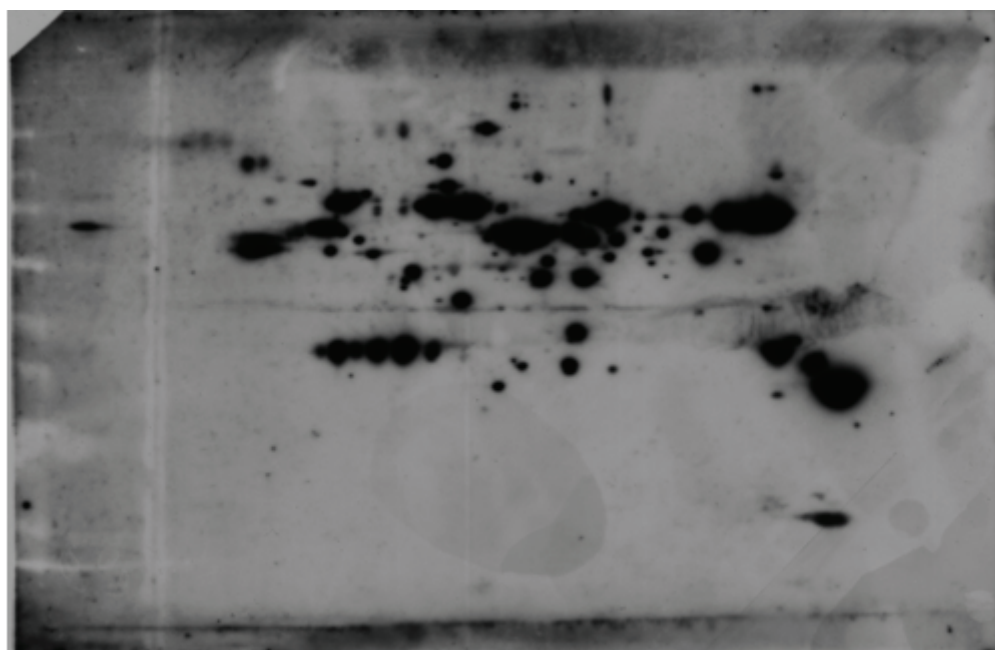
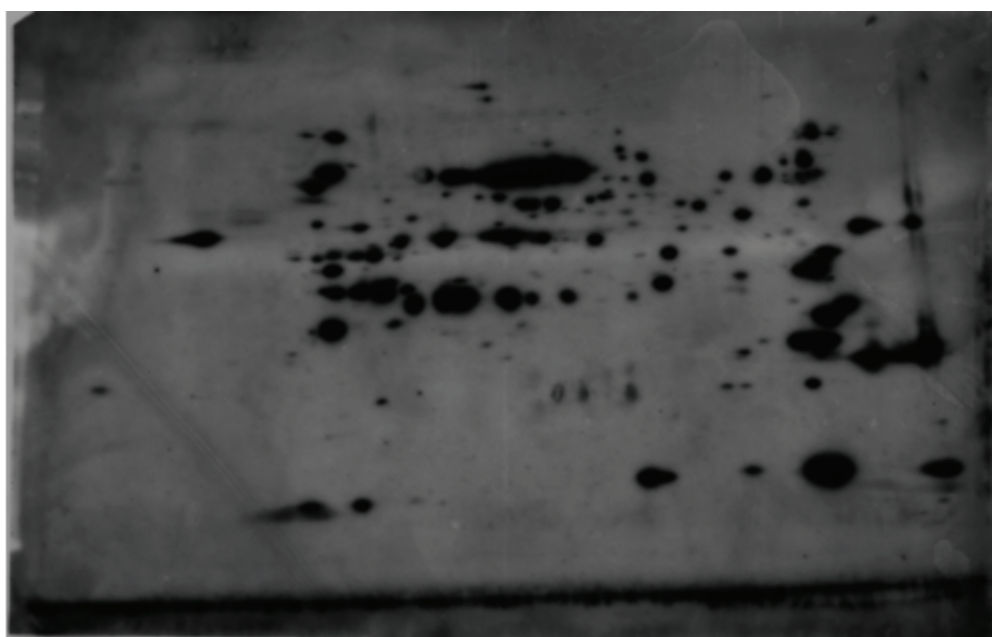


Figure1. 2D gel of *Aedes albopictus* SGE.
profile of Aedes albopictus salivary glands extracts after 2Delectrophoresis. SGE were run on immobilized dry strip pH3-11 for the first dimension and then on 10.5-14% tris gel for the second dimension as described in Methods. Numbers are the spots submitted to mass spectrometry identification.



Supplemental figure 1: *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins in individual exposed to *Ae. albopictus*



Supplemental figure 2: *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins in individual exposed to *Ae. aegypti*

Table: *Ae. albopictus* immunogenic salivary secreted proteins

Protein number	Identification	Function	Accession number	Nominal Mass (kDa)	Pi	Sequence Coverage %	Ms source
1	Putative adenosine deaminase OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIX2_AEDAL	61	6,27	8	MALDI TOF
2	Similar to Aedes aegypti 34 kDa salivary secreted protein 34k-2 OS=Aedes albopictus	unknown	Q5MIU2_AEDAL	36	5,95	38	MALDI TOF
3	Long form D7 salivary protein D7I2 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW6_AEDAL	37	8,6	43	MALDI TOF
4	Putative adenosine deaminase OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIX2_AEDAL	61	6,27	14	MALDI TOF
5	Putative salivary secreted protein 62k-3 OS=Aedes albopictus	unknown	Q5MIU9_AEDAL	65	6,43	30	MALDI TOF
6	Similar to Aedes aegypti 34 kDa salivary secreted protein 34k-2 OS=Aedes albopictus	unknown	Q5MIU2_AEDAL	36	5,95	30	MALDI TOF
7	Putative adenosine deaminase OS=Aedes albopictus PE=2 SV=1	blood feeding	Q5MIX2_AEDAL	61	6,27	12	MALDI TOF
8	Putative adenosine deaminase OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIX2_AEDAL	61	6,27	23	MALDI TOF
9	Putative salivary secreted protein 62k-3 OS=Aedes albopictus	unknown	Q5MIU9_AEDAL	65	6,43	12	MALDI TOF
10	Short form D7 salivary protein SD7-1 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIX1_AEDAL	18	9,1	31	MALDI TOF
11	D7 salivary protein d7s6 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIP1_AEDAL	21	9,23	49	MALDI TOF
12	D7 salivary protein d7s6 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIP1_AEDAL	21	9,23	46	MALDI TOF
13	Salivary serpin putative anticoagulant OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW0_AEDAL	47	6,15	32	MALDI TOF

14	Salivary apyrase OS=Aedes albopictus	blood feeding	E0D877_AEDAL	63	8,17	14	MALDI TOF
15	Salivary apyrase OS=Aedes albopictus	blood feeding	E0D877_AEDAL	63	8,17	26	MALDI TOF
16	Salivary serpin putative anticoagulant OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW0_AEDAL	47	6,15	22	MALDI TOF
17	Putative salivary serpin OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW4_AEDAL	47	5,54	20	MALDI TOF
18	Long form D7Bclu1 salivary protein d711 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW7_AEDAL	39	8,87	37	MALDI TOF
19	Putative salivary serpin OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW4_AEDAL	47	5,54	25	MALDI TOF
20	Putative salivary C type lectin OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIZ0_AEDAL	17	5,55	25,49	LC-MS/MS QTOF
21	Short D7 salivary protein d7s5 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIT1_AEDAL	19	8,00	26,92	LC-MS/MS QTOF
22	Short D7 salivary protein d7s5 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIT1_AEDAL	17	8,00	24,36	LC-MS/MS QTOF
23	D7 salivary protein d7s6 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIP1_AEDAL	21	9,10	30,60	LC-MS/MS QTOF
24	Nucleoside diphosphate kinase OS=Aedes aegypti	metabolism	Q16MB4_AEDAE	18	8,63	23,81	LC-MS/MS QTOF
25	Long form D7Bclu1 salivary protein d711 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW7_AEDAL	38	8,66	6,02	LC-MS/MS QTOF
26	Long form D7 salivary protein D7I2 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW6_AEDAL	36	8,32	18,27	LC-MS/MS QTOF
27	Long form D7Bclu1 salivary protein d711 OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW7_AEDAL	38	8,66	15,66	LC-MS/MS QTOF
28	Similar to Aedes aegypti 34 kDa salivary secreted protein 34k-2 OS=Aedes albopictus	unknown	Q5MIU2_AEDAL	36	6,29	18,01	LC-MS/MS QTOF

29	Long form D7Bclu1 salivary protein d7l1 blood feeding OS=Aedes albopictus	Q5MIW7_AEDAL	38	8,66	12,35	LC-MS/MS QTOF	
30	Putative salivary protein 34k-1 OS=Aedes unknown albopictus	Q5MIU3_AEDAL	36	5,33	21,27	LC-MS/MS QTOF	
31	Similar to Aedes aegypti 34 kDa salivary secreted protein 34k-2 OS=Aedes albopictus	unknown	Q5MIU2_AEDAL	36	6,29	29,81	LC-MS/MS QTOF
32	Angiopoietin like salivary protein OS=Aedes metabolism albopictus		Q5MIV8_AEDAL	32	5,24	10,53	LC-MS/MS QTOF
33	Long form D7 salivary protein D7l2 OS=Aedes blood feeding albopictus		Q5MIW6_AEDAL	36	8,32	13,62	LC-MS/MS QTOF
34	Long form D7Bclu1 salivary protein d7l1 blood feeding OS=Aedes albopictus		Q5MIW7_AEDAL	38	8,66	9,94	LC-MS/MS QTOF
35	Angiopoietin-like protein 2 (Fragment) OS=Aedes metabolism albopictus		Q5MIV9_AEDAL	26	6,77	17,02	LC-MS/MS QTOF
36	Long form D7 salivary protein D7l2 OS=Aedes blood feeding albopictus		Q5MIW6_AEDAL	36	8,32	8,05	LC-MS/MS QTOF
37	Long form D7 salivary protein D7l2 OS=Aedes blood feeding albopictus		Q5MIW6_AEDAL	36	8,32	23,84	LC-MS/MS QTOF
38	Probable salivary maltase OS=Aedes sugar feeding albopictus		Q5MIZ5_AEDAL	66	5,44	16,06	LC-MS/MS QTOF
39	AAEL009524-PA OS=Aedes aegypti	Carbohydrate metabolism	A2I874_AEDAE	66	5,45	7,68	LC-MS/MS QTOF
40	Putative salivary secreted protein 62k-2 OS=Aedes albopictus	Defense response	Q5MIV0_AEDAL	64	6,23	4,94	LC-MS/MS QTOF
41	Putative salivary serpin OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIW4_AEDAL	47	5,71	11,85	LC-MS/MS QTOF
42	Salivary serpin putative anticoagulant OS=Aedes blood feeding albopictus		Q5MIW0_AEDAL	46	6,58	9,16	LC-MS/MS QTOF
43	Myo-inositol-1 phosphate synthase OS=Aedes aegypti	metabolism	Q17H06_AEDAE	61	6,43	9,87	LC-MS/MS QTOF

44	Putative adenosine deaminase	OS=Aedes albopictus	blood feeding	Q5MIX2_AEDAL	61	6,74	9,01	LC-MS/MS QTOF
45	Putative salivary secreted protein	62k-2 OS=Aedes albopictus	Defense response	Q5MIV0_AEDAL	64	6,23	17,99	LC-MS/MS QTOF
46	Putative 62 kDa salivary secreted protein	unknown OS=Aedes albopictus		Q5MIV1_AEDAL	65	6,39	7,36	LC-MS/MS QTOF
47	AAEL009524-PA OS=Aedes aegypti	Carbohydrate metabolism		A2I874_AEDAE	66	5,45	4,89	LC-MS/MS QTOF
48	Putative 56 kDa salivary secreted protein	unknown OS=Aedes albopictus		Q5MIU5_AEDAL	58	8,18	6,42	LC-MS/MS QTOF
49	Salivary secreted antigen-5	AG5-3 unknown OS=Aedes albopictus		Q5MIV5_AEDAL	29	8,84	14,51	LC-MS/MS QTOF

Supplemental table: *Ae. albopictus* immunogenic intracellular salivary proteins

Identification	Accession number	Nominal Mass (kDa)	Pi	Sequence Coverage %	Ms source
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Culex quinquefasciatus	B0WEB5_CULQU	35	8,45	24	MALDI TOF
Heat shock cognate 70 OS=Aedes aegypti	Q1HQZ5_AEDAE	71	5,31	24	MALDI TOF
Actin OS=Aedes albopictus	Q0Z987_AEDAL	42	5,3	28	MALDI TOF
ATP synthase subunit alpha OS=Aedes aegypti	Q1HRQ7_AEDAE	59	9,01	21	MALDI TOF
Alpha tubulin OS=Aedes aegypti	Q1HR53_AEDAE	50	5,01	20	MALDI TOF
Peroxiredoxin-like protein OS=Aedes aegypti	Q5UG08_AEDAE	16	7,21	28,66	LC-MS/MS QTOF
Peroxiredoxin 5, prdx5 OS=Culex quinquefasciatus	B0WM11_CULQU	17	7,30	13,50	LC-MS/MS QTOF
Putative uncharacterized protein OS=Anopheles darlingi	E3X9A3_ANODA	17	6,90	16,86	LC-MS/MS QTOF
Ribosomal protein S10 OS=Ochlerotatus taeniorhynchus	B5AKB5_OCHTA	18	9,79	8,81	LC-MS/MS QTOF
Pyruvate dehydrogenase OS=Aedes aegypti	Q17D51_AEDAE	38	6,84	19,49	LC-MS/MS QTOF
3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase OS=Aedes aegypti	Q0IEU5_AEDAE	35	6,27	10,79	LC-MS/MS QTOF
Putative uncharacterized protein OS=Aedes aegypti	Q16L48_AEDAE	32	6,02	9,38	LC-MS/MS QTOF
60S acidic ribosomal protein P0 OS=Culex quinquefasciatus	B0WQZ4_CULQU	33	5,81	6,98	LC-MS/MS QTOF
60S ribosomal protein L5 (Fragment) OS=Culex tarsalis	B8RJE4_CULTA	25	9,10	10,13	LC-MS/MS QTOF
Arginine kinase (Fragment) OS=Aedeomyia squamipennis	D3J8Q6_9DIPT	26	7,06	19,75	LC-MS/MS QTOF

Arginine kinase					
(Fragment)					
OS=Coquillettidia perturbans	D3J8R0_9DIPT	27	7,46	19,75	LC-MS/MS QTOF
V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_AEDAE	68	5,39	18,57	LC-MS/MS QTOF
OS=Aedes aegypti					
Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	E2C1G9_9HYME	68	5,38	14,94	LC-MS/MS QTOF
OS=Harpegnathos saltator					
GF15651 OS=Drosophila ananassae	B3MNH5_DROAN	68	5,29	7,82	LC-MS/MS QTOF
GI18089 OS=Drosophila mojavensis	B4KGL5_DROMO	74	5,08	5,62	LC-MS/MS QTOF
AAEL009524-PA OS=Aedes aegypti	A2I874_AEDAE	66	5,45	7,68	LC-MS/MS QTOF
Myo-inositol-1 phosphate synthase OS=Aedes aegypti	Q17H06_AEDAE	61	6,43	9,87	LC-MS/MS QTOF
Kinesin light chain 1 and OS=Aedes aegypti	Q16LZ3_AEDAE	58	6,23	6,26	LC-MS/MS QTOF
Past-1 OS=Aedes aegypti	Q16T24_AEDAE	61	6,51	6,16	LC-MS/MS QTOF
Myelinprotein expression factor OS=Aedes aegypti	Q17EV4_AEDAE	59	8,53	3,70	LC-MS/MS QTOF
AAEL009524-PA OS=Aedes aegypti	A2I874_AEDAE	66	5,45	4,89	LC-MS/MS QTOF
Xaa-Pro aminopeptidase 1 OS=Culex quinquefasciatus	B0WH45_CULQU	58	8,21	4,30	LC-MS/MS QTOF

Principaux résultats

Protéines salivaires immunogéniques d'*Ae. albopictus*

Les expérimentations en immunoblot 2D montrent que l'essentiel des protéines immunogéniques se situent entre les pH 5 et 9 avec un poids moléculaire variant entre 17 et 65 kDa. Au total 73 protéines salivaires immunogéniques ont pu être identifiées par spectrométrie de masse. Parmi ces protéines, plus de la moitié (63%) est sécrétée alors que le reste est exprimé en intracellulaire. Parmi les protéines sécrétées qui sont immunogéniques, on retrouve majoritairement les protéines ayant un rôle dans la prise du repas sanguin notamment les D7, l'apyrase, les serpinines et l'adénosine deaminase. On retrouve également d'autres protéines antigéniques et sécrétées telles que celles de la famille de la 34 kDa et de la 62 kDa mais dont les fonctions restent inconnues à ce jour.

Profile immunogénique et intensité/spécificité de l'exposition

Les résultats des immunoblots 2D montrent des profils immunogéniques différents pour chaque individu. D'un individu à l'autre, la réponse développée est très variable malgré un pattern de reconnaissance assez semblable. Chez tous les individus, on note une forte intensité de la réponse IgG anti-protéines salivaires d'*Ae. albopictus*. Cependant, cette intensité notée sur les immunoblots semble ne pas être en rapport avec la classification de l'intensité de l'exposition établie par la technique ELISA. Nous ne notons aucune corrélation entre les degrés d'exposition faible, moyen, fort et l'intensité de la réaction mise en évidence en immunoblot. De même, il ne semble y avoir aucune différence significative des profils immunogéniques en fonction de l'exposition exclusive aux piqûres d'*Ae. albopictus* ou d'*Ae. aegypti*.

Conclusion

Au cours de cette étude nous avons pu mettre en exergue les protéines salivaires immunogéniques d'*Ae. albopictus*. Il a été noté une forte hétérogénéité de la réponse dirigée contre les protéines salivaires d'*Ae. albopictus* quelque soit la nature et l'intensité de l'exposition. La comparaison de la réponse entre individus exclusivement exposés à *Ae. albopictus* ou à *Ae. aegypti* ne permet pas d'identifier des protéines salivaires spécifiques de l'exposition à *Ae. albopictus*. Cependant, cette étude a permis d'identifier les protéines immunogéniques du genre *Aedes* qui pourraient être utilisées pour la mesure de l'exposition aux piqûres de ce vecteur. Par exemple, les protéines de la famille de la 34 kDa qui ont été décrites spécifiques aux *Aedes*, se sont révélées antigéniques chez tous les individus testés.

Ainsi, ces protéines de la famille de la 34 kDa sont de potentiels candidats dans l'optique de développer un bio-marqueur d'exposition de genre.

Malgré le fait que nous n'avons pas pu identifier une protéine spécifique à *Ae. albopictus*, ces travaux ont permis de constituer, pour la première fois une banque de protéines salivaires sécrétées antigéniques d'*Ae. albopictus*. La constitution de cette banque ouvre une nouvelle voie pour le développement de bio-marqueur spécifique d'espèce. L'étude minutieuse des protéines antigéniques qui la constituent pourrait servir à l'identification de peptides salivaires spécifiques à *Ae. albopictus*. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour développer un bio-marqueur spécifique aux *Anopheles*.

*4- Utilisation de la réponse Ac anti-salive comme indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle contre *Aedes albopictus* à La Réunion*

Nos trois premières études ont montré la possibilité d'utiliser les réponses anticorps anti-salive totale pour évaluer l'exposition de l'homme aux piqûres des *Aedes*. Ces études ont également mis en exergue une certaine spécificité de la réponse Ac contre les protéines salivaires montrant ainsi la possibilité de développer un bio-marqueur spécifique d'exposition. L'utilisation de l'immunoblot 2D a permis d'identifier des antigènes salivaires, candidats pour le développement de bio-marqueur spécifique à *Ae. albopictus*. La dernière partie de notre travail avait pour objectif d'évaluer la possibilité d'utiliser de tels bio-marqueurs dans la lutte anti-vectorielle contre *Ae. albopictus*. En effet, l'incertitude et la difficulté d'utilisation des méthodes de mesures entomologiques actuelles constituent un frein pour évaluer correctement l'efficacité des moyens de lutte qui sont mis en œuvre. Ainsi, la première étape était d'évaluer si la réponse Ac anti-salive totale pourrait être utilisée comme indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle (LAV) contre *Ae. albopictus* à La Réunion.

Cette étude fait partie intégrante du projet LAV-Albo (Lutte anti-vectorielle *Ae. albopictus*) qui a été financée par la Direction Générale de la Santé (DGS). Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'Agence Régionale de Santé (ARS) Océan Indien par l'intermédiaire de l'InVS–CIRE (volet épidémiologique) et des services chargés de la lutte anti-vectorielle à La Réunion (volet LAV et données entomologiques). L'objectif général du projet LAV-Albo est d'évaluer si la réponse Ac anti-salive pourrait représenter un nouveau critère, un nouvel outil, permettant d'apprécier l'efficacité de la LAV contre *Ae. albopictus* à deux niveaux: i) critère d'efficacité à court terme, de l'utilisation d'insecticide par pulvérisation spatiale combinée à l'élimination des gîtes larvaires; ii) contrôle de l'efficacité de ces stratégies à long terme (marqueur de recolonisation par *Aedes* dans les zones traitées). Cette étude a été réalisée à La Réunion, zone à forte problématique d'exposition à *Ae. albopictus* et avec un important risque de transmission de chikungunya.

Présentation de l'étude

L'évaluation de la réponse Ac (IgG) anti-salive (extraits salivaires totaux) d'*Ae. albopictus* a été faite pendant une opération de lutte anti-vectorielle classique combinant deux outils : pulvérisation spatiale de deltaméthrine et destruction des gîtes larvaires d'*Ae. albopictus*. Le taux des IgG anti-salive a été mesuré avant la pulvérisation de deltaméthrine (T0), et deux (T2), quatre (T4) et six (T6) semaines après. A chacun des passages (T0, 2, 4 et 6), avant de

procéder à leur élimination, tous les gîtes larvaires d'*Ae. albopictus* sont répertoriés, les indices larvaires calculés. Tout au long de l'étude, la densité de la population adulte d'*Ae. albopictus* a été mesurée tous les deux jours par des pièges à gaz.

Cette évaluation longitudinale a concerné 102 individus âgés de 18 à 65 ans. Cette population a été divisée en trois classes en fonction de l'âge : 18-35, 36-50 et > 50 ans.

Article 4

Human antibody response to *Ae. albopictus* salivary proteins, a new biomarker to evaluate the efficacy of vector control strategies in area of chikungunya virus transmission.

Souleymane Doucoure^{1*}, François Mouchet¹, Sylvie Cornelié¹, Papa M. Drame, Eric D'Ortenzio², Jean S. DeHecq², Franck Remoue¹.

¹Unité MIVEGEC Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle ; UMR IRD224-CNRS5290- Universités Montpellier 1 and 2 , Montpellier, France.

²Agence Régionale de Santé, Océan Indien, Saint Denis, La Réunion.

* Corresponding author: Souleymane Doucoure.

Phone: + 33 467 416 178

Fax: + 33 467 416 330

e-mail : souleymane.doucoure@ird.fr

Abstract**Background:**

The global expansion of *Aedes albopictus* stresses the need to improve current indicators for evaluating the human exposure to vector. Recent findings suggest that human antibody (Ab) response to arthropod salivary proteins can provide new tool for monitoring the exposure of human populations to arthropod bites. In La Reunion urban area, *Aedes albopictus* is the only anthropophilic *Aedes* species. The aim was to evaluate, in exposed adult individuals, the human IgG response to *Ae. albopictus* salivary proteins in order to measure the impact of vector control against *Ae. albopictus*.

Methodology/Principal findings:

The IgG response to *Ae. albopictus* saliva was assessed before (T0), two (T2), four (T4) and six (T6) weeks after deltamethrin insecticide spraying and elimination of breeding sites. Immunological results were compared to the evolution of rainfall during the studied periods and the abundance of *Ae. albopictus* population monitored by entomological parameters. Before insecticide spraying (T0), high proportion (83%) of immune responders and high level of specific IgG were observed which is consistent with the high vector density in such urban context in Reunion Island. The heterogeneity of this Ab response allowed also to classify the study population in three groups of immune responders: low, medium and high. At the whole population level, a significant decrease of the percentage of immune responders (61%) and the specific IgG levels are observed 6 weeks after vector control measures (T6) which were associated with the decline of *Ae. albopictus* populations. This decrease occurred earlier at T2 and T4 in the groups of low and medium immune responders, respectively, and appeared to be age-dependent.

