

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Entomologie médicale et vétérinaire

Présentée et soutenue publiquement par

JEAN-PHILIPPE MARTINET

Le 11 mai 2021

Les moustiques de la région Grand-Est : biodiversité et compétence vectorielle pour des virus zoonotiques

Thèse dirigée par **JEROME DEPAQUIT ET HUBERT FERTE**

JURY

Mme Anna-Bella Failloux,	Professeur,	Institut Pasteur Paris,	Président
M. Jérôme Depaquit,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Co-Directeur de thèse
M. Hubert Ferté,	Maître de Conférences HDR,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Co-Directeur de thèse
Mme Claire Garros,	Cadre de recherche HDR,	CIRAD Montpellier,	Rapporteur
M. Frédéric Gay,	Maître de Conférences HDR,	Sorbonne Université,	Rapporteur
Mme Emilie Bouhsira,	Maître de Conférences,	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,	Examineur
M. Bruno Mathieu,	Ingénieur d'Études HDR,	Université de Strasbourg,	Examineur



Résumé :

Depuis les années 1960, la France métropolitaine a subi des émergences et des réémergences des virus Usutu (USUV) et West-Nile (WNV). Ces arbovirus (Arthropod Borne viruses) ont pour réservoir les populations aviaires et sont transmises par un moustique vecteur du genre *Culex*. En France, le WNV a connu plusieurs émergences dont la fréquence s'accélère depuis les années 2000. A ce jour, la circulation de ce virus est limitée au sud de la France, s'étendant depuis son foyer historique situé dans la région de la Camargue. Régulièrement, des cas humains sont détectés. Son vecteur *Culex pipiens* est ubiquitaire sur le territoire. Le virus Usutu a quant à lui émergé sur le territoire métropolitain en 2015, causant des épisodes de mortalité aviaires chez des espèces sensibles telles que le merle (*Turdus merula*) ou encore la chouette lapone (*Strix nebulosa*). Usutu s'est rapidement disséminé sur le territoire métropolitain, touchant des populations aviaires résidentes de la région Grand-Est. Dans ce contexte, nous avons effectué des travaux d'inventaires des moustiques de la région afin d'actualiser les données de présence. Afin d'améliorer la réactivité des échantillonnages en cas d'émergence dans la région, nous avons appliqué à nos échantillons des techniques d'identification dites de géomorphométrie alaire (Wing Geometric Morphometrics ou WGM). Cette technique s'avère fiable dans la classification des espèces de moustiques de la région. Nous avons revu l'ensemble des infections expérimentales réalisées sur des populations de moustiques originaires d'Europe de l'Ouest. Enfin, nous avons testé la compétence vectorielle de trois espèces de moustiques endémiques dans la région Grand-Est pour WNV et USUV (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* et *Culex pipiens*). Les données acquises par ces expérimentations pourront permettre à l'avenir une meilleure préparation et une meilleure prise en charge d'une hypothétique émergence de WNV ou d'USUV dans la région Grand-Est.

Mots clés : Moustiques, Compétence vectorielle, Géomorphométrie, virus du Nil occidental, virus Usutu

Summary :

Mosquitoes of the Grand-Est region : biodiversity and vector competence for zoonotic arboviruses

Since the 1960s, metropolitan France has undergone the emergence and re-emergence of the Usutu (USUV) and West-Nile (WNV) viruses. These arboviruses (Arthropod Borne viruses) circulate between avian populations reservoir and their vector (mosquito belonging to the *Culex* genus). In France, WNV has experienced several emergences, with accelerated frequency since the 2000s. To date, the circulation of this virus is limited to the south of France, extending from its historic area located in the region of Camargue. Regularly, human cases are detected. Its *Culex pipiens* vector is ubiquitous in France. The Usutu virus emerged in metropolitan France in 2015, causing episodes of bird mortality in sensitive species such as blackbird (*Turdus merula*) or the great gray owl (*Strix nebulosa*). Usutu quickly spread across metropolitan territory, affecting bird populations resident of the Grand-Est region. In this context, we carried out inventory work on mosquitoes in the region in order to update the presence data. In order to improve the responsiveness of the sampling in the event of an emergence in the region, we applied identification techniques known as Wing Geometric Morphometrics (WGM) to our samples. This technique has proven to be reliable in classifying mosquito species. We reviewed all the experimental infections performed on mosquito populations originating from Western Europe. Finally, we tested the vector competence of three endemic mosquito species in the Grand-Est region for WNV and USUV (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* and *Culex pipiens*). The data acquired by these experiments may allow better preparation and better management of a hypothetical emergence of WNV or USUV in the Grand-Est region in the future.

Key words : Mosquitoes, Vector competence , Wing Geometric Morphometrics, West-Nile virus, Usutu virus

Remerciements :

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans le soutien financier de l'Université de Reims Champagne-Ardenne. Je remercie l'URCA de m'avoir octroyé cette bourse de thèse.

A mes co-directeurs de thèse qui m'ont fait l'honneur d'encadrer ce travail et qui m'ont soutenu tout au long de ces quatre années, je ne saurais jamais vous être assez reconnaissant.

Au Professeur Jérôme Depaquit, qui a encadré ce travail de longue haleine. Merci pour ton implication, ta bienveillance constante, et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

Au Docteur Hubert Ferté, qui a également encadré ce travail. Merci pour ta patience, et pour m'avoir initié et guidé dans l'étude de ces moustiques champ-ardennais qui me sont désormais si chers. Le terrain ne sera plus jamais le même après notre passage.

Au Professeur Anna-Bella Failloux, qui me fait l'honneur de présider ce jury, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Aux Docteurs Emilie Boushira, Claire Garros, Bruno Mathieu et Frédéric Gay qui ont accepté d'évaluer ce travail, soyez assurés de ma profonde gratitude.

Au Professeur Isabelle Villena, directrice de l'EA 7510 ESCAPE, ainsi qu'au Docteur Dominique Aubert, merci pour l'intérêt que vous avez porté à ces travaux ainsi que pour votre soutien durant ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe d'ESCAPE qui a rendu ce travail possible. Au Docteur Sandie Escotte-Binet, pour ton aide technique, ta gentillesse et ta disponibilité. J'espère que le MinIon se montrera docile en mon absence. Au Docteur Fano Randrianambinintsoa, pour ton soutien et ta bonne humeur, je garderai le souvenir de nos missions de terrain. Au Docteur Elodie Maisonneuve-Fabre, pour nos conversations, nos volcano-plots et nos ateliers de décoration de mugs. A Eva Nast, pour ton aide technique inestimable.

A toute l'équipe de l'unité Arbovirus et Insectes Vecteurs de l'Institut Pasteur Paris, tous les mots que je pourrai inscrire ici ne pourraient exprimer l'étendue de ma gratitude. Au Professeur Anna-Bella Failloux, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir permis d'intégrer ton équipe et d'avoir pu réaliser les infections en P3. Au Docteur Marie Vazeille, à qui je dois ma formation P3, j'espère sans avoir trop éprouvé ta patience. À Laurence Mousson, pour tes conseils inestimables, ta disponibilité et ta patience moi et mes moustiques crasseux (et pour tes réserves

de réactifs intarissables aussi !!!). À Chloé Bohers, pour ton aide précieuse, les soins apportés à mes bébés en mon absence et nos discussions hautement scientifiques sur l'univers Marvel. À mes collègues étudiants passés et présents pour nos discussions et pour maintenir une ambiance de dingue. Merci donc à Gaëlle Gabiane, Rachel Bellone, Marine Viglietta, Lucy de Guilhem de Lataillade. Merci au Docteur Vincent Houé pour nos compétitions sportives amicales et au Docteur Adrien Blisnick pour faire rougir Chloé en mon absence. Last but not the least, I would like to thank Doctor Pei-Shi Yen for our discussions and the Friday evenings.

A Malika Hocine et Jocelyne Alexandre pour le maintien des populations au sein de l'insectarium Metchnikoff, ainsi qu'à Marie Demeslay pour les innombrables DAR, merci pour tout.

Un grand merci à l'Unité des Virus Émergents de Marseille pour avoir traité les échantillons. Nous remercions les Professeurs Xavier de Lamballerie et Rémi Charrel, le Docteur Nazli Ayhan ainsi que Konrad Wesselmann, Pauline Jourdan et Laura Pezzi.

Merci également aux vétérinaires des parcs zoologiques d'Amnéville, de Mulhouse et de Sainte-Croix, les docteurs vétérinaires Alexis Maillot, Vanessa Alerte, Jennifer Lahoreau, Brice Lefaux et Benoît Quintard.

Merci au Docteur Jean-Claude Monboisse et à Madame Valérie Piraupe de l'École Doctorale Sciences Fondamentales-Santé pour le volet administratif de cette thèse.

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien tout au long de ces années. A mes parents, sans qui rien de cela n'aurait été possible. A Marie-Astride et Frédéric, pour m'avoir accueilli lors des manipulations sur Paris. A Sandrine et Sébastien, pour m'avoir permis de prélever chez eux.

A mes amis, Tryphon et Justine, Léa et Greg, Gégette et Benj, au Docteurs Brahim Azzouz et Antoine Huguenin, ainsi qu'à tous ceux qui m'ont soutenu au cours de ces dernières années.

A Arthur, mon petit bonhomme.

A Amélie, ma meilleure moitié, pour ton soutien de tous les instants. Cet aboutissement est aussi le tien.

Valorisation scientifique :

Publications :

Article 1 : Martinet JP, Ferté H, Failloux AB, Schaffner F, Depaquit J. Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review. *Viruses*. 2019;11(11).

Article 2 : Martinet JP, Ferté H, Sientzoff P, Krupa E, Mathieu B, Depaquit J. Wing Morphometrics of *Aedes* Mosquitoes from North-Eastern France. Soumis à *Insects*, en révision.

Article 3 : Martinet JP, Vazeille M, Mousson L, Bohers C, Ferté H, DEapquit J, Failloux AB. West-Nile virus vector competence of northern France populations of *Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* and *Culex pipiens*. En préparation pour soumission à *PLOS Neglected Tropical Diseases*.

Article 4 : Martinet JP, Aatif I, Ferté H, Depaquit J. On mermithids parasitizing French mosquitoes. En préparation pour soumission à *Journal of Invertebrate Pathology*.

Articles publiés hors du contexte de la thèse :

Randrianambinintsoa FJ, Depaquit J, **Martinet JP**, Golden CD, Boyer S, Robert V, et al. Two new phlebotomine sandflies (*Diptera: Psychodidae*) from the forest edge in Madagascar: the anthropophilic *Phlebotomus artemievi* sp. nov. and *Sergentomyia maroantsetraensis* sp. nov. *Parasitol Res*. 2020;119(4):1177-99.

Detection of *Leishmania tarentolae* DNA in *Sergentomyia antennata* in Togo. Ferlet E, **Martinet JP**, Randrianambinintsoa FJ, Ravel C, Depaquit J. *Journal of Vector Borne Diseases* (sous presse)

Communications orales :

Martinet, JP. **MosquiTwo : Transmission de deux arbovirus (West Nile et Usutu) par les moustiques du nord de la France**. Réunion Arbo-France (Visioconférence), 18 janvier 2021.

Poster :

Martinet JP., Ferté H., Depaquit J., Failloux AB. **Détermination de la compétence vectorielle des moustiques du Grand-Est pour le virus West-Nile**. Journée jeunes chercheurs de la SFR CAP-Santé, Reims, 18 octobre 2018.

Table des matières

Chapitre I : Généralités.....	1
1.1. Introduction d' <i>Aedes albopictus</i> en France métropolitaine.....	3
1.2. Autres espèces invasives.....	4
1.3. Arbovirus et arboviroses zoonotiques.....	8
1.3.1. Virus West-Nile.....	9
1.3.2. Virus Usutu.....	12
1.4. Objectifs.....	14
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	15
2.1. Sites de prélèvements.....	15
2.1.1. Sites sauvages, urbains et ruraux.....	15
2.1.2. Parcs zoologiques.....	18
2.2. Matériels de capture.....	27
2.2.1. Stades aquatiques.....	27
2.2.2. Adultes.....	28
2.3. Conservation et préparation du matériel.....	30
2.4. Identification des espèces.....	31
2.4.1. Clés utilisées.....	31
2.4.2. Approches moléculaires.....	33
2.4.3. La morphométrie alaire.....	34
2.4.3.1. Préparation des échantillons.....	38
2.4.3.2. Traitement des images.....	39
2.4.3.3. Traitement statistique des échantillons.....	39
2.5. Screening des moustiques infectés naturellement.....	41
2.6. Expérimentations de compétence vectorielle.....	42
2.6.1. Origine des populations de moustiques.....	42
2.6.2. Obtention des souches virales.....	43
2.6.3. Infections expérimentales.....	43
2.6.4. Titrage.....	44
Chapitre III : espèces recensées.....	46
3.1. Résultats.....	46
3.2. Associations espèces-gîtes-milieu.....	48
3.2.1. Gîtes urbains.....	48
3.2.2. Gîtes ruraux.....	49
3.2.3. Gîtes sauvages.....	50

3.3.	Résultats des inventaires des parcs zoologiques	52
3.4.	Mention d' <i>Aedes japonicus</i>	54
3.5.	Identification des repas sanguins	55
Chapitre IV : Apport de la géomorphométrie alaire.....		57
4.1.	La technique de géomorphométrie alaire.....	57
4.2.	Analyse géomorphométrique des ailes	58
4.3.	Publication	63
Chapitre V : Compétence vectorielle		80
5.1.	État des connaissances	80
5.2.	Détection sur les populations sauvages.....	105
5.3.	Résultats des infections expérimentales.....	105
Discussion et perspectives.....		121
Conclusion.....		123
Références		125
Données préliminaires sur l'observation de Mermithidae infestant des moustiques du genre <i>Aedes</i> .		132
Annexes.....		140
Annexe 1 : Gîtes de captures		140
Annexe 2 : Pools de moustiques screenés (Région, 2018).....		143
Annexe 3 : Pools de moustiques screenés (Oeting, 2019).....		144
Annexe 4 : Pools de moustiques screenés (Annéville).....		145
Annexe 5 : Comparaison des positions des landmarks par couples d'espèces du genre <i>Aedes</i>		146
Annexe 6 : Validation croisée des CVA pour les espèces du genre <i>Aedes</i>		161
Annexe 7 : comparaison des positions des landmarks validation croisée des ACV pour les espèces du genre <i>Culex</i>		176
Annexe 8 : comparaison des positions des landmarks validation croisée des ACV pour les espèces du genre <i>Culiseta</i>		177

Table des abréviations :

BG	BioGents®
CHIKV	Chikungunya virus
CDC	Center for Disease Control
CS	Centroid Size
CVA	Canonical Variate Analysis
DENV	Dengue virus
DR	Dissemination Rate
ECDC	European Center for Disease Control
GM	Geometric Morphometrics
IR	Infection Rate
JEV	Japanese Encephalitis Virus
LM	Landmark
PFU	Plaque Forming Unit
TBE	Tick Borne Encephalitis
TCID ₅₀	median Tissue Culture Infectious Dose
TR	Transmission Rate
USUV	Usutu virus
WNV	West-Nile virus
ZIKV	Zika virus

Table des illustrations : figures

Figure 1 : <i>Aedes albopictus</i> (©H Ferté)	3
Figure 2 : Carte de répartition d' <i>Aedes albopictus</i> au 1er janvier 2021 (https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/article/cartes-de-presence-du-moustique-tigre-aedes-albopictus-en-france-metropolitaine)	4
Figure 3 : Mâle d' <i>Aedes japonicus</i> (©JP Martinet)	5
Figure 4 : Distribution d' <i>Aedes japonicus</i> en Europe au 1er janvier 2018 (18).....	6
Figure 5 : Distribution d' <i>Aedes japonicus</i> en Europe au 1 ^{er} mai 2020 (18).....	6
Figure 6 : Structure du virus West-Nile (25).....	8
Figure 7 : Structure du virus Usutu (26).....	9
Figure 8 : Cycle du virus West Nile (adapté de https://www.cdc.gov/westnile/transmission/index.html)	9
Figure 9 : Phylogénie du virus West-Nile (d'après (34))	10
Figure 10 : Nombre d'infections humaines et équine par WNV entre 2015 et 2019 (d'après (42))... ..	11
Figure 11 : Chronologie d'apparition et de dispersion de WNV en France métropolitaine	12
Figure 12 : Chronologie d'apparition et de dispersion d'USUV en France métropolitaine	13
Figure 13 : Localisation des prélèvements entomologiques (©Google maps).....	16
Figure 14 : Plan de la Réserve Naturelle Régionale des Trous de Leu (©Conservatoire d'espaces naturels de Champagne-Ardenne). Les lettres A et L signifient respectivement la capture d'adultes et de larves.....	17
Figure 15 : Plan des sites d'échantillonnage sur le parc zoologique d'Amnéville.....	19
Figure 16 : Arrière des volières dans le parc zoologique d'Amnéville (©JP Martinet).....	20
Figure 17 : Sites de prélèvements dans le parc zoologique d'Amnéville.....	20
Figure 18 : Vue aérienne du parc de Sainte-Croix (©Google Maps). La nomenclature est explicitée dans le tableau suivant (Tableau 3).	22
Figure 19 : Sites de prélèvements larvaires dans le parc de Sainte-Croix (©H Ferté).....	23
Figure 20 : Sites de prélèvements larvaires dans le parc de Sainte-Croix (©H Ferté).....	24
Figure 21 : Plan du parc zoologique de Mulhouse	25
Figure 22 : Sites de prélèvements larvaires au parc zoologique de Mulhouse (©H Ferté)	26
Figure 23 : Sites de prélèvements d'adultes au parc zoologique de Mulhouse (©H Ferté)	26
Figure 24 : Principe de fonctionnement d'un piège BG Sentinel (www.bg-sentinel.com).....	28
Figure 25 : Schéma d'un piège CDC (©J. Depaquit).....	29
Figure 26 : Pose d'un piège BG Sentinel®, capture sur moustiquaire et pose d'un piège CDC (©JP Martinet/H Ferté).....	30
Figure 27 : Méthode de gorgement des moustiques (©Biorender)	31
Figure 28 : Description anatomique d'une aile de Culicidae (79)	35
Figure 29 : Numérotation et insertion des landmarks sur une aile droite d' <i>Aedes rusticus</i> femelle (grossissement x4 ; ©J-P Martinet).....	38
Figure 30 : Carte de provenance des populations utilisées en infection expérimentale (©Google Earth)	42
Figure 31 : Salivation d' <i>Aedes rusticus</i> (©L. Mousson).....	44
Figure 32 : Exemples de gîtes urbains (1 : Piège pondoir à saint-Brice Courcelles (Marne), 2 et 3 : Egout à Oeting (Moselle), 4 : Egout à Reims (Marne), 5 : Jardin à Reims (Marne), 6 : Jardin de particulier à Oeting (Moselle)) (©JP Martinet).....	48

Figure 33 : Exemples de gîtes ruraux (1 : Bidon abandonné à Saint-Léonard (Marne), 2 : Récupération d'eau de pluie à Machault (Ardennes), 3 : Récupération d'eau de pluie à Machault, bidon enterré (Ardennes)) (©JP Martinet)	49
Figure 34 : Exemple de gîtes sauvages (1 : Mare temporaire à Argentolles (Lac du Der-Chantecoq, Marne), 2 : Mare temporaire à Berru (Marne), 3 : Fossé à proximité de l'étang des Landres (Marne), 4 : Prairie inondable à Saint-Léonard (Marne), 5 : Trou d'arbre à Courlandon (Marne)) (©JP Martinet).....	50
Figure 35 : Décor du parc zoologique d'Amnéville (©JP Martinet).....	54
Figure 36 : Analyse en Variable Canonique des quatre genres de moustiques Aedes, Anopheles, Culex et Culiseta.....	59
Figure 37 : Analyse en Variable Canonique des dix espèces d'Aedes retrouvées sur le terrain.....	60

Table des illustrations : tableaux

Tableau 1 : Sites de capture sur la RNR des Trous de Leu	17
Tableau 2 : Sites d'échantillonnages sur la zone du parc zoologique d'Amnéville	21
Tableau 3 : Sites d'échantillonnages sur la zone du parc de Sainte-Croix :	23
Tableau 4 : Sites d'échantillonnages sur la zone du parc zoologique de Mulhouse (Les sites en rouge sont les sites qui se sont révélés négatifs) :	25
Tableau 5: Répartition des landmarks sur une aile de moustique	37
Tableau 6 : Espèces retrouvées en fonction des milieux	47
Tableau 7 : Inventaire du parc zoologique d'Amnéville :	52
Tableau 8 : Inventaire du parc de Sainte-Croix	53
Tableau 9 : Inventaire du parc zoologique de Mulhouse.....	53
Tableau 10 : Identification des repas sanguins du parc zoologique d'Amnéville (Les espèces captives sont représentées en rouge. Les espèces présentes en captivité et à l'état sauvage sont représentées en vert. Les espèces sauvages sont représentées en noir).....	55
Tableau 11 : Femelles analysées par géomorphométrie alaire. Les espèces marquées* ne proviennent pas de notre échantillonnage mais ont été collectées par Eva Krupa et Bruno Mathieu dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Strasbourg.	58
Tableau 12 : P-values des test de permutation en distance Procrustéennes (1000 permutations) entre les différentes espèces du genre Aedes	61

Chapitre I : Généralités

Les moustiques sont des arthropodes hématophages pouvant être vecteurs d'agents pathogènes. Parmi les plus connus de ces pathogènes, nous pouvons citer ici les agents du paludisme, des filaires et surtout des virus.

Les arbovirus (Arthropod borne Viruses) et les parasites transmis par les arthropodes représentent un problème de Santé Publique majeur au niveau mondial. Concernant le paludisme, le nombre de personnes ayant contracté le parasite au cours de l'année 2019 s'élève à 229 millions, et selon l'OMS le nombre de décès s'élève à 409 000 (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>). Depuis les années 2000, nous avons vu apparaître de nombreuses émergences ou ré-émergences de virus transmis par les moustiques, tels que la dengue, le Zika ou encore le Chikungunya. Durant les 20 dernières années, le nombre annuel de cas de dengue recensé par l'OMS a été multiplié par huit, passant de 505 430 cas en 2000 à 2,4 millions en 2010, et à 4,2 millions en 2019 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>).

La circulation des arbovirus est complexe. Pour le virus de la fièvre jaune, celle-ci comprend plusieurs composantes. La circulation primaire s'effectue au niveau selvatique, avec le passage du virus entre les populations de primates dans leur habitat naturel et les moustiques forestiers. Des zones d'émergences s'établissent à l'interface entre ces milieux naturels et des zones d'activités humaines, comme par exemple lors d'épisodes de déforestation. Les arbovirus se retrouvent alors en contact avec une population humaine naïve, et les moustiques alors naturellement inféodés aux grands primates peuvent se gorger sur l'Homme. Une fois l'Homme infecté, celui-ci peut servir de repas sanguin pour des moustiques dont les préférences trophiques le permettent. Le cycle selvatique est alors transposé du milieu rural vers le milieu urbain, avec une circulation entre les moustiques et le réservoir humain. Ces différents compartiments impliquent des espèces de moustiques différentes. La propagation augmente avec les densités humaines et vectorielles si celles-ci sont combinées. En France métropolitaine, pour les virus régulièrement importés sur le territoire tels que les virus de la dengue, du chikungunya et du Zika, la seule circulation possible sera une circulation urbaine.

Les affections provoquées par les arbovirus peuvent être décrites suivant leur mode de circulation tout en sachant qu'interviendra un arthropode vecteur. Les anthroponoses vont circuler d'un Homme qui joue le rôle de son propre réservoir à un autre Homme par le biais

d'un vecteur. Ce sera le cas par exemple lors des épisodes de transmission autochtone de dengue en France métropolitaine (1). Une zoonose est une affection qui va circuler d'un animal à un autre qui pourra circuler entre l'Homme et l'Animal, et pourra comporter plusieurs réservoirs. Les arboviroses anthroponotiques sont présentes en France métropolitaine depuis 2010, date du premier épisode de transmission autochtone de dengue en France métropolitaine (2). En effet, l'augmentation des transports de biens et de marchandises a facilité la dissémination des arboviroses via le transport de personnes virémiques dont le nombre n'a cessé d'augmenter au fil des ans (3). Si la fréquence des importations est en augmentation, l'absence de vecteur naturel permettait jusque récemment d'interrompre la circulation du virus et de contenir l'affection à la seule personne porteuse. Seulement, l'introduction et l'établissement du moustique tigre (*Aedes albopictus*) sur le territoire métropolitain a fourni un vecteur à des arboviroses tropicales périodiquement importées. Il en résulte depuis les dix dernières années des cas annuels de transmission d'arbovirus locales menaçant la Santé Publique, et notamment celui de la dengue.

Le territoire Français n'est pas exempt d'arboviroses zoonotiques. En plus de celles ayant pour vecteurs les moustiques que nous traiterons ci-après, nous pouvons citer de manière non exhaustive les virus du genre *Phlebovirus* transmis par les Phlébotomes sur le pourtour méditerranéen, ou bien encore l'encéphalite à tique (Tick-Borne Encephalitis, TBE) présente de façon épisodique dans le nord-est de la France (4). Deux arbovirus à circulation zoonotique transmis par les moustiques sur le territoire français ont émergé ou ré-émergé durant ces vingt dernières années : les virus du Nil occidental (ou virus West-Nile : WNV) et Usutu (USUV).

1.1. Introduction d'*Aedes albopictus* en France métropolitaine

Le moustique tigre ou *Aedes albopictus* (figure 1) est une espèce invasive originaire du sud-est asiatique.



Figure 1 : *Aedes albopictus* (©H Ferté)

Les œufs constituent le stade hivernant. La ponte s'effectue dans des gîtes de petite taille, majoritairement anthropiques. Résistant au froid et à la dessiccation, ces œufs ont été transportés notamment par le commerce international de pneus qui a permis la dissémination de cette espèce au niveau mondial. En France métropolitaine, cette espèce a été retrouvée pour la première fois en 1999 dans l'Orne mais ne semble pas avoir perduré (5). Il a de nouveau été retrouvé en 2004 sur la commune de Menton dans les Alpes-Maritimes (6). Depuis, son expansion sur le territoire n'a cessé de croître, via une dynamique « en tache d'huile » du sud vers le nord. A ce jour, 64 départements sont déclarés colonisés (figure 2).

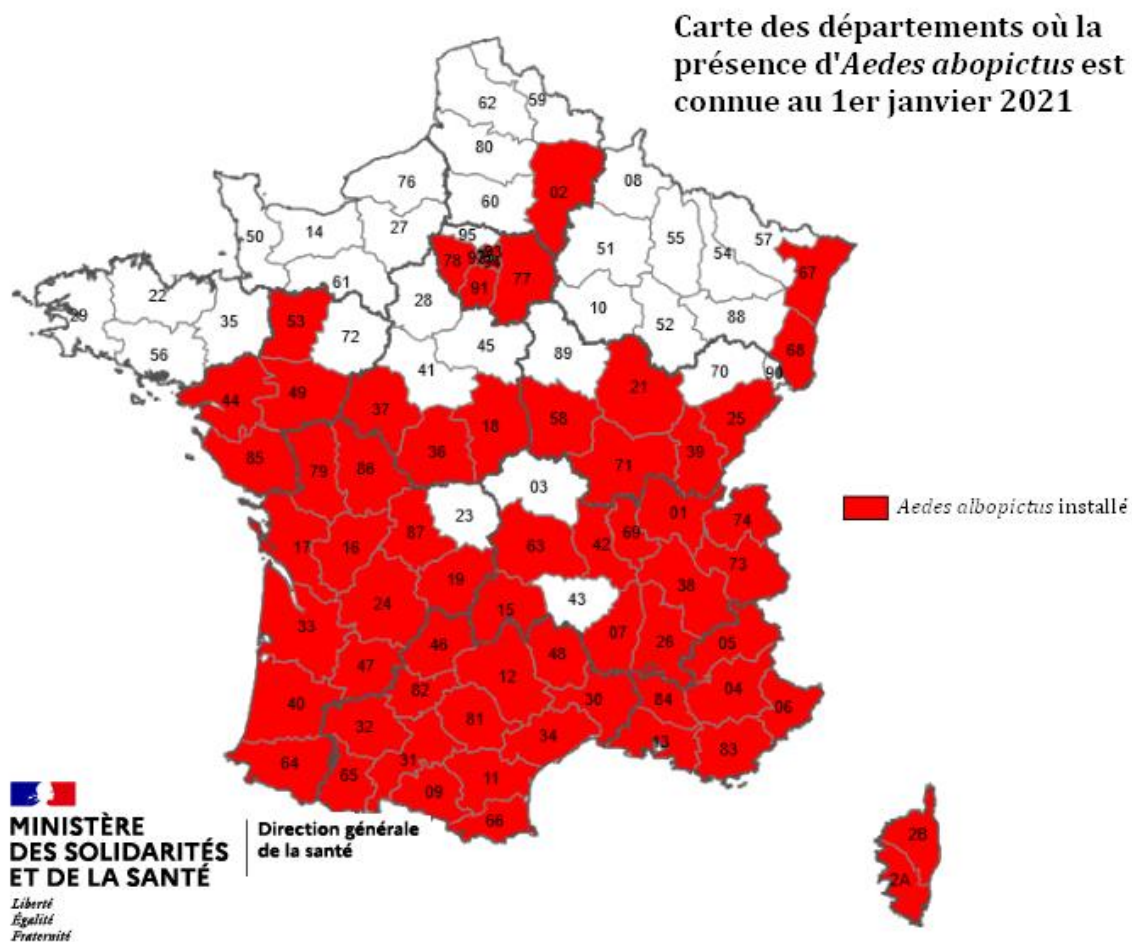


Figure 2 : Carte de répartition d'*Aedes albopictus* au 1er janvier 2021 (<https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/article/cartes-de-presence-du-moustique-tigre-aedes-albopictus-en-france-metropolitaine>)

Dans notre région d'intérêt, il a été détecté pour la première fois dans le département du Bas-Rhin en novembre 2014 (7). A ce jour, il est implanté dans les départements du Haut-Rhin et du Bas-Rhin et n'a pas encore été détecté dans les autres départements de la région. Il a également été observé dans le département limitrophe de l'Aisne en 2018. Entre 2018 et 2021, il n'a pas été fait mention de la présence d'*Aedes albopictus* dans de nouveaux départements de la région Grand-Est.

1.2. Autres espèces invasives

L'Europe, comme le reste du monde, est soumise à la dispersion d'espèces de moustiques exotiques déterminées comme invasives. En dehors d'*Aedes albopictus*, ces espèces sont : *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. atropalpus*, *Ae. koreicus*, *Ae. japonicus* et *Ae. triseriatus*.

Aedes aegypti, vecteur principal au niveau mondial des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika, est encore absent de la région Grand-Est. En Europe, sa répartition se limite aux Pays-

Bas (où cette espèce est introduite régulièrement mais non établie) et au Portugal (île de Madère) (8).