Conclusion/Significance:

These results suggest that IgG response to *Ae. albopictus* saliva could be a potential biomarker of exposure to *Ae. albopictus* bites and a potential tool for short-time evaluation of vector control. Such indicator could be therefore integrated in the survey of the risk of *Ae. albopictus*-borne diseases transmission and its control.

Introduction

Aedes albopictus is one of the most invasive mosquito species in the world (Knudsen, 1995) and is vector for a number of human diseases particularly emerging arboviroses, such as chikungunya and dengue (Gratz, 2004). In Asia, Africa and South America, these arthropod-borne diseases are considered to be public health problems (Gubler, 2002) while they threaten to emerge in developed world (Gould *et al.*, 2010). So far no curative or prophylactic treatment is available to fight these emerging arboviroses. The main strategy developed to control their transmission is based essentially on vector control. The principal objective of vector control strategy is to reduce the human-vector contact. To achieve this objective, the control strategy targets are at three levels: i) to make aware people about the risk of arbovirus transmission ii) the reduction of larval source, i. e. the breeding sites, by the elimination of water-holding container and/or by using larvicides and iii) insecticides spraying against local adults population. This strategy can prevent urban districts from a large scale outbreak (Tan *et al.*, 2011). The evaluation of the efficacy or effectiveness of such interventions is crucial for optimal control of arboviruses transmission and it is currently evaluated by classical entomological methods: identification of breeding sites, capture of mosquitoes by traps, indoor spraying and human landing catches (Focks & Chadee, 1997; Barbazan *et al.*, 2008). Many calculated indexes (Breteau index, pupal index, premise index...) appeared currently the more pertinent indicators for evaluating abundance of adult *Aedes* (Focks, 2003). However, entomological methods for measuring the intensity of *Aedes* exposure which could bite human populations present considerable limitations. The count of positive breeding site is a very long and fastidious method to obtain solid results and the evaluation of adult *Aedes* density by usual entomological methods is not enough sensitive to estimate the low-level exposure to vector bites. These current methods are mainly applicable at the population level and do not enable to evaluate the heterogeneity of individual exposure to *Aedes* bites. Altogether, these methods have substantial limitations in terms of large-scale field application and may raise ethical concerns, especially for human landing catches. These limitations appeared even more considerable in the context of urban exposure. In order to improve vector control and to survey the risk of arbovirus transmission, much effort is being devoted to developing new, simple, rapid and highly sensitive complementary indicators to evaluate the exposure level to *Aedes* bites and the efficacy of control strategies. Recent findings suggest that human antibody (Ab) response to vector salivary proteins, injected human skin during the bite, can be a relevant immuno-epidemiological marker to evaluate human

exposure to vector bites. This evidence has been demonstrated for a wide range of vectors, tick (Schwartz & Goldstein, 1990; Schwartz *et al.*, 1990; Schwarz *et al.*, 2009a; Schwarz *et al.*, 2009b)-mosquito (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994; Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997; Poinsignon *et al.*, 2008a; Poinsignon *et al.*, 2009; Poinsignon *et al.*, 2010)-sand flies (Clements *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2010; Marzouki *et al.*, 2011b). Concerning *Aedes* vector, quantitative evaluation of anti-saliva Ab responses (IgG and specific isotypes) could give a measure of human exposure to biting *Aedes* (Reunala *et al.*, 1994; Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997). In particular, we have showed that IgE and IgG4 responses to *Ae. aegypti* saliva could be detected in young African children during the exposure season (Remoue *et al.*, 2007) and that IgG Ab level to whole saliva was a pertinent biomarker of human exposure to *Ae. aegypti* bites, because of associated with the referent entomological indicators of exposure (Doucoure *et al.* Submitted). More recently, high IgG response to whole saliva of *Ae. albopictus* were detected, for the first time, in adult populations living in urban area in Reunion Island and " highly exposed to *Ae. albopictus* bites and presented very low cross-reactivity with *Ae. aegypti* saliva (Doucoure *et al.*, submitted). Interestingly, recent studies have shown the usefulness of this anti-saliva Ab response in the measurement of the effectiveness of vector control strategies. Indeed, such biomarker has been used to evaluate the efficacy of vector control (i. e., impregnated bed nets against malaria) both at individual and community level (Drame *et al.*, 2010a; Drame *et al.*, 2010b; Schwarz *et al.*, 2011). This study addresses the potential application of this salivary biomarker as a complementary indicator to evaluate the efficacy of another type of vector control strategy, and here, for *Aedes*, the use of insecticide space spraying and the elimination of breeding sites.

The objective of the study was to evaluate the IgG response to *Ae. albopictus* whole salivary gland extract (SGE) in adult populations before and after vector control of *Ae. albopictus* by deltamethrin space spraying and elimination of breeding sites (i. e., elimination of larval population), in urban areas of La Reunion Island. The vector control efficacy was especially evaluated during short-time period, i. e. two, four and six weeks after control strategies. The immunological results were compared with the entomological data, used as references, and the evaluation of rainfall during the studied period.

Materials and methods

Ethics statement

All studies followed ethical principles as stipulated in the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration. The studies in La Reunion and the North of France were approved by a French Ethics Committee (the *Sud Ouest, Outre Mer* Ethics Committee, 25/02/2009) and authorized by French Drug Agency (AFFSAP, Ministry of Health; 12/01/2009). Written informed consent was obtained from all subjects included in the study.

Studied populations

The study was carried out in two urban districts at Saint-Denis, the biggest city of La Reunion Island. Chikungunya transmission was high during the 2006 epidemic. Seventy five household was randomly selected and 102 individuals, from 18 and 65 years of age, were included for a longitudinal follow-up during the seasonal peak of *Ae. albopictus*, from the 2th of May to 9th of July 2010. The evaluation occurred before (T0) and at two (T2), four (T4) and six (T6) weeks after at the intervention of vector control technicians. At each visit, dried blood spot (on filter paper) were collected from each individual for immunological analysis. Just after the T0 visit, the vector control strategies was i) the elimination of all breeding sites and ii) the treatment by two successive insecticide space spraying, by deltamethrin at 1g/ha, in the area. At each passage, all *Ae. albopictus* breeding sites were identify and eliminated and, the Stegomyia indices (Breteau index and house index) calculated before their elimination. During the follow up, the density of adult *Ae. albopictus* was monitored every two days by four Mosquito Magnet traps baited with CO₂ and octenol.

Sera of unexposed individuals (n=18) from a region free of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* (North of France) were used as a negative control.

Collection of *Aedes* salivary gland extracts

Salivary Gland Extracts (SGE) were obtained from 10 day-old uninfected female bred in insectary. *Ae. albopictus* strain was bred from larvae collected in the field in Reunion Island (Agence Régionale de Santé, Saint Denis, Reunion Island). Briefly, two days after a blood meal, the mosquitoes were sedated with CO₂, legs and wings were removed and the salivary glands were dissected and transferred into a tube containing 30 µl of Phosphate Buffer Saline (PBS). The dissected glands were then pooled in 30 or 60 pairs per batch and frozen at -80°C, before extraction. A simple technique consisting of 3 successive freeze-thaw cycles in liquid nitrogen was used to disrupt the membranes. The soluble SGE fraction was then separated by centrifugation for 20 minutes at 30 000g (at +4°C). The quantity of protein was evaluated by

the Bradford method (OZ Biosciences) after pooling of the different batches to generate a homogenous SGE for immunological assessment. SGEs were then stored at -80°C before use.

Evaluation of human IgG Ab levels

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out using Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) coated with *Ae. albopictus* SGE, (2µg/ml Phosphate Buffer Saline-PBS) at 37 ° C for 150 min. Plates were blocked using 250 µl of protein free Blocking-Buffer (Pierce, Thermo Fisher, France) for 60 minutes at room temperature. Individual sera were incubated in duplicate at a 1/100 dilution in PBS-Tween 1%, 4°C overnight. Monoclonal mouse biotinylated Ab against human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA) was incubated at a 1/1000 dilution for 90 minutes at 37°C. Peroxidase-conjugated streptavidin (GE, Orsay, France) was added at 1/1000 for 60 minutes at 37°C. Colorimetric development was carried out using ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium) in 50 mM citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H₂O₂, and absorbance was measured at 405 nm. Each test sample was assessed in duplicate wells and in a blank well containing no antigen (ODn) to measure non-specific reactions, as previously described. Individual results were expressed as the ΔOD value calculated using the equation $\Delta OD = OD_x - OD_n$, where OD_x represents the mean of the OD readings in the two antigen wells. A subject was considered as an “immune responder” if the ΔOD result was higher than the mean ΔOD + (3 SD) for unexposed individuals (negative control). The threshold of immune response was 0.5 for IgG Ab level to *Ae. albopictus*.

Statistical analysis

Graph Pad Prism Software (San Diego, CA USA) was used to analyse the data. After confirmation of non-normal distribution, a non-parametric Mann-Whitney test was used to compare Ab levels between two independent groups, and a non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparisons between more than two groups. All differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Individual IgG response to *Ae. albopictus* saliva before and after mosquito control measures.

The proportion (%) of immune responders and the individual anti-saliva IgG level (Figure 1) were compared before (T0) and after the vector control strategies (deltamethrin pulverisation and elimination of positive breeding sites), at T2, T4, T6 time-periods. For T0, T2 and T4 visits, the % of immune responder were 86%, 80% and 77%, respectively. No difference was observed in the % of immune responder and the level of specific IgG at T2 and T4 compared to T0. In contrast, a significant decrease of % of immune responders was observed at T6 (65%) compared to T0 ($P = 0.0006$). This trend was also observed for the level of anti-saliva IgG level. Indeed, despite of intra-individual variation, no difference was observed between the three first visits with median values at 0.850, 0.860 and 0.720, respectively and a significant drop of specific IgG level was observed at T6 (median value=0.6200, compared to T0 ($P = 0.0006$)). This decrease of specific IgG observed at T6 is also significant when compared to T2 and T4 periods ($P = 0.0018$ and 0.0328 , respectively).

The impact of vector control on the immunological results was assessed according to the initial level of specific IgG. For these reasons, three groups of immune responder were defined arbitrary according to the cut off value of specific IgG level initially observed at T0: low ($0.50 \leq \Delta OD \leq 0.70$), medium ($0.80 \leq \Delta OD \leq 1.15$), and high ($1.19 \leq \Delta OD \leq 3.12$). At T0, the percentages of immune responders in these three groups were 29%, 24%, and 47%, respectively. The evolution of the anti-saliva IgG level in each “immune responders” group was checked during all the follow up (T0 to T6, Figure 2). For the low group (Figure. 2A), a decrease of anti-saliva IgG level is observed earlier, at the T2 period ($P = 0.0482$ compared to T0) and then IgG level appeared to progressively decreased from T2 to T6. This decrease is also significant when comparing the T4 period to T0 ($P = 0.0057$) and the T6 to T0 ($P = 0.0328$).

For medium (Figure 2B) and high (Figure 2C) immunological group, a significant decrease of the % of immune responder and the level of Ab response were observed at T4 and T6 period, respectively ($P = 0.0262$ and 0.0008 , compared to T0, respectively). Taken together, these results suggest that the decrease of specific IgG level after vector control appeared to be time-dependent, according to the initial level of specific Ab. The beginning of decrease was earlier (2 weeks) for individuals presenting initial low level of IgG Ab and was later for individuals with medium (4 weeks) and high (6 weeks) Ab level.

The random effect of age and sex on the development of IgG response was analysed. The population was then divided in three arbitrary groups of age: 18-35, 36-50 and > 55 years old (Figure 3). At T0 period, no significant difference was observed in the anti-saliva IgG level

between the 3 groups. The percentage of immune responder in each group was very high, 88%, 89% and 83%, respectively. In each group of age, the evolution of the anti-saliva IgG level was evaluated from T0 to T6. For 18-35 age group, no significant decrease is observed from the T0 period to T6 (Figure 3A). The T6 period is marked by a significant decrease of IgG level for both 36-50 (Fig. 3B) and > 55 (Fig. 3C) years age groups, compared to T0 ($P = 0.0115$ and 0.0107 respectively). The percentage of males and females in the studied populations were 41% and 59% respectively. Similar decrease of the median of IgG level from T0 to T6 was observed between males and females (Table 1) suggesting that the decrease of Ab level was not dependent to the gender of individuals. Also, analysis indicates that there is no random effect of district in the acquisition of IgG response against *Ae. albopictus* SGE.

Entomological data and rainfall

In order to compare immunological results with the entomological parameters, the evolution of *Ae. albopictus* adult density, the Breteau and House Indices and the number of breeding sites with larvae and/or pupae were presented in studied households and during the follow-up period (Figure 4, Table 1). The majority of positive breeding site was artificial and constituted by saucers (48%) and small containers (40%). The number of houses with positive breeding sites (House index) and the number of breeding sites decreased progressively from T0 to T6 (37% to 10%). The number of positive houses was 38, 20 and 12 at T0, T2 and T4, respectively and the number of breeding sites was 90, 36 and 20 at T0, T2 and T4 respectively. Slight decrease of positive house is noticed two weeks after mosquito control measures, while by the same time a considerable reduction of the number of breeding sites is observed. At T6, this decrease is very marked with only 5 breeding sites in 5 houses (Table 1). The adult trapping between the two districts of St-Denis are different (F-Test, $p=0.0077$) and no significant decrease of adult density is observed after deltamethrin treatment. The evaluation of *Ae. albopictus* adult density showed a peak at T2, corresponding to the highest observed rainfall in the studied site, and then decrease at T4 and T6 periods compared to T2 and T0 (Figure 4). The Breteau index decreased only at T6 whereas no difference was observed for T2 and T4 compared to T0.

Discussion

In this study, the human Ab response to *Ae. albopictus* whole saliva was investigated in adult individuals before and after two, four and six weeks after vector control measures.

In the whole population, the proportion of immune responders was high before and two, four weeks after vector control. A significant decrease of the percentage of immune responders is noticed at six weeks (T6). The same pattern of evolution was also observed with respect to entomological data. The evaluation of *Ae. albopictus* immature and adults stage indicated high density of vector population at the periods of T0, T2, and followed by a decrease at T4 and T6 period. These results point to an association between the entomological data and anti-saliva IgG Ab level. Indeed, the percentage of immune responders and the specific IgG level at each visit was associated with the intensity of exposure to *Ae. albopictus* bites as evaluated by entomological methods. These results confirm the validity of the evaluation of anti-saliva IgG response as an immuno-epidemiological marker for *Ae. albopictus* exposure. These results are consistent with previous data indicating the potentiality to use human Ab response for evaluating the exposure to vectors bites (Poinsignon *et al.*, 2009; Clements *et al.*, 2010).

We addressed the potentiality to use the Ab response against *Ae. albopictus* salivary proteins to monitor vector control measures in aiming to reduce the human contact with *Ae. albopictus* by insecticide spray and breeding sites elimination. In this study, a significant decrease of *Ae. albopictus* population (immature and adults) is noticed at T6 period coinciding with the drop of the anti-saliva IgG response at the whole population level. Similar results has been reported according the use of protection tools (Clements *et al.*, 2010; Drame *et al.*, 2010a; Drame *et al.*, 2010b) suggesting that the application of deltamethrin had an impact on *Ae. albopictus* population density at least six week after. In regard to most pyrethroid insecticides, deltamethrin has a powerful repulsive effect and is an effective mosquito killer. One can speculate that its effect should be apparent earlier in *Ae. albopictus* density since no resistance to this insecticide has been reported in Reunion Island. Before the decrease of *Ae. albopictus* density at T6, a considerable drop of rainfall is observed at T4 period which is susceptible to influence the development and abundance of *Ae. albopictus* density (Delatte *et al.*, 2009). Therefore the impact of rainfall decrease could, induce a possible confusion about the deltamethrin effect on *Ae. albopictus* population density. To better understand the evolution of specific IgG response, relating the level of exposure to *Ae. albopictus*, after vector control, the studied population was arbitrary divided in three groups of immunological responders (according to IgG level), correspond therefore to 3 groups with different intensity of exposure to *Ae. albopictus* bites: low, medium and high. For all groups, the same trend of Ab decrease is observed at T6 period compared to T0. Interestingly, for the group of low immune responders, a significant decrease is observed earlier at the periods T2 then T4, so only two

and four weeks after anti-vector control intervention. This decrease was observed at T4 for medium group and only at T6 for high group of Ab level. This result indicated that a rapid decrease of the level of specific IgG level could be observed in individuals presenting low initial level of exposure to *Ae. albopictus* bites. The use of such biomarker could be therefore evaluated a short-time period efficacy of vector control in this particular context. During the T2 period, a significant increase in rainfall was observed in comparison to T0 which indicates that the observed decrease of anti-saliva IgG response could be related to the deltamethrin application and destruction of breeding sites. The estimation of human Ab response to *Ae. albopictus* salivary proteins could provide a potential tool for evaluating the immediate impact of vector control program in the case of low level exposure, whereas the decrease of *Ae. albopictus* population density was not detected by the current entomological indicators. Previous investigations indicated the usefulness of human or animal Ab response against vector salivary proteins in monitoring the efficacy of vector control program based on insecticide treatment or the use of insecticide treated net and this whatever the density of vector population (Clements *et al.*, 2010; Drame *et al.*, 2010a; Drame *et al.*, 2010b; Schwarz *et al.*, 2011). Nevertheless, the present study indicated the possibility to use the anti-saliva Ab response for monitoring vector control program in the case of low level of exposure to *Ae. albopictus*, for example when surveying recently colonised area. The results indicated also that the best time-period for evaluating the efficacy of vector control against *Ae. albopictus* could be a choice according to the initial level of human mosquito exposure: from 2 weeks after vector control for low exposure to 6 weeks for high intensity of exposure to bites. In such area, classical entomological methods may lack of sensibility in detecting vector presence or population density fluctuation. However, in many endemic areas, *Ae. albopictus* is found in high density, and some improvement of such tools may be needed to detect the decrease of vector density earlier after the action of vector control. These can be done by the measure of more appropriate isotype like IgE and IgG4. For example, the measure of IgG4 has been used to detect intense exposure to *Aedes* bites (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994). Also by the evaluation of Ab response to specific antigenic salivary proteins (Drame *et al.*, 2010a). In this study, no difference was observed in the anti-saliva IgG response according to different age groups at T0. After the deltamethrin application, a decrease of IgG response is observed for the age groups of 36-50 and > 50 years age at T6, compared to T0. It indicated that this biomarker could not be valid whatever the age of individuals. However, previous study showed that *Anopheles* saliva biomarker was pertinent for evaluating malaria vector

control in all studied age groups (Drame *et al.*, 2010a). Other factors like human behaviour, may also be investigated to elucidate this difference of response according to age groups. Indeed, it can not be excluded that the group of 18-35 years may be constituted by the most active individuals of the population, otherwise, which can be potentially exposed to *Ae. albopictus* during the day in places other than the studied households. This group of “active population” in whom the vector control seems to have limited impact could constitute a population at high risk during outbreaks of arbovirus. It could be also interesting to evaluate the efficacy of control strategy in youngest population like children generally more sensitive to arthropod-borne diseases.

However, we cannot dismiss the hypothesis of potential cross-reactivity of IgG response to others mosquito salivary proteins, by evaluating in the present study, the Ab response against *Ae. albopictus* whole saliva. Indeed, some salivary proteins are species or genus shared and therefore, one salivary protein or peptide specific to *Ae. albopictus* should be identified to improve the usefulness of this potential tool. This perspective is currently under investigations as previously developed for malaria vectors. Indeed, one salivary peptide of *Anopheles* gSG6 protein has been shown to be pertinent for evaluating vector control strategy (impregnated bednet) in malaria endemic area (Drame *et al.*, 2010a). This salivary peptide has shown a high sensibility to detect human-vector contact with *Anopheles*, and this peptide approach can be beneficial for the detection of IgG level in individual highly exposed to *Ae. albopictus* bites.

Altogether, these results suggest that the measurement of human Ab response to *Ae. albopictus* salivary proteins could provide a reliable biomarker for evaluating the efficacy of vector control and strengthen the general approach to use Ab response to salivary antigens for evaluating the quantitative human exposure to mosquito bites.

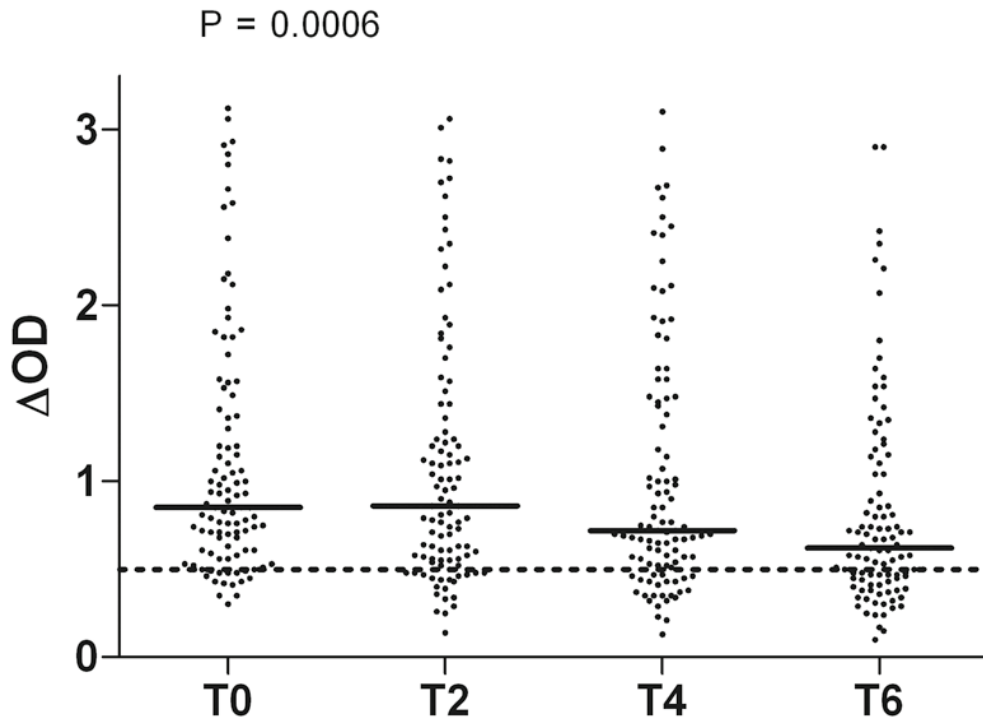


Figure1. Evolution of individual IgG response to *Ae. albopictus* SGE before and after deltamethrin spray.

Individual IgG Ab responses are represented by ΔOD . Bars indicate median value and the dotted line represents the threshold of positive specific Ab response to *Ae. albopictus* SGE ($\Delta OD=0.5$).

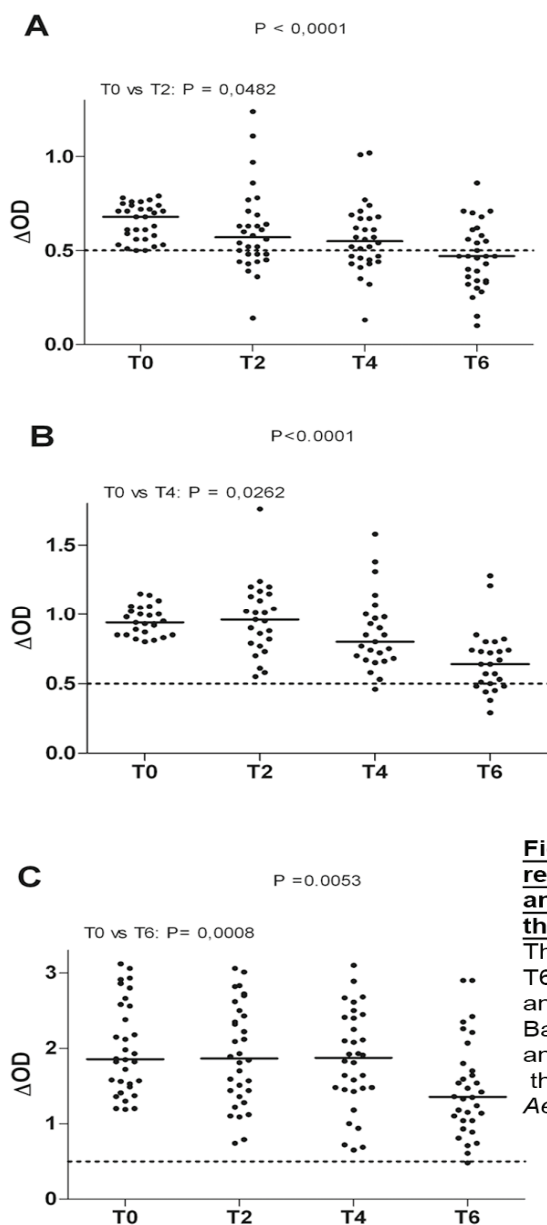


Figure 2. Evolution of individual IgG response to *Ae. albopictus* SGE before and after deltamethrin spray according to three groups of exposure.

The results IgG Ab level between T0 and T6 were presented for low (A), medium (B) and high (C) groups of "immune responders". Bars indicate median value in each group and the dotted line represents the threshold of specific Ab response to *Ae. albopictus* SGE ($\Delta OD=0.5$).

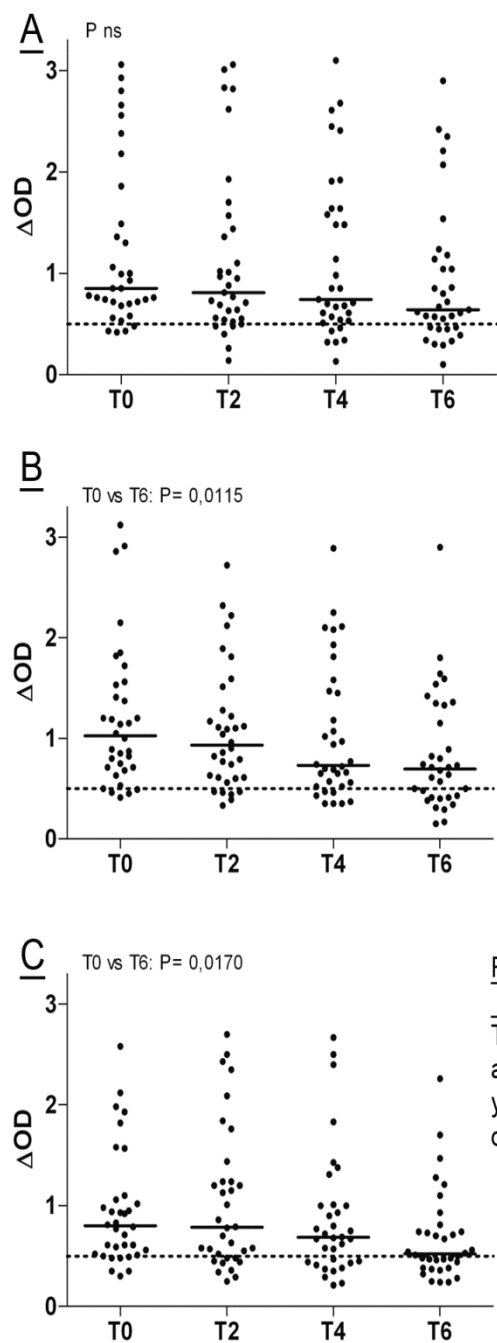


Figure 3. Evolution of individual IgG response to *Ae. albopictus* SGE before and after deltamethrin spray according to age.

The results IgG Ab level between T0 and T6 were presented according to the 3 groups of age: 18-35 (A), 36-50 (B) and ≥ 55 year-old (C). Bars indicate median value in each group and the dotted line represents the threshold of specific Ab response to *Ae. albopictus* SGE ($\Delta OD=0.5$).

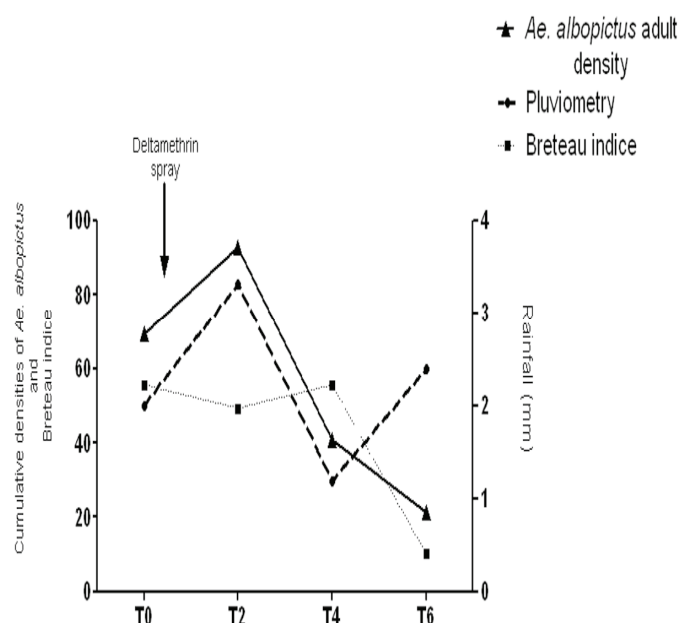


Figure 4. Evolution of the entomological indices and the rainfall according to the studied period

The entomological data of exposure to *Ae. albopictus*, i.e. intensity of *Ae. albopictus* adult (solid line dark triangle) and Breteau indice (fine dotted line) in the studied households and the rainfall intensity in the studied site (dotted line dark point) are presented according to the time-point. The timing of vector control intervention (deltamethrin spray) is indicated.

Table 1: Entomological parameters and IgG Ab median level

	T0	T2	T4	T6
Number of visited houses	162	55	65	49
Number of 90 positive breeding sites		36	20	5
House indice*	23.4%	6.8%	18.5%	10.2%
Breteau indice*	55.5	49.3	55.5	10.2
Total population	0.850	0.860	0.720	0.620
IgG median	[0.300-3.120]	[0.140-3.060]	[0.130-3.100]	[0.100-2.900]
Males	0.740	0.770	0.650	0.550
IgG median	[0.350-2.930]	[0.260-3.010]	[0.290-2.680]	[0.150-2.350]
Females	0.860	0.860	0.720	0.630
IgG median	[0.300-3.120]	[0.140-3.060]	[0.130-3.100]	[0.100-2.900]

House indice: poucentage of psositive house

Bretau indice: number of positive containers per 100 houses inspected.

References

1. Knudsen, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia* 37, 91-7 (1995).
2. Gratz, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 18, 215-27 (2004).
3. Gubler, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33, 330-42 (2002).
4. Gould, E. A., Gallian, P., De Lamballerie, X. & Charrel, R. N. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 16, 1702-4 (2010).
5. Tan, C. H. et al. Entomological investigation and control of a chikungunya cluster in Singapore. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 383-90 (2011).
6. Barbazan, P. et al. Assessment of a new strategy, based on *Aedes aegypti* (L.) pupal productivity, for the surveillance and control of dengue transmission in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 102, 161-71 (2008).
7. Focks, D. A. & Chadee, D. D. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. *Am J Trop Med Hyg* 56, 159-67 (1997).
8. Focks, D. A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors. World Health Organization TDR/ IDE/Den/03.1 (2003).
9. Schwartz, B. S. & Goldstein, M. D. Lyme disease in outdoor workers: risk factors, preventive measures, and tick removal methods. *Am J Epidemiol* 131, 877-85 (1990).
10. Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M. & Goldstein, M. D. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132, 58-66 (1990).
11. Schwarz, A. et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e532 (2009).
12. Schwarz, A. et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 39, 1021-9 (2009).
13. Brummer-Korvenkontio, H. et al. Detection of mosquito saliva-specific IgE antibodies by capture ELISA. *Allergy* 52, 342-5 (1997).
14. Brummer-Korvenkontio, H. L., P. Reunala, T. Palosuo, T. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG₄ antibodies by immunoblotting. *Allergy and Clinical Immunology* 93, 551-5 (1994).
15. Poinsignon, A. et al. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. *Malar J* 8, 198 (2009).
16. Poinsignon, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One* 3, e2472 (2008).
17. Poinsignon, A. et al. First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. *Trop Med Int Health* 15, 1198-203 (2010).
18. Clements, M. et al. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 82, 801-7 (2010).
19. Marzouki, S. et al. Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 84, 653-61 (2011).
20. Souza, A. P. et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e649 (2010).
21. Teixeira, C. et al. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e638 (2010).
22. Reunala, T. et al. Frequent occurrence of IgE and IgG₄ antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol* 104, 366-71 (1994).
23. Remoue, F. et al. IgE and IgG₄ antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop* 104, 108-15 (2007).
24. Drame, P. M. et al. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS One* 5, e15596 (2010).
25. Drame, P. M. et al. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to

- evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *Am J Trop Med Hyg* 83, 115-21 (2010).
26. Schwarz, A. et al. Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. *Int J Parasitol* (2011).
27. Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A. & Fontenille, D. 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 (2009).

Principaux résultats

Caractéristiques de la réponse IgG anti-salive d'*Ae. albopictus* à T0

Au début de l'étude, à T0, nous avons noté un fort pourcentage de répondeurs en IgG spécifique (83%). L'ensemble des répondeurs a été divisé en trois groupes de répondeurs, en fonction de leur niveau de réponse IgG anti-salive : faible, moyen et fort. Ces trois groupes correspondraient à différents niveaux d'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus*, comme précédemment décrit. Le pourcentage de répondeurs dans chaque groupe d'exposition est de 29%, 24% et 47%, respectivement. L'analyse statistique montre qu'à T0, cette réponse IgG ne dépend pas de l'âge et du sexe des individus.

Evolution de la réponse IgG anti-salive de T0 à T6

En considérant l'ensemble de la population, nos résultats ne montrent aucune variation des taux d'IgG spécifiques entre avant LAV (T0) et 2 semaines après (T2). Une baisse significative du niveau des IgG anti-salive est notée progressivement de T2 à jusqu'à 45 jours (T6) après la mise en place de la LAV. Cette baisse coïncide également avec une diminution de la population d'*Ae. albopictus* mesurée par les méthodes entomologiques classiques. Ces résultats indiquent que la mesure de la réponse IgG anti-salive pourrait servir d'outil de mesure de l'efficacité de la lutte anti *Ae. albopictus*, et ceci à court terme (soit seulement 15 jours après LAV). Ce résultat est d'autant plus important qu'il n'est pas âge ou sexe-dépendant. Mais cependant, à ce stade, il est impossible de s'avoir qu'elle est l'efficacité de la LAV du moment qu'il a été noté dans la zone d'étude une importante baisse de la pluviométrie. Cette baisse des précipitations est susceptible d'influencer la densité vectorielle et d'être confondant à l'effet de la LAV.

L'étude plus approfondie de cette réponse IgG montre une évolution différente en fonction des trois groupes d'exposition. La chute du niveau des Ac IgG anti salive survient très tôt, à T2, chez les individus faiblement exposés, ce qui confirme la tendance déjà observée au sein de l'ensemble de la population. Cette baisse de la réponse IgG anti-salive à T2, période où aucune variation significative de la pluviométrie n'est observée, n'a pu être détectée par les techniques entomologiques classiques. Cette évolution de la réponse IgG spécifique a aussi été étudiée en fonction des différentes classes d'âge. Contrairement à l'ensemble de la population chez qui nous notons une baisse du niveau de réponse à T6, chez les individus entre 18-35, aucune baisse de la réponse IgG anti-salive n'est observée et cela tout au long de

l'étude contrairement aux individus plus âgés chez qui une baisse de la réponse IgG est observée au bout de six semaines.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons mis en exergue la possibilité d'utiliser les Ac anti-salive totale afin d'évaluer l'efficacité de la lutte anti-*Ae. albopictus*. Ceci constitue une première approche qui nécessite confirmation afin de s'affranchir de facteurs de biais, telle que la pluviométrie. De plus, nous avons montré qu'elle serait très adaptée dans des contextes de faible exposition aux piqûres des vecteurs. Ces résultats suggèrent également que la lutte menée sur l'Ile de La Réunion pourrait être efficace sur le contact homme-vecteur, dès deux semaines après sa mise en place. Avec les techniques d'évaluation classiques, il est impossible de détecter cette efficacité en un temps aussi court. Cette précocité de réponse de notre approche à détecter la baisse de la population vectorielle est le signe de la labilité des Ac IgG anti salive donc de sa sensibilité. Ceci est une indication de sa potentialité à détecter les faibles expositions de même que les faibles fluctuations des densités vectorielles. Ces caractéristiques font que ce potentiel bio-marqueur pourrait être un outil pertinent pour évaluer l'efficacité de la LAV.

L'autre aspect important soulevé au cours de cette étude concerne l'efficacité de la lutte contre un vecteur diurne comme certains *Aedes* dont *Ae. albopictus*. Nous avons montré que chez la catégorie de population la plus active dont la fréquence de déplacement hors de la zone est susceptible d'être beaucoup plus importante, il est difficile ou quasi-impossible d'arriver à une protection efficace contre la piqûre du vecteur. Ceci permet, dans une certaine mesure, d'identifier les individus les plus à risque d'infection.

Discussion

Les travaux décrits dans ce mémoire ont porté sur l'utilisation de la réponse anticorps anti-salive d'*Aedes*, chez l'homme, comme indicateur d'exposition aux piqûres des *Aedes* en tenant compte de facteurs épidémiologiques liés à l'âge, le sexe et de facteurs entomologiques, tels que la densité de population des vecteurs. Nous avons également étudié la spécificité de cette réponse Ac et dans quelle mesure elle pourrait être utilisée comme un bio-marqueur spécifique de l'exposition à *Ae. albopictus*. Afin d'optimiser l'utilisation de ce potentiel bio-marqueur, nous avons développé une stratégie immuno-protéomique qui nous a permis de comparer l'immunogénicité des protéines salivaires d'*Ae. albopictus* en fonction de l'intensité et de la nature de l'exposition. Cette étude a été l'occasion d'identifier des protéines salivaires antigéniques comme potentiels candidats bio-marqueur d'exposition spécifiques aux *Aedes*. Nos travaux ont également abordé l'application de ces biomarqueurs dans le cadre de la lutte pour prévenir la transmission des arbovirus par *Ae. albopictus*.

6-1 Réponse IgG anti-salive, biomarqueur d'exposition aux piqûres des *Aedes*

De précédents travaux avaient déjà montré que l'évaluation de la réponse Ac anti-salive pouvait servir d'indicateur d'exposition aux piqûres d'*Aedes*. La plupart de ces travaux ont été réalisés dans un contexte particulier. Dans les pays du Nord, ces travaux ont porté sur l'étude des mécanismes allergiques et de la désensibilisation allergique, induites par la piqûre du moustique *Aedes* (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2002). Les investigations menées en zone tropicale avaient essentiellement pour but d'estimer le niveau d'exposition aux piqûres et le risque de transmission de pathogènes (Remoue *et al.*, 2007).

L'intérêt et la pertinence de nos travaux se situent à plusieurs niveaux. Ces études sont les premières du genre à avoir pour cadre des zones à fort risque de transmission des virus de la dengue (Bolivie) et du chikungunya (Ile de La Réunion). Elles ont tenu compte de paramètres tels que l'hétérogénéité de l'âge de la population d'étude. Elles ont révélé et à établir une corrélation entre la réponse Ac anti-salive et la densité des vecteurs *Aedes* présents dans la zone d'étude. L'originalité de notre approche était également d'intégrer l'étude de populations spécifiquement exposées aux piqûres d'*Ae. albopictus* ou d'*Ae. aegypti*. L'incorporation de l'ensemble de ces paramètres nous a permis de définir certaines caractéristiques de ce potentiel bio-marqueur d'exposition aux piqûres d'*Aedes*.

6-1-1 Sensibilité de la réponse Ac anti-salive d'*Aedes*.

Pour nos deux terrains d'étude, nous avons pu mettre en évidence de forts pourcentages de répondeurs en IgG spécifique. En Bolivie, nous notons que 59% des individus développent une réponse IgG anti-salive d'*Ae. aegypti* alors que ce taux atteint 88% à La Réunion où la population est en contact avec un seul *Aedes* : *Ae. albopictus*. Ces résultats confirment ainsi ceux précédemment obtenus au cours d'autres investigations qui ont porté sur l'étude de la réponse Ac anti-salive d'*Aedes* (Remoue *et al.*, 2007) mais également sur d'autres arthropodes vecteurs de maladies comme le paludisme (Remoue *et al.*, 2006) et la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) (Poinsignon *et al.*, 2008b). Nous avons montré qu'il est possible d'utiliser la réponse IgG anti-salive afin de détecter le contact de l'homme avec les moustiques du genre *Aedes*. Cependant, cet aspect à lui seul ne permet pas de valider l'utilisation de ce potentiel bio-marqueur. En effet, au-delà de la simple détection de l'exposition, il est aussi nécessaire d'appréhender l'intensité de la réponse Ac et le pourcentage de répondeurs par rapport aux données entomologiques de la zone d'étude. En d'autres termes, il est nécessaire d'étudier la sensibilité de la réponse Ac anti-salive en vue de son utilisation comme bio-marqueur d'exposition. A cet effet, l'originalité de notre investigation en Bolivie, à la différence de plusieurs autres études ayant porté sur la réponse Ac anti-salive d'*Ae. aegypti*, est qu'elle a comparé les paramètres entomologiques avec l'évaluation de la réponse IgG anti-salive. En se basant sur le décompte des stades immatures, nous avons pu établir des proxy d'exposition aux piqûres d'*Ae. aegypti* : E1 et E2. Ces estimations ont été définies de façon qu'elles indiquent le risque immédiat d'exposition à *Ae. aegypti* mais aussi le risque lié à une exposition de longue durée à *Ae. aegypti*. La division de chaque paramètre en cinq groupes d'intensité d'exposition croissante a permis d'affiner la mesure du degré d'exposition.

Nous avons pu montrer que le niveau de la réponse IgG anti salive était en fonction de l'intensité d'exposition à *Ae. aegypti* avec une augmentation significative de la réponse Ac anti-salive chez les individus les plus exposés (groupe 5).

L'absence de différence significative entre les quatre premiers groupes pourrait être due à la sensibilité relativement faible des techniques entomologiques utilisées pour évaluer l'exposition entre ces groupes. Ou alors, ce bio-marqueur basé sur la salive totale serait peut-être trop sensible pour évaluer quantitativement l'exposition aux piqûres des *Aedes*. Ces résultats rendent ainsi compte de la sensibilité de notre approche, la mesure de la réponse Ac anti-salive, et ils sont d'autant plus pertinents que la corrélation a été faite avec des données entomologiques rapportées par individu. Cette estimation est beaucoup plus précise que celle

obtenue avec les indices classiques tels que l'indice Breteau ou indice maison renforçant ainsi la sensibilité de détection obtenue avec la mesure de la réponse Ac anti-salive (Focks & Chadee, 1997).

Sur la base de ces constatations, nous pensons que les différentes intensités de réponse IgG anti salive d'*Ae. albopictus* observées à La Réunion correspondraient à différents niveaux d'exposition aux piqûres de ce vecteur. Cette hypothèse s'appuie non seulement sur les observations faites en Bolivie mais aussi, sur l'étude d'autres vecteurs tels que les *Anopheles* (Poinsignon et al., 2009). Ce résultat semble être en accord avec les données d'exposition à *Ae. albopictus* de l'Ile de La Réunion se caractérisant par une abondance des gîtes de reproduction d'*Ae. albopictus* (Delatte et al., 2008).

L'étude plus poussée de la sensibilité nous a amené à intégrer des individus non exposés ni à *Ae. albopictus* ni à *Ae. aegypti*. Ces témoins (Nord de la France), susceptibles d'être non exposés à ces espèces d'*Aedes*, ne développent aucune réponse Ac IgG contre les protéines salivaires d'*Ae. aegypti* ou d'*Ae. albopictus*. Ce même profil de réponse IgG a été aussi observé chez des individus non exposés aux piqûres des glossines (Poinsignon et al., 2008b). Cette absence totale de réponse Ac spécifique chez les non exposés indique à quel point notre test peut être sensible pour la détection des Ac IgG anti-salive d'*Aedes* et indique, dans l'absolu, qu'il serait possible d'identifier des individus exposés ou non aux piqûres des *Aedes*. Ce résultat apparaît pertinent dans l'élaboration d'un test diagnostique identifiant l'exposition ou non aux piqûres des moustiques, et donc un indicateur de risques de transmission des arboviroses. Cet outil serait particulièrement intéressant pour un bio-marqueur applicable aux voyageurs revenant de zones d'exposition aux *Aedes* vecteurs. Ceci est également une indication supplémentaire que les faibles intensités de réponse Ac anti-salive d'*Ae. albopictus* décrites chez la population Réunionnaise, dont la majorité dépasse à peine le seuil de positivité, sont induites par des niveaux d'exposition très faibles aux piqûres des vecteurs montrant ainsi le potentiel de notre outil à détecter les faibles expositions. Cette possibilité de mettre en évidence les faibles expositions aux piqûres des vecteurs a été déjà présentée par l'emploi de bio-marqueurs salivaires (Poinsignon et al., 2009; Schwarz et al., 2009b)

6-1-2 Spécificité de la réponse IgG anti-salive d'*Aedes* : vers un biomarqueur spécifique d'espèce?

Le degré de spécificité d'un biomarqueur est un élément clé pour son utilisation en vue d'évaluer l'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs. Des travaux ayant porté sur d'autres vecteurs tels que les phlébotomes (Drahota et al., 2009) ont permis de cerner cet

aspect et de poser définitivement l'existence d'une spécificité d'espèce de la réponse Ac anti-salive. Au cours de nos études, en nous appuyant sur une population non exposée, nous avons montré l'incapacité de ces individus à produire une réponse IgG contre les protéines salivaires d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti*. Cette absence de réponse indique, dans une certaine mesure, la spécificité de notre test à détecter les Ac IgG anti-salive d'*Aedes* d'autant plus que ces individus ont été certainement exposés aux piqûres d'autres *Culicidae* et même d'autres *Culicinae* tels que les *Culex*. Dans l'absolu, ce résultat indique qu'il est possible de distinguer des individus exposés aux piqûres des *Aedes*.

La pertinence d'un biomarqueur dépend aussi de son potentiel à discriminer l'exposition entre espèces d'un même genre. Par exemple *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* sont deux moustiques génétiquement très proches. Nous avons voulu explorer si la réponse Ac IgG développée contre les protéines salivaires d'*Aedes* pouvait servir à discriminer l'exposition entre ces deux vecteurs au sein des populations Réunionnaise et Bolivienne. Nos résultats ont mis en évidence un faible pourcentage de réaction croisée contre les protéines d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* au sein des populations Réunionnaise et Bolivienne, respectivement. Aussi, la majorité des réponses positives observées avec ces ELISA hétérologues ne sont que de très faible intensité et observés majoritairement chez les individus présentant un haut niveau d'Ac spécifique (homologue). Ce résultat, pourtant obtenu à partir d'extraits totaux des glandes salivaires, est d'autant plus important que ces deux vecteurs ont un répertoire de protéines salivaires très proche (Arca *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). Cette faible réaction croisée observée peut être le fruit de l'historique de l'exposition aux piqûres des *Aedes*. En effet, malgré le fait que le répertoire protéique est identique entre ces deux moustiques, on ne peut pas exclure l'existence d'épitopes différents et spécifiques d'espèce sur des protéines identiques aux deux espèces. Par exemple, il a été montré dans le cadre des allergies induites par la salive d'arthropodes que certains individus étaient capables de développer une réaction allergique de type immédiate très forte à la piqûre de *Cimex lectularius* alors que la piqûre de *Cimex rotundatus* n'induisait aucune réaction allergique chez ces mêmes individus (Hase, 1916). Dans ce registre, il a aussi été montré de façon expérimentale que l'injection d'extraits salivaires d'*Ae. aegypti*, bien qu'étant capable d'induire une sensibilisation contre *Ae. atropalpus*, *Ae. excrucians* et *Ae. flavescens*, ne provoque, chez le lapin, aucune réaction contre *Ae. campestris*, *Ae. canadensis*, *Ae. fitchii*, *Ae. hexodontus*, *Ae. nearcticus*, *Ae. nigripes* et *Ae. vexans* (McKiel, 1959). Ces deux exemples illustrent parfaitement l'existence d'antigènes salivaires dont l'immunogénicité peut être spécifique d'espèce ou de genre.