Aedes atropalpus est une espèce nord-américaine qui, tout comme *Ae. albopictus*, a été introduite en Europe via le commerce de pneus (9). Les stades hivernants sont les œufs et cette espèce est capable d'autogénie (10). En Europe, elle a été retrouvée dans les années 1990 en Italie, puis en 2003 en France métropolitaine (Choin & Schaffner, données non publiées) et aux Pays-Bas en 2009 (11). La compétence vectorielle de cette espèce est peu documentée. Elle se montre capable de transmettre le virus de La Crosse en conditions de laboratoire, et la transmission verticale de ce virus a également été observée (12).

Aedes japonicus (Figure 3) (east-Asian bush mosquito ou rock-pool mosquito) est endémique en Corée, au Japon, à Taiwan, en Chine du Sud et en Russie (13).



Figure 3 : Mâle d'*Aedes japonicus* (©JP Martinet)

Dans la région Grand-Est, la présence d'*Ae. japonicus* a été caractérisée depuis juillet 2013 (14). Ce n'était pas la première détection de l'espèce en France métropolitaine, puisqu'il avait déjà été retrouvé dans l'Orne en 2000 mais avait été éliminé (15, 16). La détection de 2000 était la première au niveau européen. En ce qui concerne la dynamique d'introduction de cette espèce, il semble que le commerce de pneus soit impliqué comme pour *Ae. albopictus*, comme il en est fait mention dans la première détection de l'implantation de l'espèce en Belgique en 2007 (17). Il a ensuite été détecté en Suisse (2008) puis en Allemagne (16). Concernant sa dynamique de dispersion, c'est une espèce qui semble progresser de façon centrifuge, et cette progression s'exprime en région Grand-Est par une expansion de l'est vers l'ouest (Figures 4 et 5)

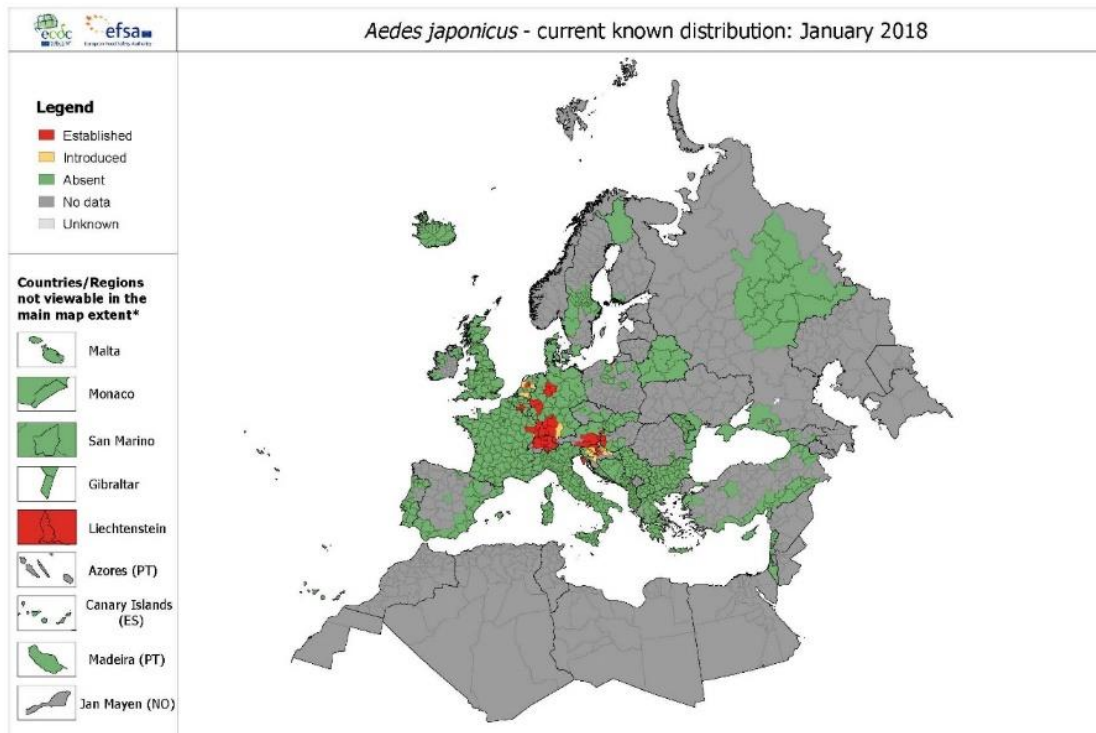


Figure 4 : Distribution d'*Aedes japonicus* en Europe au 1er janvier 2018 (18)

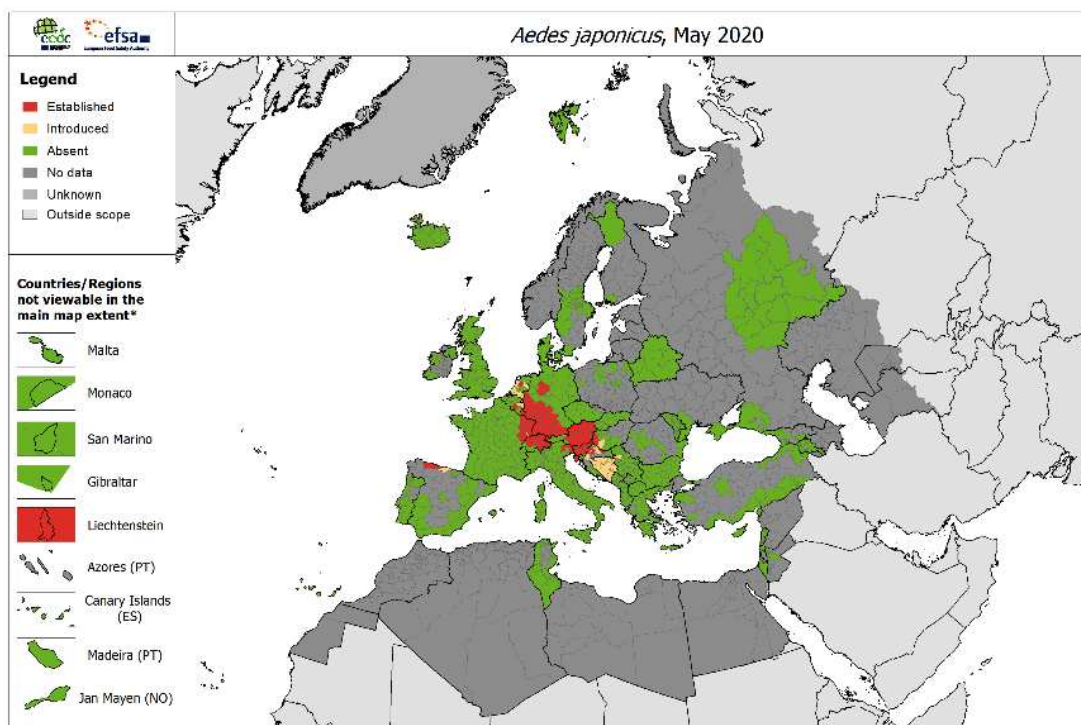


Figure 5 : Distribution d'*Aedes japonicus* en Europe au 1^{er} mai 2020 (18)

Cette espèce se gorge aussi bien sur l'Homme que sur l'animal (17) . Comme les populations d'*Ae. japonicus* provenant d'Allemagne et de Suisse sont compétentes pour transmettre les virus de la dengue, du chikungunya et du West-Nile (19), cette espèce pourrait jouer un rôle dans l'émergence de ces virus au niveau local.

Aedes koreicus est endémique en Corée, en Chine, au Japon et dans certaines parties de la Russie (13). Bien qu'il ne soit pas présent dans la région Grand-Est, il a été retrouvé en Belgique en 2008. Peu d'éléments sont connus sur cette espèce, mais elle semble pouvoir s'adapter aux conditions climatiques tempérées d'Europe occidentale (20). Retrouvée pour la première fois en Europe en Italie en 2011, elle a depuis été répertoriée en Allemagne, Belgique, Russie, Suisse, Hongrie et Slovénie (21). Cette espèce a été retrouvée en Allemagne en 2015 et y est établie depuis 2016 (22, 23). De par sa présence au sein d'un pays frontalier, l'éventualité de l'introduction de cette espèce dans la région mérite d'être envisagée.

Aedes triseriatus, tout comme *Ae. atropalpus*, est une espèce exotique originaire d'Amérique du nord. C'est le vecteur principal du virus La Crosse dans cette zone (24). Intercepté en France dans un lot de pneus originaire de Louisiane en 2004, son éradication semble avoir été efficace (Choin & Schaffner, données non publiées).

1.3. Arbovirus et arboviroses zoonotiques.

Au cours de ces vingt dernières années, deux arboviroses zoonotiques ayant pour vecteur le moustique ont circulé en France métropolitaine, les virus West-Nile et Usutu. Ils appartiennent tous deux au genre *Flavivirus*. Les virus du genre *Flavivirus* sont des particules sphériques mesurant environ 50 nm de diamètre. Ils possèdent une enveloppe lipidique, une capsidie protéique et un génome d'ARN linéaire de polarité positive. Les virus West-Nile et Usutu possèdent un génome de 11 000 nucléotides. L'ARN du virus West-Nile code pour trois protéines structurales :

- la protéine C, protéine de capsidie ;
- La protéine prM/M, « precursor membrane »
- La protéine E, glycoprotéine formant l'enveloppe virale.

En plus de ces protéines structurales, il va coder pour sept protéines non structurales :

- NS1, cofacteur de réplication virale
- NS2A, réplication, assemblage et apoptose
- NS2B, co-facteur de NS3
- NS3, peptidase et hélicase
- NS4A, co-facteur de réplication
- NS4B, inhibiteur de signalisation cellulaire
- NS5, ARN-polymérase ARN dépendante (dépourvue d'activité de correction)

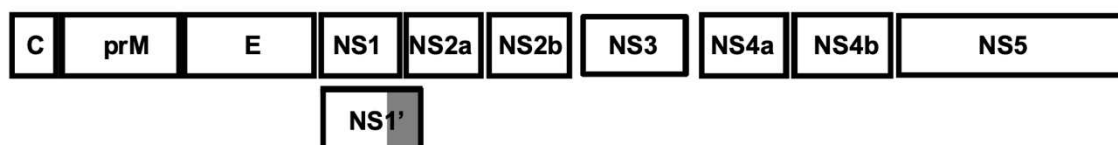


Figure 6 : Structure du virus West-Nile (25)

La structure du virus Usutu va différer de celle du virus West-Nile par la présence d'une protéine non-structurale supplémentaire, la protéine 2K.

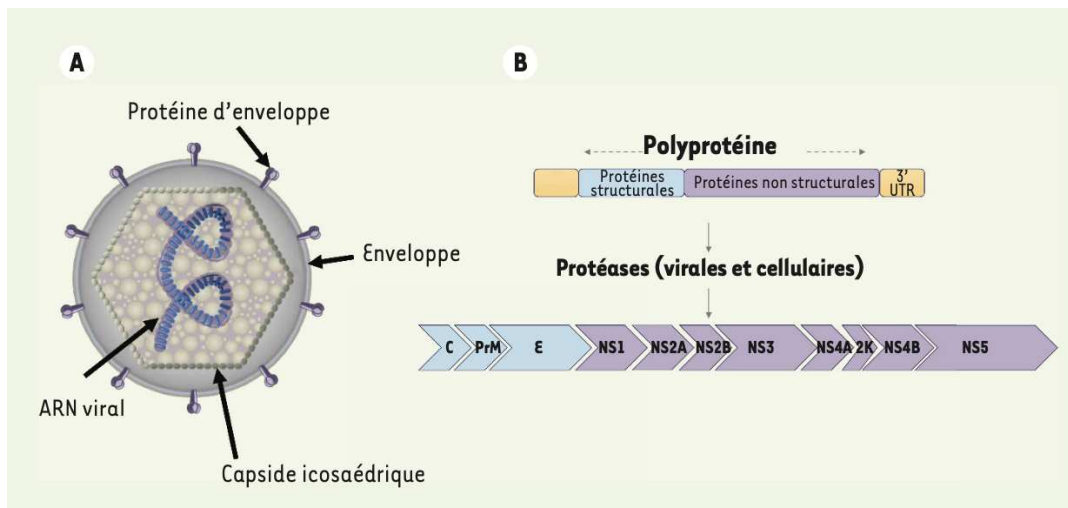


Figure 7 : Structure du virus Usutu (26)

1.3.1. Virus West-Nile

Le virus West-Nile est un flavivirus appartenant à la famille antigénique de l'encéphalite japonaise (JEV) (27). Cet arbovirus circule entre les populations d'oiseaux qui joue le rôle de réservoir et le moustique vecteur appartenant majoritairement au genre *Culex* (28). Ce pathogène peut être transmis aux mammifères tels que l'Homme ou le cheval (Figure 8). Lors d'une telle infection, la charge virale de ces hôtes mammifères est trop faible pour pouvoir infecter efficacement le vecteur, on parle dans ce cas d'impasse épidémiologique (29). Si la charge virale reste insuffisante pour perpétuer le cycle viral, ce pathogène peut néanmoins provoquer des affections de gravité variable chez l'Homme ou le cheval.

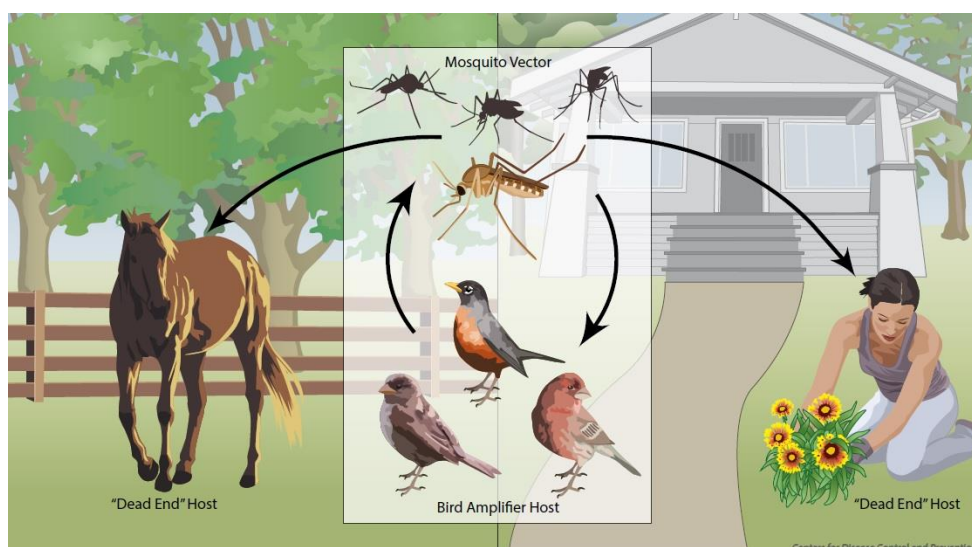


Figure 8 : Cycle du virus West Nile (adapté de <https://www.cdc.gov/westnile/transmission/index.html>)

Dans la majorité des cas (80%), l'infection par WNV restera asymptomatique et sera détectable *a posteriori* via des tests sérologiques (30). Cependant, certaines formes peuvent évoluer vers des formes graves, pouvant mettre en péril le pronostic vital. Les formes graves chez l'Homme se manifestent par des encéphalites. Ces manifestations cliniques surviennent dans environ 1% des cas chez l'Homme contre 10% chez le cheval (30, 31). La virulence des symptômes chez l'humain et chez le Cheval varie selon plusieurs paramètres, et notamment en fonction de la lignée virale. En effet, le WNV possède plusieurs lignées, définies par la variation de la séquence d'acides nucléiques, particulièrement au niveau de la protéine E et NS5 (32). A ce jour, jusqu'à neuf lignées différentes ont été décrites (Figure 9)(33).

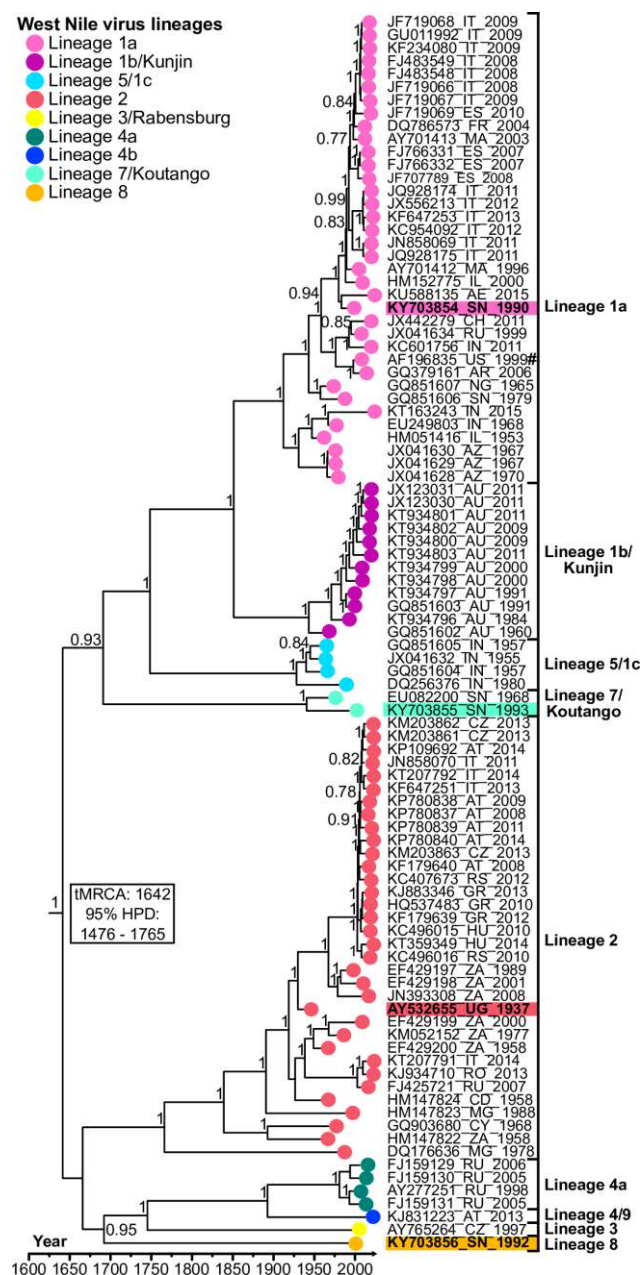


Figure 9 : Phylogénie du virus West-Nile (d'après (34))

Les lignées les plus répandues et les plus pathogènes sont les lignées 1 et 2 (35). La neurovirulence des lignées 1 et 2 (lignées circulant en Europe) peut varier très fortement (faible pouvoir neuroinvasif des souches de WNV1a de Kunjin et de WNV de Chypre, alors que d'autres souches des lignées 1 et 2 sont très neuro-invasives) (36).

Au niveau européen, les premiers isollements de WNV ont été effectués dans les années 1960 en France métropolitaine, au Portugal et à Chypre (35). En France métropolitaine, la première introduction du WNV date de 1962 (37), et le premier isolement du virus chez un moustique (*Culex modestus*) date de 1964 (38). Durant les années suivantes, aucune circulation de WNV n'a pas été objectivée pendant près de 35 ans. C'est en 2000 en Camargue que le WNV est à nouveau isolé à travers 76 échantillons prélevés sur des chevaux (39). Cette réémergence a poussé les autorités à mettre en place un programme de surveillance afin de suivre l'évolution de l'incidence de WNV dans le sud de la France. En 2015, une nouvelle émergence est apparue avec 39 cas équins confirmés (40), puis de nouveaux cas en 2018 (41). Dans l'ensemble des cas, il s'agit du WNV de la lignée 1. L'année 2018 marque un tournant dans l'épidémiologie de WNV en France métropolitaine (figure 10). Plusieurs faits sont remarquables ou inattendus :

- C'est la première fois qu'est mise en évidence la circulation de la lignée 2 du WNV dans le pays,
- C'est l'année où le nombre de cas humains est historiquement le plus haut (Figure 10),
- C'est l'année durant laquelle des cas de WNV ont été répertoriés en dehors de leur zone historique du littoral méditerranéen, notamment via l'observation de cas en Corse (Figure 11).

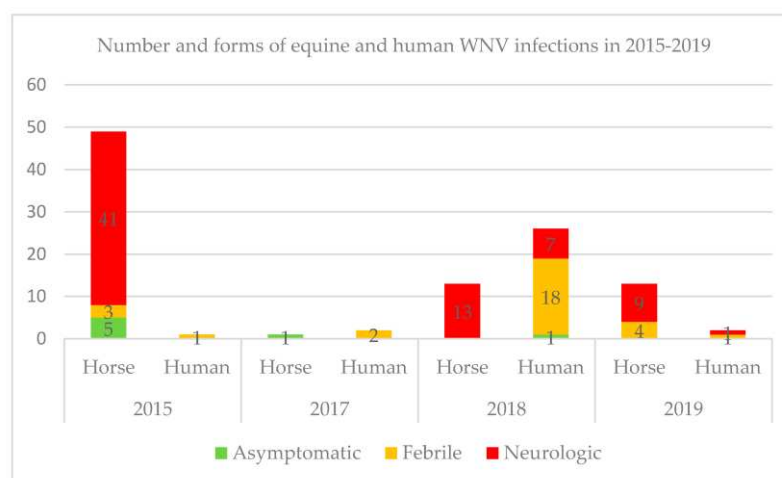


Figure 10 : Nombre d'infections humaines et équines par WNV entre 2015 et 2019 (d'après (42)).

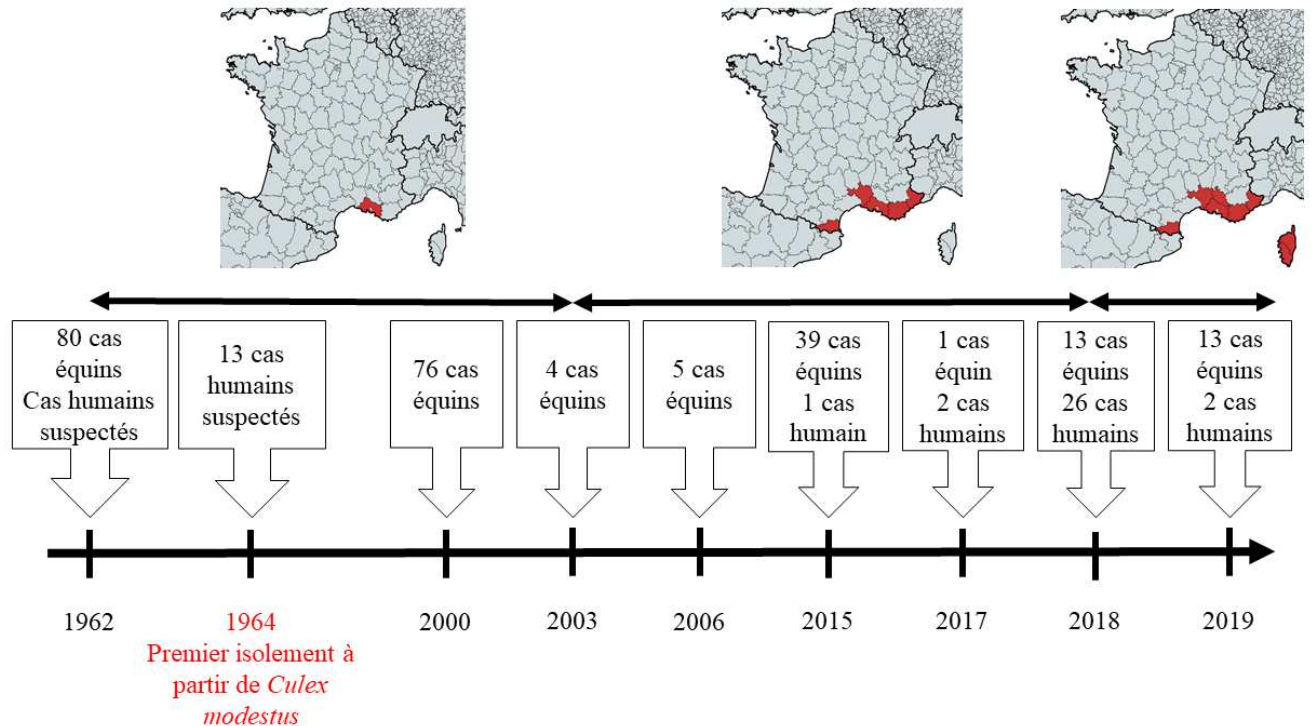


Figure 11 : Chronologie d'apparition et de dispersion de WNV en France métropolitaine

1.3.2. Virus Usutu

Le virus Usutu (USUV) est un flavivirus initialement isolé en Afrique du Sud en 1959 (43). Tout comme le virus West-Nile, il appartient à la famille antigénique de l'encéphalite japonaise. Il circule entre les moustiques du genre *Culex* et certaines familles d'oiseaux, majoritairement les Passériformes et les Strigiformes (44) qui représentent le réservoir. Le virus Usutu est transmis en Europe par *Culex pipiens s.l.* (45).

La détection du virus en Hongrie en 2001 a pendant quelques années été considérée comme le premier isolement du virus en Europe (46). Cependant, à la lumière de travaux plus récents, il apparaît que la première circulation virale d'Usutu remonte à 1996 en Italie, avec un virus proche de l'épisode de 2001 en Autriche (47). Depuis, USUV a émergé dans cinq pays européens (Allemagne, Belgique, France, Pays-Bas, Suisse) (48). Devant l'expansion rapide de zones de circulation virale, des surveillances de différents types ont été mises en place dans plusieurs pays européens. Les populations aviaires captives ou sauvages sont alors soumises à des tests antigéniques. Ainsi, des anticorps dirigés contre USUV ont été retrouvés dans l'avifaune dans cinq pays d'Europe de l'ouest, à savoir en Angleterre en 2002, en France en

2009-2010, en Allemagne en 2011, en Belgique en 2012, en Autriche et en Suisse en 2013 et aux Pays-Bas en 2014 (49-54). Une étude rétrospective a mis en évidence des anticorps dirigés contre USUV chez 58 espèces d'oiseaux appartenant à 26 familles et 13 ordres différents (55). Huit lignées d'USUV sont répertoriées à ce jour ; cinq sont dites Européennes (European lineage 1-5) et trois Africaines (African lineage 1-3). Usutu est un virus zoonotique, et donc transmissible à l'Homme. Les premiers cas humains ont été répertoriés en Afrique en 1981 (56). Les premières formes neuro-invasives humaines ont été recensées en Italie en 2009 (57). En France métropolitaine, les premières suspicions de circulation remontent à 2009, après analyse des anticorps de populations sentinelles de *Pica pica* (54). En 2015, un épisode de mortalité aviaire apparaît dans les départements du Haut-Rhin et du Rhône, et le virus est isolé sur des cadavres de merles (*Turdus merula*) et à partir d'individus de *Culex pipiens* (54, 58). En 2016 et 2017, le nombre de départements où le virus circule ou a circulé monte à 6 (Ardèche, Bas-Rhin, Isère, Loir-et-Cher, Moselle et Savoie) (59). En 2018 une flambée épidémique a été observée avec 17 départements touchés (59). Un cas humain a été détecté à Montpellier en 2016 (60). La chronologie de circulation du virus Usutu en France métropolitaine est rappelée dans la figure 12.

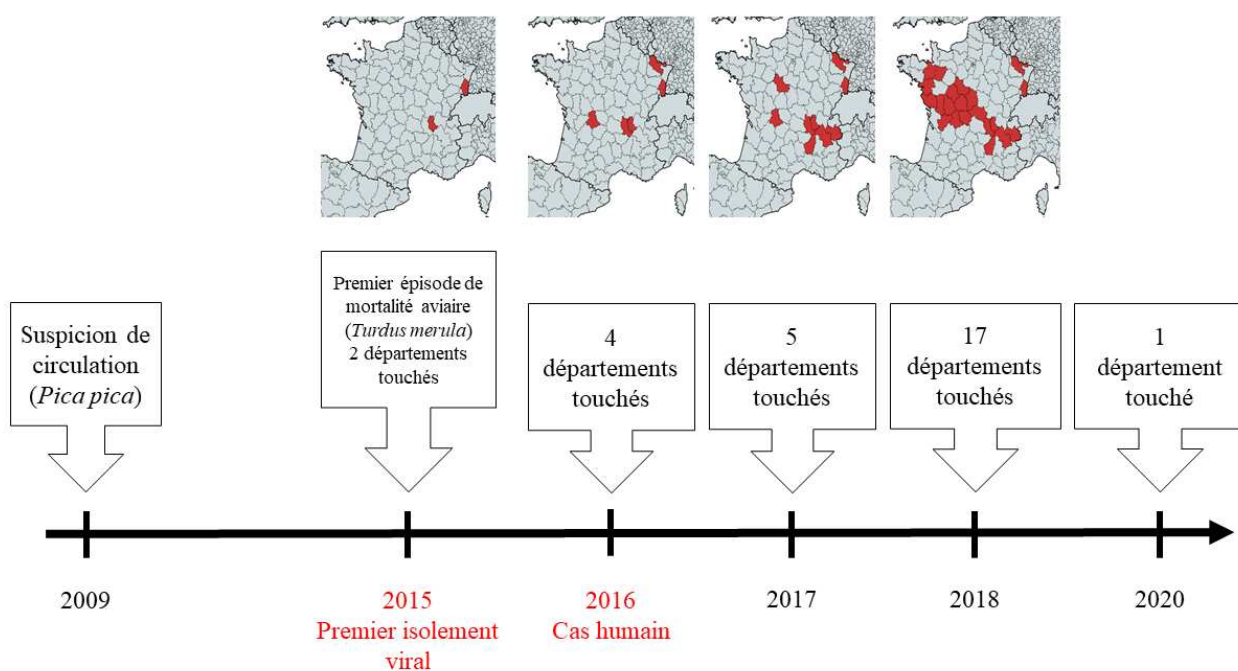


Figure 12 : Chronologie d'apparition et de dispersion d'USUV en France métropolitaine

1.4. Objectifs

Les objectifs de cette thèse sont :

- une actualisation des données concernant les moustiques dans la région Grand-Est. Cette mise à jour comprend aussi bien l'analyse de données bibliographiques que de données récoltées sur le terrain au cours de nos propres sessions de capture. Les individus ont été identifiés sur des critères morphologiques et/ou moléculaires. A partir du matériel récolté une nouvelle approche d'identification des espèces autochtones a été envisagé en utilisant les ailes, basée sur la géomorphométrie (geometric morphometrics GM) qui est une comparaison statistique de structures anatomiques remarquables ;

- la recherche de virus zoonotiques pouvant circuler au sein des populations de moustiques, recherche orientée dans notre travail sur les virus West-Nile et Usutu ;

- la détermination de la compétence vectorielle de populations issues de la région par infections expérimentales afin d'obtenir des données préliminaires et d'anticiper une éventuelle émergence des virus West-Nile et Usutu dans la région Grand-Est.

Chapitre II : Matériels et méthodes

2.1. Sites de prélèvements

Des missions de prélèvements ont été conduites entre 2017 et 2020. Nous avons ciblé plusieurs biotopes différents (sauvages, urbains et péri-urbains). La liste des sites visités (où la présence de moustiques a été avérée) ainsi que leur coordonnées GPS sont disponibles en [Annexe 1](#). Nous avons essayé de maintenir pour les gîtes les plus proches du laboratoire une fréquence de prélèvement régulière.