Cependant, en zone endémique, ce qui est le cas dans notre étude, la diversité et l'intensité de l'exposition peuvent influencer la réponse Ac anti-salive, d'où la nécessité de replacer l'interprétation de ces résultats dans un contexte « d'exposition répétée » et donc où les individus peuvent présenter un important « historique d'exposition », au fur et à mesure des années. En effet, il n'est pas à exclure que l'exposition répétée soit à l'origine d'une sélection plus ou moins importante d'épitopes spécifiques d'espèce et expliquer ainsi la faible réaction croisée observée dans la réponse Ac contre la salive de ces deux vecteurs. Ce phénomène, absence ou faible réaction croisée de la réponse Ac anti-salive, en cas d'exposition répétée, a déjà été décrit de façon expérimentale chez des souris qui développent une forte réaction Ac IgG contre les extraits salivaires de *P. sergenti* alors qu'elles ne produisent aucune réponse Ac contre les protéines salivaires de *P. arbicus* et *P. papatasi* (Drahota *et al.*, 2009). L'ensemble de ces observations indique la possibilité d'une réponse Ac anti-salive spécifique d'espèce même en cas d'exposition répétée aux piqûres de vecteurs comme c'est le cas pour nos populations d'étude qui non seulement sont soumises aux piqûres des *Aedes* mais aussi à des vecteurs d'autres genres, tels *Culex* et *Anopheles*. Cette réponse Ac anti-salive spécifique d'espèce est une indication sur la possibilité de développer un bio-marqueur spécifique d'espèce. Disposer d'un bio-marqueur d'espèce peut se révéler d'un grand intérêt quand on sait que différentes espèces d'*Aedes* avec différentes capacités vectorielles peuvent se retrouver en sympatrie dans une même zone, comme c'est le cas dans une partie de l'Afrique Centrale (Paupy *et al.*, 2010). Un bio-marqueur spécifique d'espèce permettrait de mesurer non seulement l'exposition à chaque espèce mais aussi éventuellement d'estimer la contribution de chaque espèce à la transmission des pathogènes.

6-1-3 Hétérogénéité de la réponse Ac anti-salive, diversité de l'exposition aux piqûres des *Aedes*

Au sein d'une population naturellement exposée aux piqûres des vecteurs, il est logique de penser à des différences d'intensité de réponse Ac contre les protéines salivaires, entre individus d'une même zone. Ces différences peuvent être induites par une hétérogénéité de l'exposition aux piqûres des vecteurs ou alors influencées par d'autres facteurs (âge, facteurs génétiques, facteurs socio-économiques) dont pourraient être tributaires l'utilité et la pertinence d'un bio-marqueur. Au sein de la population Bolivienne très hétérogène, l'âge des sujets d'étude peut être un facteur induisant des disparités au niveau de la réponse Ac anti-salive d'*Ae. aegypti*. Nous notons une forte proportion de répondeurs chez les individus âgés de moins de 14 ans. L'intensité de la réponse Ac IgG est également beaucoup plus importante

chez cette catégorie de la population. A partir de l'âge de 15 ans, ces deux paramètres immunologiques décroissent de façon très importantes pour se stabiliser à partir de 25 ans. Ces résultats indiquent clairement une différence de réponse Ac anti-salive, en fonction de l'âge, au sein de cette population très hétérogène. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible qu'il a été montré chez de jeunes enfants, vivant en zone tempérée, un pic de production d'Ac IgG et IgE entre 1 et 6 mois et 6 et 12 mois, respectivement (Peng *et al.*, 2004).

Toutefois, pour mieux évaluer cette différence de réponse Ac anti-salive, il est nécessaire d'analyser cette question sous un autre angle en considérant i) la complexité de la réponse immunitaire contre les antigènes salivaires qui peut aller d'une réaction allergique à une désensibilisation, ii) le contexte de l'étude. En considérant ces deux aspects, nous pouvons logiquement penser que les observations de Peng et al (Peng *et al.*, 2004), décrites un peu plus haut peuvent être amoindries au sein de notre population d'étude pour diverses raisons : i) le déclin de la réponse Ac intervient rapidement, à 5 ans, après le pic observé au bout de 6 et 12 mois. La proportion d'individus de moins de 5 ans représente moins de 2% de notre population d'étude, donc il est tout à fait plausible que la majorité des individus de moins de 14 aient déjà dépassé ce stade où la réponse Ac est boostée par l'âge. ii) Cette décroissance de la réponse IgG peut se faire de façon très rapide suite à des expositions répétées aux piqûres des vecteurs. Par exemple, les réactions urticantes provoquées par la piqûre finissent par disparaître au bout de quelques mois d'exposition chez des individus initialement naïfs. Aussi, il a été montré en milieu tropical qu'il n'y avait aucune différence significative de la réponse IgG4 et IgE anti-salive en fonction de l'âge chez des enfants de 1 à 6 ans exposés aux piqûres d'*Ae. aegypti* (Remoue *et al.*, 2007). Cette tendance a aussi été observée au sein d'une population japonaise dont l'âge se situe entre 2 semaines et 98 ans et exposée de façon répétée aux piqûres d'*Ae. albopictus*. A partir de 2 ans, aucune différence de la réponse Ac IgG et IgE n'est observée en fonction de l'âge des individus (Konishi, 1990). Tout récemment, en zone de transmission palustre, il a été montré que la réponse IgG dirigée contre un peptide salivaire d'*Anopheles* était beaucoup plus importante chez des individus âgés de plus de 14 ans (adolescents et adultes) comparé à des enfants de moins de 14 ans. Au sein même de cette population d'enfants, on note des différences de réponse entre ceux âgés de 0 à 6 ans qui produisent moins d'Ac que ceux entre 7 et 14 ans (Drame *et al.*, 2010a). Ces évidences indiquent donc que la forte réponse notée chez les jeunes individus pourrait être liée à

l'intensité d'exposition aux piqûres des vecteurs et non à leur particularité à développer une réponse Ac anti-salive surabondante.

Ces résultats indiquent donc que tous les individus d'une même zone d'étude ne sont pas soumis à la même pression d'exposition aux piqûres des vecteurs, certains semblent plus exposés aux piqûres des *Aedes*. Les résultats obtenus sur l'Ile de La Réunion semblent aussi confirmer cette hétérogénéité de l'exposition. Malgré une population d'étude homogène pour l'âge (18-30 ans) et vivant pour la plupart à proximité les uns des autres, on constate qu'il existe de grandes disparités, entre individus au niveau des intensités de réponses Ac développées contre la salive d'*Ae. albopictus*.

Ces résultats, confirment les précédentes investigations qui ont montré que l'intensité de la réponse Ac développée contre les protéines salivaires est en étroite rapport avec l'intensité de l'exposition aux piqûres des vecteurs, aussi bien sur le terrain que lors d'expérimentations en laboratoire. Ces résultats montrent que la mesure de la réponse Ac anti-salive pourrait constituer un outil pour la détection de l'exposition aux piqûres des *Aedes* mais indiquent aussi la sensibilité de cette approche à mettre en exergue l'hétérogénéité de l'exposition au sein d'une même population ou d'une même zone d'étude. De plus, notre méthodologie montre la capacité de ce potentiel bio-marqueur à identifier les groupes d'individus faiblement exposés aux piqûres d'*Aedes*. Ces paramètres ne peuvent être mis en évidence par les méthodes entomologiques actuellement utilisées.

6-2 Quelles implications/applications pour la mesure de l'exposition aux piqûres des *Aedes*?

Nos investigations ont permis de mettre en exergue certains critères indispensables à l'utilisation optimale d'un biomarqueur salivaire. Les propriétés décrites ci-dessus pourraient revêtir un intérêt particulier dans l'évaluation de l'exposition de l'homme aux piqûres des *Aedes*.

- Amélioration de la mesure de l'exposition aux piqûres des *Aedes*

Contrairement à certains vecteurs comme les *Anopheles* dont le contact avec l'homme peut être mesuré indirectement par des techniques de capture de femelles adultes (Le Goff *et al.*, 1997), l'exposition de l'homme aux *Aedes* s'évalue essentiellement par le décompte des stades immatures aquatiques, les stratégies de capture d'adultes étant très imprécises (Focks, 2003). Pour avoir des mesures plus précises de l'exposition, il est obligatoire de procéder à des explorations poussées des gîtes et cela malgré les tentatives d'amélioration de ces méthodes par l'utilisation d'indices portant sur les nymphes (Focks & Chadee, 1997;

Arredondo-Jimenez & Valdez-Delgado, 2006). Mais ces dernières demeurent toujours indirectes et ne peuvent refléter exactement le degré de contact entre l'homme et les *Aedes*. Cette tâche est quasi impossible dans certains contextes notamment quand il s'agit de réservoirs d'eau de très grand volume (Barrera *et al.*, 2006) mais aussi quand la densité des stades nymphaux est faible (Knox *et al.*, 2010). Ces difficultés soulignent la nécessité d'améliorer l'évaluation de l'exposition aux *Aedes* par l'emploi de techniques beaucoup plus faciles dans leur mise en place. Au cours de l'étude menée en Bolivie, nous avons montré que l'utilisation de la réponse Ac anti-salive peut se révéler assez précise pour détecter l'exposition aux piqûres des *Aedes*. De plus, cette méthode de par sa simplicité, pourrait servir à standardiser les techniques d'évaluation. En effet, en fonction des opérateurs et des moyens disponibles, plusieurs procédés peuvent être utilisés pour mesurer le risque d'exposition aux piqûres des *Aedes*. Ces différences dans la procédure d'évaluation aboutissent naturellement à des disparités dans la mesure de l'exposition et finissent par renforcer l'incertitude liée à ces techniques de mesure. L'utilisation de la réponse Ac anti-salive pourrait offrir une alternative pour uniformiser les techniques entomologiques d'échantillonnage et pour mieux mesurer le contact de l'homme et les *Aedes*. En plus, il permettrait de s'affranchir du décompte des stades immatures.

-

- Mise en évidence des faibles niveaux d'exposition aux piqûres des *Aedes*

En plus de ces limites, les techniques d'échantillonnage entomologique ne semblent pas adaptées à détecter les faibles densités des populations de vecteurs. Au cours de nos études, nous avons mis en exergue la potentialité d'utiliser la réponse Ac IgG anti-salive, comme alternative, pour détecter les faibles expositions aux piqûres des *Aedes*. L'utilisation de la réponse Ac anti-salive s'est révélée pertinente pour mettre en évidence l'exposition aux piqûres des *Anopheles* dans un contexte de faible exposition où l'emploi des méthodes classiques peut se révéler hasardeux pour détecter la présence du vecteur (Poinson *et al.*, 2009). Dans cette perspective, nous pensons que l'utilisation de ce potentiel bio-marqueur pourrait constituer une importante avancée pour mettre en évidence les contacts de l'homme et les *Aedes* dans les contextes de faible exposition. Ce cas de figure concerne généralement les zones nouvellement colonisées par les *Aedes* ou les portes d'entrée des vecteurs comme les zones portuaires. Dans ce genre de situation, il est difficile pour les techniques habituelles de détecter la présence du vecteur sur des étendues plus ou moins importantes. Cette tâche est d'autant plus ardue qu'il est quasi impossible de procéder à des captures de moustiques

adultes et que la prospection des gîtes nécessite d'importants moyens humains et matériels (Holder *et al.*, 2010). La sensibilité pour la détection de faible exposition par le bio-marqueur salivaire pourrait être complémentaire des méthodes mises en place dans ce contexte. Au-delà de la surveillance de certaines zones sensibles, la haute sensibilité de ce potentiel biomarqueur pourrait aussi être utile à l'évaluation pertinente d'une lutte anti-vectorielle notamment quand il s'agit de procéder à des programmes d'élimination. La réussite d'une telle campagne nécessite une surveillance constante des risques de ré-infestation par *Aedes* ce qui peut s'avérer difficile avec les moyens de détection et la raréfaction des vecteurs qui pourrait faire suite à un programme d'élimination. La forte sensibilité du bio-marqueur pourrait constituer une alternative pour estimer l'efficacité des programmes d'élimination et surveiller les risques de ré-infestation.

- Intérêt de la mesure de l'hétérogénéité de l'exposition aux piqûres des *Aedes*

Jusqu'à présent, les techniques entomologiques utilisées ne donnent qu'un aperçu global de l'exposition aux piqûres des *Aedes* dans une zone d'étude. Ce procédé ne rend pas compte des disparités de l'exposition et de ce fait, il est difficile d'évaluer correctement les groupes d'individus ou zones les plus à risque de transmission d'arbovirus. Ce facteur, identification des groupes à risque, est important zone endémique puisque les individus les plus exposés aux piqûres de vecteurs sont plus susceptibles d'être infectés (Schwartz *et al.*, 1990; Remoue *et al.*, 2006; Waitayakul *et al.*, 2006). Cette incapacité à identifier les individus les plus exposés aux piqûres des *Aedes* se traduit généralement par une absence de fiabilité quand il s'agit d'estimer le risque de transmission des arbovirus. Par exemple, en zone endémique, les seuils d'alerte basé sur l'indice maison (House Index-HI) se sont révélés inadaptés pour informer du risque de transmission de la dengue (Pontes *et al.*, 2000). L'hétérogénéité de l'exposition montrée par la mesure de la réponse Ac IgG anti-salive pourrait permettre de faciliter l'identification des individus ou groupes d'individus les plus exposés aux piqûres des vecteurs au sein d'une population d'étude. Son apport pourrait être considérable pour les programmes de contrôle quand on sait la difficulté d'identifier les gîtes les plus productifs afin d'arriver à identifier les individus qui seraient les plus exposés aux piqûres des *Aedes*.

Ces études, réalisée en Bolivie et à La Réunion, démontrent qu'il est possible d'utiliser la réponse Ac anti-salive en vue de mesurer l'exposition de l'homme aux piqûres des *Aedes*. Cette technique peut également contribuer à améliorer l'évaluation de l'exposition de l'homme aux vecteurs aussi bien en zone endémique que dans un contexte de faible exposition. Mais en l'état actuel, nos travaux peuvent soulever quelques interrogations. En

effet, même si nous avons montré que l'exposition est corrélée aux données entomologiques, il serait important de savoir jusqu'à quel niveau peut-on parler de faible exposition en utilisant la réponse IgG anti salive. L'emploi de cette technique, peut être trop sensible, ne montrant pas de différence significative entre les groupes d'exposition de 1 à 4. Pour répondre à cette question, il aurait certainement fallu étudier d'autres contextes où l'exposition aux *Aedes* est moins importante comparée à la Bolivie ou à La Réunion. Les zones récemment colonisées avec une faible densité vectorielle pourraient servir de modèle d'étude pour mieux évaluer la capacité de notre bio-marqueur à évaluer les faibles expositions aux *Aedes*.

En dehors de l'âge, il aurait été intéressant d'étudier d'autres facteurs qui peuvent influencer l'acquisition de la réponse IgG anti salive. L'étude de la réponse IgG contre la protéine salivaire gSG6 d'*Anopheles* a montré une différence de réponse en fonction des groupes ethniques (Rizzo *et al.*, 2011). Cette différence serait due à un déficit fonctionnel des cellules T régulatrices (Torcia *et al.*, 2008) entraînant une forte réponse anti salive chez un des groupes ethniques. Dans notre étude, nous n'avons pas pris en compte ces facteurs génétiques qui peuvent influencer l'intensité de la réponse IgG anti salive. L'étude de tels facteurs pourrait être pertinente pour l'utilisation du bio-marqueur chez les populations africaines qui se caractérisent par une grande diversité génétique (Ramsay *et al.*, 2011).

L'association de méthodes entomologiques aux données épidémiologiques est le plus souvent utilisée pour estimer le risque de transmission d'arbovirus. De ce fait, l'intérêt de nos investigations ne devrait pas se limiter à la détection de l'exposition aux piqûres des *Aedes* mais renseigner dans quelle mesure cette détection pourrait servir à évaluer le risque de transmission. Notre bio-marqueur n'apporte aucune indication à ce propos. Cela est certainement dû aux contextes épidémiologiques dans lesquels nos études ont été réalisées. Aussi bien en Bolivie qu'à La Réunion, notre échantillonnage a été effectué en période post épidémique; dès lors, il est impossible d'établir une quelconque association. D'autres études ont corrélé l'intensité de la réponse anti salive avec la morbidité palustre (Remoue *et al.*, 2006; Waitayakul *et al.*, 2006). Mais dans le contexte des arboviroses, on doit s'interroger sur l'existence d'une association entre la réponse Ac anti salive et la morbidité puisque l'incubation virale est plus courte comparée à une infection parasitaire. Tout de même, des études ont montré une association entre l'infection par la dengue et l'antigénicité des protéines salivaires d'*Ae. aegypti*. Certaines protéines salivaires sont uniquement antigéniques chez des individus souffrant de dengue hémorragique (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2009). Par ailleurs, cette antigénicité est variable en fonction de la sévérité de la maladie (Machain-

Williams *et al.*, 2011). Une étude longitudinale dans un contexte épidémique devrait apporter plus d'informations à ce propos.

Sans nul doute, les principales limitations de notre approche se situent à deux niveaux:

- L'utilisation de prélèvements sanguins pourrait limiter l'application de notre technique à grande échelle. Même si au cours de nos investigations suivantes nous avons utilisé des éluats de goutte de sang total sur du papier buvard, l'utilisation de technique de prélèvement invasive diminuerait l'intérêt de notre approche.
- L'utilisation d'extraits salivaires totaux d'*Aedes* comme antigènes ne peut pas constituer une méthode de diagnostic utilisable sur les terrains d'étude. L'utilité d'un bio-marqueur d'exposition aux piqûres des arthropodes dépend en grande partie de son degré de spécificité mais aussi de sa simplicité d'utilisation. Même si nous avons montré qu'il existe une faible réaction croisée entre *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, l'emploi des extraits salivaires totaux ne peut constituer un bio-marqueur idéal. La collecte des glandes salivaires est fastidieuse. De plus, l'état physiologique des moustiques et la conservation des échantillons sont susceptibles d'induire une variation des constituants protéiques de la salive. Ces facteurs limitant, montrent qu'il est nécessaire d'identifier des protéines ou peptides salivaires qui sont spécifiques d'espèce.

Dans le but de répondre à ces besoins, nous avons développé un volet immuno-protéomique afin d'identifier des protéines salivaires qui nous permettraient de nous affranchir de l'emploi des extraits salivaires totaux.

6-3 Identification des protéines salivaires immunogéniques d'*Ae. albopictus*

Pour atteindre cet objectif, nos travaux nous ont conduits à effectuer des immunoblots 2D pour identifier les protéines salivaires d'*Ae. albopictus* antigéniques chez des individus exclusivement exposés à *Ae. albopictus* ou à *Ae. aegypti*. L'expression différentielle de ces protéines antigéniques en fonction de la nature de l'exposition aurait permis d'identifier et de caractériser les protéines antigéniques spécifiques d'espèce. Au cours de cette étude, nous avons pu identifier 73 protéines antigéniques d'*Ae. albopictus*. La majorité de ces protéines antigéniques sont sécrétées et se retrouvent impliquées dans le repas sanguin. Nous retrouvons notamment les protéines de la D7, l'apyrase, l'adenosine deaminase et les serpinines. La quasi-totalité de ces protéines ne sont pas reconnues par les individus non exposés à *Ae. albopictus* ni à *Ae. aegypti*, seul un petit cluster de protéines est détecté antigénique chez cette population

non exposée. Ceci confirme ainsi la spécificité observée pendant les expérimentations en ELISA. Cependant, nous n'avons pu noter aucune différence de l'expression immunogénique de ces protéines en fonction de la nature de l'exposition, à *Ae. albopictus* ou *Ae. aegypti*, ou de l'intensité de l'exposition aux piqûres de ces vecteurs, contrairement aux observations précédemment faites en ELISA. Ces constatations semblent indiquer une divergence des résultats obtenus entre les immunoblots 2D et les ELISA. Toutefois, cette forte réaction croisée observée en immunoblot 2D pourrait être la conséquence d'une différence de présentation des antigènes entre ces deux techniques. La dénaturation des protéines salivaires au cours des expérimentations en immunoblot peut induire une différence au niveau de la présentation des épitopes entre ces deux techniques. Il est tout à fait possible que les sites antigéniques soient beaucoup plus accessibles aux anticorps présents dans le sérum. De plus, la forte résolution de la technique de l'immunoblot 2D qui se caractérise par une propension à mettre en évidence les iso-formes de chaque protéine, pourrait permettre de mettre en évidence plus d'antigènes que la technique de l'ELISA. Ces deux facteurs peuvent ainsi expliquer la forte occurrence des réactions croisées observées en immunoblots 2D. Ces résultats posent ainsi le problème du choix de la technique à utiliser pour l'étude comparative de l'immunogénicité des protéines salivaires d'arthropodes. La grande majorité de ces études ont été réalisées grâce à la technique de l'immunoblot 1D, moins résolutive que la 2D mais permettant une comparaison relativement facile des différents profils immunogéniques. Ces études ont mis en évidence de nette différences d'expression de bandes protéiques immunogéniques en fonction de l'exposition (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994; Reunala *et al.*, 1994; Jeon *et al.*, 2001). Tout récemment, cette technique a permis de montrer la spécificité de la réponse Ac anti-salive de phlébotome. En zone sympatrique, des individus exposés essentiellement à *Lu. intermedia* ne reconnaissent aucune bande contre *Lu. longipalpalis* alors que les bandes protéiques de la salive de *Lu. intermedia* sont très fortement reconnues (Teixeira *et al.*, 2010). Il aurait été intéressant de comparer ces deux approches afin de mieux élucider l'occurrence de ces réactions croisées et de déterminer la pertinence de ces outils pour l'étude comparative de protéines antigéniques. Cette forte occurrence de réaction expliquerait l'absence de différence d'expression des protéines antigéniques en fonction de l'intensité de l'exposition. Ainsi, nous n'avons pas pu identifier une protéine salivaire spécifique d'*Ae. albopictus* parmi celles qui se sont révélées antigéniques. Cependant, certaines protéines semblent être reconnues par tous les individus qu'ils soient exposés à *Ae. albopictus* ou à *Ae. aegypti* et quelque soit l'intensité de leur exposition définie

précédemment. C'est le cas notamment des protéines de la famille de la 34 kDa qui ont déjà été décrites comme spécifiques aux *Aedes* (Arca *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). L'utilisation de ces protéines ou des peptides qui en seront issus, permettrait au moins de développer un bio-marqueur spécifique du genre *Aedes*. Ces résultats montrent qu'il y a une grande similitude des protéines salivaires immunogéniques entre *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, confirmant ainsi dans une certaine mesure la forte identité de leurs sialomes. L'intérêt de notre étude est qu'elle a fourni une base de travail par la constitution d'une banque de protéines salivaires immunogéniques d'*Ae. albopictus*. L'importance de cette banque se mesure par la quantité de protéines salivaires sécrétées qui en représentent plus de la moitié (49 /73 protéines antigéniques identifiées) et dont la plupart interviennent dans le repas sanguin du vecteur. Ceci ouvre la possibilité d'identifier des candidats bio-marqueurs d'exposition. Le screening de cette banque, couplé à d'autres outils complémentaires pourrait aboutir à l'identification de peptides salivaires spécifiques d'espèce. Ce procédé a été utilisé pour élaborer un bio-marqueur spécifique aux piqûres des *Anopheles* (Poinsignon *et al.*, 2009). L'intérêt d'une telle démarche est non seulement qu'elle permettrait de mesurer de façon spécifique l'exposition à *Ae. albopictus*, mais aussi elle est plus pratique en matière de production et de reproductibilité. Nous avons déjà commencé à effectuer ce screening; différents peptides sont testés, notamment ceux provenant des protéines de la famille de la 34 kDa. Il aurait sans doute été intéressant de développer d'autres approches complémentaires pour identifier un candidat bio-marqueur spécifique d'espèce. L'utilisation de la technique de « l'épitope mapping » pourrait être une piste pour améliorer le processus de développement de ce bio-marqueur. De même, il est tout à fait possible de développer des protéines synthétiques qui auront l'avantage d'être spécifiques d'espèce mais qui pourraient aussi se révéler plus antigénique du fait de leur taille.

Sur un plan purement épidémiologique, vu la dynamique de colonisation d'*Ae. albopictus* qui risque de se retrouver de plus en plus en sympatrie avec *Ae. aegypti*, il est nécessaire, sinon primordial de mettre en place un marqueur d'exposition spécifique d'espèce. Sur de tels terrains d'étude, la connaissance de l'activité de chaque espèce de vecteur sur l'homme pourrait servir à prévenir ou stopper la transmission d'arbovirus.

6-4 Réponse Ac anti-salive : nouveau critère d'efficacité de la lutte anti-vectorielle contre *Ae. albopictus* ?

Face à l'absence de vaccins et de thérapies curatives, la lutte anti-vectorielle est l'unique moyen disponible pour empêcher la transmission des arbovirus tels la dengue et le

chikungunya. Cette situation souligne l'importance que revêt le contrôle des vecteurs dans des zones à fort risque de transmission comme l'Ile de La Réunion. La connaissance de l'efficacité des moyens mis en œuvre pour lutter contre le développement de vecteurs est aussi capitale pour le contrôle de ces maladies. Les mêmes outils sont utilisés aussi bien pour la mesure de l'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs que pour évaluer l'efficacité des moyens de lutte mis en œuvre. De ce fait, les déficiences précédemment citées pour la mesure de l'exposition basée uniquement sur les méthodes entomologiques impacteront forcément la connaissance de l'efficacité de la lutte anti-vectorielle. Au cours de nos travaux, nous avons évalué la potentialité d'utiliser la réponse Ac IgG anti-salive pour évaluer l'efficacité de la lutte contre ce vecteur après une action classique des services de la lutte anti-vectorielle concernant la pulvérisation spatiale de deltaméthrine et l'élimination des gîtes larvaires au cours de chaque passage sur le terrain d'étude. Sur l'Ile de La Réunion, l'application de ce protocole a permis de constater une baisse de la réponse Ac IgG anti-salive, 6 semaines après le début des mesures de lutte. En considérant les propriétés de la réponse Ac anti-salive précédemment décrite, nous en avons déduit que l'action de la lutte anti-vectorielle a abouti à une baisse de la densité d'*Ae. albopictus* suggérant l'efficacité de la lutte au bout de 6 semaines, ce qui a été confirmé par les données entomologiques. Ces résultats indiquent ainsi la potentialité d'utiliser la réponse Ac IgG anti salive comme indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle et ceci par une évaluation à court terme. Cette étude confirme les précédentes investigations qui ont porté sur la lutte contre d'autres vecteurs tels les *Anopheles*, *Triatominae* et *Phlebotomae* (Clements *et al.*, 2010; Drame *et al.*, 2010a; Drame *et al.*, 2010b; Schwarz *et al.*, 2011). Et pour la première fois, il est montré que cette technique peut s'appliquer aux moustiques du genre *Aedes* ce qui constitue une avancée très importante si l'on considère toutes les contraintes pour mesurer l'exposition de l'homme aux piqûres de ce vecteur.

6-4-1 Ac anti-salive : indicateur d'efficacité de la lutte anti *Ae. albopictus*

- En contexte de faible exposition ?**

Cependant, cette efficacité de la lutte notée seulement au bout de six semaines soulève certaines questions puisque la deltaméthrine, comme tout les pyréthrinoides, a un important effet « knock down » (Kumar *et al.*, 2011) et son emploi a été combiné à une élimination systématique des gîtes larvaires. En plus, le point à 6 semaines correspond à une importante variation climatique pouvant aussi expliquer la baisse de la densité vectorielle. La résistance des moustiques à la deltaméthrine pourrait théoriquement être mise en avant pour expliquer

cette efficacité relative mais jusqu'à présent sur l'Ile de La Réunion aucune résistance à cet insecticide n'a été décrite. Les phénomènes climatiques ne semblent pas non plus en mesure d'expliquer à eux seuls cette baisse de la population d'*Ae. albopictus*, avant le point de collecte à 6 semaines. L'étude détaillée de la réponse Ac anti-salive a permis de mieux cerner l'efficacité de la lutte contre *Ae. albopictus*. Sur la base de l'hétérogénéité de la réponse Ac anti-salive, la subdivision de la population en trois groupes d'exposition a visualisé une évolution différente de la réponse Ac anti-salive en fonction de ces trois groupes de répondeurs correspondant probablement à trois groupes différant pour l'exposition. En effet, avec le groupe faiblement exposé, on détecte une chute de la réponse Ac IgG anti-salive dès deux semaines après le début de la lutte. Ce résultat est pertinent à plusieurs niveaux. i) Dans un premier temps, il met en évidence l'efficacité de la lutte anti-vectorielle, associant une réduction à la source et l'élimination massive des stades adultes, efficace dans un très court terme. Cette information peut être capitale en cas d'épidémie d'arbovirus et permettrait de savoir au bout de combien de temps il est possible d'arriver à une réduction significative de la population des vecteurs. Sa connaissance, combinée aux données d'immunité de la population pourrait permettre de prédire le risque et l'évolution de l'épidémie. ii) Pour la première fois il est mis en évidence la potentialité d'utiliser la réponse Ac anti-salive comme indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle en cas de faible exposition. Ceci indique donc qu'il est possible d'utiliser cette technique dans les zones de faible exposition comme celles récemment colonisées ou bien alors en cas de stratégie d'élimination des vecteurs.

Cette étude met aussi en avant l'incapacité des outils entomologiques classiques à détecter les faibles variations de densité vectorielle. Cette incapacité peut conduire les services de la lutte anti-vectorielle à renforcer leur activité par une utilisation massive et continue d'insecticides, une telle action peut conduire à la longue au développement de résistances contre les molécules utilisées. Dans la perspective d'empêcher l'utilisation abusive d'insecticides; il semble nécessaire d'optimiser l'utilisation de notre outil afin d'arriver à détecter très tôt une baisse de la population vecteurs chez les individus fortement exposés.

- Quelle validité en zone endémique ou de forte exposition?

Sur l'ensemble de la population, la baisse de la réponse Ac anti salive intervient tardivement, six semaine après le début de la lutte. Contrairement à ce qui a été observé chez d'autres vecteurs comme les phlébotomes où une forte baisse de la réponse IgG notée au bout de deux semaines après la mise en place des stratégies de lutte au sein d'une population fortement exposée *P. argentipes* (Clements et al., 2010). Cette même tendance a aussi été observée

après une lutte dirigée contre *Anopheles* en zone endémique (Drame *et al.*, 2010a; Drame *et al.*, 2010b). Au vu de ces constatations, des études supplémentaires devraient être réalisées afin de savoir s'il est possible de détecter précocement une baisse de la réponse Ac anti salive au niveau populationnel. A cette fin, il est possible de doser d'autres isotypes tels les IgG4 qui pourraient être un indicateur de forte exposition aux piqûres d'*Aedes* (Reunala *et al.*, 1994). De même l'amélioration de la détection par l'emploi de peptides salivaires pourrait permettre de mieux évaluer l'efficacité de la lutte contre *Ae. albopictus*. En Angola, l'utilisation du peptide gSG6-P1 a permis de détecter la baisse drastique de la réponse Ac anti salive d'*An. gambiae* après la mise en place de moustiquaires imprégnées d'insecticide dans la zone d'étude (Drame *et al.*, 2010a). Une autre alternative pourrait venir du développement d'un modèle expérimental qui permettrait de savoir à partir de quel délai il est possible de détecter une baisse du niveau des Ac anti salive après la mise en place des mesures de lutte. Au sein de notre laboratoire, le modèle animal que nous avons développé montre que trois mois après l'arrêt de l'exposition à *Ae. albopictus*, les lapins produisent des IgG anti salive mais à un niveau moindre que pendant la période d'exposition. Ce modèle expérimental prendra bien sûr en compte les différents niveaux d'exposition aux vecteurs mais pourrait présenter l'handicap d'être difficilement transposable en conditions réelles du fait de l'historique et l'exposition et de la mémoire immunitaire qu'elle engendre.

La réalisation de ces études complémentaires permettra de savoir les limites de notre biomarqueur et le degré d'efficacité des mesures de lutte mises en place.

6-4-2 Disparité de l'efficacité de la lutte anti-*Ae. albopictus* : quelles implications pour le contrôle des épidémies d'arbovirus ?

Cette étude a également mis en évidence une différence d'efficacité de la lutte en fonction de clusters établis sur la base de l'âge des individus de l'étude. Nous notons que tout au long de l'étude, aucune baisse de la réponse Ac anti-salive n'est observée chez les individus les plus jeunes (18-35 ans) contrairement au reste de la population. Notre étude décrit pour la première fois ce profil en ce qui concerne l'utilisation de la réponse Ac anti-salive dans la lutte antivectorielle. Les précédentes études ayant travaillé sur cet aspect ne montrent aucune différence en ce qui concerne l'âge des populations étudiées (Drame *et al.*, 2010a; Gidwani *et al.*, 2011). Cette observation pourrait être en rapport avec la particularité des *Aedes* qui sont des moustiques diurnes. Les individus du groupe 18-35 ans sont plus susceptibles de se déplacer hors de la zone d'étude du fait qu'ils font partie de la tranche d'âge la plus active à La Réunion. De ce fait ils sont plus à même de se faire piquer au niveau de leur lieu d'activité.

ce qui pourrait expliquer cette absence de variation de la réponse Ac IgG anti-salive, au cours du temps. Ceci démontre encore une fois l'inégalité de l'exposition au sein d'une même population d'étude et la difficulté pour les programmes de lutte anti-vectorielle à assurer une bonne protection à l'ensemble de la population.

Au delà, l'étude de la réponse Ac anti-salive appliquée à la lutte anti-vectorielle permet d'identifier les groupes à risque du moment qu'ils restent exposés aux piqûres de vecteurs malgré leur élimination de la zone d'étude. Ceci est reflété par les données de l'épidémie de chikungunya sur l'Ile de La Réunion en 2006, chez une population de 20-30 ans, assez voisine en âge de la notre, le taux d'infection s'élevait à 15%, un des plus élevé par rapport au reste de la population (Renault *et al.*, 2007). Ceci démontre que, dans une certaine mesure, la pertinence de notre outil à détecter non seulement les individus qui restent non protégés mais également qui sont les plus à risque. En période épidémique, il aurait été intéressant de connaître le taux d'infection chez ces individus apparemment non protégés pendant la campagne de lutte. A ce propos, il est possible de faire une étude rétrospective sur une banque de sérums réalisée au moment de l'épidémie de chikungunya en 2006 à La Réunion. L'identification de ces individus à risque pourrait être un élément clé dans la lutte contre les arbovirus en période d'épidémie, ils peuvent par exemple faire l'objet d'une campagne ciblée sur la protection contre les piqûres en tenant compte bien sûr des considérations éthiques. Par exemple, même si leur efficacité peut être limitée, on pourrait recommander à cette catégorie de population d'utiliser en plus d'une lutte anti-vectorielle « communautaire » (comme dans notre étude) de moyens de protection individuels. Il a été montré que la connaissance du risque engendré par l'exposition aux piqûres des vecteurs permettait de mieux combattre la formation de gîtes larvaires au sein de l'espace domestique (Pacheco-Coral Adel *et al.*, 2010). En outre il semble, ici à La Réunion, que ce groupe à risque se caractériserait par une forte mobilité, ce qui faciliterait la dissémination des pathogènes en cas d'épidémies si l'on tient compte de l'importance des déplacements dans la transmission des maladies vectorielles (Stoddard *et al.*, 2009). Ainsi, ces individus « actifs » sont importants à surveiller car ils pourraient être des « amplificateurs » de pathogène en période d'épidémie, car mal protégés par une lutte anti-vectorielle classique. Pour mieux cerner les disparités de l'efficacité de la lutte anti-vectorielle, il serait aussi intéressant d'étudier l'évolution de la réponse Ac anti-salive chez les jeunes enfants. Notre étude en Bolivie a montré que cette tranche de la population pourrait être très fortement exposée aux piqûres des vecteurs et présente une très forte réponse Ac spécifique. Nous pouvons aussi supposer qu'ils ont été très exposés avec une

protection relativement inefficace si l'on sait que le taux d'infection par le virus du chikungunya a atteint à La Réunion, 18% de la population de 0-9 ans au cours de l'épidémie 2005-2006 (Renault *et al.*, 2007).

Conclusions et Perspectives

Les travaux de cette thèse concernaient le développement d'un biomarqueur immunologique d'exposition aux piqûres des *Aedes* et plus particulièrement à *Ae. albopictus*, vecteur d'arbovirus, en pleine expansion. Au cours de ces travaux, nous avons également évalué la potentialité d'utiliser ce biomarqueur comme critère d'efficacité des mesures de lutte antivectorielle contre *Ae. albopictus*. Le développement de ce biomarqueur se justifie par le fait que les moyens actuels d'évaluation de l'exposition à *Aedes*, reposant essentiellement sur le décompte des stades immatures, sont indirects et leur mise en place est souvent contraignante (Focks, 2003). Ces manquements sont à l'origine d'imprécisions quand il s'agit de mesurer l'exposition de l'homme au vecteur ou d'estimer le risque de transmission des pathogènes. Ces travaux de thèse constituent ainsi une première étape dans le développement d'un biomarqueur d'exposition aux *Aedes* contribuant ainsi de façon certaine à la lutte contre la transmission des arbovirus.

La réalisation de ces travaux n'a été possible qu'à travers les études menées dans des contextes d'exposition complémentaires et qui nous ont permis, à chaque étape de cette thèse, de fixer et de répondre à un objectif bien précis. Ainsi le premier objectif de ces travaux a été d'évaluer la relation entre la réponse Ac IgG anti-salive d'*Aedes* et l'intensité de l'exposition aux piqûres de ce vecteur, évalué par des données entomologiques de référence. Pour répondre à cette question, nous nous sommes basés sur l'étude EpiDengue qui a permis d'inclure au total 1049 enfants et adultes exposés à *Ae. aegypti*, l'unique espèce d'*Aedes* de la zone d'étude. Grâce à cette étude, nous avons pu montrer pour la première fois que la réponse Ac IgG anti-salive est corrélée à l'intensité de l'exposition aux piqûres d'*Aedes*. Ce constat renforce ainsi l'idée d'utiliser la réponse Ac anti-salive comme bio-marqueur d'exposition. De plus, nous avons montré une différence de réponse IgG en fonction de l'âge des individus, les jeunes enfants développant une réponse Ac plus intense que les adultes suggérant une hétérogénéité de l'exposition et/ou des facteurs immunologiques influençant l'intensité de la réponse Ac induite.

Le deuxième objectif de notre travail a été de vérifier la potentialité de réactions croisées entre deux espèces majeures : *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Si nous considérons que certaines protéines salivaires sont spécifiques de genre ou d'espèce (Arca *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007), la pertinence d'un biomarqueur salivaire se joue principalement sur les degrés de

réactions croisées entre les espèces du même genre ou de famille. Sur l'île de La Réunion, *Ae. albopictus* est l'unique espèce d'*Aedes* anthropophile; ceci nous a permis d'élucider quelques interrogations relatives à cette réaction croisée potentielle. En effet, contrairement à la population Bolivienne, le pourcentage de répondeurs ainsi que l'intensité des réponses IgG contre les protéines salivaires d'*Ae. aegypti* sont très faibles au sein de la population Réunionnaise. Parallèlement, l'évaluation de la réponse Ac contre les extraits salivaires d'*Ae. albopictus* chez les Boliviens montre le même modèle de réponse, à savoir une faible réaction croisée. L'étude de la réponse IgG anti-salive d'*Ae. albopictus* chez les Réunionnais révèle un fort pourcentage de répondeurs avec de fortes intensités de réponse IgG. La détection de l'exposition à *Ae. albopictus* par la mesure de la réponse Ac IgG anti-salive constituait une première dans une zone à fort risque de transmission d'arbovirus tels le chikungunya et la dengue.

Les résultats de cette deuxième étude nous ont naturellement amené à fixer un objectif plus ambitieux pour améliorer l'utilisation de ce potentiel biomarqueur. La troisième partie de nos travaux a consisté à l'identification d'une protéine antigénique spécifique à *Ae. albopictus* en vue de son utilisation comme biomarqueur spécifique d'exposition à ce vecteur. L'étude immuno-protéomique développée dans ce sens a permis de mettre en évidence pour la première fois des protéines antigéniques de la salive d'*Ae. albopictus* chez des individus provenant de zones à fort risque de transmission d'arbovirus. Cette étude a aussi permis d'identifier de potentiels candidats pouvant servir de marqueurs d'exposition spécifiques du genre *Aedes*. Aussi, nous avons pu constituer une banque de protéines salivaires antigéniques qui pourra servir à développer de nouvelles stratégies aboutissant à l'identification d'un biomarqueur spécifique d'*Ae. albopictus*. Nous avons notamment pu identifier par des analyses bio-informatiques sur les protéines de la famille de la 34kDa, des peptides spécifiques à *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*. La validation de ces peptides comme bio-marqueur spécifique d'espèce est en cours.

L'intérêt d'un biomarqueur d'exposition se mesure aussi par sa capacité à être intégré dans les actions de la lutte anti-vectorielle (Clements *et al.*, 2010; Drame *et al.*, 2010a; Drame *et al.*, 2010b; Schwarz *et al.*, 2011). Ce point a été le dernier objectif de ces travaux de thèse. A La Réunion, nous avons évalué la potentialité d'intégrer cet outil dans un dispositif de lutte dirigée spécifiquement contre *Ae. albopictus*. Cette étude a montré la pertinence de ce potentiel bio-marqueur à mesurer l'efficacité des mesures de lutte contre *Ae. albopictus* dans une zone à forte densité vectorielle avec un risque assez élevé de transmission du

chikungunya. La pertinence de cet outil est telle qu'il est capable de détecter de façon très précoce (entre 2 à 6 semaines), une variation de la densité vectorielle là où l'emploi des méthodes classiques ne permet pas de voir une baisse de la population d'*Ae. albopictus*. L'ensemble de ces travaux nous a donc permis de montrer que la mesure de la réponse Ac IgG anti-salive pourrait être utilisée comme un indicateur d'exposition à *Ae. albopictus*. En effet, nos expérimentations ont révélé certains critères indispensables à l'utilisation de la réponse IgG anti-salive comme bio-marqueur d'exposition : i) La sensibilité : nos résultats montrent une association entre l'intensité de la réponse IgG anti-salive et le niveau d'exposition aux piqûres des *Aedes*. Cette corrélation indique même qu'il serait possible de détecter les faibles niveaux d'exposition, cette sensibilité permettrait d'identifier des individus exposés ou non aux piqûres d'*Ae. albopictus*. ii) La spécificité : dans des conditions particulières d'exposition, nous avons montré que ce bio-marqueur salivaire pourrait se révéler d'une certaine spécificité. Les niveaux de réactions croisées semblent très modérés ; et ces derniers semblent très marqués chez les individus probablement très exposés à *Ae. albopictus* ou *Ae. aegypti*. Ces travaux, dans leur globalité, constituent une contribution significative à l'étude de l'interaction Homme/*Aedes* grâce aux recherches sur les protéines salivaires du vecteur. L'importance de ce travail se mesure aussi à la rareté des publications portant sur ce domaine et dont la majorité s'est focalisée sur l'étude des mécanismes allergiques induites par la salive des *Aedes*. De plus, en ce qui concerne le domaine particulier du développement de bio-marqueur d'exposition aux *Aedes*, ce travail et les articles qui y seront associés, constitueront, après celui de *Remoue et al.* en 2007, les seuls travaux à avoir étudié des populations autochtones en zone endémique avec un risque de transmission de dengue et de chikungunya (Tableau 3).

Tableau 3 : Principales études sur l'interaction Homme /salive des *Aedes*.

Travaux antérieurs			
Antigènes	Allergies	Cohorte et contexte épidémiologique	Auteurs
Extraits salivaires totaux d' <i>Aedes</i>	Détection des protéines salivaires antigéniques	Adultes et enfants volontaires Faible risque de transmission d'arbovirus (hémisphère nord)	<i>Shen et al., 1988</i>
			<i>Penneys et al., 1989</i>
			<i>Brummer-Korvenkontio et al., 1990</i>

			<i>Reunala et al., 1991</i>
			<i>Brummer-Korvenkontio et al., 1993</i>
			<i>Reunala et al., 1994</i>
			<i>Shan et al., 1995</i>
			<i>Peng et al., 1996</i>
	Détection des protéines salivaires antigéniques en fonction de l'infection	Adultes Thaïlandais infectés ou non par la dengue (zone à risque de transmission d'arbovirus)	<i>Wasinpyamongkol et al., 2009</i>
	Détection des protéines salivaires antigéniques et mesure de la réponse Ac anti-salive	Adultes et enfants volontaires Faible risque de transmission d'arbovirus (hémisphère nord)	<i>Brummer-Korvenkontio et al., 1997</i>
			<i>Jeon et al., 2001</i>
	Mesure de la réponse Ac anti-salive	Adultes et enfants volontaires Faible risque de transmission d'arbovirus (hémisphère nord)	<i>Oka et al., 1989</i>
			<i>Konishi et al., 1990</i>
			<i>Peng et al., 1995</i>
			<i>Peng et al., 1996</i>
			<i>Peng et al., 2004</i>
Protéines salivaires recombinantes	Détection des protéines salivaires antigéniques et mesure de la réponse Ac anti-salive	Adultes et enfants volontaires Faible risque de transmission d'arbovirus (hémisphère nord)	<i>Peng et al., 2006</i>
Antigènes	Bio-marqueur	Cohorte et contexte épidémiologique	Auteurs

Extraits salivaires totaux d' <i>Ae. aegypti</i>	Mesure exposition aux piqûres d' <i>Ae. aegypti</i>	Militaires Français en mission au Gabon et en Côte d'Ivoire (Zones à risque de transmission d'arbovirus)	<i>Orlandi-Pradines et al., 2007</i>
		Enfants en zone rurale (risque transmission dengue chikungunya et fièvre jaune)	<i>Remoue et al., 2007</i>
Travaux de thèse			
Antigènes	Bio-marqueur	Cohorte et contexte épidémiologique	Auteurs
Extraits salivaires totaux d' <i>Ae. aegypti</i>	Mesure exposition aux piqûres d' <i>Ae. aegypti</i>	Adultes et enfants en zone urbaine Bolivienne, risque élevé transmission dengue	<i>Doucoure et al., soumis</i>
Extraits salivaires totaux d' <i>Ae. albopictus</i>	Mesure exposition aux piqûres d' <i>Ae. albopictus</i>	Adultes en zone urbaine, La Réunion, risque élevé transmission chikungunya	<i>Doucoure et al., soumis</i>
Extraits salivaires totaux d' <i>Ae. albopictus</i>	Identification protéines spécifiques <i>Ae. albopictus</i>	Adultes et enfant en zone urbaine, risque élevé transmission chikungunya et dengue	<i>Doucoure et al., en prep</i>
Extraits salivaires totaux d' <i>Ae. albopictus</i>	Evaluation efficacité mesures de lutte anti- <i>Ae. albopictus</i>	Adultes en zone urbaine, La Réunion, risque élevé transmission chikungunya	<i>Doucoure et al., en prep</i>
Travaux en cours			

Antigènes	Bio-marqueur	Cohorte et contexte épidémiologique	Auteurs
Peptide Nterm 34 kDa <i>Ae. aegypti</i>	Validation Bio-marqueur spécifique <i>Ae. aegypti</i>	Enfants en zone rurale Bénin, risque transmission arbovirus	<i>Ellanga et al., en prep</i>
Peptide Nterm 34 kDa <i>Ae. aegypti</i>	Validation Bio-marqueur spécifique <i>Ae. albopictus</i>	Adultes en zone urbaine, La Réunion, risque élevé transmission chikungunya	En cours
Peptide Nterm 34 kDa <i>Ae. aegypti</i>	Validation Bio-marqueur spécifique <i>Ae. aegypti</i>	Adultes et enfants en zone urbaine Bolivienne, risque élevé transmission dengue	En cours

Quelles améliorations pour une utilisation optimale ?