2.1.1. Sites sauvages, urbains et ruraux

Dans le but de mettre à jour les données faunistiques, des sites urbains, ruraux et sauvages ont été prospectés. Nous entendons par site urbain un site fortement anthropisé avec de nombreuses constructions et peu /pas de végétation environnante. Un site rural pourra présenter des constructions mais possèdera une végétation environnante. Un gîte selvatique se définit par l'absence de modification anthropique du paysage. L'agglomération rémoise a été prospectée (avec autorisation de la mairie) au niveau de ses espaces verts et de ses sites universitaires (Campus Sciences Naturelles et Exactes ainsi que le Campus Médecine-Pharmacie). En milieu rural, les jardins des particuliers sont largement équipés de systèmes de récupération de l'eau de pluie, offrant de bons gîtes de ponte notamment pour les espèces du genre *Culex*. Nous avons donc prospecté plusieurs de ces gîtes. Les gîtes sauvages concernent une large proportion des gîtes surveillés lors de nos travaux. Plusieurs massifs forestiers ont été prospectés dans les départements des Ardennes, de la Marne et de la Haute-Marne. Le site du Lac du Der, espace protégé, a été prospecté du fait d'un partenariat avec l'accord de l'Office National de la Biodiversité, organisme responsable de la gestion du site. Les positions des différents lieux de capture sont résumées sur la figure 13.

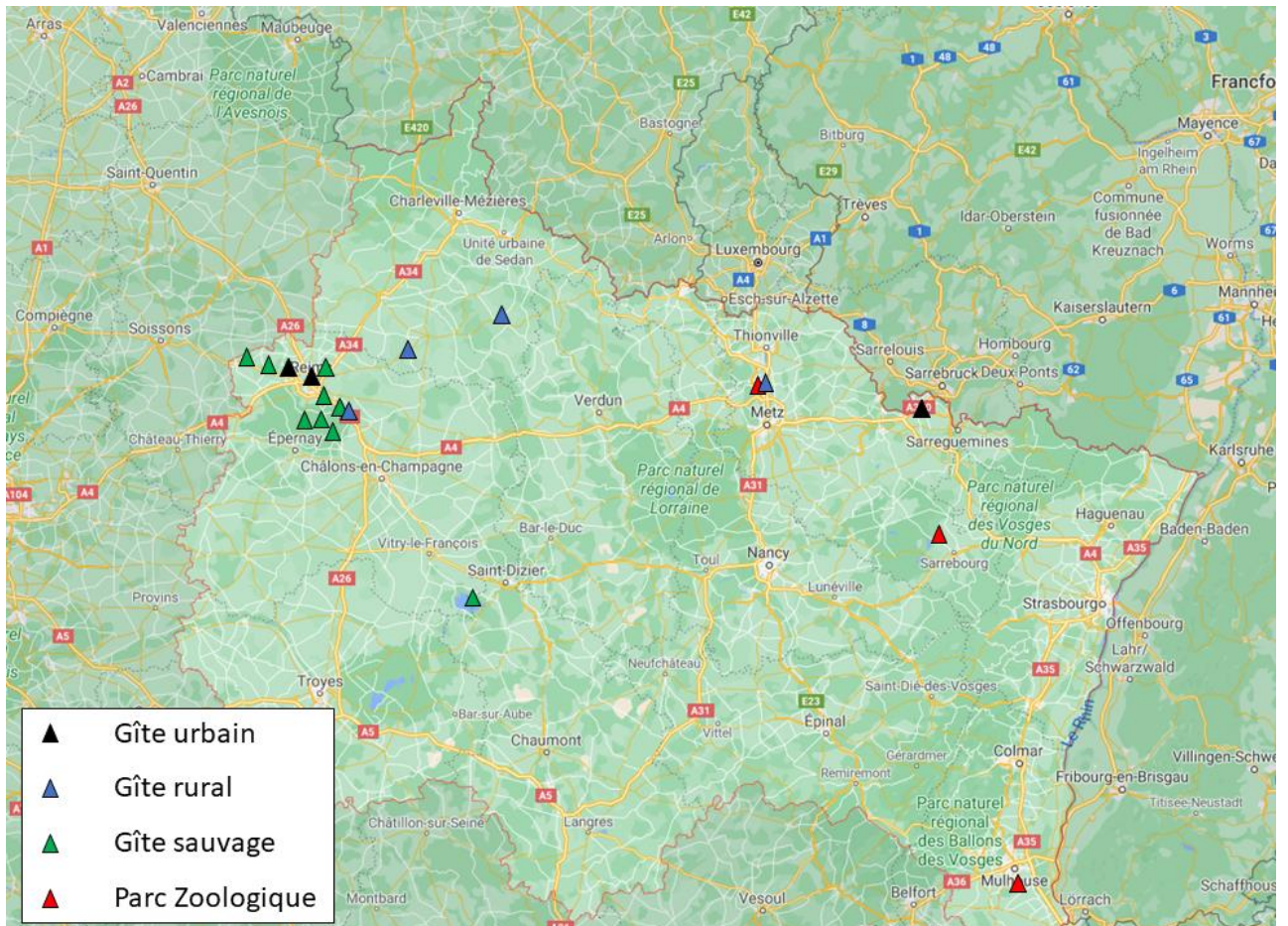


Figure 13 : Localisation des prélèvements entomologiques (©Google maps)

De même, un accord avec le Conservatoire d'espaces naturels de la Champagne-Ardenne nous a permis de prospecter durant l'année 2018 au sein de la Réserve Naturelle des Trous de Leu, située en périphérie de l'agglomération rémoise. Cet espace naturel est bordé de champs ainsi que d'une zone d'activités de transport de marchandises. Sa situation à l'interface de milieux urbains et ruraux nous a semblé intéressante pour étudier l'entomofaune présente dans cet espace. Le plan détaillé de cette réserve est proposé sur la figure 14.

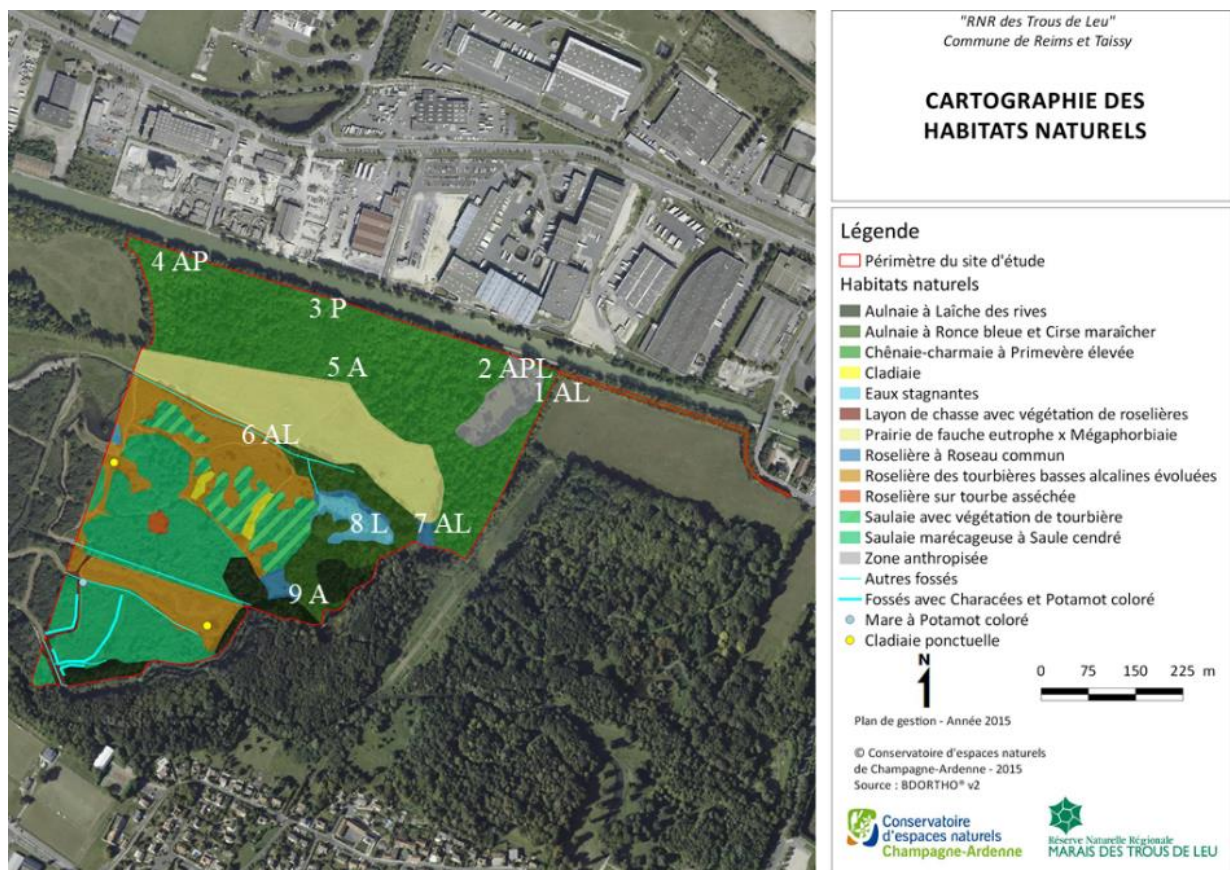


Figure 14 : Plan de la Réserve Naturelle Régionale des Trous de Leu (©Conservatoire d'espaces naturels de Champagne-Ardenne). Les lettres A et L signifient respectivement la capture d'adultes et de larves.

La répartition des sites de captures est détaillée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Sites de capture sur la RNR des Trous de Leu

Numéro du site	Détails	Pose de pièges adultes	Capture larvaire	Piège pondoir
1	Ancien jardin	X	X	
2	Maison entrée	X	X	X
3	Bordure parc	X		X
4	Bordure parc	X		X
5	Bois	X		
6	Rigole	X		
7	Mare ouest	X		
8	Bras mort		X	
9	Péninsule	X		

2.1.2. Parcs zoologiques

Les parcs zoologiques d'Amnéville, de Mulhouse et de Sainte-Croix ont été prospectés entre 2019 et 2020 en partenariat avec les vétérinaires responsables des sites afin de répondre à l'inquiétude grandissante que représentaient la circulation du virus Usutu au sein des populations aviaires captives. Une approche entomologique visant à y identifier les espèces de moustiques ainsi que leur localisation précise au sein des parcs a été mise en œuvre.

Le parc zoologique d'Amnéville est une structure enclavée entre une zone de loisirs et une zone forestière. Les allées sont goudronnées et les gîtes anthropiques pour les moustiques y sont nombreux. Autres que les bassins artificiels des enclos, le système de drainage du parc possède de nombreux regards dans lesquelles stagnent de petites collections d'eau. Ces regards sont disséminés sur l'ensemble du parc. Nous avons donc élaboré un plan d'échantillonnage prenant en compte les dispositifs présents dans les enclos (bassins, enrichissements à base de pneus pour les fauves) et hors des enclos (systèmes de vidange des bassins, évacuations, gîtes potentiels de repos, zone technique). Notre attention s'est portée tout naturellement sur les volières des rapaces afin de caractériser la présence d'éventuels vecteurs. Ces volières sont situées en bordure du parc qui est adossé aux sous-bois voisins. La nomenclature des types de piégeage est la même que précédemment (figure 15).



Figure 15 : Plan des sites d'échantillonnage sur le parc zoologique d'Amnéville

En prospectant au niveau des volières des chouettes lapones (*Strix nebulosa*), nous nous sommes rendu compte que l'arrière des volières était en bois légèrement humide et que les adultes femelles gorgées se posaient régulièrement dessus (Figure 16). Nous avons donc pu effectuer des prélèvements à l'aide de captureurs à bouche dans le but d'identifier les repas sanguins ces spécimens. Des exemples de gîtes prospectés sont illustrés sur la figure 17. L'identification des origines des repas sanguins est détaillée dans la section 4.2 de ce chapitre.

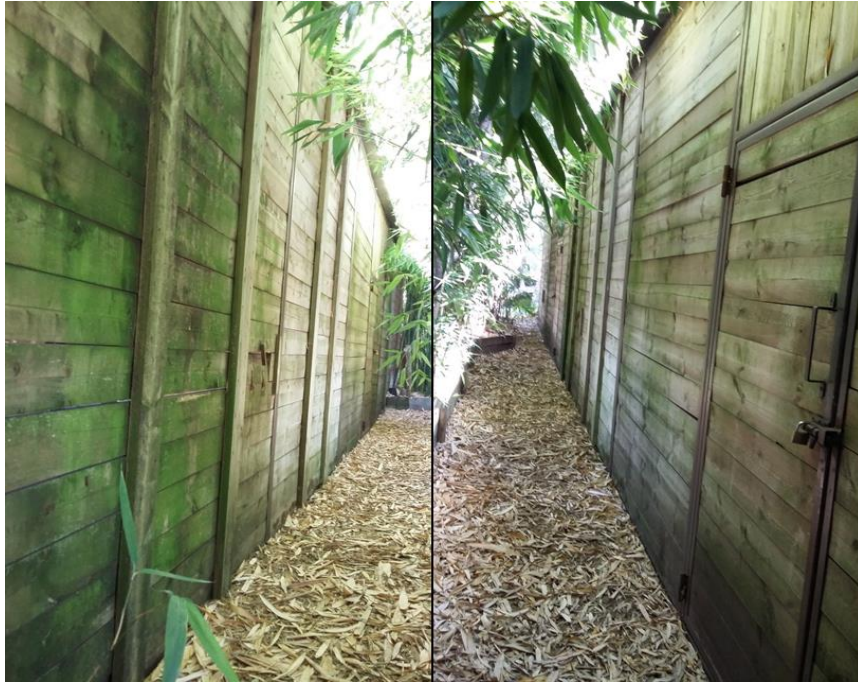


Figure 16 : Arrière des volières dans le parc zoologique d'Annéville (©JP Martinet)

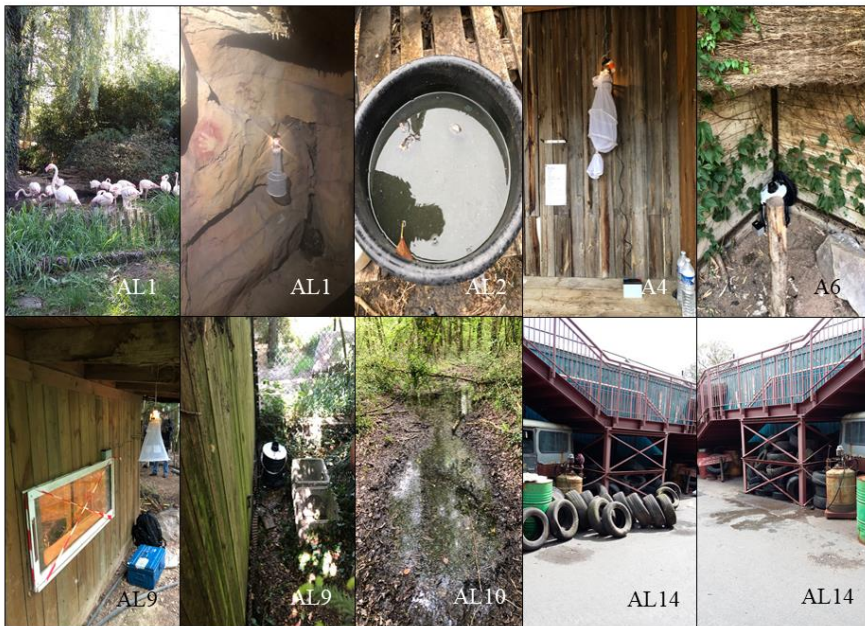


Figure 17 : Sites de prélèvements dans le parc zoologique d'Annéville

Les sites d'échantillonnages sur la zone du parc zoologique d'Amnéville sont détaillés dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Sites d'échantillonnages sur la zone du parc zoologique d'Amnéville

Numéro du site	Détails	Pose de pièges adultes (CDC Light Trap [®] et BG Sentinel [®])	Capture larvaire
AL1	Flamands roses et grotte des lemmings	X	X
AL2	Zone technique	X	X
A3	Ecuries TigerWorld	X	
A4	Volières rapaces animations 1	X	
A5	Volières rapaces animations 2	X	
A6	Volières <i>Strix</i> 1	X	
AL7	Volières <i>Strix</i> 2	X	
A8	Volière <i>Strix</i> 3	X	
AL9	Volière Vautour	X	
AL10	Bassin extrémité Parc	X	
A11	Enclos Jaguar	X	
A12	Grotte Chiroptères	X	
L13	Bauge Rhinoceros		X
AL14	Enclos Géladas	X	X

Parc d'observation de Sainte-Croix :

Le parc d'observation de Sainte-Croix possède un biotope très éloigné de celui d'Amnéville. C'est un parc très ouvert, où des populations de cervidés vivent en semi-liberté. La configuration de ce parc est très proche de celle d'un parc de vision avec de grands enclos se fondant dans le milieu naturel. Les volières des rapaces se situent en sous-bois. Cet environnement est relativement sec et ne dispose que de très peu de collection d'eau même temporaires pouvant servir de gîtes de pontes aux espèces forestières. Comme pour Amnéville, nous avons choisi de prospecter à proximité immédiate des volières. Nous avons également échantillonné dans les bassins des enclos lorsque cela était possible (Figures 18, 19, 20 ; tableau 3).



Figure 18 : Vue aérienne du parc de Sainte-Croix (©Google Maps). La nomenclature est explicitée dans le tableau suivant (Tableau 3).

Tableau 3 : Sites d'échantillonnages sur la zone du parc de Sainte-Croix :

Numéro du site	Détails	Pose de pièges adultes	Capture larvaire
A1	Parc des Rennes	X	
A2	Zone des volièrès (Chouettes, tétaras et renards polaires)	X	
A3	Site Yellowstone (galeries, fort)	X	
A4	Volière (Grand-duc, Corbeau)	X	
L1	Zone technique		X
L2	Étang des pélicans		X
L3	Lodge Cerf / Sanglier		X
L4	Mare face aux volièrès		X
L5	Parcours pieds nus		X

Les différents sites de captures sont illustrés ci-après (figures 19 et 20).



Figure 19 : Sites de prélèvements larvaires dans le parc de Sainte-Croix (©H Ferté)



Figure 20 : Sites de prélèvements larvaires dans le parc de Sainte-Croix (©H Ferté)

Parc zoologique de Mulhouse :

Le parc zoologique de Mulhouse se rapproche de celui d'Annéville et présente les mêmes types de biotopes. Des allées goudronnées, des enclos avec des bassins naturels et artificiels, des décors pour fauves à base de pneus, ainsi que de nombreuses bouches d'évacuation des eaux de pluies. Au niveau de la faune, la principale différence est l'absence d'une faune africaine abondante (figure 21).



Figure 21 : Plan du parc zoologique de Mulhouse

Tableau 4 : Sites d'échantillonnages sur la zone du parc zoologique de Mulhouse (Les sites en rouge sont les sites qui se sont révélés négatifs) :

Numéro du site	Détails	Pose de pièges adultes	Capture larvaire
A1	Grotte lion	X	
A2	Manchot	X	
A3	Volière Grand-duc / Grue	X	
A4	Volières multiples / Cistude	X	
L1	Tortues de Floride		X
L2	Pneu panthère nébuleuse		X
L3	Pneu tigre		X
L4	Jardin jurassien		X
L5	Poubelle « Okapi »		X
L6	Regard « Bongo »		X
L7	Flamand rose		X
L8	Bharal / Takin		X
L9	Jardin botanique		X
L10	Regards et vasque Zèbre		X
L11	Cistude		X
L12	Regards volière		X

Les différents sites de captures (tableau 4) sont illustrés ci-après (figures 22 et 23).



Figure 22 : Sites de prélèvements larvaires au parc zoologique de Mulhouse (©H Ferté)

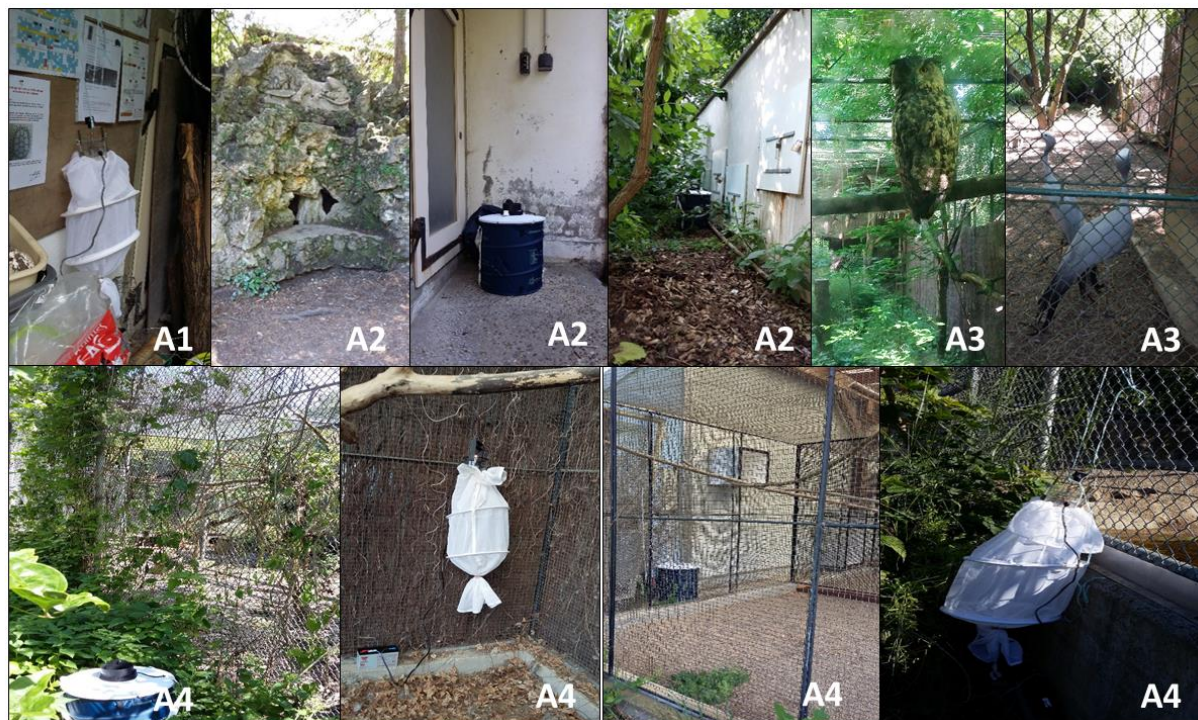


Figure 23 : Sites de prélèvements d'adultes au parc zoologique de Mulhouse (©H Ferté)

2.2. Matériels de capture

2.2.1. Stades aquatiques

Les captures de stades larvaires ont été conduites en parallèle des captures d'adultes. Des gîtes naturels (mares, ornières) aussi bien que des gîtes artificiels ont été échantillonnés. La surface de l'eau a été écrémée à l'aide de passoire à maille fine. Les larves de tous les stades de développement (L1 à L4 et nymphes) sont ensuite disposées en pots hermétiques et installées en cristalliseur au laboratoire. En vue de leur éclosion, les larves sont disposées à raison d'une centaine d'individus par litre d'eau. L'alimentation mise à leur disposition varie suivant le genre. Les larves du genre *Aedes* se voient proposer de la levure, alors que les larves du genre *Anopheles* et *Culex* se voient proposer de l'alimentation féline sous forme de croquettes. L'eau est changée dès qu'un trouble commence à être observé. Les bassines sont contrôlées tous les deux jours, et les nymphes obtenues sont alors isolées en cristalliseur et placées en cages par espèce et par origine en vue de l'obtention de leur éclosion.

2.2.2. Adultes

Les captures ont été conduites avec deux types de pièges : des pièges BG Sentinel et des pièges lumineux de type CDC. Le piège BG Sentinel (figures 24 et 26) est un piège pouvant être posé au sol, constitué d'un support, d'un ventilateur et d'un appât odorant (BG lure[®]). Les moustiques (majoritairement des femelles) attirés par l'appât sont aspirés à l'aide d'un ventilateur dans un sac en tissu. Dans le cadre de ce travail, les pièges sont déposés le soir et relevés le matin suivant. La pose de ces pièges a été effectuée dans les deux heures qui précédaient le coucher du soleil et le relevage a été effectué dans les deux heures qui suivaient le lever du soleil le matin suivant. Bien que les batteries alimentant ces pièges aient une autonomie supérieure (environ 48 heures par temps chaud si la batterie est en bon état), nous avons pris la décision de procéder par plages de 12 heures afin de pouvoir récupérer des adultes vivants et en bon état pour envisager les différentes approches : maintien au laboratoire, mise en élevage, screenings, barcoding et géomorphométrie alaire.

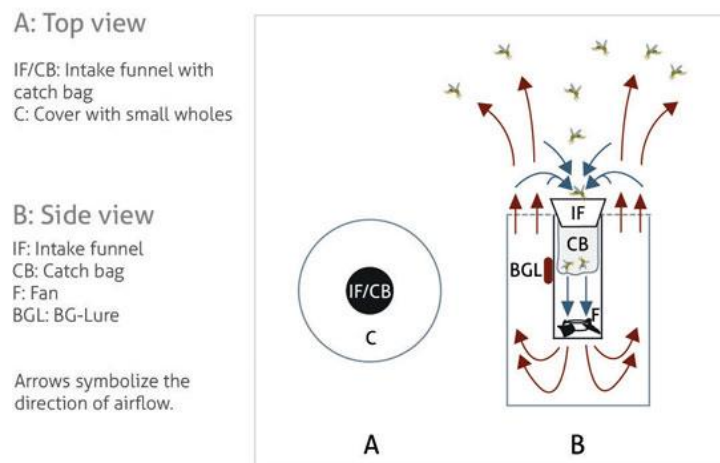


Figure 24 : Principe de fonctionnement d'un piège BG Sentinel (www.bg-sentinel.com)

Le piège CDC (figures 25 et 26) est un piège au fonctionnement similaire à celui du BG Sentinel mais en diffère par l'existence d'une ampoule à incandescence permettant d'attirer les espèces photophiles (notamment les espèces du genre *Culex*). La périodicité de pose des pièges CDC est la même que celle des BG Sentinel.

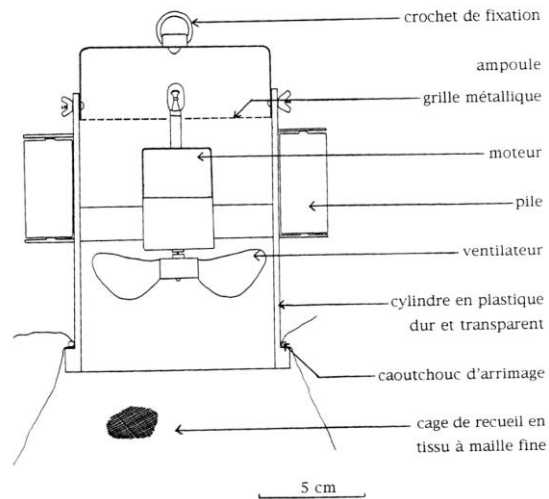


Figure 25 : Schéma d'un piège CDC (©J. Depaquit)

-Capture sur appât humain : lors des missions notamment en milieu forestier nous avons observé une forte anthropophilie de la part de certaines espèces (*Aedes cantans*, *Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus*). Nous avons donc procédé à :

-des captures sur support : dans certains milieux anthropisés, notamment sur les sites des parc zoologiques d'Annéville et de Saint Croix, des moustiques adultes ont été observés au repos et ont pu être capturés à l'aide de captureurs manuels.

- des captures sur moustiquaire : en milieu péri-urbain, certaines fortes densités de moustiques non anthropophiles ont été décelées. Nous avons alors procédé à une capture à l'aide d'une moustiquaire. Brièvement, une moustiquaire (non imprégnée d'insecticide) est tendue, puis les hautes herbes sont foulées afin de faire s'envoler les moustiques au repos qui y séjournaient en plus de ceux, plus nombreux, à la recherche d'un repas sanguin. Les moustiques viennent se poser sur la moustiquaire blanche, les rendant facilement décelables et permettant leur capture à l'aide d'aspirateurs manuels (figure 26).



Figure 26 : Pose d'un piège BG Sentinel©, capture sur moustiquaire et pose d'un piège CDC
(©JP Martinet/H Ferté)

2.3. Conservation et préparation du matériel

Conservation des individus adultes sur le site de Reims :

Les adultes sont conservés en cages sur lesquelles sont disposés des cotons humidifiés quotidiennement. Leur alimentation est constituée d'eau sucrée de concentration 10% m/V. Cette eau sucrée leur est proposée *ad libitum*. Les conditions atmosphériques sont les suivantes : température 19-23°C, Humidité relative (HR) 50%. La photopériode n'est pas contrôlée et suit le cycle naturel extérieur. Ne disposant ni de système Hémotek©, ni d'agrément pour l'utilisation de souris à Reims, les adultes sont gorgés avec un gorgeur en verre recouvert d'intestin de porc contenant du sang total de porc et thermostaté à 37°C via une pompe à eau (Figure 27).

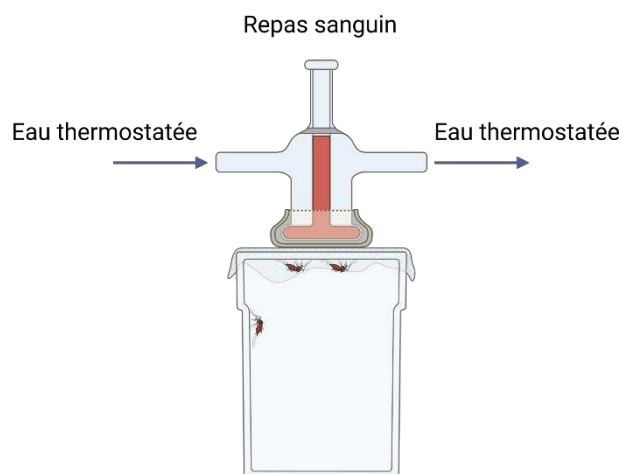


Figure 27 : Méthode de gorgement des moustiques (©Biorender)

Conservation des individus adultes sur le site de l'Institut Pasteur Paris :

L'insectarium étant un site à environnement contrôlé, les différentes populations provenant du terrain sont mises à l'écart dans une pièce de quarantaine réservée à cet usage. Les conditions y sont réglées à 22°C et 60% HR, avec une photopériode 12h ; 12h (L ; D). Les dispositions et alimentation des populations larvaires sont identiques au site de Reims. Les adultes sont conservés en cages en chambre climatique dans les conditions les plus propices à leur bon développement. Par exemple, pour des espèces tempérées telles qu'*Aedes rusticus*, les conditions y sont 20°C, 80% HR, 16h ; 8h (L ; D). Ces conditions sont propices au développement de cette espèce de fonte des neiges. Pour des espèces estivales, telles qu'*Anopheles plumbeus*, les conditions sont modifiées de la manière suivante : 22°C, 80% HR, 16h ; 8h (L ; D). Les températures employées dans ces protocoles sont volontairement basses afin, de ne pas accélérer le développement des moustiques au détriment de leur fitness. Les gorgements nécessaires à l'amplification des populations ont été réalisés sur souris anesthésiée en accord avec l'agrément du Ministère de l'Agriculture.