- *S'affranchir de l'utilisation des extraits totaux salivaires*

En vue de son utilisation optimale dans la lutte contre les arbovirus, il est nécessaire d'apporter certaines améliorations au bio-marqueur. L'une des premières améliorations visera à simplifier l'utilisation de ce test. L'emploi des extraits totaux constitue un frein indéniable à son utilisation. La collecte difficile et fastidieuse des glandes salivaires est un facteur considérablement limitant. En plus, il n'est pas rare d'être confronté à des problèmes de conservation et de reproductibilité (Fontaine *et al.*, 2011). Cette situation montre l'urgence de trouver un antigène salivaire, protéine ou peptide, facilement reproductible. De préférence, cet antigène devrait être un peptide salivaire pour trois raisons principales : i) il est plus facile de produire un peptide qu'une protéine entière, sous forme recombinante par exemple; ii) les peptides sont plus reproductibles que les protéines, ceci est un gage de reproductibilité du test pour la détection de l'exposition iii) sachant qu'un peptide est composé d'un nombre restreints d'acides aminés (20 à 30 pour les peptides salivaires utilisés), la réactivité croisée potentielle des épitopes avec d'autres arthropodes ou organismes en général, est plus limitée qu'avec une protéine recombinante. Au-delà de la facilité d'utilisation du test par l'emploi d'un peptide salivaire, cette approche pourrait aussi avoir une conséquence sur sa sensibilité. Par exemple, en ce qui concerne les *Anopheles*, il a été montré que l'utilisation d'un seul peptide salivaire est plus sensible pour détecter l'exposition à *An. gambiae* et notamment pour détecter de très faible exposition des individus au vecteur (Poinsignon *et al.*, 2009).

- *Développer un biomarqueur spécifique d'espèce dans un court/moyen terme*

Aussi, il est tout à fait concevable de penser que l'emploi d'un peptide salivaire permettrait d'améliorer la spécificité du test du fait qu'il peut reposer sur un ou en tous cas un nombre très limité d'épitopes. Cette limitation du nombre d'épitopes pourrait aboutir à une sélection d'antigènes spécifiques d'espèce. La recherche de cette spécificité devrait être une des priorités pour une utilisation optimale de ce biomarqueur. Du fait de la colonisation effrénée du moustique tigré, *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* et du fait qu'ils sont retrouvés de plus en plus souvent en sympatrie avec des capacités vectorielles différentes pour les différents arbovirus (Paupy *et al.*, 2010). Dans un tel contexte, seule l'utilisation d'un antigène salivaire spécifique permettrait de discriminer l'exposition entre ces deux vecteurs. Nos travaux ont déjà anticipé cette probabilité. En se basant sur les protéines la famille des protéines de 34 kDa des *Aedes*, nous avons pu identifier, par analyse bioinformatiques, des peptides spécifiques d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti*. Actuellement, nous en sommes à l'étape de validation de ces peptides. En utilisant les deux cohortes bolivienne et réunionnaise, nous nous assurerons de l'antigénicité de ces peptides ainsi que de leur spécificité et sensibilité. Aussi pour mieux déterminer ces deux paramètres, nous avons développé un modèle animal (lapins piqués uniquement par *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Cu. quinquefasciatus* ou *An. gambiae*). La mise en place de ce modèle animal permettra non seulement de mesurer ces deux paramètres par rapport à *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* mais aussi aux autres *Culicidae* comme *Anopheles* et *Culex* qui sont présents dans la plupart des zones endémiques.

- **Prendre en compte les conditions d'utilisation sur le terrain**

Au cours de cette étude, nous avons également montré une différence de réponse Ac entre les enfants et les adultes. Dès lors, il paraît nécessaire d'étudier les facteurs susceptibles d'influencer cette différence de réponse. Dans l'idéal, le biomarqueur qui sera utilisé devrait être, au mieux, applicable à l'ensemble de la population. Le cas échéant, il serait pertinent d'évaluer la possibilité de développer un outil spécifique à chaque catégorie de la population. L'utilisation d'un peptide salivaire pourrait aussi permettre de résoudre ce problème aux cas où il serait lié à un facteur immunologique dépendant de l'âge. Si tel est le cas, on pourrait supposer que les adultes auraient développé une tolérance contre certaines protéines salivaires. L'utilisation d'un peptide salivaire qui induirait une réponse identique aussi bien chez les enfants que les adultes permettrait d'avoir un bio-marqueur utilisable à l'échelle populationnelle. Le peptide gSG6-P1 d'*Anopheles* est, par exemple, utilisable quelque soit l'âge des individus exposés (Drame *et al.*, 2010a). L'utilisation d'autres classes d'Ig anti

salive pourrait permettre de mieux évaluer l'exposition en fonction de l'âge. Il n'est pas exclu que les IgM soient mieux indiquée pour mesurer l'exposition chez les enfants en bas âge. Nos études réalisées en Angola, montrent l'existence d'un transfert IgG anti salive d'*Anopheles* de la mère à l'enfant. Par contre, la mesure des IgM anti gSG6-P1 semble être un bon indicateur de l'exposition des enfants aux *Anopheles* (Drame, en soumission)

Cependant, l'utilisation de ce test dans un dispositif de lutte contre les *Aedes* et les arbovirus qu'ils transmettent, devra être standardisé. A partir de ce moment il pourra être utilisé pleinement comme un outil diagnostic et d'évaluation de la lutte anti *Ae. albopictus*. Cette perspective soulève beaucoup d'interrogations par rapport à nos résultats. En effet, nous avons vu, au laboratoire, que la mesure de la densité optique permettait de mettre en exergue deux propriétés de la réponse Ac IgG anti-salive: i) il est possible de corrélér l'intensité de la réponse Ac contre la salive au niveau d'exposition aux vecteurs; ii) En plus cette mesure permet un suivi temporel des variations de réponse donc d'exposition d'un individu ou d'une population. Mais on pourrait se poser la question de savoir si un test diagnostic, basé éventuellement sur une méthode chromatographique et la détection d'un seul antigène, pourrait permettre de mettre en évidence ces différents critères. D'un point de vue populationnel ce test qui à priori à forte sensibilité, permettra de distinguer les individus exposés ou non aux piqûres des *Aedes*. Mais dans un contexte endémique, où l'exposition est très hétérogène, un test basé sur un seul antigène ne permettra pas de distinguer les différents niveaux d'exposition. D'un autre côté, il est fort probable, après les mesures de lutte anti-vectorielle, aussi efficace soient-elles, que la majorité des individus portent toujours d' Ac IgG malgré la baisse de la densité des vecteurs. Un test diagnostic basé uniquement sur la détection ne devrait pas permettre dans ce cas d'apprécier l'efficacité de la lutte anti-vectorielle à moins que les individus deviennent séronégatifs en IgG anti-salive en un temps très court, ce qui semble exclus. Ces questions méritent d'être étudiées de façon plus approfondie pour la pertinence du développement d'un test diagnostic. Certainement, le modèle animal que nous avons déjà mis en place au sein de notre laboratoire permettra d'apporter quelques éclaircissements. Ces expérimentations permettront de déterminer au bout de combien de temps, ce test diagnostic basé sur un seul antigène permettra d'apprécier l'efficacité de la lutte anti-vectorielle. Ou alors, de nous renseigner sur la possibilité d'utiliser plus d'un antigène salivaire pour améliorer la performance de ce potentiel test. D'un autre côté, jusqu'à présent, nous n'avons mesuré que la réponse IgG totale contre les protéines salivaires. Il serait judicieux d'investiguer si d'autre isotypes IgG ou immunoglobulines

permettraient de mesurer et de différencier l'intensité de l'exposition au niveau populationnel. Par exemple, il a été montré en ce qui concerne les *Aedes* que la mesure de la réponse IgG4 était associée à une forte exposition à *Ae. aegypti* (Reunala et al., 1994). Dans le cas de triatomines la détection des IgM indiquerait une faible exposition à *Triatomia infestans* (Schwarz et al., 2009b).

Les moyens entomologiques utilisés actuellement sont très critiqués au regard de leur incapacité à donner une mesure réelle et de leur difficulté d'investiguer de façon efficace tout une zone d'étude. Ces mêmes reproches pourraient aussi se poser concernant notre outil. Comme pour les techniques entomologiques classiques, il est impensable avec notre bio-marqueur d'investiguer tous les individus ou toute une zone d'étude. Il serait nécessaire en fonction des modèles d'exposition et de transmission d'arbovirus de définir les limites d'investigation afin d'avoir une idée réelle de l'exposition au niveau populationnel. Pour être pleinement efficace et utilisé en routine, cet outil devrait permettre à partir d'un échantillonnage réduit au strict nécessaire d'informer correctement de l'exposition aux *Aedes* dans toute une zone d'étude. Ceci serait un gage d'utilisation systématique dans les études épidémiologiques et il permettrait aussi de mobiliser le minimum d'enquêteur sur le terrain d'étude. Par rapport aux outils entomologiques actuellement utilisés, il n'est pas rare d'être confronté aux réticences des populations étudiées quand il s'agit d'installer des pièges ou de procéder au décompte de stades immatures au sein des concessions. L'utilisation de test, comme nous proposons de le faire, se basant sur une prise de sang au bout du doigt, même avec des méthodes de prélèvement très peu invasives, pourrait constituer un frein à l'emploi de notre potentiel bio-marqueur. On peut présager que son utilisation sera assortie d'un avis favorable des autorités compétentes en matière d'éthique. Afin d'éviter ces contraintes et réticences, il serait important de réfléchir à d'autres types de prélèvements acceptables par les populations étudiées. Par exemple, les IgA contenus dans la salive humaine ont servi à diagnostiquer des cas de dengue en zone endémique (Yap et al., 2011).

- *Vers un bio-marqueur de piqûre infectante ?*

Afin de mieux lutter contre la transmission des arbovirus, l'étude de la réponse Ac anti-salive devrait aller au-delà de la simple détection de l'exposition et proposer de nouveaux outils qui permettraient de mieux cerner le risque de transmission des pathogènes. Par exemple, il a été montré une différence d'antigénicité des protéines salivaires d'*Ae. aegypti* en fonction d'individus infectés ou non par le virus de la dengue (Wasinpiyamongkol et al., 2009). Ceci

est une forte indication pour aller vers un bio-marqueur de piqure infectante même si au cours de nos études nous n'avons pu montrer ce lien entre la réponse Ac IgG anti-salive et la réponse IgM et IgG anti-dengue ou chikungunya. Cependant d'autres modèles, ont mis en évidence une association entre le niveau de la réponse anti salive et l'infection parasitaire (Remoue *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2009). Aussi, il a été montré que l'infection du moustique *Anopheles* par le *Plasmodium* induit un changement d'expression des protéines salivaires de ce moustique (Choumet *et al.*, 2007). Des études plus approfondies utilisant l'immo-protéomique devraient nous édifier sur cette possibilité. Le développement de cette technique devrait faciliter le diagnostic de ces maladies. Actuellement, il n'existe aucun moyen de diagnostic fiable et facilement accessible dans les pays endémiques.

Aussi, il serait intéressant d'étudier l'effet potentiel de l'exposition aux piqures non infectantes, donc de la salive, sur le développement de l'infection du chikungunya chez l'homme, notamment de formes chroniques et invalidantes, en se basant sur une cohorte de l'épidémie de chikungunya qui a touché La Réunion

L'intérêt de l'étude de la salive ne devrait pas se limiter au développement d'outils de diagnostic. L'influence des protéines salivaires sur la réponse immune contre les pathogènes mérite une plus grande attention en vue de la mise au point de vaccins pour les populations en zones endémiques. Les modèles d'étude sur les *Phlebotominae* ont mis en exergue l'influence de la salive sur l'acquisition de la protection contre l'infection par leishmanie (Rohousova *et al.*, 2011). En plus du phénomène de l'immunomodulation largement décrite dans l'introduction de ce manuscrit, il serait judicieux d'étudier l'impact des protéines salivaires sur d'autres mécanismes influençant les mécanismes de défense du vertébré. Par exemple, il a été montré que les simules vectrices de l'agent de l'onchocercose, portent dans leur salive des protéines qui induisent l'apoptose chez l'hôte vertébré favorisant ainsi son infection par les pathogènes (Tsujimoto *et al.*, 2010).

L'étude de la salive des arthropodes recèle beaucoup de potentialités qui devraient fournir ou améliorer les outils actuellement utilisés pour lutter contre les maladies vectorielles. Mais à travers les propriétés énumérées dans cette thèse, nous nous rendons compte qu'au delà du contrôle des maladies à transmission vectorielle, l'étude des protéines salivaires pourraient revêtir un intérêt majeur pour des pathologies non infectieuses, chroniques. Par exemple, il est possible d'induire la mort de cellules cancéreuses en utilisation des extraits salivaires d'*Amblyomma cajennense* (Simons *et al.*, 2011). A terme l'étude de la salive des arthropodes

sur l'hémostase des vertébrés devrait servir à trouver de nouveaux constituants salivaires pour lutter contre certaines pathologies ou déficiences chez l'homme.

Bibliographie

- A-Elgayoum, S., El-Rayah, E. & Giha, H., In areas of low transmission, is the presumptive treatment of febrile but bloodsmear-negative patients for malaria validated by the results of PCR-based testing?, *Ann Trop Med Parasitol*, 104, 573-81.
- Abeku, T. A., Hay, S. I., Ochola, S., Langi, P., Beard, B., de Vlas, S. J. & Cox, J., Malaria epidemic early warning and detection in African highlands, *Trends Parasitol*, 2004, 20, 400-5.
- Abramides, G. C., Roiz, D., Guitart, R., Quintana, S., Guerrero, I. & Gimenez, N., Effectiveness of a multiple intervention strategy for the control of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Spain, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011, 105, 281-8.
- Adhami, J. & Reiter, P., Introduction and establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania, *J Am Mosq Control Assoc*, 1998, 14, 340-3.
- Akahata, W., Yang, Z. Y., Andersen, H., Sun, S., Holdaway, H. A., Kong, W. P., Lewis, M. G., Higgs, S., Rossmann, M. G., Rao, S. & Nabel, G. J., A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection, *Nat Med*, 2010, 16, 334-8.
- Andrade, B. B., Rocha, B. C., Reis-Filho, A., Camargo, L. M., Tadei, W. P., Moreira, L. A., Barral, A. & Barral-Netto, M., Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon, *Malar J*, 2009, 8, 121.
- Appanna, R., Ponnampalavanar, S., Lum Chai See, L. & Sekaran, S. D., Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population, *PLoS One*, 2010, 5,
- Arca, B., Lombardo, F., Francischetti, I. M., Pham, V. M., Mestres-Simon, M., Andersen, J. F. & Ribeiro, J. M., An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*, *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37, 107-27.
- Arredondo-Jimenez, J. I. & Valdez-Delgado, K. M., *Aedes aegypti* pupal/demographic surveys in southern Mexico: consistency and practicality, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2006, 100, S17-S32.
- Atkins, N. S., Lindo, J. F., Lee, M. G., Conway, D. J., Bailey, J. W., Robinson, R. D. & Bundy, D. A., Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, 91, 609-13.
- Aubry, P. & Gaüzère, B., The "red fever" epidemic of 1873 on Reunion Island: was it dengue fever or a dengue-like syndrome?, *Med Trop*, 2008, 68, 236-7.
- Bagny, L., Delatte, H., Quilici, S. & Fontenille, D., Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s, *J Med Entomol*, 2009, 46, 1541-5.
- Barbazan, P., Tuntaprasart, W., Souris, M., Demoraes, F., Nitapattana, N., Boonyuan, W. & Gonzalez, J. P., Assessment of a new strategy, based on *Aedes aegypti* (L.) pupal

- productivity, for the surveillance and control of dengue transmission in Thailand, *Ann Trop Med Parasitol*, 2008, 102, 161-71.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E. D., Valenzuela, J. G., Charlab, R., Barral-Netto, M. & Ribeiro, J. M., Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?, *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62, 740-5.
- Barrera, R., Simplified pupal surveys of *Aedes aegypti* (L.) for entomologic surveillance and dengue control, *Am J Trop Med Hyg*, 2009, 81, 100-7.
- Barrera, R., Amador, M. & Clark, G. G., Sample-size requirements for developing strategies, based on the pupal/demographic survey, for the targeted control of dengue, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2006, 100, S33-S43.
- Barrera, R., Avila, J. & Gonzalez-Tellez, S., Unreliable supply of potable water and elevated *Aedes aegypti* larval indices: a causal relationship?, *J Am Mosq Control Assoc*, 1993, 9, 189-95.
- Beaman, J. R. & Turell, M. J., Transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected in North and South America, *J Med Entomol*, 1991, 28, 161-4.
- Beltrame, A., Angheben, A., Bisoffi, Z., Monteiro, G., Marocco, S., Calleri, G., Lipani, F., Gobbi, F., Canta, F., Castelli, F., Gulletta, M., Bigoni, S., Del Punta, V., Iacovazzi, T., Romi, R., Nicoletti, L., Ciufolini, M. G., Rorato, G., Negri, C. & Viale, P., Imported Chikungunya Infection, Italy, *Emerg Infect Dis*, 2007, 13, 1264-6.
- Ben Hadj Ahmed, S., Chelbi, I., Kaabi, B., Cherni, S., Derbali, M. & Zhioua, E., Differences in the salivary effects of wild-caught versus colonized *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) on the development of zoonotic cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, *J Med Entomol*, 2010, 47, 74-9.
- Billingsley, P. F., Baird, J., Mitchell, J. A. & Drakeley, C., Immune interactions between mosquitoes and their hosts, *Parasite Immunol*, 2006, 28, 143-53.
- Blacksell, S. D., Newton, P. N., Bell, D., Kelley, J., Mammen, M. P., Jr., Vaughn, D. W., Wuthiekanun, V., Sungkakum, A., Nisalak, A. & Day, N. P., The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection, *Clin Infect Dis*, 2006, 42, 1127-34.
- Boppana, V. D., Thangamani, S., Adler, A. J. & Wikel, S. K., SAAG-4 is a novel mosquito salivary protein that programmes host CD4 T cells to express IL-4, *Parasite Immunol*, 2009, 31, 287-95.
- Boulanger, D., Doucoure, S., Grout, L., Ngom, A., Rogerie, F., Cornelie, S., Sokhna, C., Mouchet, F., Riveau, G., Simondon, F. & Remoue, F. J., Immunoglobulin G antibody profiles against *Anopheles* salivary proteins in domestic animals in Senegal, *J Med Entomol*, 2011, 48, 691-3.
- Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B. & Oldstone, M. B., Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo, *Nat Med*, 2006, 12, 1301-9.
- Brummer-Korvenkontio, H., Lappalainen, P., Reunala, T. & Palosuo, T., Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG₄ antibodies by immunoblotting, *Allergy and Clinical Immunology*, 1994, 93, 551-5.
- Brummer-Korvenkontio, H., Palosuo, K., Palosuo, T., Brummer-Korvenkontio, M., Leinikki, P. & Reunala, T., Detection of

- mosquito saliva-specific IgE antibodies by capture ELISA, *Allergy*, 1997, 52, 342-5.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. & Brandt, W. E., Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera, *J Gen Virol*, 1989, 70 (Pt 1), 37-43.
- Calvitti, M., Moretti, R., Lampazzi, E., Bellini, R. & Dobson, S. L., Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), *J Med Entomol*, 2010, 47, 179-87.
- Calvo, E., Andersen, J., Francischetti, I. M., de, L. C. M., deBianchi, A. G., James, A. A., Ribeiro, J. M. & Marinotti, O., The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands, *Insect Mol Biol*, 2004, 13, 73-88.
- Calvo, E., Mans, B. J., Ribeiro, J. M. & Andersen, J. F., Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 3728-33.
- Calvo, E., Mizurini, D. M., Sa-Nunes, A., Ribeiro, J. M., Andersen, J. F., Mans, B. J., Monteiro, R. Q., Kotsyfakis, M. & Francischetti, I. M., Alboserpin, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity, *J Biol Chem*, 2011, 286, 27998-8010.
- Calvo, E., Sanchez-Vargas, I., Favreau, A. J., Barbian, K. D., Pham, V. M., Olson, K. E. & Ribeiro, J. M., An insight into the sialotranscriptome of the West Nile mosquito vector, *Culex tarsalis*, *BMC Genomics*, 2010a, 11, 51.
- Calvo, E., Sanchez-Vargas, I., Kotsyfakis, M., Favreau, A. J., Barbian, K. D., Pham, V. M., Olson, K. E. & Ribeiro, J. M., The salivary gland transcriptome of the eastern tree hole mosquito, *Ochlerotatus triseriatus*, *J Med Entomol*, 2010b, 47, 376-86.
- Calvo, E., Tokumasu, F., Marinotti, O., Villeval, J. L., Ribeiro, J. M. & Francischetti, I. M., Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin $\alpha 2 \beta 1$, and von Willebrand factor, *J Biol Chem*, 2007, 282, 26928-38.
- Cassetti, M. C., Durbin, A., Harris, E., Rico-Hesse, R., Roehrig, J., Rothman, A., Whitehead, S., Natarajan, R. & Laughlin, C., Report of an NIAID workshop on dengue animal models, *Vaccine*, 2010, 28, 4229-34.
- Cavalcante, R. R., Pereira, M. H. & Gontijo, N. F., Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects, *Parasitology*, 2003, 127, 87-93.
- Chadee, D. D. & Ritchie, S. A., Efficacy of sticky and standard ovitraps for *Aedes aegypti* in Trinidad, West Indies, *J Vector Ecol*, 2010, 35, 395-400.
- Champagne, D. E., Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods, *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2004, 4, 375-96.
- Champagne, D. E., Smartt, C. T., Ribeiro, J. M. & James, A. A., The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92, 694-8.

Chawla, B. & Madhubala, R., Drug targets in Leishmania, *J Parasit Dis*, 2010, 34, 1-13.

Choumet, V., Carmi-Leroy, A., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A., Roth, C. & Brey, P. T., The salivary glands and saliva of Anopheles gambiae as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study, *Proteomics*, 2007, 7, 3384-94.

Chretien, J. P., Anyamba, A., Bedno, S. A., Breiman, R. F., Sang, R., Sergon, K., Powers, A. M., Onyango, C. O., Small, J., Tucker, C. J. & Linthicum, K. J., Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa, *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76, 405-7.

Clements, M., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D., Kumar, V., Das, P., Muller, I., Hamilton, G., Volfova, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C. & Rogers, M., Measurement of recent exposure to Phlebotomus argentipes, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva, *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82, 801-7.

Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J. M., Elnaïem, D. E., Fischer, L., Valenzuela, J. G. & Kamhawi, S., Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for Leishmania, *PLoS Pathog*, 2009, 5, e1000441.

Congpuong, K., Bualombai, P., Banmairuroi, V. & Na-Bangchang, K., Compliance with a three-day course of artesunate-mefloquine combination and baseline anti-malarial treatment in an area of Thailand with highly multidrug resistant falciparum malaria, *Malar J*, 2010, 9, 43.

Cornelie, S., Remoue, F., Doucoure, S., Ndiaye, T., Sauvage, F. X., Boulanger, D. & Simondon, F., An insight into immunogenic salivary proteins of Anopheles gambiae in African children, *Malar J*, 2007, 6, 75.

D'Ortenzio, E., Grandadam, M., Balleydier, E., Dehecq, J. S., Jaffar-Bandjee, M. C., Michault, A., Andriamandimby, S. F., Reynes, J. M. & Filleul, L., Sporadic cases of chikungunya, Reunion Island, August 2009, *Euro Surveill*, 2009, 14,

Das, M. K., Mishra, A., Beuria, M. K. & Dash, A. P., Human natural antibodies to Culex quinquefasciatus: age-dependent occurrence, *J Am Mosq Control Assoc*, 1991, 7, 319-21.

Das, T., Jaffar-Bandjee, M. C., Hoarau, J. J., Krejbich Trotot, P., Denizot, M., Lee-Pat-Yuen, G., Sahoo, R., Guiraud, P., Ramful, D., Robin, S., Alessandri, J. L., Gauzere, B. A. & Gasque, P., Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus, *Prog Neurobiol*, 2010, 91, 121-9.

Davis, J. L., Hodge, H. M. & Campbell, W. E., Jr., Growth of chikungunya virus in baby hamster kidney cell (BHK-21-clone 13) suspension cultures, *Appl Microbiol*, 1971, 21, 338-41.