2.4. Identification des espèces

2.4.1. Clés utilisées

Les stades adultes sont identifiés selon les espèces sur des caractères morphologiques et moléculaires. Pour les individus mâles, les *hypopygia* sont prélevés, éclaircis dans le Marc-

André à froid ou à chaud, et montés entre lame et lamelle dans de la gomme au chloral ou dans l'Euparal[®]. Après identification, le reste du corps sera conservé à une température de 8°C dans de l'éthanol à 70°. Les femelles adultes capturées sont anesthésiées par le froid et disposées sous loupe binoculaire pour identification. L'identification morphologique a été effectuée en utilisant plusieurs clés d'identification dichotomique ou polytomique :

-Clé d'Arnold modifiée (61) :

Issue de sa thèse soutenue en 1983. Très bien illustrée et facile d'utilisation, elle sera largement utilisée pour la diagnose des larves et des imagos mâles. Cependant, pour l'identification des imagos femelles du genre *Aedes*, on préférera se reporter aux clés de Schaffner. On notera toutefois l'absence de détermination pour *Aedes refiki* et de *Culiseta annulata*.

-Clé de Schaffner pour les imagos femelles du genre *Aedes* du Nord-Est de la France (*Diptera, Culicidae*) (62):

Elle a été publiée dans le Bulletin de la Société entomologique de France en 1993. Elle repose principalement sur l'étude des taches d'écailles et des soies des pleures thoraciques, alors que les autres clés reposent en grande partie sur la coloration des tergites abdominaux. Bien que délicate à manier, cette clé permet une diagnose fine et (relativement) rapide des femelles du genre *Aedes* de la région.

-Clé de Möhrig « Die Culiciden Deutschlands : Untersuchungen zur Taxonomie, Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken » (63) :

Pour celles et ceux qui ne pratiquent pas la langue allemande (tel que nous), les clés d'identification de cet ouvrage ont été traduites par Jean RAGEAU en 1970. Très bien illustré et exhaustif, cet ouvrage permet la détermination des espèces de culicidés présentes dans la région. La qualité des dessins permet une vérification des caractères en présence après identification.

-Les moustiques d'Europe : logiciel d'identification et d'enseignement (64):

Elle s'articule sur plusieurs propositions associées à de l'iconographie. Elle permet une identification des larves et imagos (mâles et femelles) des individus des genres *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta* et *Coquillettidia*. De nombreuses iconographies sont disponibles afin d'identifier les caractères morphologiques à rechercher. Bien qu'ayant été élaborées par le

même auteur, nous remarquons que certains caractères se contredisent entre cette clé et la précédente (notamment au niveau de la présence de pleures thoraciques pour certaines espèces du genre *Aedes*). En cas de litige, nous avons favorisé la plus récente.

-Clé MoskeyTool (65) :

C'est une clé interactive recensant 128 espèces de la région Euro-Méditerranéenne. Facile d'utilisation et pouvant être installée sur un ordinateur portable, c'est la clé d'identification que nous avons le plus utilisé au cours de ce travail.

2.4.2. Approches moléculaires

La technique de barcoding utilisée repose sur le séquençage d'un fragment d'une longueur de 648 bases du gène de la Cytochrome Oxydase I mitochondrial. Brièvement, l'ADN est extrait à partir d'une paire de pattes avec le kit Qiagen© DNeasy Blood and Tissue extraction kit suivant le protocole du fabricant. Une Polymerase Chain Reaction (PCR) est ensuite réalisée avec les paramètres suivants : dénaturation initiale 94°C pendant 30 s, puis 5 cycles à 94°C pendant 30 s, 45°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min, puis 35 cycles à 94°C pendant 30 s, 51°C pendant 30 s, 72°C pendant 1 min puis enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Les primers utilisés sont :

- LEPF1 (5'-TTTCTACAAATCATAAAGATATTGG- 3'), and
- LEPR1 (5'- TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') (66).

Les amplicons non purifiés sont ensuite envoyés pour purification et séquençage en double sens par la technique de Sanger (Genewiz, Allemagne). La qualité des séquences obtenues est analysée avec les logiciels du Staden package (PreGap v4 et Gap v5) (67) et les séquences consensus sont ensuite comparées à celles existantes dans GenBanK à l'aide de l'algorithme BLAST et les identifications sont réalisées au niveau spécifique si le score est supérieur à 99%.

Pour différencier les différentes formes de *Culex pipiens* (*Culex pipiens pipiens* et *Culex pipiens molestus*), nous avons utilisé les outils moléculaires proposés par Bahnck et Fonseca (68).

L'ADN a été extrait des pattes des femelles avec le kit Qiagen© DNeasy Blood and Tissue extraction kit. Une Polymerase Chain Reaction (PCR) est ensuite réalisée avec les paramètres suivants : dénaturation initiale 94°C pendant 5 m, puis 40 cycles à 94°C pendant 30 s, 54°C pendant 30 s et 72°C pendant 40 s et enfin une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Les primers utilisés sont :

- pipCQ11R (5'-CATGTTGAGCTTCGGTGAA-3')
- molCQ11R (5'-CCCTCCAGTAAGGTATCAAC-3')
- CQ11F2 (5'-GATCCTAGCAAGCGAGAAC-3')

Le produit de PCR est utilisé pour une migration sur gel. Une taille d'amplicons supérieure à 200 paires de bases (bp) indique la forme *pipiens*, une taille supérieure à 250 bp indique la forme *molestus*.

Au niveau du parc zoologique d'Amnéville, la topologie du parc nous a permis de capturer des femelles gorgées. Nous avons alors mis en œuvre une identification moléculaire de l'origine du repas sanguin afin de déterminer les préférences alimentaires des moustiques du parc. Le protocole utilisé est celui de Reeves et al. (69). L'ADN a été extrait de l'abdomen des femelles avec le kit Qiagen© DNeasy Blood and Tissue extraction kit. Une Polymerase Chain Reaction (PCR) est ensuite réalisée avec les paramètres suivants : dénaturation initiale 94°C pendant 3 min, puis 40 cycles à 94°C pendant 40 s, 48,5°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min et enfin une élongation finale à 72°C pendant 7 min.

Les primers utilisés sont :

- Mod_RepCOI_F (5'- TNT TYT CMA CYA ACC ACA AAG A - 3')
- Mod_RepCOI_R (5'- TTC DGG RTG NCC RAA RAA TCA -3') (69).

Les amplicons sont ensuite envoyés au séquençage par la technique de Sanger (Genewiz, Allemagne). Les séquences obtenues sont comparées à celles existantes dans GenBank à l'aide de l'algorithme BLAST et les identifications sont réalisées au niveau spécifique si le score est supérieur à 99%.

2.4.3. La morphométrie alaire

Une technique d'identification des genres et espèces des individus de la famille des *Culicidae* par l'analyse des ailes a été récemment développée, et pourrait permettre de s'affranchir des méthodes traditionnellement utilisées pour la reconnaissance des espèces. Si la géomorphométrie alaire est en plein essor, les bases mathématiques utilisées pour le traitement des données sont posées depuis longtemps (70, 71).

La morphométrie traditionnelle utilisée en biologie se base sur la mesure de distances entre des points homologues sur des organismes. La morphométrie géométrique, quant à elle, étudie

la conformation géométrique indépendamment de la taille. En s'affranchissant du facteur taille, la géomorphométrie alaire permet de minimiser le nombre de variables utiles qui décrivent une forme (70).

De récents travaux démontrent qu'il est possible de différencier les genres et les espèces de moustiques par l'analyse de leur nervation alaire par analyse géomorphométrique (72-74). Cependant, cette technique n'a pour le moment été appliquée qu'aux espèces ayant une importance en tant que vecteurs de parasites, de bactéries ou à l'origine de la transmission d'arboviroses parmi les genres *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* (75-77). Ces études, au-delà des objectifs de caractérisation, abordent également la problématique des mouvements de populations. En effet, le suivi des populations vectrices est indispensable au processus de compréhension des épidémies de maladies vectorielles et est un prérequis indispensable à la mise en place d'actions de lutte. Nous nous proposons donc d'appliquer la caractérisation géomorphométrique aux espèces présentes dans la région. Nous émettons l'hypothèse que ce traitement permettra, comme il l'a déjà fait pour certaines espèces vectrices, une différenciation certes nette des genres mais aussi des espèces autochtones.

La géomorphométrie alaire est l'étude géométrique de différents points d'intérêt des ailes (dans le cadre de ce travail, nous étudierons les différents points de jonction des nervures alaires). La structure des nervations des ailes de culicidés est détaillée en figure 27. La nomenclature utilisée est celle de Harbach (78).

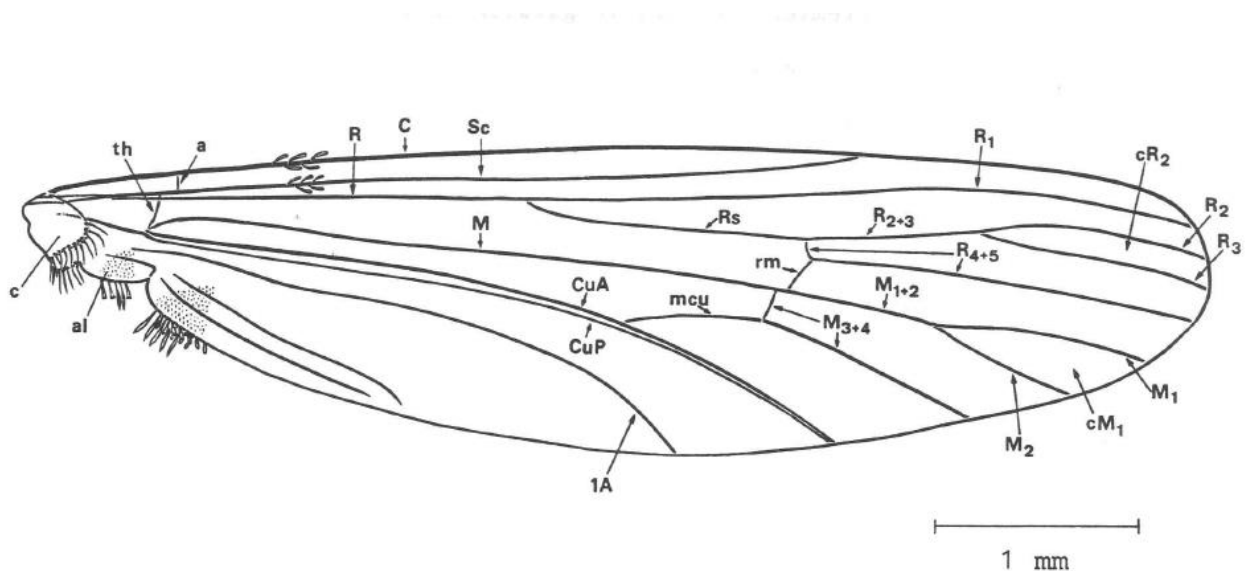


Figure 28 : Description anatomique d'une aile de *Culicidae* (79)

Les landmarks (LM) étudiés dans ce travail seront ceux utilisés précédemment dans d'autres travaux d'identification (77, 80) ainsi que dans des études portant sur le dimorphisme sexuel des ailes chez les culicidés (81). Bien que la probabilité soit faible que les espèces rencontrées lors de cet inventaire fassent partie des espèces vectrices les plus présentes dans la littérature, il semble néanmoins logique de leur appliquer le même traitement géomorphologique que les vecteurs, ceci afin d'obtenir des points de comparaison et un référentiel.

Le nombre et la position des landmarks utilisés dans la littérature ne sont pas constants. Si certains auteurs privilégient un nombre de 17 landmarks (82), nous avons pris le parti de nous référer au schéma le plus répandu, à savoir 18 landmarks (figure 28) permettant d'étudier le dimorphisme sexuel chez les culicidés, ainsi que la séparation des genres (77, 81). Nous utiliserons donc 18 landmarks, répartis comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5: Répartition des landmarks sur une aile de moustique

Numéro du landmark	Situation
1	Jonction radius 1 (R_1) et secteur radial (R_s)
2	Jonction costa (C) et subcosta (Sc)
3	Jonction costa (C) et radius 1 (R_1)
4	Jonction costa (C) et radius 2 (R_2)
5	Jonction costa (C) et radius 3 (R_3)
6	Jonction costa (C) et radius 4+5 (R_{4+5})
7	Jonction costa (C) et media 1 (M_1)
8	Jonction costa (C) et media 2 (M_2)
9	Jonction costa et media 3+4 (M_{3+4})
10	Jonction costa (C) et cubitus antérieur (CuA)
11	Extrémité proximale de la transverse médio-cubitale (mcu)
12	Extrémité distale de la transverse médio-cubitale (mcu)
13	Extrémité proximale de la media 3+4 (M_{3+4})
14	Base de la transverse radio-médiane (rm)
15	Jonction radio-médiane (rm) et radius 4+5 (R_{4+5})
16	Jonction radius 2+3 (R_{2+3}) et radius 4+5 (R_{4+5})
17	Apex de la cellule R_2 (cR_2)
18	Apex de la cellule M_1 (cM_1)

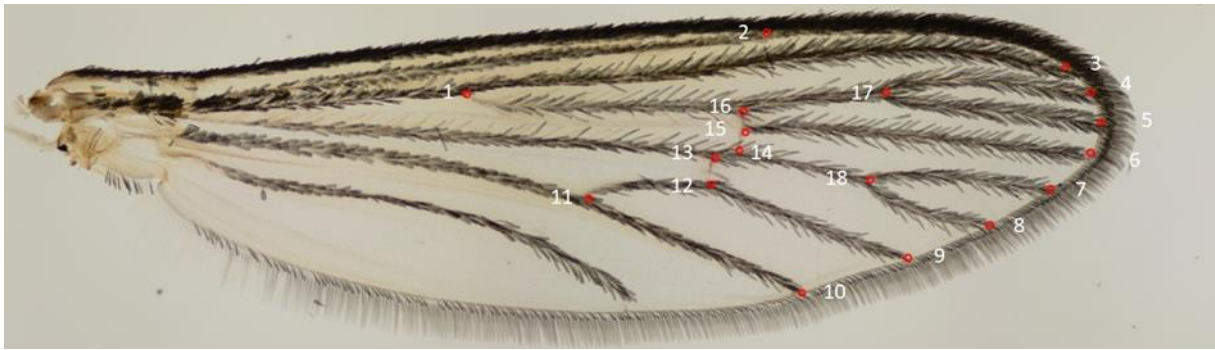


Figure 29 : Numérotation et insertion des landmarks sur une aile droite d'*Aedes rusticus* femelle (grossissement x4 ; ©J-P Martinet)

Cependant, il est possible que pour certaines espèces proches, ces landmarks ne soient pas suffisants pour bien les différencier. Dans ce cas, il sera possible d'utiliser des semi-landmarks (SL). Ces SL diffèrent des landmarks « classiques » par l'introduction d'une notion de variabilité de forme de la structure étudiée. Si des landmarks ne suffisent pas à caractériser deux espèces entre elles, ils apportent cependant assez d'informations pour observer des variations de position de certains d'entre eux. Il faudra alors se concentrer sur les landmarks les plus variables et étudier non seulement les changements de position de ces marqueurs, mais aussi effectuer un suivi des contours de la cellule sur laquelle ils sont apposés.

2.4.3.1. Préparation des échantillons

Les ailes des individus conservés dans de l'éthanol 70° seront déposées sur lame, déshydratées par rinçages successifs à l'alcool à 95° et montées dans l'Euparal® sous lamelle ronde. Pour les espèces où les nombreuses écailles alaires peuvent être un obstacle à l'apposition de landmarks (notamment chez les femelles), un traitement au Marc-André à chaud suivi d'un rinçage pourra être conduit avant montage. Un traitement physique (brossage au pinceau) peut également être utilisé. Pour des échantillons où les nervures alaires seraient peu visibles, une coloration à la Fuchsine acide devra être mise en œuvre. Cette coloration étant chronophage, elle ne sera pas mise en œuvre systématiquement (83).

Compte tenu de la nature fragile des ailes de moustiques, le brossage mécanique peut aboutir à la rupture de la membrane alaire et donc parfois à la destruction d'une partie ou de la totalité de l'aile. Cependant c'est la méthode la plus efficace et c'est celle que nous mettons en œuvre dans ce travail. Les échantillons d'ailes sont photographiés après montage dans l'Euparal® au grossissement x20 sur une loupe binoculaire Olympus® SZX10, couplé à une

caméra Olympus® DP26. L'acquisition des images et leurs éventuelles reconstructions sont effectuées sur le logiciel StreamEssentials® 1.7.

2.4.3.2. Traitement des images

Les images seront analysées à l'aide de plusieurs logiciels. Le premier traitement s'effectuera à l'aide des logiciels de la suite TPS (84). Ces logiciels permettent de compiler plusieurs photographies en un seul fichier, et de numériser les landmarks. TPSDig® (version 2.29) permet d'attribuer des coordonnées brutes à ces landmarks. Ces coordonnées (x,y) sont définies par les pixels sur lesquels elles ont été apposées, l'origine du repère se trouvant dans le coin inférieur gauche de la photo. La conversion des coordonnées du format pixel au format métrique s'effectue lors de la mise à l'échelle.

Ces coordonnées brutes seront traitées avec MorphoJ® (85) qui permet d'effectuer l'alignement procustéen, d'établir les matrices de covariances et d'effectuer des processus analytiques (Analyse en Composante Principale) et prédictifs (Analyse en Variable Canonique). De plus, les fonctions de comparaison permettent des représentations graphiques permettant de visualiser les variations de disposition des landmarks.

Quant aux données numériques, elles seront traitées avec le logiciel RStudio (86) et le logiciel PAST® (87).

2.4.3.3. Traitement statistique des échantillons

Lors de la digitalisation des landmarks, au-delà des différences naturelles des schémas de nervations alaires, les coordonnées obtenues ne se superposent pas. En effet, la disposition des ailes sur les lames, la disposition des lames lors des prises de vues produisent des coordonnées non alignées qui ne peuvent être analysées comme telles. Il faut donc passer par un processus de superimposition, qui va permettre de supprimer l'allométrie entre les différents échantillons afin de pouvoir les comparer entre eux. Ce processus est appelé General Procrustes Analysis (ce nom vient de Procrustes, bandit de la mythologie grecque qui forçait ses victimes à s'allonger sur un lit et modifiait leur taille afin que celle-ci s'adapte à la longueur du lit). Les coordonnées (x et y) des landmarks sont disposées en matrices à 18 lignes et 3 colonnes. Ce procédé comporte trois étapes, dont nous résumons brièvement le contenu :

-la première étape est le centrage des coordonnées. Pour n individus avec p landmarks sur un objet à k dimensions, les coordonnées sont stockées sous forme de matrices X_n de taille

k x p. Pour simplifier la démonstration, nous prendrons ici n=2. Cette opération est réalisée en considérant les coordonnées (x,y) comme des déviations par rapport à la moyenne des coordonnées totales, et ce centrage est obtenu par multiplication de la matrice Xn par I-P, où I représente une matrice d'identité de p x p, et P une matrice p x p où tous les éléments sont égaux à 1/p.

-la deuxième étape est la mise à l'échelle, et s'effectue par la formule suivante :

$$X_n' = (I-P)X_n / S_i'$$

$$S_i' = \sqrt{\text{tr}((I-P)X_n X_n^t (I-P))}$$

S_i' représente la somme des distances au carré de chaque landmark par rapport au barycentre.

- Enfin, la rotation est effectuée afin d'obtenir une racine carrée de la somme des distances au carré minimale entre les différents points.

$$X_n^{\circ} = X_n' \times H, \text{ avec } H = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix}$$

Dans le cas où l'étude des semi-landmarks serait préférée à celle des landmarks, le processus de traitement mathématique appliqué à ces SL serait le même que pour les LM. Ces processus sont illustrés par la figure 28.

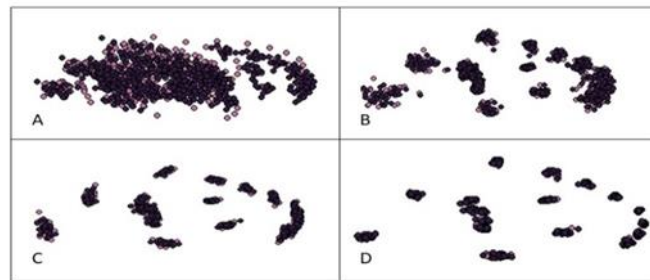


Figure 28 : Processus d'alignement : superimposition (A), centrage (B), mise à l'échelle (C) et rotation (D)

L'allométrie entre deux ailes différentes peut porter sur deux composantes : la taille et la forme. Pour identifier une éventuelle allométrie de taille, nous allons étudier la distribution dans les différents groupes du Centroid Size (CS). Le CS est une variable continue qui est la racine carrée de la somme des carrés des distances par rapport au barycentre de ces coordonnées (88). Ceci donne une valeur à une dimension, projection du barycentre sur un axe horizontal. Son

unité sera le millimètre. Par son mode de calcul, le CS est un bon indicateur de la taille de l'aile. A noter que le CS représente un indicateur de taille, et non la taille réelle de l'aile.

La deuxième composante de l'allométrie est la forme générale de l'aile. Cette allométrie sera caractérisée par la variation de position des différents landmarks apposés sur cette aile. Celle-ci sera étudiée par réalisation d'une Analyse en Variable Canonique (CVA), qui permettra de comparer les formes des ailes entre elles, en réalisant des histogrammes de fréquence pour une variable canonique la plus représentative.

La CVA sera réalisée via le module de comparaison du logiciel MorphoJ® (85).

2.5. Screening des moustiques infectés naturellement

Les screenings ont été effectués afin de déterminer si les échantillons capturés pouvaient contenir les virus WNV et USUV. Les screenings réalisés au cours de l'année 2018 ont été menés par l'Unité des Virus Emergents de Marseille. Pour l'année 2018, un total de 38 pools de moustiques sauvages provenant de l'ensemble de la région (Annexe 2) (et regroupant les espèces *Ae. annulipes*, *Ae. cantans*, *Ae. cinereus* et *Ae. rusticus*) ont été analysés avec les protocoles Pan-flavivirus (89), Usutu virus (système in house) et West-Nile virus système Duo (90, 91). En 2019, 46 pools (annexe 3) de *Culex pipiens* provenant de la commune d'Oeting (Moselle) ont été analysés pour recherche d'USUV sur le campus parisien par RT-qPCR. Cette analyse fait suite au signalement par l'ONCFS [(Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage) depuis devenu OFB (Office Français de la Biodiversité)] de cas suspect de mortalité de merles (*Turdus merula*) possiblement dû à USUV sur la commune d'Oeting (Moselle) fin juillet. De ce fait, une mission d'enquête entomologique a été réalisée sur place afin de piéger les moustiques adultes présents sur site.

Capturés au parc zoologique d'Amnéville en 2019, 13 pools (Annexe 4) de *Culex pipiens* ont également été analysés.

L'ARN des abdomens de moustiques a été extrait avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA (Hoerd, France). Le protocole utilisé sur le campus de l'Institut Pasteur Paris est un protocole TaqMan. La RT-qPCR a été mise en œuvre sur un Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. Le kit utilisé est le TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (ThermoFisher, USA). Le cycle est composé comme suit : 15 min à 48°C, 10 min à 95°C, puis 45 cycles à 15s à 95°C, 1 min à 60°C et lecture des puits. Les puits ont été réalisés en duplicat.

Les primers et la sonde utilisés pour le screening Usutu sont :

- UV-550F : 5'-CACGCAACATGGGAAAACC-3'
- UV-648R : 5'-GCATCCAGTTTGGGGCATTTC-3'
- UV-574P : 5'-[6FAM]TGCTGGATTAGAGCCATGGATGTCGGGTA[BHQ1]-3'

2.6. Expérimentations de compétence vectorielle

Les expériences d'infection expérimentales ont toutes été réalisées sur le campus de l'Institut Pasteur de Paris au sein du laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (BSL3) de l'unité Arbovirus et Insectes Vecteurs.

2.6.1. Origine des populations de moustiques

Les populations de moustiques soumises aux infections expérimentales ont été capturées par nos soins à des stades immatures et matures. Au total, 4 populations différentes ont été utilisées (Figure 29).

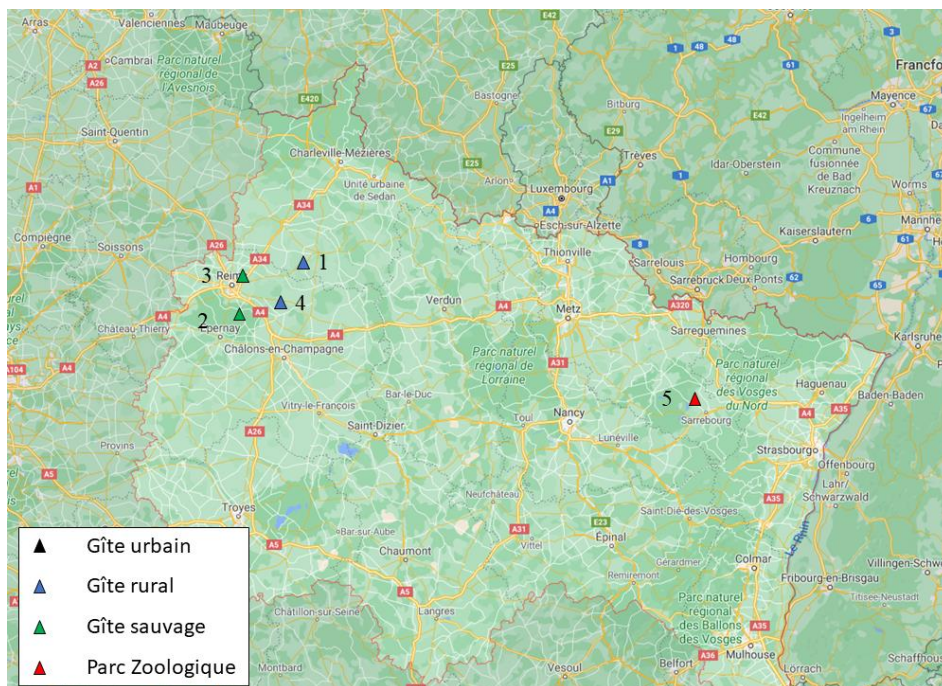


Figure 30 : Carte de provenance des populations utilisées en infection expérimentale
(©Google Earth)

Si les effectifs des captures étaient suffisants, nous avons privilégié l'infection de la population native (F_0). Dans le cas contraire, nous avons opté pour une amplification de la population initiale (comme décrit dans le paragraphe 3 de ce chapitre) pour aboutir à une F_1 voire à une F_2 .

- La population de *Culex pipiens* provenant du site de Machault (Ardennes) a été capturée sous forme larvaire le 5 septembre 2018. La génération infectée est la F_0 .

- Celle de *Culex pipiens* provenant du site de Verzy (Marne) sous forme de femelles hivernantes le 28 octobre 2019. La génération infectée est la F_2 .

- Celle d'*Aedes rusticus* du site de Berru (Marne) sous forme larvaire le 8 mars 2020. La génération infectée est la F_0 .

- Celle d'*Anopheles plumbeus* a été collectée par la technique de l'appât humain à Beaumont sur Vesle (51) le 26 mai 2020. La génération infectée est la F_2 .

2.6.2. Obtention des souches virales

La souche virale utilisée dans les manipulations d'infection expérimentale avec le WNV est celle isolée en Camargue en 2000 par Murgue et al. (92). La souche virale d'USUV est la souche Europe 3 isolée dans le Haut-Rhin en 2018 fournie par Madame Lecollinet (Laboratoire de Santé Animale de Maison-Alfort, ANSES).

2.6.3. Infections expérimentales

Les femelles âgées de 8 à 10 jours sont préparées au niveau de l'insectarium. Après anesthésie par le froid, les femelles sont triées et disposées en boîtes cartonnées fermées par moustiquaire par lot de 60. Elles sont ensuite introduites dans le BSL3 où elles sont mises à jeun pendant 24h. L'infection expérimentale est réalisée via un système Hemotek[®]. Une capsule métallique est recouverte d'une membrane d'intestin de porc et remplie d'une solution composée d'érythrocytes de lapins lavés, de suspension virale et de phagostimulant (ATP). Cette capsule est ensuite posée sur les boîtes cartonnées afin que les femelles puissent effectuer leur repas de sang. Après 30 minutes, les femelles sont à nouveau anesthésiées par le froid afin de pouvoir séparer les femelles gorgées des femelles non gorgées. Les femelles gorgées sont disposées en boîtes neuves, et une solution d'eau sucrée à 10% leur est fournie *ad libitum* via un petit coton imbibé posé sur la boîte. Les femelles gorgées sont ainsi maintenues à 28°C, 80% d'humidité

relative (RH) et photopériode de 12h ; 12h (L ; D). Dans notre protocole, des lots d'au moins 24 individus sont sacrifiés à 7, 14 et 21 jours post-infection afin d'évaluer les paramètres d'infection, de dissémination et de transmission. Cela s'effectue par la dissection du moustique en trois parties (tête, thorax et abdomen). L'infection est le fait que le moustique présente des particules virales infectieuses au niveau abdominal (dans l'intestin moyen ou midgut). Cela prouve que le virus a bien été ingéré et s'est répliqué au niveau du tube digestif. La dissémination virale est caractérisée par la présence de particules virales infectieuses au niveau de la cavité générale (tête et thorax). La transmission est caractérisée par la présence de particules virales infectieuses dans la salive. Afin de récupérer la salive, la femelle anesthésiée subit une ablation des pattes et des ailes afin de provoquer un stress qui la fera saliver. Le proboscis est alors inséré dans un cône de pipette contenant 5 μ L de sérum de veau fœtal (SVF) (Figure 30). La salivation dure 20 à 30 minutes, et ensuite le contenu du cône est vidé dans 45 μ L de DMEM et congelé à -80°C pour futur titrage.



Figure 31 : Salivation d'*Aedes rusticus* (©L. Mousson)

2.6.4. Titrage

Les abdomens, thorax et têtes sont disposés dans 300 μ L de DMEM à 2% de SVF et broyés à l'aide de billes en verre et d'un système de broyage Precellys™. Le tube est alors centrifugé, et le surnageant est récupéré pour titrage. Si une extraction d'ARN doit être effectuée, elle sera préférentiellement pratiquée sur le culot.

Pour le WNV, le titrage s'effectue sur cellules Vero (dénomination ATCC : CCL81) en plaque 6 puits. Après inoculation, les plaques sont incubées 5 jours, puis les tapis cellulaires sont fixés (à l'aide de formaldéhyde et cristal violet) et l'effet cytopathogène est observé sous la forme de plages de lyses ou PFU (Plaque Forming Unit). Le nombre de PFU est alors compté et ramené à la dilution initiale pour obtenir un nombre de PFU/mL.

Chapitre III : espèces recensées

3.1. Résultats

Les résultats de présence sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Espèces retrouvées en fonction des milieux

Espèce retrouvée	Milieu urbain			Milieu rural			Milieu selvatique										
	Reims	Oeting	St Brice Courcelles	Machault	Boult aux Bois	Beaumont sur Vesle	Chalons sur Vesle	Saint Léonard	Courlandon	Berru	Lac du Der	Trépail	Verzy	Boult aux Bois	Amnéville	Germaine	St Imoges
<i>Aedes cantans</i>			X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
<i>Aedes annulipes</i>							X	X	X		X						
<i>Aedes cinereus</i>								X		X	X				X		
<i>Aedes communis</i>								X		X							
<i>Aedes geminus</i>						X		X		X	X						
<i>Aedes geniculatus</i>			X			X		X	X		X						
<i>Aedes punctor</i>																	
<i>Aedes refiki</i>									X								
<i>Aedes rusticus</i>	X				X	X		X	X	X	X		X	X	X		X
<i>Aedes sticticus</i>						X	X	X		X							
<i>Anopheles claviger</i>									X								
<i>Anopheles maculipennis</i>																X	X
<i>Anopheles messeae</i>													X				
<i>Anopheles plumbeus</i>	X					X		X									
<i>Coquilletidia richiardii</i>								X		X							
<i>Culex hortensis</i>	X		X														
<i>Culex pipiens</i>	X	X	X	X				X			X	X	X				
<i>Culex torrentium</i>	X		X														
<i>Culiseta annulata</i>								X									
<i>Culiseta longiareolata</i>	X			X									X				
<i>Culiseta morsitans</i>				X			X	X	X	X	X	X					

3.2. Associations espèces-gîtes-milieus

Nous proposons ci-après des planches photographiques décrivant les différents gîtes de capture, avec une description qualitative des espèces principalement retrouvées au sein de ces biotopes.

3.2.1. Gîtes urbains



Figure 32 : Exemples de gîtes urbains (1 : Piège pondoir à saint-Brice Courcelles (Marne), 2 et 3 : Egout à Oeting (Moselle), 4 : Egout à Reims (Marne), 5 : Jardin à Reims (Marne), 6 : Jardin de particulier à Oeting (Moselle)) (©JP Martinet)

Les gîtes urbains (figure 31) sont de petite taille et possèdent une durée de mise en eau variable. En conditions estivales, certains peuvent se retrouver régulièrement asséchés. La qualité des eaux contenues dans ces récipients est variable, cependant elle est souvent très chargée en matières organiques. Les espèces retrouvées au cours de ce travail dans ces gîtes regroupent des espèces appartenant aux genres *Culex*, *Culiseta* et *Anopheles*. On retrouve les espèces *Culex pipiens* et *Culex torrentium*, dont les préférences pour ces gîtes sont bien documentées (64). *Culex hortensis* est également une espèce assez fréquemment retrouvée dans ces gîtes. L'espèce *Culiseta longiareolata* a également été retrouvée dans un regard au niveau d'un gîte de Reims (Marne), en accord avec les données disponibles sur les préférences de cette espèce (93). Cependant, on retrouve également dans ces gîtes des individus d'*Anopheles plumbeus*.

3.2.2. Gîtes ruraux

Les gîtes ruraux échantillonnés dans le cadre de cet inventaire sont tous situés à proximité de dispositifs de récupération d'eau de pluie entretenus ou non (figure 32).

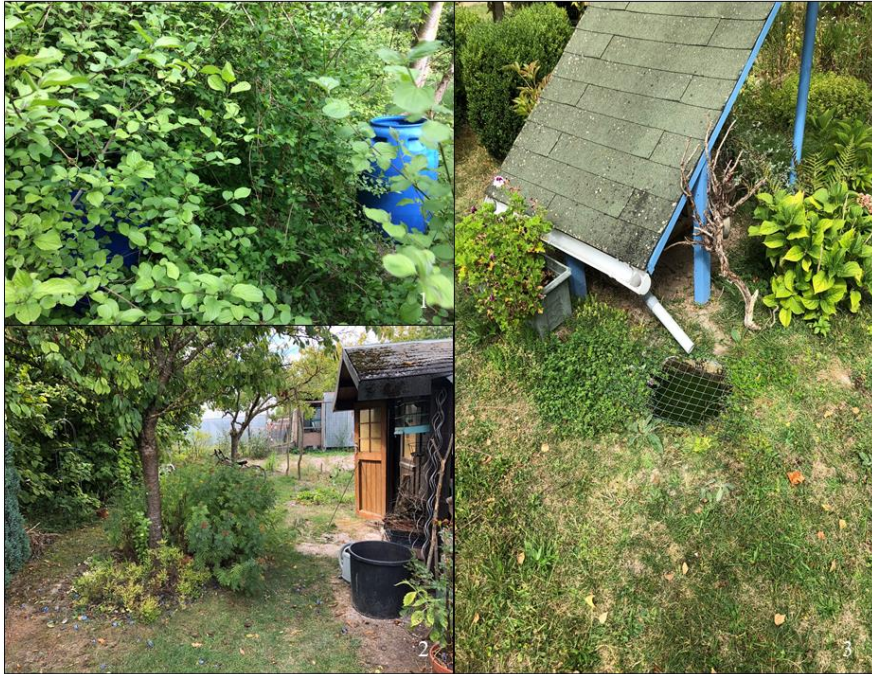


Figure 33 : Exemples de gîtes ruraux (1 : Bidon abandonné à Saint-Léonard (Marne), 2 : Récupération d'eau de pluie à Machault (Ardennes), 3 : Récupération d'eau de pluie à Machault, bidon enterré (Ardennes)) (©JP Martinet)

Au niveau de ces gîtes on retrouve les espèces des genres *Culex* et *Culiseta*. Si on retrouve dans tous ces gîtes *Culiseta longiareolata*, la présence de *Culex pipiens* et *Culex torrentium* n'est pas aussi systématique.

3.2.3. Gîtes sauvages



Figure 34 : Exemple de gîtes sauvages (1 : Mare temporaire à Argentolles (Lac du Der-Chantecoq, Marne), 2 : Mare temporaire à Berru (Marne), 3 : Fossé à proximité de l'étang des Landres (Marne), 4 : Prairie inondable à Saint-Léonard (Marne), 5 : Trou d'arbre à Courlandon (Marne)) (©JP Martinet)

Les espèces retrouvées dans ces gîtes (figure 33) sont des espèces appartenant aux genre *Aedes*, *Culiseta* et *Coquilletidia*. Concernant les *Aedes*, on retrouve préférentiellement les espèces forestières endémiques *Ae. annulipes*, *Ae. cantans*, *Ae. communis*, *Ae. refiki* et *Ae. rusticus*. Ces espèces sont retrouvées régulièrement en sympatrie. Pour ces espèces, les larves y sont présentes tôt en saison (mars-avril) et sont retrouvées jusqu'au milieu d'été.

3.2.4. Changements de préférences et dispersion

Des changements de préférences de gîtes concernant deux espèces (*Anopheles plumbeus* et *Aedes geniculatus*) retrouvées dans cet inventaire ont été observés. *Anopheles plumbeus* est une espèce bien répartie en France métropolitaine. Elle est initialement connue pour être une espèce forestière principalement arboricole, préférant pondre ses œufs dans des trous d'arbres. Cependant, le changement de préférences de cette espèce des gîtes forestiers pour des gîtes plus anthropiques a été documenté en Belgique (94). Les données acquises au cours de cet inventaire viennent corroborer ces dernières conclusions, car la totalité des larves d'*An. plumbeus* ont été retrouvées dans ce type de gîtes (déchets, mobilier de jardin, pneus). Cette espèce a été retrouvée en sympatrie avec *Aedes geniculatus* (Amnéville) et *Culex pipiens* (Reims).

Aedes geniculatus est une espèce forestière pondant ses œufs dans les trous d'arbres. Selon Schaffner, elle possède un vol lourd qui ne permet pas aux femelles d'aller chercher loin leur nourriture. Cependant, nous avons retrouvé cette espèce dans des gîtes anthropiques (tels que des pneus), et nous avons régulièrement retrouvé des œufs de cette espèce dans des pièges pondoires destinés à *Ae. albopictus*. Sa présence dans des gîtes artificiels humains, sa capacité à se gorger sur l'homme et sa capacité de vol limitée pourra certainement créer des nuisances si son implantation près des habitations est maintenue.

Egalement, nous notons la présence inattendue de l'espèce *Culex hortensis*. Cette espèce possède des préférences trophiques particulières, ne se gorgeant que sur des animaux à sang froid (reptiles ou amphibiens). Absente des derniers inventaires de la région (95), nous avons pu observer sa présence dans de nombreux gîtes artificiels dans deux des départements où nous avons été collectés (Marne et Moselle).

3.3. Résultats des inventaires des parcs zoologiques

Les espèces retrouvées au sein du parc zoologique d'Annéville sont listées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Inventaire du parc zoologique d'Annéville :

Numéro du site	Détails	Espèces retrouvées
AL1	Grotte proximité Flamands roses et grotte des lemmings	<i>Cx. pipiens, Cs. annulata</i>
AL2	Zone technique	<i>Cx. hortensis, Cx. pipiens</i>
A3	Ecuries TigerWorld	<i>Cs. annulata</i>
A4	Volières rapaces animations 1	<i>Cx. pipiens, Cs. annulata</i>
A5	Volières rapaces animations 2	<i>Cx. pipiens, Cs. annulata</i>
A6	Volières <i>Strix</i> 1	<i>Cx. pipiens</i>
AL7	Volières <i>Strix</i> 2	<i>Cx. pipiens</i>
A8	Volière <i>Strix</i> 3	<i>Cx. pipiens</i>
AL9	Volière Vautour	<i>Ae. rusticus</i>
A10	Bassin extrémité Parc	<i>Ae. cantans, Ae. cinereus, Ae. rusticus</i>
A11	Enclos Jaguar	<i>Cx. pipiens</i>
A12	Grotte Chiroptères	<i>An. messeae</i>
L13	Bauge Rhinoceros	<i>Cx. hortensis</i>
AL14	Enclos Géaldas	<i>Ae. japonicus, Ae. geniculatus, An. plumbeus, Cx. pipiens</i>

Les espèces retrouvées au sein du parc de Sainte-Croix sont listées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Inventaire du parc de Sainte-Croix

Numéro du site	Détails	Espèces retrouvées
A1	Parc des Rennes	<i>Cs. annulata</i> , <i>Cx. pipiens</i>
A2	Zones des volières (Chouettes, tétras et renards polaires)	<i>Cx. pipiens</i>
A3	Site Yellowstone (galeries, fort)	<i>Cx. pipiens</i>
A4	Volière (Grand-duc, Corbeau)	<i>Cx. pipiens</i>
L1	Zone technique	<i>Cx. hortensis</i> , <i>Cx. pipiens</i>
L2	Etang des pélicans	<i>Cx. pipiens</i>
L3	Lodge Cerf / Sanglier	<i>Cx. pipiens</i>
L4	Mare face aux volières	<i>Cx. pipiens</i>
L5	Parcours pieds nus	<i>Cx. pipiens</i>

Les espèces retrouvées au sein du parc zoologique de Mulhouse sont listées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Inventaire du parc zoologique de Mulhouse

Numéro du site	Détails	Espèces retrouvées
A1	Grotte lion	<i>Cx. pipiens</i>
A2	Manchot	<i>Cx. hortensis</i> , <i>Cx. pipiens</i>
A3	Volière Grand-duc / Grue	<i>Cx. pipiens</i>
A4	Volières multiples / Cistude	<i>Cx. hortensis</i> , <i>Cs. annulata</i>
L1	Tortues de Floride	<i>An. maculipennis</i> , <i>Cx. hortensis</i>
L2	Pneu panthère nébuleuse	<i>Cx. hortensis</i>
L4	Jardin jurassien	<i>An. maculipennis</i> , <i>Cx. pipiens</i>
L5	Poubelle «Okapi »	<i>Cx. hortensis</i> , <i>Cx. pipiens</i>
L7	Flamand rose	<i>An. maculipennis</i> , <i>Cx. pipiens</i> , <i>Cs. annulata</i>
L8	Barhal / Takin	<i>An. maculipennis</i>
L10	Regards et vasque Zèbre	<i>Cx. pipiens</i>
L11	Cistude	<i>An. maculipennis</i> , <i>Cx. hortensis</i> , <i>Cs. annulata</i>
L12	Regards volière	<i>C. pipiens</i>

3.4. Mention d'*Aedes japonicus*

Lors de nos prospections dans le parc zoologique d'Amnéville, notre attention a été attirée par un décor constitué d'un empilement de pneus (site N°14, enclos des géladas) (figure 34).



Figure 35 : Décor du parc zoologique d'Amnéville (©JP Martinet)

Les prospections de larves effectuées au sein de ce décor ont mené à la découverte de 12 larves de stades IV appartenant à l'espèce *Aedes japonicus*. Les larves ont été identifiées morphologiquement et laissées en cage au laboratoire. Les adultes, mâles et femelles, issus des nymphes ont été identifiés morphologiquement et moléculairement comme décrit dans le chapitre I partie 4.2.

Après confirmation de la diagnose de cette espèce non recensée dans le département de la Moselle, une déclaration conjointe avec les vétérinaires du parc zoologique a été effectuée auprès de l'ECDC via la plateforme VectorNet le 15 mai 2019.

L'espèce a été retrouvée lors de ce prélèvement en sympatrie avec des larves d'*Anopheles plumbeus*. Elle a été observée à l'état larvaire les 25 avril et 7 mai 2019 (10 larves de stade 4). Depuis, aucun autre individu de cette espèce (adulte ou larve) n'a été capturé.

3.5. Identification des repas sanguins

Entre les mois de juillet et août 2019, quinze femelles appartenant aux genres *Culex* et *Culiseta* ont été capturées présentant un repas sanguin frais au niveau abdominal. L'analyse de ces repas sanguins a été conduite comme décrit au chapitre I paragraphe 4.2. Les résultats d'identification sont synthétisés dans le tableau 10. Le biotype des individus *Culex* n'ont pas été déterminés.

Tableau 10 : Identification des repas sanguins du parc zoologique d'Amnéville (Les espèces captives sont représentées en rouge. Les espèces présentes en captivité et à l'état sauvage sont représentées en vert. Les espèces sauvages sont représentées en noir).

Espèce de moustique	Date capture	Lieu capture	Hôte du repas sanguin	Séquences de comparaison (GenBank)
<i>Culex pipiens s.l.</i>	11/07/2019	Volières laponnes	<i>Chouette lapone</i> <i>Strix nebulosa</i>	KF525370
<i>Culex pipiens s.l.</i>	11/07/2019	Volières laponnes	<i>Tourterelle turque</i> <i>Streptopelia decaocto</i>	NC037513
<i>Culex pipiens s.l.</i>	11/07/2019	Volières laponnes	<i>Chouette de l'Oural</i> <i>Strix uralensis</i>	NC038218
<i>Culex pipiens s.l.</i>	11/07/2019	Volières laponnes	<i>Homo sapiens</i>	MG952802.1
<i>Culex pipiens s.l.</i>	08/08/2019	Grotte lemmings	<i>Grand-duc indien</i> <i>Bubo bengaliensis</i>	NA
<i>Culex pipiens s.l.</i>	08/08/2019	Grotte lemmings	<i>Grand-duc indien</i> <i>Bubo bengaliensis</i>	NA
<i>Culex pipiens s.l.</i>	08/08/2019	Volières laponnes	<i>Pie</i> <i>Pica pica</i>	KP252235
<i>Culex pipiens s.l.</i>	08/08/2019	Volières laponnes	<i>Chouette leptogramme</i> <i>Strix leptogrammica</i>	KL953095
<i>Culex pipiens s.l.</i>	08/08/2019	Volières laponnes	<i>Tourterelle turque</i> <i>Streptopelia decaocto</i>	NC037513
<i>Culex pipiens s.l.</i>	08/08/2019	Volières laponnes	<i>Tourterelle turque</i> <i>Streptopelia decaocto</i>	NC037513
<i>Culex pipiens s.l.</i>	08/08/2019	Volières laponnes	<i>Pigeon ramier</i> <i>Columba palumbus</i> <i>palumbus</i>	MN122869
<i>Culex pipiens s.l.</i>	06/08/2019	Ecuries rapaces	<i>Buse de Harris</i> <i>Parabuteo unicinctus</i>	KR017964
<i>Culex pipiens s.l.</i>	06/08/2019	Volières laponnes	<i>Pigeon ramier</i> <i>Columba palumbus</i> <i>palumbus</i>	MN122869
<i>Culiseta annulata</i>	06/08/2019	Ecuries TigerWorld	<i>Cheval</i> <i>Equus caballus</i>	MW534083
<i>Culiseta annulata</i>	06/08/2019	Volières Arènes	<i>Corneille noire</i> <i>Corvus corone</i>	MT773172

Pour l'identification du Grand-duc indien, nous n'avions pas de référence GenBank satisfaisante, nous avons alors séquencé à partir de plumes du spécimen à proximité du site de capture.

Nous observons ici que les moustiques du parc se gorgent aussi bien sur faune captive que faune sauvage, ce qui pourrait faciliter une circulation virale entre une faune captive et un réservoir sauvage.

Chapitre IV : Apport de la géomorphométrie alaire

4.1. La technique de géomorphométrie alaire

Au cours des années 2000 une technique d'étude des critères morphologiques des individus a connu une expansion sans précédent, c'est la technique de géomorphométrie. Elle repose sur l'étude de caractères constants retrouvés chez les espèces, et en ce qui concerne la morphométrie alaire chez les moustiques, l'étude des landmarks présents sur les ailes. Brièvement, cette technique consiste à placer des points de repère sur des photographies de structures anatomiques d'intérêt (= landmarks) afin de comparer ces différentes structures dans l'espace et d'obtenir des projections qui permettent de comparer les différents spécimens entre eux. Cette technique, née dans les années 1970 avec l'avènement des premiers ordinateurs, a permis le développement des outils statistiques nécessaires à l'analyse des données obtenues. Couramment utilisée dans d'autres domaines que l'entomologie, notamment dans l'imagerie médicale, cette technique a été largement mise en œuvre pour l'étude de groupes entomologiques d'intérêt médical ou vétérinaire (80, 96-98). De nombreuses espèces de moustiques ont été analysées par cette technique, notamment les espèces jouant un rôle en santé humaine ou animale, à savoir les espèces vectrices de virus ou de parasites. Chez les espèces vectrices de virus nous pouvons citer les espèces *Aedes aegypti* et *Ae. albopictus* qui sont les principaux vecteurs au niveau mondial des virus de la dengue, de Chikungunya et de Zika (99, 100). Ces groupes, en raison de leur importance médicale et vétérinaire, ont été fortement étudiés au cours de ces dernières années. Avec l'avènement d'une informatique de pointe et de traitements de données plus rapides, mais également des ordinateurs portables très performants, ces travaux peuvent être menés aussi bien au laboratoire que sur le terrain. Cette technique désormais arrivée à maturité permet dorénavant d'analyser des populations d'importance moindre en médecine humaine et vétérinaire, et représente un outil efficace d'identification des différentes espèces.

4.2. Analyse géomorphométrique des ailes

En complément des données soumises à publication, nous synthétisons ci-après l'ensemble des données de géomorphométrie alaire issues de l'étude de toutes les espèces recensées lors des missions de terrain.

Nous avons appliqué la technique de géomorphométrie alaire aux espèces que nous avons retrouvées lors de nos prospections. La liste des espèces est synthétisée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Femelles analysées par géomorphométrie alaire. Les espèces marquées* ne proviennent pas de notre échantillonnage mais ont été collectées par Eva Krupa et Bruno Mathieu dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Strasbourg.

Espèce	Provenance	Effectif
<i>Aedes albopictus</i> *	Schiltigheim*	31
<i>Ae. annulipes</i>	Chalons sur Vesle	5
<i>Ae. cantans</i>	Chalons sur Vesle	20
<i>Ae. cinereus</i>	Berru	26
<i>Ae. communis</i>	Berru	3
<i>Ae. geniculatus</i>	Berru	4
<i>Ae. japonicus</i> *	Schiltigheim*	10
<i>Ae. refiki</i>	Courlandon	6
<i>Ae. rusticus</i>	Berru	33
<i>Ae. sticticus</i>	Berru	32
<i>Anopheles maculipennis</i>	Germaine	1
<i>An. plumbeus</i>	Beaumont sur Vesle	17
<i>Culex hortensis</i>	Mulhouse	24
<i>Cx. pipiens</i>	Machault	28
<i>Culiseta annulata</i>	Berru	7
<i>Cs. longiareolata</i>	Reims	9
<i>Cs. morsitans</i>	Berru	16

Les landmarks ont été analysés suivant les méthodes décrites dans le chapitre I. Les positions moyennes des landmarks ont été comparées deux à deux pour les individus appartenant aux mêmes genres. Une CVA a été réalisée sur les genres et les espèces (figures 35 et 36). Les figures représentant la variation de position des landmarks des couples d'espèces

sont disponibles en annexe 5 et 7. Des validations croisées post CVA ont été réalisées et sont disponibles en annexe 6. Pour les espèces à faible effectif ($N < 10$), les tests statistiques ne peuvent être significatifs. Cependant, il nous a tout de même semblé intéressant de voir la dispersion des landmarks.

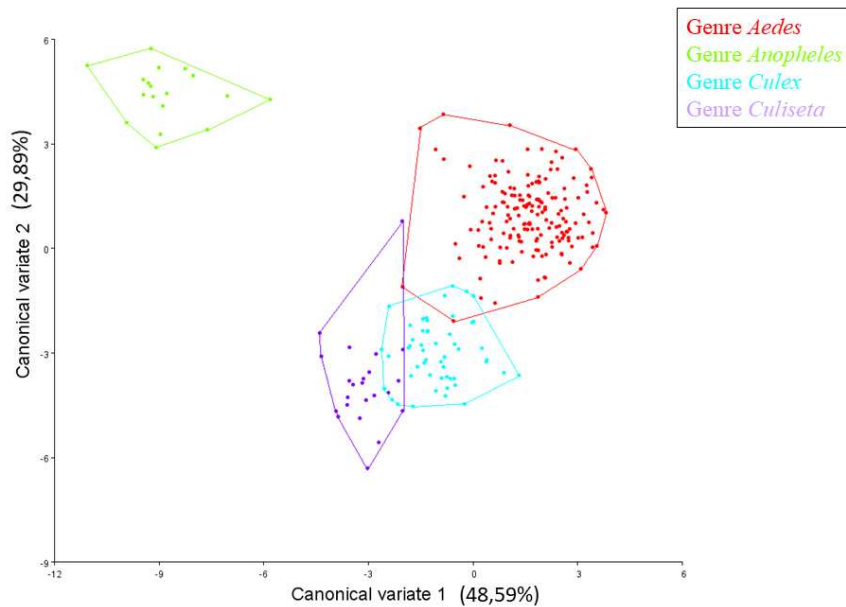


Figure 36 : Analyse en Variable Canonique des quatre genres de moustiques *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* et *Culiseta*

Les p-values des tests de permutation en distance Procrustéennes (1000 permutations) entre les différents groupes sont toutes significatives ($p < 0,0001$). Dans le plan, les genres sont relativement bien séparés, surtout les individus du genre *Anopheles*.

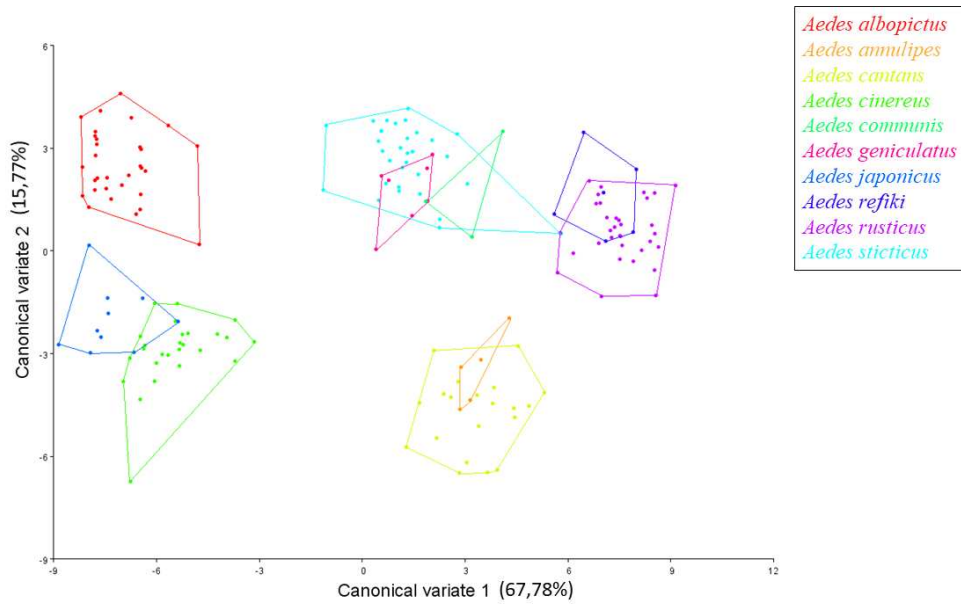


Figure 37 : Analyse en Variable Canonique des dix espèces d'*Aedes* retrouvées sur le terrain
 Pour les espèces appartenant au genre *Aedes*, les espèces ont correctement différenciées entre elles, avec des valeurs de p-value du test de permutation en distance Procrustéennes (1000 permutations) toutes inférieures à 0,05. Le détail des valeurs est disponible dans le tableau 12.

Tableau 12 : P-values des test de permutation en distance Procrustéennes (1000 permutations) entre les différentes espèces du genre *Aedes*

	<i>Ae. albopictus</i>	<i>Ae. annulipes</i>	<i>Ae. cantans</i>	<i>Ae. cinereus</i>	<i>Ae. communis</i>	<i>Ae. geniculatus</i>	<i>Ae. japonicus</i>	<i>Ae. refiki</i>	<i>Ae. rusticus</i>
<i>Aedes annulipes</i>	<.0001								
<i>Ae. cantans</i>	<.0001	<.0001							
<i>Ae. cinereus</i>	<.0001	<.0001	<.0001						
<i>Ae. communis</i>	<.0001	0,0159	0,0004	0,0002					
<i>Ae. geniculatus</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0002				
<i>Ae. japonicus</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0001	<.0001			
<i>Ae. refiki</i>	<.0001	0,0025	<.0001	<.0001	0,0004	0,0001	<.0001		
<i>Ae. rusticus</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0001	<.0001	<.0001	<.0001	
<i>Ae. sticticus</i>	<.0001	0,0009	<.0001	<.0001	0,003	<.0001	<.0001	0,0004	<.0001

Pour les espèces du genre *Anopheles*, le trop faible effectif ne permet pas de comparaison entre les deux espèces.

Pour les espèces du genre *Culex*, la différenciation est également significative (p -value $<0,001$). C'est également le cas pour les espèces du genre *Culiseta*. Le détail des variations de position des landmarks et des tests de validation croisée pour ces deux genres sont disponibles en annexes 7 et 8 respectivement.

Comme précédemment reporté dans plusieurs études, la technique de géomorphométrie alaire est efficace pour séparer les différents genres (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex* et *Culiseta*), ainsi que la majorité des espèces au sein de ces genres. Afin de valoriser ces données, nous avons choisi de soumettre pour publication les données relatives à un échantillonnage regroupant plusieurs espèces d'*Aedes*. Cet article est détaillé dans le chapitre suivant.

4.3. Publication

Article N°1 soumis pour publication à *Insects* : Wing Morphometrics of *Aedes* Mosquitoes from North-Eastern France

Article

Wing Morphometrics of *Aedes* Mosquitoes from North-Eastern France

Jean-Philippe Martinet^{1,2,*}, Hubert Ferté^{1,3}, Pacôme Sientzoff¹, Eva Krupa⁴, Bruno Mathieu⁴ and Jérôme Depaquit^{1,3}

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, Faculté de Pharmacie, SFR Cap Santé, EA7510 ESCAPE – USC VECPAR, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims CEDEX, France ; j.martinet.p@gmail.com, pacome.sientzoff@gmail.com

² Institut Pasteur, Département de Virologie, Arbovirus et Insectes Vecteurs, 25-27 rue du docteur Roux, 75015 Paris, France ;

³ Laboratoire de Parasitologie, Hôpital Maison-Blanche, CHU de Reims, 45 rue Cognacq-Jay, 51100 Reims, France ; jerome.depaquit@univ-reims.fr ; hubert.ferte@univ-reims.fr

⁴ Université de Strasbourg, DIHP UR 7292, Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg ; e.krupa@unistra.fr ; bmathieu@unistra.fr

* Correspondence: jerome.depaquit@univ-reims.fr

Abstract: Background: In the context of the increasing circulation of arboviruses, a simple, fast and reliable identification method for mosquitoes is needed. Geometric morphometrics have proven useful for mosquito classification and have been used around the world on known vectors such as *Aedes albopictus*. Morphometrics applied on French indigenous mosquitoes would prove useful in the case of autochthonous outbreaks of arboviral diseases.

Methods: We applied geometric morphometric analysis on six indigenous and invasive species of the *Aedes* genus in order to evaluate its efficiency for mosquito classification.

Results: Six species of *Aedes* mosquitoes (*Ae. albopictus*, *Ae. cantans*, *Ae. cinereus*, *Ae. sticticus*, *Ae. japonicus*, *Ae. rusticus*) were successfully differentiated with Canonical Variate Analysis of a Procrustes dataset of superimposed coordinates of 18 wing landmarks.

Conclusions: Geometric morphometrics are effective tools for the rapid, inexpensive and reliable classification of at least six species of the *Aedes* genus in France.

Keywords: geometric morphometrics; mosquito wings; *Culicidae*

1. Introduction

Identification of mosquitoes is a matter of public health. Numerous mosquitoes are proven vectors of human or zoonotic arboviruses, such as dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), West Nile (WNV) or Usutu (USUV). Recently, Southern Europe suffered autochthonous dengue epidemics (1). These highlight the need for rapid vector identification, surveillance and control. Morphological methods, initially used for the description of original species and their comparisons, are the main means to quickly identify mosquitoes. They rely upon dichotomic/polytomous keys, illustrated simplified keys and interactive keys (2). The latter, with regard to the European fauna, were firstly developed in 2000 (3) and were recently updated using the Xper2 software (4) leading to MosKeyTool (5). This interactive identification key for mosquitoes of the Mediterranean region requires updates on fauna composition and morphological data, but also well-preserved specimens analyzed by expert personnel. While such morphological tools are very helpful, their routine use can turn out to be time-consuming. With the advent of molecular biology, molecular tools were developed in order to accurately identify mosquito species. Mostly based on barcoding techniques (analysis of the Cytochrome Oxidase I gene) (6), the sequencing and comparison of sequences with online databases (GenBank, BOLD) provide a reliable identification method (7, 8). However, some cryptic species like those of the *Culex pipiens* complex require further analysis of the ACE2 (acetylcholinesterase) gene and microsatellites to achieve accurate identification (9, 10). In addition to barcoding techniques, more precise molecular tools were developed in order to identify mosquitoes belonging to the same species complex. For instance, the multiplex allele-specific PCR technique was used to diagnose similar *Aedes* mosquitoes from the *Stegomyia* subgenus (11), and mosquitoes from the *Anopheles gambiae* and *Anopheles barbirostris* complexes (12, 13). In another area of molecular biology, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays were created with possible outcomes in field surveillance of invasive species (14). Finally, proteomic approaches have recently flourished in entomological identification. The MALDI-ToF technique has been successfully applied for mosquito (both adults and larvae) and blood-meal identification (15-17). These approaches appear to be accurate, but are time-consuming, somewhat expensive and need consequent laboratory equipment to be performed. Barcoding can however be of help to identify collections or damaged specimens.