De Benedictis, J., Chow-Shaffer, E., Costero, A., Clark, G. G., Edman, J. D. & Scott, T. W., Identification of the people from whom engorged Aedes aegypti took blood meals in Florida, Puerto Rico, using polymerase chain reaction-based DNA profiling, *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 68, 437-46.

de Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R. N., Tsetsarkin, K., Higgs, S. & Gould, E. A., Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a

- sign of things to come?, *Virol J*, 2008, 5, 33.
- de Moura, T. R., Oliveira, F., Novais, F. O., Miranda, J. C., Clarencio, J., Follador, I., Carvalho, E. M., Valenzuela, J. G., Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C. & de Oliveira, C. I., Enhanced Leishmania braziliensis infection following pre-exposure to sandfly saliva, *PLoS Negl Trop Dis*, 2007, 1, e84.
- Degallier, N., Herve, J. P., Travassos da Rosa, A. P. & Sa, G. C., [Aedes aegypti (L.): importance of its bioecology in the transmission of dengue and other arboviruses. I], *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 1988, 81, 97-110.
- Dehecq, J. S., Baviile, M., Margueron, T., Mussard, R. & Filleul, L., [The reemergence of the Chikungunya virus in Reunion Island on 2010: evolution of the mosquito control practices], *Bull Soc Pathol Exot*, 2010, 104, 153-60.
- Dehecq, J. S., Baviile, M., Margueron, T., Mussard, R. & Filleul, L., [The reemergence of the Chikungunya virus in Reunion Island on 2010: evolution of the mosquito control practices], *Bull Soc Pathol Exot*, 2011, 104, 153-60.
- Delatte, H., Dehecq, J. S., Thiria, J., Domerg, C., Paupy, C. & Fontenille, D., Geographic distribution and developmental sites of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2008, 8, 25-34.
- Delatte, H., Desvars, A., Bouetard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G. & Fontenille, D., Blood-feeding behavior of Aedes albopictus, a vector of Chikungunya on La Reunion, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010, 10, 249-58.
- Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A. & Fontenille, D., 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*, 2009, 46, 33-41.
- Delogu, I., Pastorino, B., Baronti, C., Nougairede, A., Bonnet, E. & Lamballerie, X., In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant, *Antiviral Res*, 2011, 90, 99-107.
- Diallo, M., Laganier, R. & Nangouma, A., First record of Ae. albopictus (Skuse 1894), in Central African Republic, *Trop Med Int Health*, 2010, 15, 1185-9.
- Diallo, M., Thonnon, J., Traore-Lamizana, M. & Fontenille, D., Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles, *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60, 281-6.
- Djegbe, I., Cornelie, S., Rossignol, M., Demetere, E., Seveno, M., Remoue, F. & Corbel, V., Differential Expression of Salivary Proteins between Susceptible and Insecticide-Resistant Mosquitoes of Culex quinquefasciatus, *PLoS One*, 2011, 6, e17496.
- Donovan, M. J., Messmore, A. S., Scrafford, D. A., Sacks, D. L., Kamhawi, S. & McDowell, M. A., Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites, *Infect Immun*, 2007, 75, 2523-30.
- Drahota, J., Lipoldova, M., Volf, P. & Rohousova, I., Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by Phlebotomus sergenti, *Parasite Immunol*, 2009, 31, 766-70.
- Drame, P. M., Poinsignon, A., Besnard, P., Cornelie, S., Le Mire, J., Toto, J. C., Foumane, V., Dos-Santos, M. A., Sembene, M., Fortes, F., Simondon, F., Carnevale, P. & Remoue, F., Human

- antibody responses to the Anopheles salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control, *PLoS One*, 2010a, 5, e15596.
- Drame, P. M., Poinsignon, A., Besnard, P., Le Mire, J., Dos-Santos, M. A., Sow, C. S., Cornelie, S., Foumane, V., Toto, J. C., Sembene, M., Boulanger, D., Simondon, F., Fortes, F., Carnevale, P. & Remoue, F., Human antibody response to Anopheles gambiae saliva: an immunological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control, *Am J Trop Med Hyg*, 2010b, 83, 115-21.
- Dussart, P., Labeau, B., Lagathu, G., Louis, P., Nunes, M. R., Rodrigues, S. G., Storck-Herrmann, C., Cesaie, R., Morvan, J., Flamand, M. & Baril, L., Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum, *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13, 1185-9.
- Edelman, R., Tacket, C. O., Wasserman, S. S., Bodison, S. A., Perry, J. G. & Mangiafico, J. A., Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218, *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62, 681-5.
- Eisen, L. & Lozano-Fuentes, S., Use of mapping and spatial and space-time modeling approaches in operational control of Aedes aegypti and dengue, *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3, e411.
- Ejrnaes, M., Filippi, C. M., Martinic, M. M., Ling, E. M., Togher, L. M., Crotty, S. & von Herrath, M. G., Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade, *J Exp Med*, 2006, 203, 2461-72.
- Facchinelli, L., Valerio, L., Pombi, M., Reiter, P., Costantini, C. & Della Torre, A., Development of a novel sticky trap for container-breeding mosquitoes and evaluation of its sampling properties to monitor urban populations of Aedes albopictus, *Med Vet Entomol*, 2007, 21, 183-95.
- Fay, R. W. & Eliason, D. A., A preferred oviposition site as a surveillance method for Aedes aegypti, *Mosquito News*, 1966, 26, 531 – 535 .
- Fialova, A., Cimburek, Z., Iezzi, G. & Kopecky, J., Ixodes ricinus tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells, *Microbes Infect*, 2010, 12, 580-5.
- Flahault, A., [Emerging infectious diseases: the example of the Indian Ocean chikungunya outbreak (2005-2006)], *Bull Acad Natl Med*, 2007, 191, 113-24; discussion 125-8.
- Focks, D., A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors, *World Health Organization*, 2003, TDR/ IDE/Den/03.1,
- Focks, D. A., Brenner, R. J., Hayes, J. & Daniels, E., Transmission thresholds for dengue in terms of Aedes aegypti pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts, *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62, 11-8.
- Focks, D. A. & Chadee, D. D., Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for Aedes aegypti: an example using data from Trinidad, *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56, 159-67.
- Focks, D. A., Linda, S. B., Craig, G. B., Jr., Hawley, W. A. & Pumpuni, C. B., Aedes albopictus (Diptera: Culicidae): a statistical model of the role of temperature, photoperiod, and geography in the induction of egg diapause, *J Med Entomol*, 1994, 31, 278-86.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Misse, D., Pages, F., Fusai, T., Rogier, C. &

- Almeras, L., Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions, *Parasit Vectors*, 2011, 4, 187.
- Franco, L., Palacios, G., Martinez, J. A., Vazquez, A., Savji, N., De Ory, F., Sanchez-Seco, M. P., Martin, D., Lipkin, W. I. & Tenorio, A., First Report of Sylvatic DENV-2-Associated Dengue Hemorrhagic Fever in West Africa, *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5, e1251.
- Frankie, G. E., Ecology of insects in urban environments, *Annu. Rev. Entomol* 1978, 23, 367–87.
- Fukuda, M. M., Klein, T. A., Kochel, T., Quandelacy, T. M., Smith, B. L., Villinski, J., Bethell, D., Tyner, S., Se, Y., Lon, C., Saunders, D., Johnson, J., Wagar, E., Walsh, D., Kasper, M., Sanchez, J. L., Witt, C. J., Cheng, Q., Waters, N., Shrestha, S. K., Pavlin, J. A., Lescano, A. G., Graf, P. C., Richardson, J. H., Durand, S., Rogers, W. O., Blazes, D. L., Russell, K. L., Akala, H., Gaydos, J. C., DeFraites, R. F., Gosi, P., Timmermans, A., Yasuda, C., Brice, G., Eyase, F., Kronmann, K., Sebeny, P., Gibbons, R., Jarman, R., Waitumbi, J., Schnabel, D., Richards, A. & Shanks, D., Malaria and other vector-borne infection surveillance in the U.S. Department of Defense Armed Forces Health Surveillance Center-Global Emerging Infections Surveillance program: review of 2009 accomplishments, *BMC Public Health*, 2011, 11 Suppl 2, S9.
- Gardner, J., Anraku, I., Le, T. T., Larcher, T., Major, L., Roques, P., Schroder, W. A., Higgs, S. & Suhrbier, A., Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice, *J Virol*, 2010, 84, 8021-32.
- Gerardin, P., Guernier, V., Perrau, J., Fianu, A., Le Roux, K., Grivard, P., Michault, A., de Lamballerie, X., Flahault, A. & Favier, F., Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic, *BMC Infect Dis*, 2008, 8, 99.
- Gidwani, K., Picado, A., Rijal, S., Singh, S. P., Roy, L., Volfova, V., Andersen, E. W., Uranw, S., Ostyn, B., Sudarshan, M., Chakravarty, J., Volf, P., Sundar, S., Boelaert, M. & Rogers, M. E., Serological Markers of Sand Fly Exposure to Evaluate Insecticidal Nets against Visceral Leishmaniasis in India and Nepal: A Cluster-Randomized Trial, *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5, e1296.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., Silva, C., de Oliveira, C. I., Miranda, J. C., Elnaïem, D. E., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G. & Brodskyn, C. I., Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 7845-50.
- Gomes, R. B., Brodskyn, C., de Oliveira, C. I., Costa, J., Miranda, J. C., Caldas, A., Valenzuela, J. G., Barral-Netto, M. & Barral, A., Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-Leishmania chagasi delayed-type hypersensitivity, *J Infect Dis*, 2002, 186, 1530-4.
- Gould, E. A., Gallian, P., De Lamballerie, X. & Charrel, R. N., First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality!, *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16, 1702-4.
- Gould, E. A. & Higgs, S., Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2009, 103, 109-21.
- Gratz, N. G., Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*, *Med Vet Entomol*, 2004, 18, 215-27.

- Grivard, P., Le Roux, K., Laurent, P., Fianu, A., Perrau, J., Gigan, J., Hoarau, G., Grondin, N., Staikowsky, F., Favier, F. & Michault, A., Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection, *Pathol Biol (Paris)*, 2007, 55, 490-4.
- Gubler, D. & LeDuc, J., Viral zoonoses, In: Dale DC, Federman DD, editors. *Scientific American medicine*. , 1998, Vol. II. Seven infectious diseases. Seattle, WA, USA: Scientific American, Inc: 1-10.,
- Gubler, D. J., The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems, *Arch Med Res*, 2002, 33, 330-42.
- Gubler, D. J., Vector-borne diseases, *Rev Sci Tech*, 2009, 28, 583-8.
- Guy, B., Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M., Teyssou, R. & Lang, J., From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine, *Vaccine*, 2011, 29, 7229-41.
- Hajnicka, V., Fuchsberger, N., Slovak, M., Kocakova, P., Labuda, M. & Nuttall, P. A., Tick salivary gland extracts promote virus growth in vitro, *Parasitology*, 1998, 116 (Pt 6), 533-8.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M. & Bowman, A. S., Ixodes ricinus tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes, *Parasite Immunol*, 2003, 25, 27-37.
- Hase, A., Weitere Beobachtungen uber die Lauseplage, *Central. F. Bacteriol. I Orig*, 1916, 77, 153-63
- Hasebe, F., Parquet, M. C., Pandey, B. D., Mathenge, E. G., Morita, K., Balasubramaniam, V., Saat, Z., Yusop, A., Sinniah, M., Natkunam, S. & Igarashi, A., Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction, *J Med Virol*, 2002, 67, 370-4.
- Hii, J., A resurvey of potential vectors of dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Sabah., *Med. J. Malays.*, 1977, 32, 193-96.
- Hoarau, J. J., Jaffar Bandjee, M. C., Krejbich Trotot, P., Das, T., Li-Pat-Yuen, G., Dassa, B., Denizot, M., Guichard, E., Ribera, A., Henni, T., Tallet, F., Moiton, M. P., Gauzere, B. A., Bruniquet, S., Jaffar Bandjee, Z., Morbidelli, P., Martigny, G., Jolivet, M., Gay, F., Grandadam, M., Tolou, H., Vieillard, V., Debre, P., Autran, B. & Gasque, P., Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response, *J Immunol*, 2010, 184, 5914-27.
- Hoel, D. F., Kline, D. L. & Allan, S. A., Evaluation of six mosquito traps for collection of Aedes albopictus and associated mosquito species in a suburban setting in north central Florida, *J Am Mosq Control Assoc*, 2009, 25, 47-57.
- Holder, P., George, S., Disbury, M., Singe, M., Kean, J. M. & McFadden, A., A biosecurity response to Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in Auckland, New Zealand, *J Med Entomol*, 2010, 47, 600-9.
- Hopkins, H., Kambale, W., Kamya, M. R., Staedke, S. G., Dorsey, G. & Rosenthal, P. J., Comparison of HRP2- and pLDH-based rapid diagnostic tests for malaria with longitudinal follow-up in Kampala, Uganda, *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76, 1092-7.
- Hostomska, J., Rohousova, I., Volfova, V., Stanneck, D., Mencke, N. & Volf, P., Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly Lutzomyia

- longipalpis, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2008, 8, 443-50.
- Hovius, J. W., de Jong, M. A., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S. I. & Geijtenbeek, T. B., Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization, *PLoS Pathog*, 2008, 4, e31.
- Hu, D., Di, B., Ding, X., Wang, Y., Chen, Y., Pan, Y., Wen, K., Wang, M. & Che, X., Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection, *Virol J*, 2011, 8, 47.
- INVS, Epidémie de Chikungunya à la Réunion. Point de situation au 05 juillet 2006, [http://www.invs.sante.fr/presse/2006/le_point_sur/chikungunya_reunion_050706/chikungunya_reunion_s26.pdf] webcite, 2006,
- Izri, A., Bitam, I. & Charrel, R. N., First entomological documentation of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria, *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17, 1116-8.
- Jain, A. & Chaturvedi, U. C., Dengue in infants: an overview, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010, 59, 119-30.
- Jeon, S. H., Park, J. W. & Lee, B. H., Characterization of human IgE and mouse IgG1 responses to allergens in three mosquito species by immunoblotting and ELISA, *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 126, 206-12.
- Jirakanjanakit, N., Rongnoparut, P., Saengtharatip, S., Chareonviriyaphap, T., Duchon, S., Bellec, C. & Yoksan, S., Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005, *J Econ Entomol*, 2007, 100, 545-50.
- Jupp, P. G. & Kemp, A., What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa?, *S Afr Med J*, 1996, 86, 35-7.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E. & Sacks, D., Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies, *Science*, 2000, 290, 1351-4.
- Karabatos, N., International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates, *Am Soc Trop Med Hyg*, 1985, 2001 update,
- Kebaier, C., Voza, T. & Vanderberg, J., Neither mosquito saliva nor immunity to saliva has a detectable effect on the infectivity of *Plasmodium* sporozoites injected into mice, *Infect Immun*, 2010, 78, 545-51.
- Kern, A., Collin, E., Barthel, C., Michel, C., Jaulhac, B. & Boulanger, N., Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of lyme disease, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011, 11, 1343-50.
- Klungthong, C., Gibbons, R. V., Thaisomboonsuk, B., Nisalak, A., Kalayanaroj, S., Thirawuth, V., Nutkumhang, N., Mammen, M. P., Jr. & Jarman, R. G., Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation, *J Clin Microbiol*, 2007, 45, 2480-5.
- Knox, T. B., Nguyen, Y. T., Vu, N. S., Kay, B. H. & Ryan, P. A., Quantitative relationships between immature and emergent adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in water storage container habitats, *J Med Entomol*, 2010, 47, 748-58.

- Knudsen, A. B., Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*, *Parassitologia*, 1995, 37, 91-7.
- Konishi, E., Distribution of immunoglobulin G and E antibody levels to salivary gland extracts of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in several age groups of a Japanese population, *J Med Entomol*, 1990, 27, 519-22.
- Kouri, G. P., Guzman, M. G. & Bravo, J. R., Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987, 81, 821-3.
- Kristan, M., Abeku, T. A., Beard, J., Okia, M., Rapuoda, B., Sang, J. & Cox, J., Variations in entomological indices in relation to weather patterns and malaria incidence in East African highlands: implications for epidemic prevention and control, *Malar J*, 2008, 7, 231.
- Kumar, S., Thomas, A. & Pillai, M., Deltamethrin: Promising mosquito control agent against adult stage of *Aedes aegypti* L., *Asian Pac J Trop Med*, 2011, 4, 430-5.
- Kumari, A., Gakhar, S. K. & Hooda, V., Antibodies raised against hemolymph of *Anopheles culicifacies* reduce the fecundity and malaria parasite development, *J Vector Borne Dis*, 2009, 46, 255-60.
- Kuno, G., Gomez, I. & Gubler, D. J., An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections, *J Virol Methods*, 1991, 33, 101-13.
- La Ruche, G., Souares, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Despres, P., Lenglet, A., Jourdain, F., Leparco-Goffart, I., Charlet, F., Ollier, L., Mantey, K., Mollet, T., Fournier, J. P., Torrents, R., Leitmeyer, K., Hilairat, P., Zeller, H., Van Bortel, W., Dejour-Salamanca, D., Grandadam, M. & Gastellu-Etchegorry, M., First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010, *Euro Surveill*, 2010, 15, 19676.
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J. & Vorndam, A. V., Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 1992, 30, 545-51.
- Lane RS, M. R., Hsu YP, Wei T, Mesirov ML and Kuo MM. , Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California, *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61, 850-9.
- Le Goff, G., Carnevale, P., Fondjo, E. & Robert, V., Comparison of three sampling methods of man-biting anophelines in order to estimate the malaria transmission in a village of south Cameroon, *Parasite*, 1997, 4, 75-80.
- Lerner, E. A., Ribeiro, J. M., Nelson, R. J. & Lerner, M. R., Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, *J Biol Chem*, 1991, 266, 11234-6.
- Ligon, B. L., Infectious diseases that pose specific challenges after natural disasters: a review, *Semin Pediatr Infect Dis*, 2006, 17, 36-45.
- Liu, N., Montgomery, R. R., Barthold, S. W. & Bockenstedt, L. K., Myeloid differentiation antigen 88 deficiency impairs pathogen clearance but does not alter inflammation in *Borrelia burgdorferi*-infected mice, *Infect Immun*, 2004, 72, 3195-203.
- Llinas, G. A., Seccacini, E., Gardenal, C. N. & Licastro, S., Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010, 105, 113-6.

- Londono-Renteria, B. L., Eisele, T. P., Keating, J., James, M. A. & Wesson, D. M., Antibody response against *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) salivary protein as a measure of mosquito bite exposure in Haiti, *J Med Entomol*, 2010, 47, 1156-63.
- Machackova, M., Obornik, M. & Kopecky, J., Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in vivo, *Folia Parasitol (Praha)*, 2006, 53, 153-8.
- Machain-Williams, C., Mammen, M. P., Jr., Zeidner, N. S., Beaty, B. J., Prenni, J. E., Nisalak, A. & Blair, C. D., Association of Human Immune Response to *Aedes aegypti* Salivary Proteins with Dengue Disease Severity, *Parasite Immunol*, 2011,
- Mackenzie, J. S., Gubler, D. J. & Petersen, L. R., Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses, *Nat Med*, 2004, 10, S98-109.
- Marinotti, O., de Brito, M. & Moreira, C. K., Apyrase and alpha-glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1996, 113, 675-9.
- Marques, A. R., Lyme disease: a review, *Curr Allergy Asthma Rep*, 2010, 10, 13-20.
- Martin, E., Moutailler, S., Madec, Y. & Failloux, A. B., Differential responses of the mosquito *Aedes albopictus* from the Indian Ocean region to two chikungunya isolates, *BMC Ecol*, 2010, 10, 8.
- Marzouki, S., Ben Ahmed, M., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Aleya-Bouafif, N. B., Namane, A., Hamida, N. B., Salah, A. B. & Louzir, H., Characterization of the Antibody Response to the Saliva of *Phlebotomus papatasi* in People Living in Endemic Areas of Cutaneous Leishmaniasis, *Am J Trop Med Hyg*, 2011a, 84, 653-61.
- Marzouki, S., Ben Ahmed, M., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Ben Aleya-Bouafif, N., Namane, A., Hamida, N. B., Ben Salah, A. & Louzir, H., Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis, *Am J Trop Med Hyg*, 2011b, 84, 653-61.
- Mathur, G., Sanchez-Vargas, I., Alvarez, D., Olson, K. E., Marinotti, O. & James, A. A., Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect Mol Biol*, 2010, 19, 753-63.
- McKiel, J. A., Sensitization to mosquito bites, *Can . J. Zool*, 1959, 37, 341-51.
- McKiel, J. A. & West, A. S., Nature and causation of insect bites reactions., *Pediatr Clin North Am*, 1961, 8, 795-815.
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F. & O'Neill, S. L., Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*, *Science*, 2009, 323, 141-4.
- Mejri, N. & Brossard, M., Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naive CD4+T to induce Th2 cell differentiation in vitro and in vivo, *Int Immunol*, 2007, 19, 535-43.
- Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B. & Brossard, M., Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations, *Parasite Immunol*, 2001, 23, 61-9.
- Mercado-Hernandez, R., Aguilar-Gueta Jde, D., Fernandez-Salas, I. & Earl, P. R.,

- The association of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in Allende, Nuevo Leon, Mexico, *J Am Mosq Control Assoc*, 2006, 22, 5-9.
- Michael, E., Ramaiah, K. D., Hoti, S. L., Barker, G., Paul, M. R., Yuvaraj, J., Das, P. K., Grenfell, B. T. & Bundy, D. A., Quantifying mosquito biting patterns on humans by DNA fingerprinting of bloodmeals, *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65, 722-8.
- Montfort, W. R., Weichsel, A. & Andersen, J. F., Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods, *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1482, 110-8.
- Moore, C. G., The Centers for Disease Control's perspective of the introduction of *Aedes albopictus* into the United States, *J Am Mosq Control Assoc*, 1986, 2, 416-7.
- Morey, S. H., Kashyap, R. S., Purohit, H. J., Taori, G. M. & Dagainawala, H. F., An approach towards peptide-based antibody detection for diagnosis of Chikungunya infection, *Biomarkers*, 2010, 15, 546-52.
- Moro, M. L., Gagliotti, C., Silvi, G., Angelini, R., Sambri, V., Rezza, G., Massimiliani, E., Mattivi, A., Grilli, E., Finarelli, A. C., Spataro, N., Pierro, A. M., Seyler, T. & Macini, P., Chikungunya virus in North-Eastern Italy: a seroprevalence survey, *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82, 508-11.
- Mota, J. & Rico-Hesse, R., Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever, *PLoS One*, 2011, 6, e20762.
- Mousson, L., Martin, E., Zouache, K., Madec, Y., Mavingui, P. & Failloux, A. B., Wolbachia modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*, *Mol Ecol*, 2010, 19, 1953-64.
- Murgue, B., Severe dengue: questioning the paradigm, *Microbes Infect*, 2010, 12, 113-8.
- Nascimento, R., Santana, J., Lozzi, S., Araujo, C. & Teixeira, A., Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins, *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65, 219-26.
- Niyas, K. P., Abraham, R., Unnikrishnan, R. N., Mathew, T., Nair, S., Manakkadan, A., Issac, A. & Sreekumar, E., Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India, *Virol J*, 2010, 7, 189.
- Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B. L., Socheat, D. & Fukuda, M. M., Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia, *N Engl J Med*, 2008, 359, 2619-20.
- Ochola, L. B., Vounatsou, P., Smith, T., Mabaso, M. L. & Newton, C. R., The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard, *Lancet Infect Dis*, 2006, 6, 582-8.
- Organization, W. H., Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, Geneva, 2009, WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1,
- Orlandi-Pradines, E., Almeras, L., Denis de Senneville, L., Barbe, S., Remoue, F., Villard, C., Cornelie, S., Penhoat, K., Pascual, A., Bourgouin, C., Fontenille, D., Bonnet, J., Corre-Catelin, N., Reiter, P., Pages, F., Laffite, D., Boulanger, D., Simondon, F., Pradines, B., Fusai, T. & Rogier, C., Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa, *Microbes Infect*, 2007, 9, 1454-62.