In the 2000's, the emergence of geometric morphometrics (GM) opened a new field in mosquito identification and analysis. GM is defined as the statistical analysis of form based on Cartesian landmark coordinates (18). This approach is based on the analysis of point coordinates on the wings. A mathematical transformation can be used to extract data and then classify mosquito species (19). GM became widely used after the "revolution in morphometrics" which occurred in the 1990's (20). This technique shows a broad range of applications in biology in fields such as medical imaging, anthropology or even botany (21-23). In the field of medical entomology, the use of GM made it possible to further analyze insect populations. As the emergence of arboviruses is on the rise, populations of vectors have been of interest for GM studies. Quite naturally, insect families such as *Muscidae*, *Reduvidae*, *Ceratopogonidae* or *Culicidae* have been exhaustively studied (24).

Currently, GM is used in mosquito classification and the survey of the effects of biotic and abiotic factors on mosquito populations (25-28). However, this technique is mostly applied to the three main arbovirus vectors: *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. GM has proven reliable in the identification of the genus *Aedes*, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (the main vectors of dengue fever) and to compare life and trait variations among these populations (28, 29). For the *Anopheles* genus, GM was able to improve reliable diagnosis for some sympatric

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.;
Last-name, F. Title. *Insects* **2021**, *12*,
x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors.
Submitted for possible open access
publication under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anopheles species in South America, for instance *An. cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator* (30). Within the *Culex* genera, reliable morphological discrimination between *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* relies on GM to separate females and observe the genitalia of males (31). Since vector groups are substantially found in GM literature, entomologists begin to show interest in species of lesser epidemiological importance (32). Nevertheless, as there is a non-negligible possibility of vector competence of these species, such studies increase preparedness in the case of unexpected arboviruses emergence. GM studies performed on vectors in metropolitan France have been mostly applied to the *Psychodidae* and *Ceratopogonidae* families such as the genus *Phlebotomus* or *Culicoides* (33, 34). Mosquito vectors of metropolitan France belong to the genera *Aedes* and *Culex*. French *Ae. albopictus* has been assessed as an effective vector of DENV, CHIKV and ZIKV (35-37). *Cx. modestus* and *Cx. pipiens* from southern France have been characterized as competent for WNV transmission (38). However, to the best of our knowledge, none of the autochthonous or invasive populations of French *Aedes* mosquitoes have been submitted to GM analysis.

In the present study, we propose an analysis of wing traits and the classification of mosquito species endemic to north-eastern France. Our sampling challenges several arbovirus vectors (*Ae. albopictus*, *Ae. cinereus* s.l., *Ae. sticticus*, *Ae. japonicus*) (39) and includes a couple of species without any proven vector status (*Ae. cantans*, *Ae. rusticus*).

2. Materials and Methods

Female mosquitoes were captured from 2018 to 2019 in the Grand-Est region, in the localities of Berru, Châlons-sur-Vesle, Reichstett and Schiltigheim (Figure 1). Females were collected with BG Sentinel® traps and by human-landing techniques. Samples were brought back to the laboratory and placed into cages prior to identification, except for *Ae. albopictus* and *Ae. japonicus* which were stored in 70% ethanol until dissection and analysis. Mosquitoes were anesthetized by cold, morphologically identified at the species level using taxonomic keys [Schaffner et al. and Möhrig (3, 40)] and euthanatized. Right wings were dissected under stereomicroscope, underwent mechanical treatment to remove scales (41), dehydrated in successive ethanol baths and mounted on slides with Euparal mounting medium (7356.1, Carl Roth®).

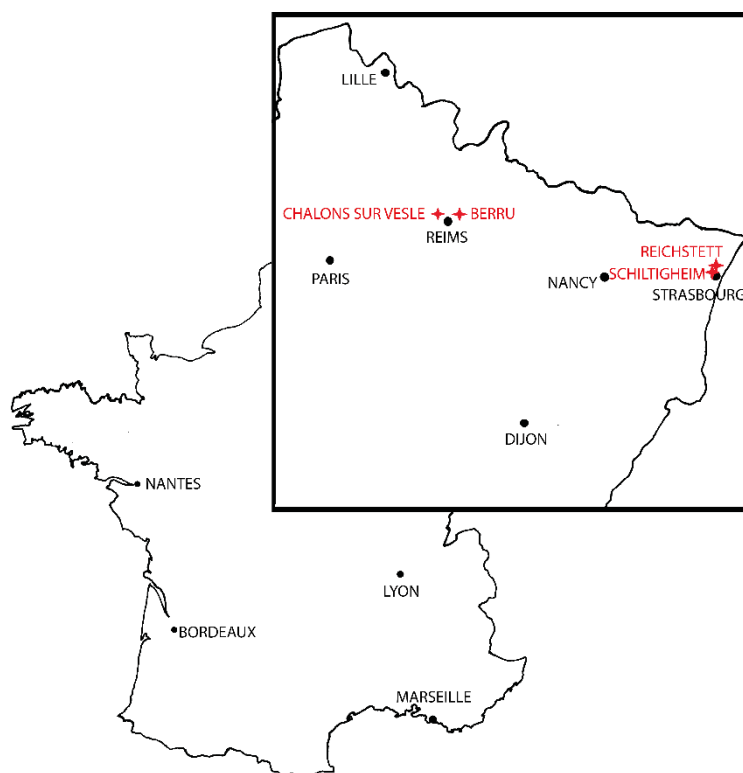


Figure 1. Sampling map.

Legs were used for molecular identification. Samples were randomly chosen within each group and went through a molecular barcoding identification. DNA was extracted with the DNeasy Blood and Tissue extraction kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instruction. Polymerase Chain Reaction performed on a 648 bp fragment of the COI gene was set as follows: initial denaturation at 94°C for 30 s, followed by 5 cycles at 94°C for 30 s, 45°C for 30 s and 72°C for 1 min, then 35 cycles at 94°C for 30 s, 51°C for 30 s, 72°C for 1 min and a final elongation step at 72°C for 10 min.

The primers used were:

- LEPF1 (5'-TTTCTACAAATCATAAAGATATTGG- 3'), and
- LEPR1 (5'- TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') (42).

Amplicons went through Sanger sequencing (Genewiz, Germany). Sequences were compared to existing GenBank sequences with the BLAST algorithm (43) and identification was considered accurate above 99% of similarity.

Pictures were taken using the Stream Essentials software version 1.7 and a DP-26 video camera connected to a SZX10 stereomicroscope (Olympus, Japan). All specimens were captured with a X2 magnification. Pictures were saved in JPEG format, and work files were built with TPS Util® version 1.76. 18 landmarks were manually digitized by one of the authors (JPM) with TPSDig® version 2.31 (44), as shown in Figure 2.

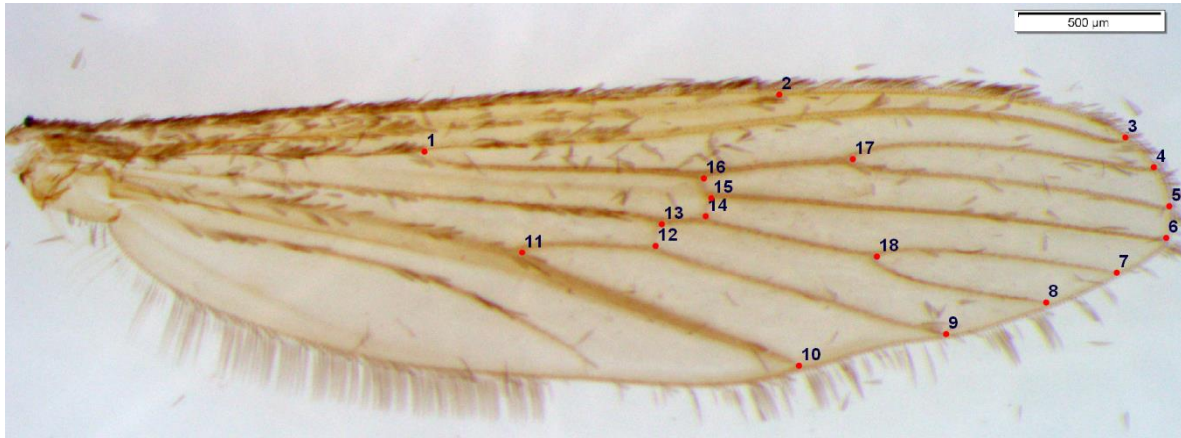


Figure 2. Position of 18 landmarks on an *Aedes cinereus* wing (scale bar = 500 μm).

-Error assessment:

In order to evaluate the error in landmarks digitization, we performed a Pearson correlation test on a subset of 76 randomly chosen pictures digitized twice by the same operator (JPM).

- Landmark analysis:

Coordinates of 18 landmarks were imported in Rstudio software (version 1.2.5019) (45) and processed within the *geomorph* package (version 3.2.1) (46). Coordinates were aligned by performing Procrustes superimposition (Figure 3). Mean positions of the landmarks per species are shown in Figure 4. Plots exported from R were made with either the generic plot function or the *ggpubr* package (version 0.3.0) (47).

Coordinates in TPS format were imported in MorphoJ software version 1.07a (48). Multivariate regression over Procrustes coordinates was performed in order to evaluate allometric influence of size over shape. Canonical Variate Analysis (CVA) was applied on the coordinates and Mahalanobis distances were computed to study the similarity between species. Pairwise cross-validated species reclassification tests with 1000 permutation runs were conducted. This test aims to quantify the rate of correct reclassification between samples.

Cross-validation over Mahalanobis distances was performed, and a Neighbor Joining tree including a population of *Culex torrentium* (N=14) as outgroup was computed over 100 bootstraps using PAST v2.17c (49).

3. Results

3.1. Mosquito collection and identification

Table 1. Localization of mosquito species.

Species	Collection Date	City	Latitude	Longitude	Number of specimens
<i>Aedes albopictus</i>	09.19.2019	Shiltigheim	48.603253	7.734191	31
<i>Aedes cantans</i>	04.24.2018	Châlons/Vesle	49.288187	3.924016	20
<i>Aedes cinereus</i>	06.29.2018	Berru	49.267750	4.133623	25
<i>Aedes sticticus</i>	06.29.2018	Berru	49.267750	4.133623	31
<i>Aedes japonicus</i>	10.01.2019	Reichstett	48.648827	7.757608	8
<i>Aedes rusticus</i>	05.23.2018	Berru	49.267750	4.133623	33

Sequences of the specimens sequenced in the present study are available in GenBank under accession numbers MW843020 to MW843031.

3.2 Error measurement

Pearson correlation test on our data subset showed a good repeatability of our digitization process (correlation coefficient of 0.9999639, 95 percent confidence interval: 0.9999611-0.9999665, p-value<0.0001).

3.3. Mean shapes

Procrustes superimposition performed on raw coordinates made it possible to align all landmarks positions (Figure 3). For each species, the median position of each landmark was processed and allowed to draw the following composite and observe the maximum deviation for landmarks 10 to 18. (Figure 4).

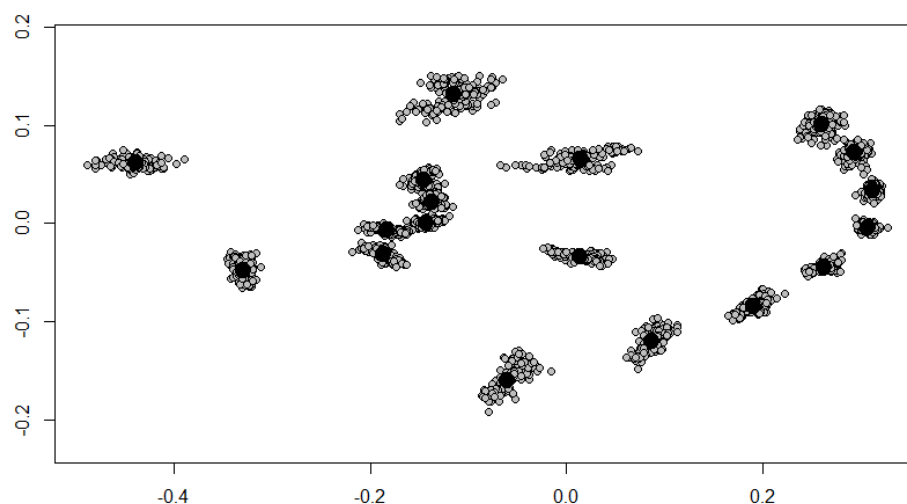


Figure 3. Landmark positions after Procrustes superimposition.

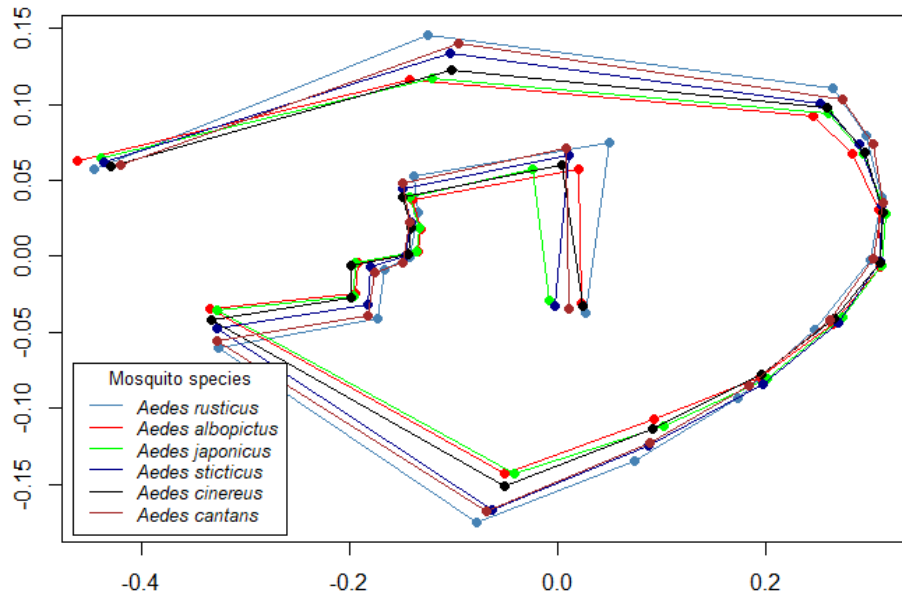


Figure 4. Mean position of 18 landmarks by mosquito species.

3.4. Allometric regression

Multivariate regression of Procrustes coordinates on CS shows an allometric effect of wing size on wing shape (3.95%, $P < 0.0001$). We did not choose to remove it as we consider, like Wilke *et al.*, that allometric size variation is a part of the process of species identification (19).

3.5. Canonical Variate Analysis

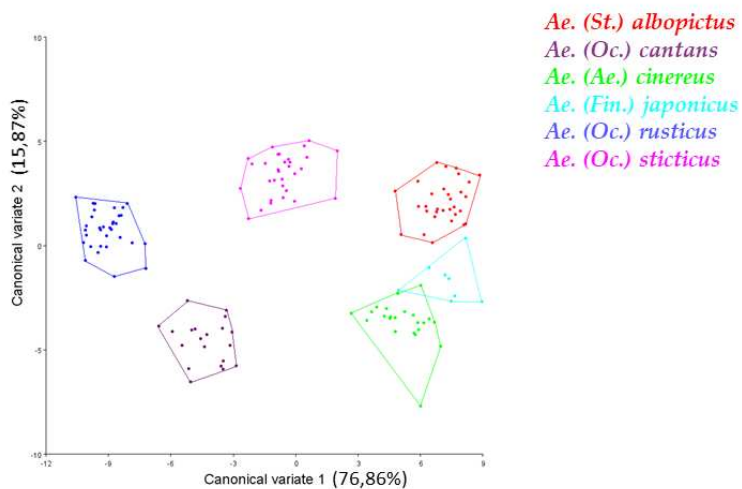


Figure 5. Canonical Variate Analysis of Procrustes coordinates of *Aedes* mosquitoes.

Canonical Variate Analysis performed on our dataset accounted for 86.73% of the total variance on the first two canonical variates. The specimens from the six species studied here belong to four subgenera: *Ae. albopictus* belongs to the subgenus *Stegomyia*, *Ae. japonicus* to the subgenus *Finlaya*, *Ae. cinereus s.l.* to the subgenus *Aedes*, *Ae. cantans*, *Ae. rusticus* and *Ae. sticticus* to the subgenus *Ochlerotatus*. Figure 5 shows a relative clustering between the *Stegomyia* and *Aedes* subgenera. Species appear to be well segregated with low overlapping. The pairwise cross-validated species reclassification test shows an accuracy of 98%. The detailed pairwise cross-validated species reclassification test is available in Table 2. A neighbor-joining tree was performed on Mahalanobis distances between these species (Figure 6).

Table 2. Pairwise cross-validated species reclassification test. Values below the diagonal correspond to the proportion of group 1 specimens correctly identified after comparison with group 2. Values above the diagonal correspond to the proportion of group 2 specimens correctly identified after comparison with group 1.

		Group 2					
		<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes cantans</i>	<i>Aedes cinereus</i>	<i>Aedes sticticus</i>	<i>Aedes japonicus</i>	<i>Aedes rusticus</i>
Group 1	<i>Aedes albopictus</i>	x	100%	100%	100%	75%	100%
	<i>Aedes cantans</i>	97%	x	100%	94%	100%	100%
	<i>Aedes cinereus</i>	100%	95%	x	100%	100%	100%
	<i>Aedes sticticus</i>	97%	100%	100%	x	100%	100%
	<i>Aedes japonicus</i>	90%	100%	96%	100%	x	100%
	<i>Aedes rusticus</i>	100%	100%	100%	97%	100%	x

The pairwise cross-validated reclassification test was efficient to separate the specimens. The lowest values were obtained between *Ae. albopictus* and *Ae. japonicus* (75%-90%). The high values shared by the other taxa can be explained by the disparity of the morphological characters separating the processed species as well as their respective sizes.

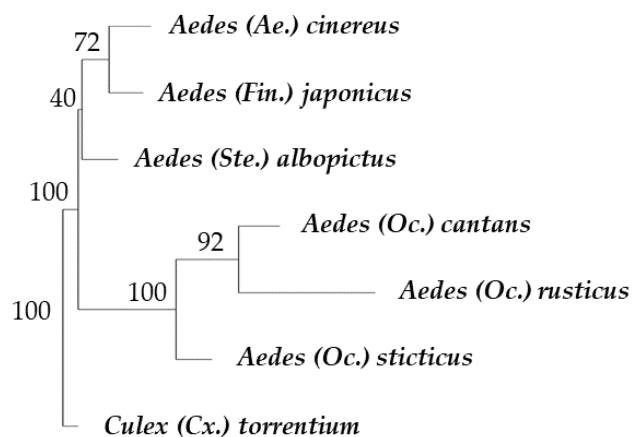


Figure 6. neighbor-joining tree performed over Mahalanobis distances and computed over 100 bootstrap replicates.

This tree shows the branching of *Ae. cantans*, *Ae. rusticus* and *Ae. sticticus* all members of the subgenus *Ochlerotatus*, well supported by a bootstrap rate of 100%. The branch including *Ae. albopictus*, *Ae. cinereus* and *Ae. japonicus* is not supported by bootstrap.

4. Discussion

In the present paper, we show that morphometric tools are efficient to classify *Aedes* mosquitoes from north-eastern France. We focused our sampling on this genus because it includes most of the vectors of mosquito-borne arboviruses. *Ae. albopictus* is an efficient vector of DENV, although less efficient than *Ae. aegypti* (50). French populations of *Ae. albopictus* are competent for DENV (37) and can also transmit CHIKV and ZIKV (35, 36). In Germany, the Netherlands and Switzerland, *Ae. japonicus* was shown to be an effective vector of CHIKV, DENV, USUV and ZIKV (51-54). The vector competence of *Ae. cantans*, *Ae. cinereus*, *Ae. rusticus* and *Ae. sticticus* remains mostly unknown, although *Ae. cantans* has been found positive for WNV in some recent screenings (55). Despite the lack of data about their vector competence, these species could be locally abundant and responsible for nuisance (personal observation).

The goal of the neighbor-joining tree built (Figure 6) is not to analyze the evolution patterns of these species, as both the sampling and the methods used are not appropriate for this purpose. The tree emphasizes that the three members of the subgenus *Ochlerotatus* (*Ae. cantans*, *Ae. rusticus* and *Ae. sticticus*) are clustered together. This means that their wings share more similarities than with the wings of other species. The origin of these similarities could be of phylogenetical inheritance providing similar structures (they belong to the same subgenus) or could be linked to their wing sizes which are the largest of our sampling (personal observation). Conversely, *Ae. albopictus* and *Ae. japonicus* are branched together, despite the fact that they belong to different subgenera.

Morphometrics have been successfully used in different applications such as the discrimination and identification of mosquitoes [including sibling species, such as *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* (31) or sympatric *Anopheles* (30)], and to assess the influence of biotic or abiotic factors on mosquito wings (26).

GM have proven effective in the entomological field for species differentiation or the analysis of cryptic complexes. In this study, we successfully applied geometric morphometrics on French indigenous and invasive *Aedes* wings. This technique allowed a rapid and effective classification of six species of the *Aedes* genus: *Ae. albopictus*, *Ae. cantans*, *Ae. cinereus s.l.*, *Ae. japonicus*, *Ae. rusticus* and *Ae. sticticus*. GM has already been used in Europe to identify female mosquitoes of autochthonous and invasive species (56). Nevertheless, this technique is still struggling to differentiate between closely-related species such as *Ae. annulipes* and *Ae. cantans* (19, 56). Our results are in accordance with other studies performed in Europe.

In all the morphometric literature, researchers are building a consequent database of wing patterns. It would be interesting if all this worldwide data could be merged in order to create a global catalog of mosquito wing patterns. As some authors have shown, the landmark disposition of two geographically isolated mosquito populations from the same species can show pattern variation (28). Nonetheless, such large databases could be of help to create worldwide tools for mosquito identification.

GM is a valuable tool to prepare for the emergence of arboviruses. Exhaustive databases could be built and made available to that end. Integration of GM tools in identification software (like MoskeyTool) could help ease the process of identification, allowing beginner field entomologists to make accurate identifications, and confirmed entomologists to save valuable time in the case of an epidemic event.

5. Conclusions

Geometric morphometrics are a proven efficient tool in mosquito classification (19). They allow the rapid and reliable identification of mosquito species, including closely-related species and genera. Six autochthonous and invasive *Aedes* species from the north-east of France were successfully segregated in this study, with a correct reclassification rate of 98%.

As the number of morphological experts decreases, morphometric identification could be of assistance when molecular identification cannot be performed (i.e., specimens deposited in curated

collections, especially type-specimens stored in museums). Today, we are witnessing an increasing number of outbreaks of mosquito-borne emerging and re-emerging diseases. In this context, field studies are mandatory to assess the presence of known vectors. Morphometrics could reduce the processing time of samples caught in the field and directly decrease latency between entomological investigation and targeted vector control operations.

Geometric morphometrics are a developing field of biological studies. The principal flaw of this technique is that landmarks must be placed manually, meaning human error is a variable in the rigorous mathematical treatment of this method. Advances in machine learning and computer vision will hopefully make it possible to automatize the entire analysis process in the near future.

Acknowledgments: The authors thank Denis AUGOT for introducing them to the GM analysis and Fano José RANDRIANAMBININTSOA for his valuable help in the GenBank sequence deposit.

Author Contributions: Conceptualization, JPM and JD; methodology, JPM; software, JPM; validation, JPM; formal analysis, JPM; writing—original draft preparation, JPM, JD, HF; writing—review and editing, JPM, HF, EK, BM, PS, JD. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the project N° 2020/01/129 funded by the National Agency for Sanitary Safety of Food, Environment and Labor (ANSES).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, Manfrin V, Pacenti M, Pavan G, et al. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(36).
2. Schaffner F, Mathieu B. Identifier un moustique : morphologie classique et nouvelles techniques moléculaires associées pour une taxonomie intégrée. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2020;2020(524):24-33.
3. Schaffner E. AG, Geoffroy Bernard, Hervy Jean-Paul, Rhaiem A., Brunhes Jacques. The mosquitoes of Europe : an identification and training programme. In: Paris (FRA) ; Montpellier : IRD ; EID, 1 CD ROM (Didactiques). ISBN 2-7099-1485-9, editor.: IRD/EID; 2001.
4. Ung V, Dubus G, Zaragueta-Bagils R, Vignes-Lebbe R. Xper2: introducing e-taxonomy. *Bioinformatics*. 2010;26(5):703-4.
5. Gunay FP, M.; Robert, V.; MosKeyTool, an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean. 2.1 ed2018.
6. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Biological sciences*. 2003;270(1512):313-21.
7. Cywinska A, Hunter FF, Hebert PD. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med Vet Entomol*. 2006;20(4):413-24.
8. Ratnasingham S, Hebert PD. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes*. 2007;7(3):355-64.
9. Bahnck CM, Fonseca DM. Rapid Assay to Identify the Two Genetic Forms of *Culex* (*Culex*) *Pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and Hybrid Populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(2):251-5.

10. Smith JL, Fonseca DM. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera : Culicidae). *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(4):339-45.
11. Higa YT, T.; Tsuda, Y.; Miyagi, I.;. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2010(63):312-6.
12. Brosseau L, Udom C, Sukkanon C, Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Saeung A, et al. A multiplex PCR assay for the identification of five species of the *Anopheles barbirostris* complex in Thailand. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):223.
13. Bass C, Williamson MS, Field LM. Development of a multiplex real-time PCR assay for identification of members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Acta Trop.* 2008;107(1):50-3.
14. Schenkel CD, Kamber T, Schaffner F, Mathis A, Silaghi C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the identification of invasive *Aedes* mosquito species. *Med Vet Entomol.* 2019;33(3):345-51.
15. Vega-Rua A, Pages N, Fontaine A, Nuccio C, Hery L, Goindin D, et al. Improvement of mosquito identification by MALDI-TOF MS biotyping using protein signatures from two body parts. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):574.
16. Yssouf A, Parola P, Lindstrom A, Lilja T, L'Ambert G, Bondesson U, et al. Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS. *Parasitol Res.* 2014;113(6):2375-8.
17. Niare S, Berenger JM, Dieme C, Doumbo O, Raoult D, Parola P, et al. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. *Malar J.* 2016;15:87.
18. Mitteroecker P, Gunz P. *Advances in Geometric Morphometrics.* *Evolutionary Biology.* 2009;36(2):235-47.
19. Wilke AB, Christe Rde O, Multini LC, Vidal PO, Wilk-da-Silva R, de Carvalho GC, et al. Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161643.
20. Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology.* 2004;71(1):5-16.
21. Utkualp N, Ercan I. Anthropometric Measurements Usage in Medical Sciences. *Biomed Res Int.* 2015;2015:404261.
22. van der Niet T, Zollikofer CP, Leon MS, Johnson SD, Linder HP. Three-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation. *Trends Plant Sci.* 2010;15(8):423-6.
23. Gharaibeh WS, Rohlf FJ, Slice DE, DeLisi LE. A geometric morphometric assessment of change in midline brain structural shape following a first episode of schizophrenia. *Biological Psychiatry.* 2000;48(5):398-405.
24. Dujardin JPSDE. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2008;8(6):875-90.
25. Lorenz C, Marques TC, Sallum MA, Suesdek L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors.* 2014;7:581.

26. Hidalgo K, Dujardin JP, Mouline K, Dabire RK, Renault D, Simard F. Seasonal variation in wing size and shape between geographic populations of the malaria vector, *Anopheles coluzzii* in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop*. 2015;143:79-88.
27. Chaiphongpachara T, Juijayan N, Chansukh KK. Wing Geometry Analysis of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), a Dengue Virus Vector, from Multiple Geographical Locations of Samut Songkhram, Thailand. *J Arthropod Borne Dis*. 2018;12(4):351-60.
28. Wilk-da-Silva R, de Souza Leal Diniz MMC, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing morphometric variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from different urban built environments. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):561.
29. Phanitchat T, Apiwathnasorn C, Sungvornyothin S, Samung Y, Dujardin S, Dujardin JP, et al. Geometric morphometric analysis of the effect of temperature on wing size and shape in *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*. 2019;33(4):476-84.
30. Lorenz C, Marques TC, Sallum MA, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors*. 2012;5:257.
31. Borstler J, Luhken R, Rudolf M, Steinke S, Melaun C, Becker S, et al. The use of morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*. 2014;39(1):204-12.
32. de Souza A, Multini LC, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance. *Acta Trop*. 2020;211:105593.
33. Prudhomme J, Cassan C, Hide M, Toty C, Rahola N, Vergnes B, et al. Ecology and morphological variations in wings of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Phlebotomidae) in the region of Roquedur (Gard, France): a geometric morphometrics approach. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):578.
34. Hajd Henni L, Sauvage F, Ninio C, Depaquit J, Augot D. Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides) in France. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;21:110-7.
35. Lourenco-de-Oliveira R, Mousson L, Vazeille M, Fuchs S, Yebakima A, Gustave J, et al. Chikungunya virus transmission potential by local *Aedes* mosquitoes in the Americas and Europe. *Plos Neglect Trop Dis*. 2015;9(5):e0003780.
36. Jupille H, Seixas G, Mousson L, Sousa CA, Failloux AB. Zika Virus, a New Threat for Europe? *Plos Neglect Trop Dis*. 2016;10(8):e0004901.
37. Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M, et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*. 2013;8(3):e59716.
38. Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, Schaffner F, Zeller H, Reiter P, et al. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(5):589-95.
39. Martinet JP, Ferte H, Failloux AB, Schaffner F, Depaquit J. Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review. *Viruses*. 2019;11(11).

40. Möhrig W. Die Culiciden Deutschlands. Untersuchungen zur Taxonomie. Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie. 1970;55(3).
41. Lorenz C, Suesdek L. Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2013;89(5):928-31.
42. Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(41):14812-7.
43. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 1990;215(3):403-10.
44. Rohlf F. The tps series of software. Hystrix It. J. Mamm. 2015;26(1):9-12
45. Team R. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA: RStudio, Inc.; 2019.
46. Adams D. CM, Kaliontzopoulou A. Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 3.2.1. 2020.
47. Kassambara A. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.3.0. 2020.
48. Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol Ecol Resour. 2011;11(2):353-7.
49. Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia electronica. 2001;4(1):9.
50. Rezza G. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. BMC Public Health. 2012;12:72.
51. Schaffner F VM, Kaufmann C, Failloux AB, Mathis A. Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. J Eur Mosq Control Assoc. 2011;29:141-2.
52. Veronesi E, Paslaru A, Silaghi C, Tobler K, Glavinic U, Torgerson P, et al. Experimental evaluation of infection, dissemination, and transmission rates for two West Nile virus strains in European *Aedes japonicus* under a fluctuating temperature regime. Parasitol Res. 2018;117(6):1925-32.
53. Jansen S, Heitmann A, Lühken R, Jöst H, Helms M, Vapalahti O, et al. Experimental transmission of Zika virus by *Aedes japonicus japonicus* from southwestern Germany. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):192.
54. Abbo SR, Visser TM, Wang H, Goertz GP, Fros JJ, Abma-Henkens MHC, et al. The invasive Asian bush mosquito *Aedes japonicus* found in the Netherlands can experimentally transmit Zika virus and Usutu virus. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(4):e0008217.
55. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. Emerg Infect Dis. 1999;5(5):643-50.
56. Sauer FG, Jaworski L, Erdbeer L, Heitmann A, Schmidt-Chanasit J, Kiel E, et al. Geometric morphometric wing analysis represents a robust tool to identify female mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Germany. Sci Rep. 2020;10(1):17613.

Résumé de l'article N°1 :

Introduction : L'identification des moustiques est une question de santé publique. De nombreux moustiques sont des vecteurs avérés d'arbovirus humains ou zoonotiques, tels que la dengue (DENV), le chikungunya (CHIKV), le West Nile (WNV) ou l'Usutu (USUV). Récemment, l'Europe du Sud a souffert d'épidémies autochtones de dengue. Ceux-ci mettent en évidence la nécessité d'une identification, d'une surveillance et d'un contrôle rapides des vecteurs. Les méthodes morphologiques, initialement utilisées pour la description des espèces originales et leurs comparaisons, sont les principaux moyens d'identifier rapidement les moustiques. Ils reposent sur des clés d'identification dichotomiques / polytomiques, des clés simplifiées illustrées et des clés interactives. Si de tels outils morphologiques sont très utiles, leur utilisation de routine peut s'avérer chronophage. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, des outils ont été développés afin d'identifier avec précision les espèces de moustiques. Principalement basés sur des techniques de codes-barres (analyse du gène de la cytochrome oxydase I), le séquençage et la comparaison de séquences avec des bases de données en ligne (GenBank, BOLD) fournissent une méthode d'identification fiable. Dans un autre domaine de la biologie moléculaire, des tests d'amplification isotherme à médiation en boucle (LAMP) ont été créés avec des résultats possibles dans la surveillance sur le terrain des espèces envahissantes. Enfin, les approches protéomiques ont récemment prospéré dans l'identification entomologique. La technique MALDI-ToF a été appliquée avec succès pour l'identification des moustiques (adultes et larves) et des repas de sang. Ces approches prennent du temps, demeurent coûteuses et nécessitent un équipement de laboratoire conséquent pour les réaliser.

Dans les années 2000, l'émergence de la morphométrie géométrique (GM) a ouvert un nouveau champ dans l'identification et l'analyse des moustiques. La géomorphométrie est défini comme l'analyse statistique de la forme basée sur des coordonnées de repère cartésiennes. Cette approche est basée sur l'analyse des coordonnées des points sur les ailes. Une transformation mathématique peut être utilisée pour extraire des données puis classer les espèces de moustiques. La GM est devenue largement utilisé après la « révolution

morphométrique » qui a eu lieu dans les années 1990. Cette technique montre un large éventail d'applications en biologie dans des domaines tels que l'imagerie médicale, l'anthropologie ou encore la botanique. Dans le domaine de l'entomologie médicale, l'utilisation de la GM a permis d'analyser plus avant les populations d'insectes. Alors que l'émergence des arbovirus est en augmentation, les populations de vecteurs ont suscité un intérêt pour les études basées sur la GM. Tout naturellement, des familles d'insectes comme les *Muscidae*, *Reduvidae*, *Ceratopogonidae* ou *Culicidae* ont été étudiées de manière conséquente.

Actuellement, la GM est utilisée dans la classification des moustiques et l'étude des effets des facteurs biotiques et abiotiques sur les populations de moustiques. Cependant, cette technique est principalement appliquée aux trois principaux vecteurs d'arbovirus et de parasites : les moustiques *Aedes*, *Anopheles* et *Culex*. La géomorphométrie s'est avéré fiable dans l'identification du genre *Aedes* et dans la comparaison de populations (répartition géographique, influence de facteurs abiotiques) (97). Pour le genre *Anopheles*, la géomorphométrie a pu améliorer le diagnostic fiable de certaines espèces sympatriques d'*Anopheles* en Amérique du Sud, par exemple *An. cruzii*, *An. homunculus* et *An. bellator* (101). Au sein des genres *Culex*, une séparation morphologique fiable entre *Cx. pipiens* et *Cx. torrentium* s'appuie sur cette technique (102). Comme une littérature abondante commence à être disponible sur les espèces de vecteurs, les entomologistes commencent à s'intéresser aux espèces de moindre importance épidémiologique. Néanmoins, comme il existe une possibilité non négligeable de compétence vectorielle pour ces espèces, de telles études permettent d'être prêt lors d'émergence inattendue d'arbovirus.

Résultats : L'analyse des barycentres (ou Centroid Size) montre une certaine disparité entre les espèces. Bien que *Ae. rusticus* et *Ae. cantans* aient les plus grandes ailes de cet ensemble de données, aucune différence statistique n'est observée entre eux. *Aedes cinereus*, *Ae. geniculatus* et *Ae. japonicus* ne montrent aucune différence significative relative à la taille de leurs ailes. Pour l'ensemble des données, trois groupes de CS sont observés : i) *Ae. albopictus*, ii) *Ae. cinereus*, *Ae. geniculatus*, *Ae. japonicus*, iii) *Ae. rusticus*, *Ae. cantans*.

L'analyse en Variable Canonique effectuée sur notre ensemble de données représentait 86,73% de la variance totale sur les deux premières dimensions. Les espèces semblent bien séparées avec un faible chevauchement. Le test de reclassification à validation croisée par paire des différents groupes montre une précision de 98%.

Discussion : Dans cet article, nous démontrons que les outils géomorphométriques sont efficaces pour classer différentes espèces du genre *Aedes* du nord-est de la France. Nous avons concentré notre échantillonnage sur ce genre car il comprend la plupart des vecteurs d'arbovirus. *Aedes albopictus* est un vecteur efficace de DENV, bien que moins efficace que *Ae. aegypti*. Les populations françaises d'*Ae. albopictus* sont compétents pour le DENV et peuvent également transmettre le CHIKV et le ZIKV. En Allemagne, aux Pays-Bas et en Suisse, *Ae. japonicus* s'est avéré être un vecteur efficace de CHIKV, DENV, USUV et ZIKV. *Aedes geniculatus* a été testé compétent pour la transmission du CHIKV en Europe. La compétence vectorielle d'*Ae. cantans*, *Ae. cinereus* et *Ae. rusticus* reste inconnue, bien qu'*Ae. cantans* a été trouvé positif pour le WNV lors de certaines analyses récentes. Malgré le manque de données sur leur compétence vectorielle, ces espèces pourraient être localement abondantes et responsables de nuisances.

Cette technique a permis une classification rapide et efficace de six espèces du genre *Aedes* : *Ae. albopictus*, *Ae. cantans*, *Ae. cinereus s.l.*, *Ae. geniculatus*, *Ae. japonicus* et *Ae. rusticus*. La géomorphométrie a déjà été utilisée en Europe pour identifier les moustiques femelles d'espèces autochtones et envahissantes. Néanmoins, cette technique a encore du mal à différencier les espèces étroitement apparentées telles que *Ae. annulipes* et *Ae. cantans*, et nos résultats sont conformes aux autres études réalisées en Europe (103).

La géomorphométrie est un outil précieux pour se préparer à l'émergence possible d'arbovirus. Des bases de données exhaustives pourraient être créées et mises à disposition à cette fin. L'intégration d'outils de géomorphométrie dans un logiciel d'identification (comme MoskeyTool) pourrait aider à faciliter le processus d'identification, permettant aux entomologistes débutants de faire des identifications précises et aux entomologistes confirmés de gagner un temps précieux en cas d'épidémie.

Chapitre V : Compétence vectorielle

5.1. État des connaissances

Dans le cadre d'une revue, les données bibliographiques concernant l'entomofaune de six pays d'Europe de l'ouest ont été analysées afin de mettre à jour l'inventaire de la faune culicidienne et d'observer les espèces ubiquistes au sein de la zone. En parallèle, toutes les infections expérimentales ayant été réalisées sur des populations de moustiques prélevées dans la zone d'étude ont été recensées. Afin de réaliser cette revue, nous avons utilisé le protocole PRISMA (104). Les bases de données PubMed et Web of Science ont été examinées du 11 janvier au 15 août 2019. Des articles en texte intégral en anglais contenant des informations sur la compétence des moustiques vecteurs ont été sélectionnés. Des articles dans d'autres langues contenant des informations critiques ont été inclus dans l'ensemble de données comme « identifiés par d'autres sources ».

Article N°2, publié dans *Viruses* le 14 novembre 2019 : Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review

Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review

Jean-Philippe Martinet ^{1,2,*}, Hubert Ferte ^{1,3}, Anna-Bella Failloux ², Francis Schaffner ^{4,5} and Jérôme Depaquit ^{1,3}

¹ Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, ANSES, SFR Cap Santé, EA7510 ESCAPE–USC VECPAR, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims CEDEX, France; hubert.ferte@univ-reims.fr (H.F.); jerome.depaquit@univ-reims.fr (J.D.)

² Arbovirus et Insectes Vecteurs, Département de Virologie, Institut Pasteur, 25-28 rue du docteur Roux, 75015 Paris, France; anna-bella.failloux@pasteur.fr

³ Laboratoire de Parasitologie, Hôpital Maison-Blanche, CHU de Reims, 45 rue Cognacq-Jay, 51100 Reims, France

⁴ National Centre for Vector Entomology, Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Rämistrasse 71, 8006 Zürich, Switzerland; fschaffner.consult@gmail.com

⁵ Francis Schaffner Consultancy, Lörracherstrasse 50, 4125 Riehen (Basel-Land), Switzerland

* Correspondence: j.martinet.p@gmail.com

Received: 24 October 2019; Accepted: 8 November 2019; Published: 13 November 2019

Abstract: Background: The intensification of trade and travel is linked to the growing number of imported cases of dengue, chikungunya or Zika viruses into continental Europe and to the expansion of invasive mosquito species such as *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus*. Local outbreaks have already occurred in several European countries. Very little information exists on the vector competence of native mosquitoes for arboviruses. As such, the vectorial status of the nine mosquito species largely established in North-Western Europe (*Aedes cinereus* and *Aedes geminus*, *Aedes cantans*, *Aedes punctor*, *Aedes rusticus*, *Anopheles claviger s.s.*, *Anopheles plumbeus*, *Coquillettidia richiardii*, *Culex pipiens s.l.*, and *Culiseta annulata*) remains mostly unknown. Objectives: To review the vector competence of both invasive and native mosquito populations found in North-Western Europe (i.e., France, Belgium, Germany, United Kingdom, Ireland, The Netherlands, Luxembourg and Switzerland) for dengue, chikungunya, Zika, West Nile and Usutu viruses. Methods: A bibliographical search with research strings addressing mosquito vector competence for considered countries was performed. Results: Out of 6357 results, 119 references were related to the vector competence of mosquitoes in Western Europe. Eight species appear to be competent for at least one virus. Conclusions: *Aedes albopictus* is responsible for the current outbreaks. The spread of *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* increases the risk of the autochthonous transmission of these viruses. Although native species could contribute to their transmission, more studies are still needed to assess that risk.

Keywords: *Aedes*; *Culex*; *Anopheles*; *Culiseta*; transmission; West Nile; Usutu; dengue; Zika; chikungunya

1. Introduction

Emerging or re-emerging disease outbreaks caused by arboviruses are increasing in Europe. Usually confined to tropical or subtropical countries, their risk of occurrence in Europe (especially in the countries of Western Europe) was considered as relatively low. In a context of global change, with an increase in travel, arboviruses can more easily expand outside of their historical range. Over the last two decades, arboviruses such as dengue, Zika or chikungunya achieved incursions in European countries [1–3], causing autochthonous human infections [4–6]. Susceptible vertebrate hosts and competent vectors can interact, under appropriate environmental and climatic conditions, to cause outbreaks. Knowledge about the vector competence of native species and their distribution, however, remains limited. As such, overwintering thermophilic species are less likely to establish in northern

European countries, as the annual isotherm becomes colder. At the present time, *Aedes albopictus* is considered as the vector species in autochthonous outbreaks of dengue and chikungunya in France [5]. While the vector competence of invasive species is widely studied [7–11], only a few studies are available on native species [12]. Competent native mosquitoes might have the potential to contribute to or to cause local outbreaks in addition to the risk related to invasive species [13].

In this work, we investigated the vector competence for dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), chikungunya virus (CHIKV), West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) according to the geographical distribution of mosquitoes in eight Western European countries (France-Corsica excluded, Belgium, Germany, United Kingdom, Ireland, The Netherlands, Luxembourg and Switzerland).

2. Materials and Methods

Our area of interest is defined as the “Cfb” climate of the Köppen-Geiger climate classification [14]. Cfb defines a temperate oceanic climate (C) without a dry season (f) but with a warm summer (b) [15]. Mainland France was investigated although the south of France is characterized as a “Csa” (temperate with a dry and hot summer) or “Csb” (temperate with a dry and warm summer) category. The island of Corsica categorized as “Csb” was excluded from our analysis [15]. Mosquito inventories were then selected in our area of interest. The last European global inventory compiled by Schaffner et al. in 2001 [16] was used, completed with more recent national sources and finally compared with the last review available [17]. For invasive species, updated European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) maps were used (<https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>). The vectorial status of mosquitoes was inferred from experimental data using infections in laboratory and/or viral detections in field-collected populations.

This review follows the PRISMA Journal Publishing protocol workflow [18]; the PubMed and Web of Science databases were screened from 11 January to 15 August 2019, with keywords presented on Supplementary File 1. Full-text articles in English language containing information on mosquito vector competence were selected. Articles in other languages containing critical information were included in the data set as “identified by other sources”. The PRISMA flow chart is described in Figure 1.

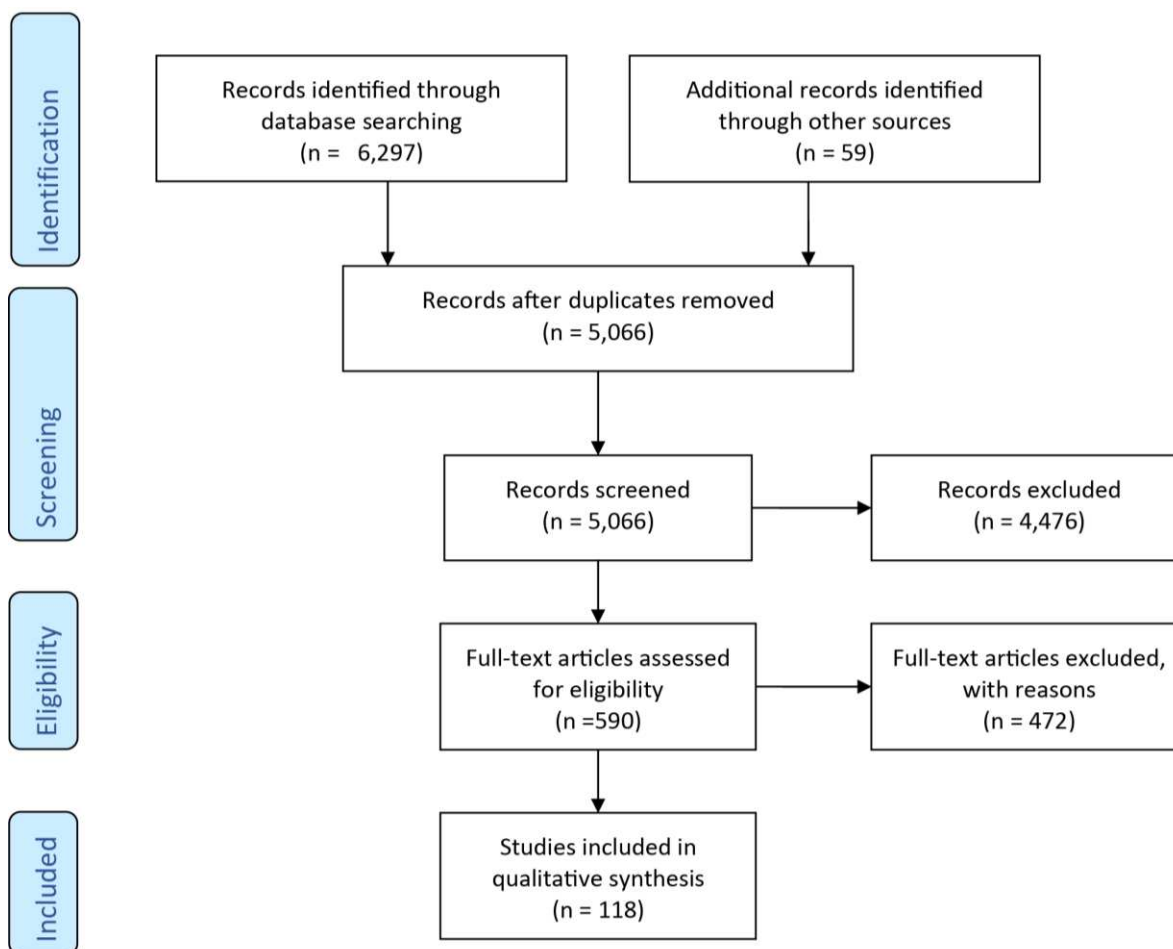


Figure 1. PRISMA flow chart.

3. Results

The compilation of mosquito inventories is summarized in Table 1. A detailed checklist is shown in Table 2, with the nine ubiquitous species highlighted in grey. Some species complexes (i.e., *Aedes cinereus/geminus*, *Anopheles maculipennis* complex, and *Culex pipiens* complex) were not identified at the species and/or biotype level. In these cases, the species denomination was annotated with an asterisk.

Detailed vector competence studies by species are presented in Table 3. Positive and negative results reported here are related to our area of study. Vector competence is defined as the ability of a mosquito to ingest, replicate and transmit a virus by biting. Firstly, species are considered to be competent if viral replication and detection of viral particles in saliva have been demonstrated. On the other hand, we do not consider the detection of viral RNA in mosquito pools as a relevant indication of vector competence. This information, however, may suggest an active virus circulation which could warrant further vector competence studies to identify potential vectors.

Results from experimental infections of European mosquito populations are listed in Table 4.

Table 1. Number of mosquito species recorded per country [16,19–25].

	Belgium	France	Germany	Ireland	Luxembourg	Switzerland	The Netherlands	UK
No. of species	33	57	49	20	15	35	38	34

Table 2. Checklist of mosquitoes recorded per country. Species in grey rows were recorded in all the countries investigated in the study. X: species recorded; -: species not recorded; i: introduced species; species complexes for which final identification could not be achieved are labelled with an asterisk.

	Belgium	France	Germany	Ireland	Luxembourg	Netherlands	Switzerland	United Kingdom
<i>Aedes (Acartomyia) mariaae</i> (Sergent and Sergent, 1903)	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Aedes) cinereus</i> Meigen, 1818 * and <i>Aedes (Aedes) geminus</i> Peus, 1970 *	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aedes (Aedes) rossicus</i> Dolbeskin, Gorickaja and Mitrofanova, 1930	-	X	X	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Aedimorphus) vexans</i> (Meigen, 1830)	X	X	X	-	-	X	X	X
<i>Aedes (Dahlia) geniculatus</i> (Olivier, 1791)	X	X	X	-	X	X	X	X
<i>Aedes (Fredwarsius) vittatus</i> (Bigot, 1861)	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Hulecoeteomyia) japonicus</i> (Theobald 1901)	X	X	X	-	-	X	X	-
<i>Aedes (Hulecoeteomyia) koreicus</i> (Edwards 1917)	X	-	i	-	-	-	X	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) annulipes</i> (Meigen, 1830)	X	X	X	-	X	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) berlandi</i> Séguy, 1921	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) cantans</i> (Meigen, 1818)	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) caspius</i> (Pallas, 1771)	X	X	X	X	-	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) cataphylla</i> Dyar, 1916	-	X	X	-	-	-	X	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) coluzzi</i> Rioux, Guilvard and Pasteur, 1998	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) communis</i> (DeGeer, 1776)	X	X	X	-	-	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) detritus</i> Haliday, 1833	X	X	X	X	-	X	-	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) diantaeus</i> Howard, Dyar and Knab, 1912	-	X	X	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) dorsalis</i> (Meigen, 1830)	X	X	X	X	-	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) excrucians</i> (Walker, 1856)	-	-	X	-	-	X	X	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) flavescens</i> (Müller, 1764)	X	X	X	-	-	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) leucomelas</i> (Meigen, 1804)	-	-	X	-	-	X	-	X

	Belgium	France	Germany	Ireland	Luxembourg	Netherlands	Switzerland	United Kingdom
<i>Aedes (Ochlerotatus) nigrinus</i> (Eckstein, 1918)	-	X	X	-	-	X	-	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) pulcritarsis</i> (Rondani, 1872)	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) pullatus</i> (Coquillett, 1904)	-	X	X	-	-	-	X	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) punctor</i> (Kirby, 1837)	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) riparius</i> Dyar and Knab, 1907	-	-	X	-	-	X	-	-
<i>Aedes (Ochlerotatus) sticticus</i> (Meigen, 1838)	X	X	X	-	X	X	X	X
<i>Aedes (Ochlerotatus) surcoufi</i> (Theobald, 1912)	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes (Rusticoides) refiki</i> Medschid, 1928	-	X	X	-	-	-	X	-
<i>Aedes (Rusticoides) rusticus</i> (Rossi, 1790)	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	-	-	-	-	-	i	-	-
<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse, 1894)	X	X	X	-	-	X	X	-
<i>Anopheles (Anopheles) algeriensis</i> (Theobald, 1903)	-	X	X	X	-	X	-	X
<i>Anopheles (Anopheles) atroparvus</i> Van Thiel, 1927	X	X	X	X	-	X	-	X
<i>Anopheles (Anopheles) claviger</i> (Meigen, 1804) <i>sensu stricto</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Anopheles (Anopheles) hyrcanus</i> (Pallas, 1771)	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Anopheles (Anopheles) maculipennis</i> Meigen, 1818 <i>sensu lato</i> *	X	X	X	-	-	X	X	-
<i>Anopheles (Anopheles) melanoon</i> Hackett, 1934	-	X	-	-	-	X	-	-
<i>Anopheles (Anopheles) messeae</i> Falleroni, 1926	X	X	X	X	-	X	-	X
<i>Anopheles (Anopheles) petragrani</i> Del Vecchio, 1939	-	X	X	-	-	-	-	-
<i>Anopheles (Anopheles) plumbeus</i> Stephens, 1828	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Coquillettidia (Coquillettidia) buxtoni</i> (Edwards, 1923)	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>Coquillettidia (Coquillettidia) richiardii</i> (Ficalbi, 1889)	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Culex (Barraudius) modestus</i> Ficalbi, 1889	-	X	X	-	-	X	X	X

	Belgium	France	Germany	Ireland	Luxembourg	Netherlands	Switzerland	United Kingdom
<i>Culex (Culex) mimeticus</i> Noé, 1899	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Culex (Culex) pipiens</i> Linnaeus, 1758 <i>sensu lato</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Culex (Culex) pipiens</i> biotype <i>pipiens</i> Linnaeus, 1758	X	-	X	X	-	-	-	X
<i>Culex (Culex) pipiens</i> biotype <i>molestus</i> Forskål, 1775	X	-	X	-	-	-	-	X
<i>Culex (Culex) theileri</i> Theobald, 1903	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Culex (Culex) torrentium</i> Martini, 1925	X	X	X	-	X	X	X	X
<i>Culex (Maillotia) hortensis</i> Ficalbi, 1889	X	X	X	-	-	-	X	-
<i>Culex (Neoculex) europaeus</i> Ramos et al., 2003 (syn. <i>Culex territans</i> Walker, 1856)	X	X	X	-	X	X	X	X
<i>Culex (Neoculex) impudicus</i> Ficalbi, 1890	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Culex (Neoculex) martinii</i> Medschid, 1930	-	X	X	-	-	-	X	-
<i>Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata</i> (Macquart, 1838)	-	X	X	-	-	-	X	X
<i>Culiseta (Culicella) fumipennis</i> (Stephens, 1825)	X	X	-	-	-	X	x	X
<i>Culiseta (Culicella) litorea</i> (Shute, 1928)	-	X	-	X	-	-	-	X
<i>Culiseta (Culicella) morsitans</i> (Theobald, 1901)	X	X	X	X	-	X	X	X
<i>Culiseta (Culicella) ochroptera</i> (Peus, 1935)	-	-	X	-	-	X	-	-
<i>Culiseta (Culiseta) alaskaensis</i> (Ludlow, 1906)	-	X	X	X	-	X	X	X
<i>Culiseta (Culiseta) annulata</i> (Schränk, 1776)	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Culiseta (Culiseta) glaphyroptera</i> (Schiner, 1864)	-	X	X	-	-	-	-	-
<i>Culiseta (Culiseta) subochrea</i> (Edwards, 1921)	X	X	X	X	-	X	-	X
<i>Orthopodomyia pulcricarpis</i> (Rondani, 1872)	X	X	-	-	-	-	-	X
<i>Uranotaenia (Pseudoficalbia) unguiculata</i> Edwards, 1913	-	X	X	-	-	-	-	-

Table 3. Vector competence studies on European mosquito populations. Negative and positive experiments are written in normal and bold typeface, respectively. Studies related to our area of concern are indicated by a reference number. Studies related to experiments carried out outside of our area of concern are indicated with a reference number and an additional letter: E: Europe; W: elsewhere in the world. Since no capture of chikungunya virus (CHIKV), dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) has been reported in our area of concern, these viruses are not mentioned in the field data part of the table.

	Laboratory Experiment					Field Data	
	Dengue	Chikungunya	Zika	Usutu	West Nile	Usutu	West Nile
<i>Aedes cinereus</i> *, <i>Aedes geminus</i> *	-	-	-	-	-	-	[26], W [27]
<i>Aedes rossicus</i>	-	-	-	-	-	-	[26], E [28]
<i>Aedes vexans</i>	-	E [13]	W [29,30]	-	W [31]	E [32]	[26], E [32] , W [27,33,34]
<i>Aedes geniculatus</i>	-	E [35]	-	-	[36]	-	[26]
<i>Aedes japonicus</i>	[11]	[11]	[37]	-	[10,38]	-	W [39]
<i>Aedes koreicus</i>	-	E [9]	-	-	-	-	-
<i>Aedes annulipes</i>	-	-	-	-	-	-	[26]
<i>Aedes cantans</i>	-	-	-	-	-	-	E [40]
<i>Aedes caspius</i>	-	-	-	-	[41]	-	E [42]
<i>Aedes detritus</i>	[12]	[12]	-	-	[12]	E [42]	-
<i>Aedes dorsalis</i>	-	-	-	-	W [43]	-	W [34]
<i>Aedes sticticus</i>	-	-	W [30]	-	-	-	[26], W [34]
<i>Aedes albopictus</i>	W [44]	[45]	[8,46]	E [47]	W [48]	E [42]	W [49]
<i>Anopheles claviger sensu lato</i>	-	-	-	-	-	-	[26]
<i>Anopheles maculipennis sensu lato</i> *	-	E [13]	-	-	-	E [42]	[26]
<i>Anopheles plumbeus</i>	-	-	-	-	[36]	-	[26]
<i>Coquillettidia richiardii</i>	-	-	-	-	-	-	[26], E [40]
<i>Culex modestus</i>	-	-	-	-	[41,50]	-	[26], E [42]

<i>Culex pipiens sensu lato</i> *	-	-	[8]	[51,52]	[41,51,53-56]	[6,57-60], E [42]	[26,61], E [42]
<i>Culex torrentium</i>	-	-	[8], E [8,62]	-	[56]	[59]	-
<i>Culex europaeus</i>	-	-	-	-	-	E [32]	W [34]
<i>Culiseta annulata</i>	-	-	-	-	-	E [32,42]	[26]
<i>Culiseta morsitans</i>	-	-	-	-	-	-	W [40]
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	-	-	-	-	-	-	E [63-65]

*: species complexes for which final identification could not be achieved

Table 4. Experimental infections performed with North-Western European mosquito populations.