- Osorio, L., Ramirez, M., Bonelo, A., Villar, L. A. & Parra, B., Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection, *Virol J*, 2010, 7, 361.
- Pacheco-Coral Adel, P., Quiñones-Pinzón, M., Serrato-Pomar, I. & Rivas-Muñoz, F., Evaluating an Information, Education and Communication (IEC) strategy which was adopted for *Aedes aegypti* control in La Dorada, Colombia., *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2010, 12, 380-90.
- Padbidri, V. S. & Gnaneswar, T. T., Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India, *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, 1979, 23, 445-51.
- Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A. & Stuart, D. I., Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure, *Mol Cell*, 1999, 3, 661-71.
- PAHO, *Aedes albopictus* in the Caribbean, *PAHO advisory*, 1993,
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V. & Fontenille, D., *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light, *Microbes Infect*, 2009, 11, 1177-85.
- Paupy, C., Ollomo, B., Kamgang, B., Moutailler, S., Rousset, D., Demanou, M., Herve, J. P., Leroy, E. & Simard, F., Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010, 10, 259-66.
- Peng, Z., Ho, M. K., Li, C. & Simons, F. E., Evidence for natural desensitization to mosquito salivary allergens: mosquito saliva specific IgE and IgG levels in children, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2004, 93, 553-6.
- Peng, Z., Li, H. & Simons, F. E., Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 101, 498-505.
- Peng, Z., Rasic, N., Liu, Y. & Simons, F. E., Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors, *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110, 816-7.
- Peng, Z. & Simons, F. E., Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens, *Int Arch Allergy Immunol*, 2004, 133, 198-209.
- Peng, Z., Xu, W., Lam, H., Cheng, L., James, A. A. & Simons, F. E., A new recombinant mosquito salivary allergen, rAed a 2: allergenicity, clinical relevance, and cross-reactivity, *Allergy*, 2006, 61, 485-90.
- Peng, Z., Yang, J., Wang, H. & Simons, F. E., Production and characterization of monoclonal antibodies to two new mosquito *Aedes aegypti* salivary proteins, *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29, 909-14.
- Peng, Z., Yang, M. & Simons, F. E., Measurement of mosquito *Aedes vexans* salivary gland-specific IgE and IgG antibodies and the distribution of these antibodies in human sera, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1995, 74, 259-64.
- Pethuan, S., Jirakanjanakit, N., Saengtharatip, S., Chareonviriyaphap, T., Kaewpa, D. & Rongnoparut, P., Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand, *Trop Biomed*, 2007, 24, 7-15.
- Peyrefitte, C. N., Bessaud, M., Pastorino, B. A., Gravier, P., Plumet, S., Merle, O. L., Moltini, I., Coppin, E., Tock, F., Daries,

- W., Ollivier, L., Pages, F., Martin, R., Boniface, F., Tolou, H. J. & Grandadam, M., Circulation of Chikungunya virus in Gabon, 2006-2007, *J Med Virol*, 2008, 80, 430-3.
- Pialoux, G., Gauzere, B. A., Jaureguiberry, S. & Strobel, M., Chikungunya, an epidemic arbovirosis, *Lancet Infect Dis*, 2007, 7, 319-27.
- Pierre, V., Thiria, J., Rachou, E., Sissoko, D., Lassalle, C. & Renault, P., Épidémiologie de la dengue à la Réunion - Bilan d'une année de surveillance, *Institut de veille sanitaire*, 2007,
- Poinsignon, A., Cornelie, S., Ba, F., Boulanger, D., Sow, C., Rossignol, M., Sokhna, C., Cisse, B., Simondon, F. & Remoue, F., Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites, *Malar J*, 2009, 8, 198.
- Poinsignon, A., Cornelie, S., Mestres-Simon, M., Lanfrancotti, A., Rossignol, M., Boulanger, D., Cisse, B., Sokhna, C., Arca, B., Simondon, F. & Remoue, F., Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites, *PLoS One*, 2008a, 3, e2472.
- Poinsignon, A., Remoue, F., Rossignol, M., Cornelie, S., Courtin, D., Grebaut, P., Garcia, A. & Simondon, F., Human IgG antibody response to Glossina saliva: an epidemiologic marker of exposure to Glossina bites, *Am J Trop Med Hyg*, 2008b, 78, 750-3.
- Poinsignon, A., Samb, B., Doucoure, S., Drame, P. M., Sarr, J. B., Sow, C., Cornelie, S., Maiga, S., Thiam, C., Rogerie, F., Guindo, S., Hermann, E., Simondon, F., Dia, I., Riveau, G., Konate, L. & Remoue, F., First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to Anopheles funestus bites, *Trop Med Int Health*, 2010, 15, 1198-203.
- Pontes, R. J., Freeman, J., Oliveira-Lima, J. W., Hodgson, J. C. & Spielman, A., Vector densities that potentiate dengue outbreaks in a Brazilian city, *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62, 378-83.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B. & Weaver, S. C., Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships, *J Gen Virol*, 2000, 81, 471-9.
- Prates, D. B., Santos, L. D., Miranda, J. C., Souza, A. P., Palma, M. S., Barral-Netto, M. & Barral, A., Changes in amounts of total salivary gland proteins of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) according to age and diet, *J Med Entomol*, 2008, 45, 409-13.
- Prophiro, J. S., Silva, O. S., Luna, J. E., Piccoli, C. F., Kanis, L. A. & Silva, M. A., Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization, *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011,
- Ramful, D., Carbonnier, M., Pasquet, M., Bouhmani, B., Ghazouani, J., Noormahomed, T., Beullier, G., Attali, T., Samperiz, S., Fourmaintraux, A. & Alessandri, J. L., Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection, *Pediatr Infect Dis J*, 2007, 26, 811-5.
- Ramsay, M., Tiemessen, C. T., Choudhury, A. & Soodyall, H., Africa: the next frontier for human disease gene discovery?, *Hum Mol Genet*, 2011, 20, R214-20.

- Randolph, S. E. & Rogers, D. J., The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions, *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8, 361-71.
- Rao, T. R., Immunological surveys of arbovirus infections in South-East Asia, with special reference to dengue, chikungunya, and Kyasanur Forest disease, *Bull World Health Organ*, 1971, 44, 585-91.
- Ratsitorahina, M., Harisoa, J., Ratovonjato, J., Biacabe, S., Reynes, J. M., Zeller, H., Raoelina, Y., Talarmin, A., Richard, V. & Louis Soares, J., Outbreak of dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006, *Emerg Infect Dis*, 2008, 14, 1135-7.
- Receveur, M., Ezzedine, K., Pistone, T. & Malvy, D., Chikungunya infection in a French traveller returning from the Maldives, October, 2009, *Euro Surveill*, 2010, 15, 19494.
- Reiter, P., Yellow fever and dengue: a threat to Europe?, *Euro Surveill*, 2010, 15, 19509.
- Reiter, P., Fontenille, D. & Paupy, C., *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem?, *Lancet Infect Dis*, 2006, 6, 463-4.
- Remoue, F., Alix, E., Cornelie, S., Sokhna, C., Cisse, B., Doucoure, S., Mouchet, F., Boulanger, D. & Simondon, F., IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children, *Acta Trop*, 2007, 104, 108-15.
- Remoue, F., Cisse, B., Ba, F., Sokhna, C., Herve, J. P., Boulanger, D. & Simondon, F., Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006, 100, 363-70.
- Remoue, F. C., S. Ngom, A. Boulanger, D and Simondon, F Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases., *In Update in tropical immunology*, 2005, Edited by Garraud O. Fort PO. Tivandrum, Herala, India: Transworld research Network 2005:377-400,
- Renault, P., Solet, J. L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., Filleul, L., Lassalle, C., Thiria, J., Rachou, E., de Valk, H., Ilef, D., Ledrans, M., Quatresous, I., Quenel, P. & Pierre, V., A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006, *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77, 727-31.
- Reunala, T., Brummer-Korvenkontio, H., Palosuo, K., Miyanij, M., Ruiz-Maldonado, R., Love, A., Francois, G. & Palosuo, T., Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children, *Int Arch Allergy Immunol*, 1994, 104, 366-71.
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M. G., Majori, G. C. & Cassone, A., Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region, *Lancet*, 2007, 370, 1840-6.
- Ribeiro, J. M., Role of saliva in blood-feeding by arthropods, *Annu Rev Entomol*, 1987, 32, 463-78.
- Ribeiro, J. M., Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?, *Infect Agents Dis*, 1995, 4, 143-52.
- Ribeiro, J. M., Arca, B., Lombardo, F., Calvo, E., Phan, V. M., Chandra, P. K. & Wikel, S. K., An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult

- female mosquito, *Aedes aegypti*, *BMC Genomics*, 2007, 8, 6.
- Ribeiro, J. M. & Francischetti, I. M., Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives, *Annu Rev Entomol*, 2003, 48, 73-88.
- Ribeiro, J. M. & Nussenzveig, R. H., The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*, *J Exp Biol*, 1993, 179, 273-87.
- Rizzo, C., Ronca, R., Fiorentino, G., Verra, F., Mangano, V., Poinssignon, A., Sirima, S. B., Nebie, I., Lombardo, F., Remoue, F., Coluzzi, M., Petrarca, V., Modiano, D. & Arca, B., Humoral response to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: a serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors, *PLoS One*, 2011, 6, e17980.
- Roca, Y., Baronti, C., Revollo, R. J., Cook, S., Loayza, R., Ninove, L., Fernandez, R. T., Flores, J. V., Herve, J. P. & de Lamballerie, X., Molecular epidemiological analysis of dengue fever in Bolivia from 1998 to 2008, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2009, 9, 337-44.
- Rohousova, I., Hostomska, J., Vlkova, M., Kobets, T., Lipoldova, M. & Volf, P., The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure, *Int J Parasitol*, 2011, 41, 481-5.
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y. & Volf, P., Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies, *Parasitology*, 2005, 130, 493-9.
- Ross, R. W., The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic, *J Hyg (Lond)*, 1956, 54, 177-91.
- Sanchez, L., Cortinas, J., Pelaez, O., Gutierrez, H., Concepcion, D. & Van der Stuyft, P., Breteau Index threshold levels indicating risk for dengue transmission in areas with low *Aedes* infestation, *Trop Med Int Health*, 2010, 15, 173-5.
- Saridaki, A. & Bourtzis, K., Wolbachia: more than just a bug in insects genitals, *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13, 67-72.
- Sawabe, K., Isawa, H., Hoshino, K., Sasaki, T., Roychoudhury, S., Higa, Y., Kasai, S., Tsuda, Y., Nishiumi, I., Hisai, N., Hamao, S. & Kobayashi, M., Host-feeding habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the urban and suburban residential areas of Japan, *J Med Entomol*, 2010, 47, 442-50.
- Schneider, B. S. & Higgs, S., The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2008, 102, 400-8.
- Schneider, B. S., Mathieu, C., Peronet, R. & Mecheri, S., *Anopheles stephensi* Saliva Enhances Progression of Cerebral Malaria in a Murine Model, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011, 11, 423-32.
- Schneider, B. S., McGee, C. E., Jordan, J. M., Stevenson, H. L., Soong, L. & Higgs, S., Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted West Nile virus infection, *PLoS One*, 2007, 2, e1171.
- Schneider, B. S., Soong, L., Coffey, L. L., Stevenson, H. L., McGee, C. E. & Higgs, S., *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection, *PLoS One*, 2010, 5, e11704.
- Schneider, B. S., Soong, L., Girard, Y. A., Campbell, G., Mason, P. & Higgs, S.,

- Potential of West Nile encephalitis by mosquito feeding, *Viral Immunol*, 2006, 19, 74-82.
- Schneider, B. S., Soong, L., Zeidner, N. S. & Higgs, S., Aedes aegypti salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection, *Viral Immunol*, 2004, 17, 565-73.
- Schoeler, G. B. & Wikel, S. K., Modulation of host immunity by haematophagous arthropods, *Ann Trop Med Parasitol*, 2001, 95, 755-71.
- Scholte, E., Den Hartog, W., Dik, M., Schoelitsz, B., Brooks, M., Schaffner, F., Foussadier, R., Braks, M. & Beeuwkes, J., Introduction and control of three invasive mosquito species in the Netherlands, July-October 2010, *Euro Surveill*, 2010, 15,
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J. M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M. P., Brehin, A. C., Cubito, N., Despres, P., Kunst, F., Rey, F. A., Zeller, H. & Brisse, S., Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak, *PLoS Med*, 2006, 3, e263.
- Schwartz, B. S. & Goldstein, M. D., Lyme disease in outdoor workers: risk factors, preventive measures, and tick removal methods, *Am J Epidemiol*, 1990, 131, 877-85.
- Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M. & Goldstein, M. D., Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research, *Am J Epidemiol*, 1990, 132, 58-66.
- Schwarz, A., Helling, S., Collin, N., Teixeira, C., Medrano-Mercado, N., Hume, J., Assumpcao, T., Marcus, K., Stephan, C., Meyer, H., Ribeiro, J., Billingsley, P., Valenzuela, J., Sternberg, J. & Schaub, G., Immunogenic salivary proteins of Triatoma infestans: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines, *PLoS Negl Trop Dis*, 2009a, 3, e532.
- Schwarz, A., Juarez, J. A., Richards, J., Rath, B., Machaca, V. Q., Castro, Y. E., Malaga, E. S., Levy, K., Gilman, R. H., Bern, C., Verastegui, M. & Levy, M. Z., Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission, *Int J Parasitol*, 2011,
- Schwarz, A., Sternberg, J. M., Johnston, V., Medrano-Mercado, N., Anderson, J. M., Hume, J. C., Valenzuela, J. G., Schaub, G. A. & Billingsley, P. F., Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of Triatoma infestans as biomarkers for low-level infestation of triatomines, *Int J Parasitol*, 2009b, 39, 1021-9.
- Service, M., Control of urban mosquitoes, *Pestic. Outl.*, 1990, 1, 17-20.
- Service, M., Mosquito Ecology Field Sampling Methods 2nd edn Elsevier Applied Science, London 1993, 515 – 520 ..
- Service, M. W., Mosquito Ecology Field Sampling Methods 2nd edn Elsevier Applied Science, London 1993, 515 – 520 ..
- Shen, H., Chen, C., Chang, H., Chang, L., Tu, W. & Han, S., Human IgE and IgG antibodies to mosquito proteins detected by the immunoblot technique., *Ann Allergy*, 1989, 63, 143-6.
- Simons, S. M., Junior, P. L., Faria, F., Batista Ide, F., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B. & Chudzinski-Tavassi, A. M., The action of Amblyomma cajennense tick saliva in compounds of the hemostatic

- system and cytotoxicity in tumor cell lines, *Biomed Pharmacother*, 2011, 65, 443-50.
- Souza, A. P., Andrade, B. B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J. C., Alcantara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C. R., Valenzuela, J. G., de Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral-Netto, M. & Barral, A., Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas, *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4, e649.
- Staples, J. E., Breiman, R. F. & Powers, A. M., Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease, *Clin Infect Dis*, 2009, 49, 942-8.
- Stark, K. R. & James, A. A., Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *J Biol Chem*, 1998, 273, 20802-9.
- Stern, D. I., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Temperley, W. H., Noor, A. M., Okiro, E. A., Shanks, G. D., Snow, R. W. & Hay, S. I., Temperature and malaria trends in highland East Africa, *PLoS One*, 2011, 6, e24524.
- Stoddard, S. T., Morrison, A. C., Vazquez-Prokopec, G. M., Paz Soldan, V., Kochel, T. J., Kitron, U., Elder, J. P. & Scott, T. W., The role of human movement in the transmission of vector-borne pathogens, *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3, e481.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A., Luck, R. F. & Werren, J. H., Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis, *Nature*, 1993, 361, 66-8.
- Sulaiman, S., Pawanchee, Z. A., Arifin, Z. & Wahab, A., Relationship between Breteau and House indices and cases of dengue/dengue hemorrhagic fever in Kuala Lumpur, Malaysia, *J Am Mosq Control Assoc*, 1996, 12, 494-6.
- Sutherst, R. W., Global change and human vulnerability to vector-borne diseases, *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17, 136-73.
- Tan, C. H., Wong, P. S., Li, M. Z., Tan, S. Y., Lee, T. K., Pang, S. C., Lam-Phua, S. G., Maideen, N., Png, A. B., Koo, S. Y., Lu, D. & Ng, L. C., Entomological investigation and control of a chikungunya cluster in Singapore, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011, 11, 383-90.
- Tatem, A. J., Rogers, D. J. & Hay, S. I., Global transport networks and infectious disease spread, *Adv Parasitol*, 2006, 62, 293-343.
- Taylor, J. L., Schoenherr, C. & Grossberg, S. E., Protection against Japanese encephalitis virus in mice and hamsters by treatment with carboxymethylacridanone, a potent interferon inducer, *J Infect Dis*, 1980, 142, 394-9.
- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaiem, D. E., Caldas, A., de Souza, A. P., Brodskyn, C. I., de Oliveira, C. I., Mendonça, I., Costa, C. H., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S. & Valenzuela, J. G., Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America, *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4, e638.
- Tesh, R. B., Travassos da Rosa, A. P., Guzman, H., Araujo, T. P. & Xiao, S. Y., Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis, *Emerg Infect Dis*, 2002, 8, 245-51.
- Thangamani, S., Higgs, S., Ziegler, S., Vanlandingham, D., Tesh, R. & Wikel, S., Host immune response to mosquito-transmitted chikungunya virus differs from

- that elicited by needle inoculated virus, *PLoS One*, 2010, 5, e12137.
- Thome, R. C., Yang, H. M. & Esteva, L., Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and insecticide, *Math Biosci*, 2010, 223, 12-23.
- Thonnon, J., Spiegel, A., Diallo, M., Diallo, A. & Fontenille, D., [Chikungunya virus outbreak in Senegal in 1996 and 1997], *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, 92, 79-82.
- Tjitra, E., Suprianto, S., Dyer, M. E., Currie, B. J. & Anstey, N. M., Detection of histidine rich protein 2 and panmalarial ICT Malaria Pf/Pv test antigens after chloroquine treatment of uncomplicated falciparum malaria does not reliably predict treatment outcome in eastern Indonesia, *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65, 593-8.
- Torcia, M. G., Santarlasci, V., Cosmi, L., Clemente, A., Maggi, L., Mangano, V. D., Verra, F., Bancone, G., Nebie, I., Sirima, B. S., Liotta, F., Frosali, F., Angeli, R., Severini, C., Sannella, A. R., Bonini, P., Lucibello, M., Maggi, E., Garaci, E., Coluzzi, M., Cozzolino, F., Annunziato, F., Romagnani, S. & Modiano, D., Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 646-51.
- Trevejo, R. T. & Reeves, W. C., Antibody response to *Culex tarsalis* salivary gland antigens among sentinel chickens in California, *Am J Trop Med Hyg*, 2005, 72, 481-7.
- Tsujimoto, H., Gray, E. W. & Champagne, D. E., Black fly salivary gland extract inhibits proliferation and induces apoptosis in murine splenocytes, *Parasite Immunol*, 2010, 32, 275-84.
- Tun-Lin, W., Kay, B. H., Barnes, A. & Forsyth, S., Critical examination of *Aedes aegypti* indices: correlations with abundance, *Am J Trop Med Hyg*, 1996, 54, 543-7.
- Turley, A. P., Moreira, L. A., O'Neill, S. L. & McGraw, E. A., Wolbachia infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*, *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3, e516.
- UN, World urbanization prospects: the 2003 revision., 2003,
- Urbanelli, S., Bellini, R., Carrieri, M., Sallicandro, P. & Celli, G., Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries, *Heredity*, 2000, 84 (Pt 3), 331-7.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Rowton, E. & Ribeiro, J. M., The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases, *J Exp Biol*, 2001, 204, 229-37.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Galperin, M. Y. & Ribeiro, J. M., Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme, *J Biol Chem*, 1998, 273, 30583-90.
- Valerio, L., Marini, F., Bongiorno, G., Facchinelli, L., Pombi, M., Caputo, B., Maroli, M. & Della Torre, A., Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome province, Italy, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010, 10, 291-4.
- Vazeille, M., Jeannin, C., Martin, E., Schaffner, F. & Failloux, A. B., Chikungunya: a risk for Mediterranean countries?, *Acta Trop*, 2008, 105, 200-2.

- Vazeille, M., Mousson, L. & Failloux, A. B., Failure to demonstrate experimental vertical transmission of the epidemic strain of Chikungunya virus in *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009, 104, 632-5.
- Vazeille, M., Mousson, L., Martin, E. & Failloux, A. B., Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva, *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4, e706.
- Vezzani, D., Velazquez, S. M. & Schweigmann, N., Control of *Aedes aegypti* with temephos in a Buenos Aires cemetery, Argentina, *Rev Saude Publica*, 2004, 38, 738-40.
- Volk, S. M., Chen, R., Tssetsarkin, K. A., Adams, A. P., Garcia, T. I., Sall, A. A., Nasar, F., Schuh, A. J., Holmes, E. C., Higgs, S., Maharaj, P. D., Brault, A. C. & Weaver, S. C., Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates, *J Virol*, 2010, 84, 6497-504.
- Waidhet-Kouadio, P., Yuda, M., Ando, K. & Chinzei, Y., Purification and characterization of a thrombin inhibitor from the salivary glands of a malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi*, *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1381, 227-33.
- Waitayakul, A., Somsri, S., Sattabongkot, J., Looareesuwan, S., Cui, L. & Udomsangpetch, R., Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand, *Acta Trop*, 2006, 98, 66-73.
- Wasinpiyamongkol, L., Patramool, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucoure, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demetere, E., Brizard, J. P., Jouin, P., Biron, D. G., Thomas, F. & Misse, D., Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins, *Proteomics*, 2009, 10, 1906-1916.
- Weaver, S. C. & Reisen, W. K., Present and future arboviral threats, *Antiviral Res*, 2010, 85, 328-45.
- Werren, J. H. & Windsor, D. M., Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?, *Proc Biol Sci*, 2000, 267, 1277-85.
- Werren, J. H., Zhang, W. & Guo, L. R., Evolution and phylogeny of Wolbachia: reproductive parasites of arthropods, *Proc Biol Sci*, 1995, 261, 55-63.
- WHO, Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1 (2008). 2008,
- WHO, Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, *Geneva*, 2009a,
- WHO, World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, *Geneva : World Health Organization.* , 2009b, *WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1*,
- WHO, World Malaria Report 2010, *Geneva : World Health Organization.* , 2010, *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*
- Wiggins, R. C. & Cochrane, C. G., Immune-complex-mediated biologic effects, *N Engl J Med*, 1981, 304, 518-20.
- Wikel, S. K., The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen, *Am J Trop Med Hyg*, 1981, 30, 284-8.
- Wiwatanaratnabutr, I., Allan, S., Linthicum, K. & Kittayapong, P., Strain-

specific differences in mating, oviposition, and host-seeking behavior between *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes albopictus*, *J Am Mosq Control Assoc*, 2010, 26, 265-73.

Wongkamchai, S., Khongtak, P., Leemingsawat, S., Komalamisra, N., Junsong, N., Kulthanan, K., Wisuthsarewong, W. & Boitano, J. J., Comparative identification of protein profiles and major allergens of saliva, salivary gland and whole body extracts of mosquito species in Thailand, *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2010, 28, 162-9.

Xi, Z., Ramirez, J. L. & Dimopoulos, G., The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection, *PLoS Pathog*, 2008, 4, e1000098.

Yadouleton, A., Martin, T., Padonou, G., Chandre, F., Asidi, A., Djogbenou, L., Dabire, R., Aikpon, R., Boko, M., Glitho, I. & Akogbeto, M., Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin, *Parasit Vectors*, 2011, 4, 60.

Yang, C. C., Hsieh, Y. C., Lee, S. J., Wu, S. H., Liao, C. L., Tsao, C. H., Chao, Y. S., Chern, J. H., Wu, C. P. & Yueh, A., Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay, *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55, 229-38.

Yap, G., Sil, B. K. & Ng, L. C., Use of saliva for early dengue diagnosis, *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5, e1046.

Yoshida, S., Sudo, T., Niimi, M., Tao, L., Sun, B., Kambayashi, J., Watanabe, H., Luo, E. & Matsuoka, H., Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito, *Blood*, 2008, 111, 2007-14.

Zeidner, N. S., Higgs, S., Happ, C. M., Beaty, B. J. & Miller, B. R., Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice, *Parasite Immunol*, 1999, 21, 35-44.

Zeller, H. G., [Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean], *Bull Soc Pathol Exot*, 1998, 91, 56-60.