Species	Country	Locality	Titer of Blood Meal	Virus Strain	Infection	Transmission	Days Post Infection	Reference
<i>Aedes vexans</i>	France	Côte d'Azur	10 ⁷ PFU/mL	CHIKV 06.21 La Réunion 2005	NA	-	12–14	[7]
<i>Aedes japonicus japonicus</i>	Switzerland	Zürich	10 ⁷ ffu/mL	CHIKV 06.21 La Réunion 2005	+	+	14	[11]
<i>Aedes japonicus japonicus</i>	Switzerland	Zürich	10 ⁷ ffu/mL	DENV Serotype 2, Bangkok Thailand	+	+	14	[11]
<i>Aedes japonicus japonicus</i>	Switzerland	Zürich	10 ⁶ TCID50/mL	West Nile virus (WNV) lineage 1 FIN Italy	+	+	14	[10]
<i>Aedes japonicus japonicus</i>	Germany	Stuttgart	2 × 10 ⁷ PFU/mL	WNV lineage 1 strain NY99	-	-	14	[38]
<i>Aedes japonicus japonicus</i>	Switzerland	Zürich	10 ⁶ TCID50/mL	WNV lineage 1 strain NY99	+	+	14	[10]
<i>Aedes japonicus japonicus</i>	Germany	-	10 ⁷ PFU/mL	ZIKV_FB-GWUH-2016	+	+	14	[37]
<i>Aedes caspius</i>	France	Côte d'Azur	10 ⁷ PFU/mL	CHIKV 06.21 La Réunion 2005	NA	+	12–14	[7]
<i>Aedes caspius</i>	France	Camargue	10 ^{10,3} PFU/mL	WNV PaAn001 AY268135	+	-	14	[41]
<i>Aedes detritus</i>	France	Côte d'Azur	10 ⁷ PFU/mL	CHIKV 06.21 La Réunion 2005	NA	+	12–14	[7]
<i>Aedes detritus</i>	United Kingdom	Little Neston	10 ⁷ PFU/mL	CHIKV NC/ 2011-568	-	-	17	[12]
<i>Aedes detritus</i>	United Kingdom	Little Neston	10 ⁷ PFU/mL	DENV Serotype 2, Bangkok Thailand	-	-	17	[12]
<i>Aedes detritus</i>	United Kingdom	Little Neston	2 × 10 ⁶ PFU/mL	WNV NY-99	+	+	17	[12]
<i>Aedes albopictus</i>	France	Bar-sur-Loup	10 ^{6,5} PFU/mL	CHIKV 06.21 La Réunion 2005	+	+	3,5,7	[45]
<i>Aedes albopictus</i>	France	Côte d'Azur	10 ⁷ PFU/mL	CHIKV 06.21 La Réunion 2005	NA	+	12–14	[7]
<i>Aedes albopictus</i>	France	Bar-sur-Loup	10 ^{6,5} PFU/mL	CHIKV 20235 2013	+	+	3,5,7	[45]

<i>Aedes albopictus</i>	France	Nice	10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	ZIKV strain (NC-2014-5132)	+	+	14	[46]
<i>Aedes albopictus</i>	Germany	-	10 ⁷ PFU/mL	ZIKV_FB-GWUH-2016	+	+	21	[8]
<i>Culex modestus</i>	France	Camargue	10 ^{10.3} PFU/mL	WNV PaAn001 AY268132	+	+	14	[50]
<i>Culex modestus</i>	France	Camargue	10 ^{10.3} PFU/mL	WNV PaAn001 AY268134	+	+	14	[41]
<i>Culex pipiens</i> hybrid form	United Kingdom	-	10 ⁶ PFU/mL	Usutu virus (USUV) African strain SAAR-1776	-	-	14	[52]
<i>Culex pipiens</i> hybrid form	Netherlands	-	5.2 × 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	WNV lineage 2 strain Greece 2010	+	+	14	[54]
<i>Culex pipiens molestus</i>	Germany	Heidelberg, Wendland, and Langenhelsten	1–1.6 × 10 ⁷ PFU/mL	WNV lineage 1 strain NY99	+	+	14	[56]
<i>Culex pipiens molestus</i>	Netherlands	Amsterdam	5.2 × 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	WNV lineage 2 strain Greece 2010	+	+	14	[54]
<i>Culex pipiens molestus</i>	Germany	Langenhelsten	10 ⁷ PFU/mL	ZIKV_FB-GWUH-2016	+	-	-	[8]
<i>Culex pipiens pipiens</i>	United Kingdom	-	10 ⁶ PFU/mL	USUV African strain SAAR-1776	+	+	14	[52]
<i>Culex pipiens pipiens</i>	Germany	Hamburg	1–1.6 × 10 ⁷ PFU/mL	WNV lineage 1 strain NY99	+	+	14	[56]
<i>Culex pipiens pipiens</i>	Netherlands	Best	5.2 × 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	WNV lineage 2 strain Greece 2010	+	+	14	[54]
<i>Culex pipiens pipiens</i>	Germany	-	10 ⁷ PFU/mL	ZIKV_FB-GWUH-2016	+	-	-	[8]
<i>Culex pipiens s.l.</i>	France	Côte d'Azur	10 ⁷ PFU/mL	CHIKV 06.21 La Réunion 2005	NA	-	12–14	[7]
<i>Culex pipiens s.l.</i>	Netherlands	Brummen	4 × 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	USUV Bologna 2009	+	+	14	[51]
<i>Culex pipiens s.l.</i>	Switzerland	Zürich	10 ^{2.6} to 10 ^{4.2} PFU/mL	WNV lineage 1 FIN Italy	+	-	14	[55]
<i>Culex pipiens s.l.</i>	Switzerland	Zürich	10 ^{2.6} to 10 ^{4.2} PFU/mL	WNV lineage 1 strain NY99	+	+	14	[55]
<i>Culex pipiens s.l.</i>	Netherlands	Brummen	1.4 × 10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	WNV lineage 2 strain Greece 2010	+	+	14	[53]
<i>Culex pipiens s.l.</i>	Netherlands	Brummen	4 × 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	WNV lineage 2 strain Greece 2010	+	+	14	[51]
<i>Culex pipiens s.l.</i>	France	Camargue	10 ^{10.3} PFU/mL	WNV PaAn001 AY268133	+	+	14	[41]

<i>Culex torrentium</i>	Germany	Hamburg	1–1,6 × 10 ⁷ PFU/mL	WNV lineage 1 strain NY99	+	+	14	[56]
<i>Culex torrentium</i>	Germany	-	10 ⁷ PFU/mL	ZIKV_FB-GWUH-2016	+	-	14,21	[8]

A Brief Summary of the Reviewed Arboviruses Is Presented Below

3.1. Chikungunya Virus

Chikungunya virus (genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*) was reported for the first time in 1952–1953 in Tanzania [66]. The original anthroponotic cycle allows the virus to circulate from *Aedes* mosquitoes to non-human primates. Outbreaks occur when an anthropophilic or opportunistic mosquito (e.g., *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*) completes the bridge between zoonotic and anthroponotic cycles. The first reported outbreaks occurred in the southern hemisphere during the 1960s [67]. Since then, three lineages have been identified: West-African, East-Central-South-African, and Asian lineages. During the 2000s, a new variant harboring a point mutation at the *E1* glycoprotein gene (E1-A226V) was isolated during the outbreak in the islands of the Indian Ocean, making *Ae. albopictus* more efficient for the transmission of CHIKV [68]. In Europe, the autochthonous transmission of CHIKV was first reported in Italy in 2007 [69]. In our area of interest, the first autochthonous cases of CHIKV occurred in 2010 in Southern France [70]. According to the ECDC, the six countries in this study reported 214 imported cases (Switzerland excluded) in 2012–2016 [71]. An autochthonous circulation of CHIKV was observed in France 2014 and 2017 [4,70,72]. An autochthonous outbreak of CHIKV also occurred in Italy in 2017 [73].

French *Ae. albopictus* and German *Ae. japonicus* are competent for CHIKV [11,45]. *Aedes detritus* from the UK was found inefficient to transmit CHIKV [12]. *Aedes vexans* from Northern Italy showed a low disseminated infection rate and its role in CHIKV transmission should not be neglected [13]. In Europe, the declaration of imported cases of CHIKV shows three temporal peaks, namely February, April, and August to November (Figure 2) [71]—periods at which travelers return from endemic areas. While mosquitoes are absent in February, they become active in April; the dynamics of *Ae. japonicus*, *Ae. koreicus* and *Ae. albopictus* coincide with the peaks of imported cases promoting autochthonous transmission.

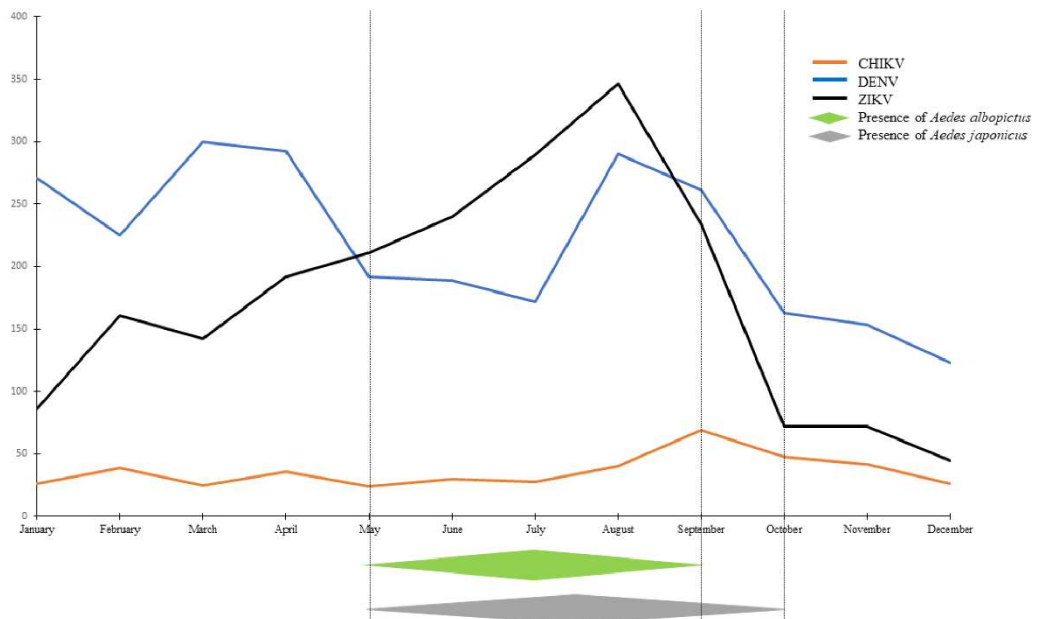


Figure 2. Number of imported cases of chikungunya, dengue and Zika viruses in Europe in 2016 (adapted from [71,74,75]).

3.2. Dengue Virus

Dengue virus (genus *Flavivirus*, family Flaviviridae) includes four serotypes (DENV-1 to DENV-4). It is the most widespread arbovirus in the world and is reported in over 100 countries [76]. *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* are the main vectors of DENV acting in urban cycles. According to the latest ECDC annual epidemiological report, covering the 2012–2016 period, 1562 cases (Switzerland excluded) were reported in our study area [74]. The first autochthonous cases of dengue fever were reported in our area of interest (France) in 2010 [77]. Other outbreaks in 2013 and 2015 also occurred in Southern France [5,78], where *Ae. albopictus* is well established and found in abundance [7].

Field-collected *Ae. japonicus* (Germany) and *Ae. detritus* (United Kingdom) were tested for their competence toward a DENV Serotype 2 isolated in Bangkok (Thailand); only *Ae. japonicus* was competent [12,55].

According to the ECDC [74], the frequency of imported cases shows three peaks: January, from March to April, and from August to September (Figure 2). Mosquitoes are only active during the second and third peaks.

3.3. Zika Virus

Zika virus (genus *Flavivirus*, family Flaviviridae), was first isolated in the Zika forest of Uganda in 1947 [79]. Since the Yap island epidemic in 2007, ZIKV has circulated on all continents except Europe [80]. There are three main lineages: two from Africa and one from Asia [81]. It is transmitted to humans (urban cycle) and primates (sylvatic cycle) by mosquitoes of the *Aedes* genus. In North-Western Europe, *Ae. albopictus* (France, Germany) and *Ae. japonicus* (Germany) are competent mosquitoes [8,37,46]. Conversely, *Culex pipiens s.l.* and *Cx. pipiens molestus* are not competent for ZIKV [8].

According to the ECDC 2016 annual epidemiological report [75], ZIKV case reports are steadily increasing from January to reach a peak in August then decrease rapidly to end in October (Figure 2). European *Ae. albopictus* is competent to transmit ZIKV [8] and *Ae. japonicus* is poorly competent [37].

3.4. Usutu Virus

Usutu virus (genus *Flavivirus*, family Flaviviridae) was initially isolated in South Africa in 1959 [82]. USUV was considered as exclusively transmitted in Africa until the first European outbreak occurred in Italy in 1996 [83]. Since then, USUV emerged in five countries studied in this paper (Belgium, France, Germany, Switzerland, and The Netherlands) [84]. USUV antibodies have been detected in resident and migratory birds in each country of our area of concern [85–90], except Ireland and Luxembourg. There are eight lineages of USUV. Five are European (European lineage 1–5) and three are African (African lineage 1–3) [84]. The first human cases were reported in Africa in 1981 [91], and the first human neuroinvasive cases were reported in Italy in 2009 [92]. USUV is transmitted in Europe by *Cx. pipiens* mosquitoes [51]. The reservoir hosts of USUV are migratory and resident birds. USUV or antibodies have been detected in 58 bird species belonging to 26 families and 13 orders [93]. Blackbirds (*Turdus merula*) seem to have the highest mortality rate among bird species affected by USUV [94]. An exhaustive review about WNV and USUV has been published [93]. *Cx. pipiens s.l.* from The Netherlands and the UK have been tested as competent for USUV strains, Bologna 2009 and SAAR-1776 [51,52].

While *Cx. pipiens s.l.* is considered the principal vector in temperate regions, Italian *Ae. albopictus* has been experimentally tested for USUV, with no clear-cut results [47]. *Ae. japonicus* from Austria has been found positive to virus dissemination [95]. To our knowledge, no other mosquito species of NW Europe has been demonstrated to be competent for USUV.

3.5. West Nile Virus

West Nile virus (genus *Flavivirus*, family Flaviviridae) was first recorded in the West Nile district of Uganda in 1937 [96]. In natural conditions, it circulates between birds and bird-feeding mosquitoes. Mammals (mainly horses and humans) are considered dead-end hosts [97]. In Europe, WNV is mainly transmitted by *Culex* mosquitoes. The first documented introduction of WNV in metropolitan France

dates from 1962, in Camargue [98]. The vector incriminated in 1964 was *Culex modestus* [99]. During the following 40 years, WNV did not cause any human cases in France, and a low prevalence of antibodies was observed in human and equine populations during the 1970s [98]. The resurgence of WNV in France occurred in 2000 with 76 laboratory confirmed equine cases. Sporadic detections of positive serology in humans and birds occurred during the following 15 years [88,100], until a new epidemic outbreak occurred in 2015 in southern France [101]. Three years later, an outbreak occurred for the first time in Germany [102]. The number of cases reported to the ECDC for 2018 was exceptionally high [103].

European mosquitoes display a variable susceptibility to WNV infection and transmission. *Culex* spp. from France, The Netherlands, Switzerland and Germany are competent for WNV lineages 1 and 2. *Culex pipiens* biotype *pipiens*, *Culex pipiens* biotype *molestus* and *Culex torrentium* from the studied area (France, The Netherlands, Switzerland and Germany) are competent for WNV lineage 1 and 2 [41,51,53,55,56,104]. *Culex pipiens s.l.* from Switzerland is susceptible to WNV infection but is not competent for WNV lineage 1 FIN Italy [55]. The competence of *Ae. detritus* (United Kingdom) was demonstrated for WNV lineage 1 strain NY99 [12].

The vector competence of other field-collected species has not been successfully demonstrated for WNV: *Ae. caspius* (France) is susceptible to infection but not able to transmit [41]. *Ae. japonicus* (Germany) could not be infected nor transmit WNV lineage 1 strain NY99 [38].

4. Discussion

North-Western Europe is at risk for emerging or re-emerging arboviruses. The epidemiology of arboviruses such as DENV, ZIKV or CHIKV is very different in Europe as compared to tropical or sub-tropical countries. In the latter countries, the existence of sylvatic cycles involving wild animals as reservoir hosts and arboreal canopy dwelling mosquitoes as vectors sustain a viral circulation of viruses all year long [105]. Epidemics only occur when anthrozoophilic mosquitoes act as bridge vector for the transmission of the virus from animals to humans. In Europe, in the absence of any sylvatic cycle, autochthonous transmission is only caused when a competent vector becomes infectious after feeding on an imported human case.

The number of imported human cases of CHIKV, DENV and ZIKV peaks in January, March–April, and September–October [71,74,75], corresponding to vacations in Europe. The last two peaks may allow the launch of local transmissions. Regarding the January peak, there is no mosquito activity at that time in the considered area. Consequently, this peak will probably have no consequences regarding a local transmission. During the March–April peak, DENV and CHIKV can be transmitted by *Ae. japonicus* [23], and ZIKV by *Ae. vexans* if European mosquitoes appear to be competent (such as Canadian ones do) [30]. The summer peak is highly correlated with the activity of *Ae. albopictus*. The competence of native populations has been characterized for CHIKV and ZIKV [8,45,46]. Outbreaks have already occurred in southern European countries such as the occurrence of chikungunya in Italy [73] and dengue in France [5]. Established vectors *Ae. albopictus* are also competent for transmitting ZIKV in Italy and Spain [106,107].

To date, *Ae. albopictus* and *Ae. japonicus* are the main species that could represent a risk of the transmission of the considered arboviruses in our area of interest. Indeed, native *Ae. albopictus* and *Ae. japonicus* can transmit CHIKV, DENV, ZIKV [11,37,45,46].

This work highlights that invasive species represent the most probable candidates for the circulation of CHIKV, DENV, and ZIKV in our area of interest. To date, three species are established in our area of interest: *Ae. albopictus*, *Ae. koreicus* and *Ae. japonicus*. *Ae. albopictus* was first introduced in France in 1999 and has been established since 2004 [49]. It is now widespread and abundant in the southern part of the country. It is also reported as established in the north-eastern part of France, in Germany, in Switzerland, in The Netherlands, and occasionally found in Belgium and the UK [108]. Similarly, *Ae. japonicus* is well established in Belgium, France, Luxembourg, Germany, The Netherlands, and Switzerland [109,110]. *Ae. koreicus* is implanted in Germany, Switzerland, and Belgium [111]. While

invasive species benefit from globalization (increased transportation of goods and people) to expand, native species are also experiencing ecological upheavals and contribute to increase the risk of arboviral emergences. Recently, *An. plumbeus* has switched from natural breeding sites to man-made sites [112] leading to consider its potential role as a vector for WNV [36].

While the vector competence of *Ae. albopictus* for the five viruses considered in this study has been largely examined, European native mosquitoes (*Anopheles*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Uranotaenia*) were poorly investigated. The role of ornithophilic species, such as *Cs. morsitans*, and opportunistic species (mosquitoes that feed on mammals as well as on birds or amphibians) like *An. plumbeus* or *Ae. geniculatus*, is still unknown, especially in the transmission of USUV and WNV. *An. plumbeus*, however, was tested competent for WNV, and *Ae. geniculatus* for CHIKV and WNV [35,36].

For USUV and WNV, the entanglement of mosquito populations with avian populations is necessary for sustaining the enzootic cycle. Recent years have shown a sharp increase in WNV cases [103]. Although serological and molecular screening is regularly carried out in human [113,114] and avian populations [39,87,115], the screening of mosquito populations is less systematic. Also, WNV antibodies are more prevalent in migratory birds, while USUV are more prevalent in resident birds [115]. USUV was more commonly found in mosquitoes than WNV [115].

Epizootics of WNV are episodic [98]; after the first emergence of WNV in France in 1962 [98], the virus was only detected again in the 2000s [116]. Outbreaks were noted from 2004 to 2018 in mainland France [101,103,117], and in 2018 in Germany [102]. The circulation of USUV was suspected in European birds in 2000–2005 [85,118]. USUV emerged in Germany in 2011 [59], and then in France in 2015 [119]. In 2016, an epizootic has globally affected France, Belgium, Germany and The Netherlands [84]. The species involved in these outbreaks were probably members of the genus *Culex* (e.g., *Cx. pipiens s.l.*) [51,52].

These recent episodes recall our knowledge gaps on the vector competence of native and invasive species such as *Ae. vexans*, *Ae. japonicus* and other *Aedes* species for ZIKV, CHIKV and DENV; *An. plumbeus*, *Ae. geniculatus*, *Cs. annulata*, and *Cx. torrentium* for USUV and WNV. In the future, attention should be given to ubiquitous species which could be of importance if their vector competence happens to be demonstrated.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Document S1: Search terms.

Author Contributions: Conceptualization and methodology: J.-P.M., H.F., and J.D.; formal analysis, writing—original draft preparation: J.P.M.; writing—review and editing: J.P.M., H.F., A.-B.F., F.S., and J.D.; supervision: A.-B.F., H.F., J.D.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: the authors thank Matthieu L. Kaltenbach for proof-reading this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vasquez, V.; Haddad, E.; Perignon, A.; Jaureguiberry, S.; Brichler, S.; Leparc-Goffart, I.; Caumes, E. Dengue, chikungunya, and Zika virus infections imported to Paris between 2009 and 2016: Characteristics and correlation with outbreaks in the French overseas territories of Guadeloupe and Martinique. *Int. J. Infect. Dis.* **2018**, *72*, 34–39.
2. Wong, N.; Ahmed, A.; Ahmed, O.; Elsanousi, F.; Veater, J.; Osborne, J.; Aarons, E.; Tang, J.W. A series of Zika virus cases imported into the UK 2016: Comparative epidemiological and clinical features. *J. Infect.* **2017**, *74*, 616–618.
3. Wiwanitkit, S.; Wiwanitkit, V. Estimated number of local transmission cases of Zika virus infection imported from Brazil to France. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 1022.

4. Delisle, E.; Rousseau, C.; Broche, B.; Leparç-Goffart, I.; L'Amber, G.; Cochet, A.; Prat, C.; Foulongne, V.; Ferre, J.B.; Catelinois, O.; et al. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, september to october 2014. *Eurosurveillance* **2015**, *20*, 8–13.
5. Succo, T.; Leparç-Goffart, I.; Ferre, J.B.; Roiz, D.; Broche, B.; Maquart, M.; Noel, H.; Catelinois, O.; Entezam, F.; Caire, D.; et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, south of France, july to september 2015. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 5–11.
6. Sieg, M.; Schmidt, V.; Ziegler, U.; Keller, M.; Hoper, D.; Heenemann, K.; Ruckner, A.; Nieper, H.; Muluneh, A.; Groschup, M.H.; et al. Outbreak and cocirculation of three different Usutu virus strains in eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 662–664.
7. Vazeille, M.; Jeannin, C.; Martin, E.; Schaffner, F.; Failloux, A.B. Chikungunya: A risk for Mediterranean countries? *Acta Trop.* **2008**, *105*, 200–202.
8. Heitmann, A.; Jansen, S.; Lühken, R.; Leggewie, M.; Badusche, M.; Pluskota, B.; Becker, N.; Vapalahti, O.; Schmidt-Chanasit, J.; Tannich, E. Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 4–6.
9. Ciocchetta, S.; Prow, N.A.; Darbro, J.M.; Frentiu, F.D.; Savino, S.; Montarsi, F.; Capelli, G.; Aaskov, J.G.; Devine, G.J. The new European invader *Aedes* (*Finlaya*) *koreicus*: A potential vector of chikungunya virus. *Pathog. Glob. Health* **2018**, *112*, 107–114.
10. Veronesi, E.; Paslaru, A.; Silaghi, C.; Tobler, K.; Glavinic, U.; Torgerson, P.; Mathis, A. Experimental evaluation of infection, dissemination, and transmission rates for two West Nile virus strains in European *Aedes japonicus* under a fluctuating temperature regime. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 1925–1932.
11. Schaffner, F.; Vazeille, M.; Kaufmann, C.; Failloux, A.B.; Mathis, A. Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* **2011**, *29*, 141–142.
12. Blagrove, M.S.; Sherlock, K.; Chapman, G.E.; Impoinvil, D.E.; McCall, P.J.; Medlock, J.M.; Lycett, G.; Solomon, T.; Baylis, M. Evaluation of the vector competence of a native UK mosquito *Ochlerotatus detritus* (*Aedes detritus*) for dengue, chikungunya and West Nile viruses. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 452.
13. Talbalaghi, A.; Moutailler, S.; Vazeille, M.; Failloux, A.B. Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? *Med. Vet. Entomol.* **2010**, *24*, 83–87.
14. Peel, M.C.; Finlayson, B.L.; McMahon, T.A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* **2007**, *11*, 1633–1644.
15. Rubel, F.; Brugger, K.; Haslinger, K.; Auer, I. The climate of the European Alps: Shift of very high resolution Köppen-Geiger climate zones 1800–2100. *Met. Zeit.* **2017**, *26*, 115–125.
16. Schaffner, F.; Angel, G.; Geoffroy, B.; Hervy, JP.; Rhaïem, A.; Brunhes, J. *The Mosquitoes of Europe: An Identification and Training Programme*; Institut de Recherche pour le Développement: Paris, France; Montpellier, France, 2001.
17. Robert, V.; Günay, F.; Le Goff, G.; Boussès, P.; Sulesco, T.; Khalin, A.; Medlock, J.M.; Kampen, H.; Petrić, D.; Schaffner, F. Distribution chart for Euro-Mediterranean mosquitoes (western Palaearctic region). *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* **2019**, *37*, 1–28.
18. Moher, D.; Shamseer, L.; Clarke, M.; Ghersi, D.; Liberati, A.; Petticrew, M.; Shekelle, P.; Stewart, L.A.; Group, P.-P. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst. Rev.* **2015**, *4*, 1.
19. Boukraa, S.; Dekoninck, W.; Versteirt, V.; Schaffner, F.; Coosemans, M.; Haubruge, E.; Francis, F. Updated checklist of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Belgium. *J. Vector Ecol.* **2015**, *40*, 398–407.
20. Walther, D.; Kampen, H. The citizen science project 'Mueckenatlas' helps monitor the distribution and spread of invasive mosquito species in Germany. *J. Med. Entomol.* **2017**, *54*, 1790–1794.
21. Medlock, J.M.; Vaux, A.G.C. *Aedes* (*Aedes*) *geminus* Peus (Diptera, Culicidae)—An addition to the british mosquito fauna. *Dipt. Dig.* **2010**, *17*, 1–6.
22. Matthias Beck, M.G.; Weitzel, T.; Fohlmeister, V.; Kaiser, A.; Arnold, A.; Becker, N. Preliminary studies on the mosquito fauna of Luxembourg. *Eur. Mosq. Bull.* **2003**, *14*, 21–24.
23. Schaffner, F.; Mathis, A. *Spatio-Temporal Diversity of the Mosquito Fauna (Diptera-Culicidae) in Switzerland*; Institute of Parasitology, University of Zürich: Zürich, Switzerland, 2013.
24. Verdonshot, P.F.M. Family Culicidae. Available online: <http://www.diptera-info.nl/news.php?fam=Culicidae> (accessed on 16 January 2016).

25. Becker, N.; Pfitzner, W.P.; Czajka, C.; Kaiser, A.; Weitzel, T. *Anopheles (Anopheles) petragrani* Del Vecchio 1939—a new mosquito species for Germany. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 2671–2677.
26. Timmermann, U.; Becker, N. Mosquito-borne West Nile virus (WNV) surveillance in the Upper Rhine Valley, Germany. *J. Vector Ecol.* **2010**, *35*, 140–143.
27. Andreadis, T.G.; Anderson, J.F.; Vossbrinck, C.R.; Main, A.J. Epidemiology of West Nile virus in Connecticut: A five-year analysis of mosquito data 1999–2003. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2004**, *4*, 360–378.
28. Hubalek, Z.; Rudolf, I.; Bakonyi, T.; Kazdova, K.; Halouzka, J.; Sebesta, O.; Sikutova, S.; Juricova, Z.; Nowotny, N. Mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance for arboviruses in an area endemic for West Nile (lineage Rabensburg) and Tahyna viruses in central Europe. *J. Med. Entomol.* **2010**, *47*, 466–472.
29. Gendernalik, A.; Weger-Lucarelli, J.; Garcia Luna, S.M.; Fauver, J.R.; Ruckert, C.; Murrieta, R.A.; Bergren, N.; Samaras, D.; Nguyen, C.; Kading, R.C.; et al. American *Aedes vexans* mosquitoes are competent vectors of Zika virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *96*, 1338–1340.
30. Dibernardo, A.; Turell, M.J.; Lindsay, L.R.; Loomer, C.; Iranpour, M. Vector competence of some mosquito species from Canada for Zika virus. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **2017**, *33*, 276–281.
31. Turell, M.J.; O’Guinn, M.L.; Dohm, D.J.; Jones, J.W. Vector competence of North American mosquitoes (Diptera-Culicidae) for West Nile virus. *J. Med. Entomol.* **2001**, *38*, 130–134.
32. Takken, W.; Knols, B.G.J. *Emerging Pests and Vector-Borne Diseases in Europe*; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2007; Volume 1, p. 499.
33. Anderson, J.F.; Main, A.J.; Armstrong, P.M.; Andreadis, T.G.; Ferrandino, F.J. Arboviruses in North Dakota, 2003–2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *92*, 377–393.
34. CDC. Mosquito Species in Which West Nile Virus Has Been Detected, United-States, 1999–2016. Available online: <https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/MosquitoSpecies1999–2016.pdf> (accessed on 21 March 2019).
35. Prudhomme, J.; Fontaine, A.; Lacour, G.; Gantier, J.C.; Diancourt, L.; Velo, E.; Bino, S.; Reiter, P.; Mercier, A. The native European *Aedes geniculatus* mosquito species can transmit chikungunya virus. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 962–972.
36. Vermeil, C.; Lavillaureix, J.; Reeb, E. Survival and transmission of West Nile virus by various arthropods. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1960**, *53*, 300–306.
37. Jansen, S.; Heitmann, A.; Lühken, R.; Jöst, H.; Helms, M.; Vapalahti, O.; Schmidt-Chanasit, J.; Tannich, E. Experimental transmission of Zika virus by *Aedes japonicus japonicus* from southwestern Germany. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 192.
38. Huber, K.; Jansen, S.; Leggewie, M.; Badusche, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Becker, N.; Tannich, E.; Becker, S.C. *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) from Germany have vector competence for Japan encephalitis virus but are refractory to infection with West Nile virus. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 3195–3199.
39. Pietsch, C.; Trawinski, H.; Lubbert, C.; Liebert, U.G. Short communication: West Nile fever imported from Austria to Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 1033–1036.
40. Hubalek, Z.; Halouzka, J. West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 643–650.
41. Balenghien, T.; Vazeille, M.; Grandadam, M.; Schaffner, F.; Zeller, H.; Reiter, P.; Sabatier, P.; Fouque, F.; Bicout, D.J. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2008**, *8*, 589–595.
42. Mancini, G.; Montarsi, F.; Calzolari, M.; Capelli, G.; Dottori, M.; Ravagnan, S.; Lelli, D.; Chiari, M.; Santilli, A.; Quaglia, M.; et al. Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Vet. Ital.* **2017**, *53*, 97–110.
43. Goddard, L.B.; Roth, A.E.; Reisen, W.K.; Scott, T.W. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 1385–1391.
44. 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*, 259–266.
45. Lourenco-de-Oliveira, R.; Mousson, L.; Vazeille, M.; Fuchs, S.; Yebakima, A.; Gustave, J.; Girod, R.; Dusfour, I.; Leparc-Goffart, I.; Vanlandingham, D.L.; et al. Chikungunya virus transmission potential by local *Aedes* mosquitoes in the Americas and Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003780.

46. Jupille, H.; Seixas, G.; Mousson, L.; Sousa, C.A.; Failloux, A.B. Zika virus, a new threat for Europe? *Plos Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004901.
47. Puggioli, A.; Bonilauri, P.; Calzolari, M.; Lelli, D.; Carrieri, M.; Urbanelli, S.; Pudar, D.; Bellini, R. Does *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) play any role in Usutu virus transmission in northern Italy? Experimental oral infection and field evidences. *Acta Trop.* **2017**, *172*, 192–196.
48. Brustolin, M.; Talavera, S.; Santamaria, C.; Rivas, R.; Pujol, N.; Aranda, C.; Marques, E.; Valle, M.; Verdun, M.; Pages, N.; et al. *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) populations as vectors for lineage 1 and 2 West Nile virus in Europe. *Med. Vet. Entomol.* **2016**, *30*, 166–173.
49. Schaffner, F.; Karch, S. Première observation d' *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en France métropolitaine. *Comptes Rendus Acad. Sci.* **2000**, *323*, 373–375.
50. Balenghien, T.; Vazeille, M.; Reiter, P.; Schaffner, F.; Zeller, H.; Bicout, D.J. Evidence of laboratory vector competence of *Culex modestus* for West Nile virus. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **2007**, *23*, 233–236.
51. Fros, J.J.; Miesen, P.; Vogels, C.B.; Gaibani, P.; Sambri, V.; Martina, B.E.; Koenraadt, C.J.; van Rij, R.P.; Vlak, J.M.; Takken, W.; et al. Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health (Amst. Neth.)* **2015**, *1*, 31–36.
52. Hernandez-Triana, L.M.; de Marco, M.F.; Mansfield, K.L.; Thorne, L.; Lumley, S.; Marston, D.; Fooks, A.A.; Johnson, N. Assessment of vector competence of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 381.
53. Fros, J.J.; Geertsema, C.; Vogels, C.B.; Roosjen, P.P.; Failloux, A.B.; Vlak, J.M.; Koenraadt, C.J.; Takken, W.; Pijlman, G.P. West Nile virus: High transmission rate in north-western European mosquitoes indicates its epidemic potential and warrants increased surveillance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003956.
54. Vogels, C.B.F.; Goertz, G.P.; Pijlman, G.P.; Koenraadt, C.J.M. Vector competence of northern and southern European *Culex pipiens pipiens* mosquitoes for West Nile virus across a gradient of temperatures. *Med. Vet. Entomol.* **2017**, *31*, 358–364.
55. Wagner, S.; Mathis, A.; Schonenberger, A.C.; Becker, S.; Schmidt-Chanasit, J.; Silaghi, C.; Veronesi, E. Vector competence of field populations of the mosquito species *Aedes japonicus japonicus* and *Culex pipiens* from Switzerland for two West Nile virus strains. *Med. Vet. Entomol.* **2018**, *32*, 121–124.
56. Leggewie, M.; Badusche, M.; Rudolf, M.; Jansen, S.; Börstler, J.; Krumkamp, R.; Huber, K.; Krüger, A.; Schmidt-Chanasit, J.; Tannich, E.; et al. *Culex pipiens* and *Culex torrentium* populations from central Europe are susceptible to West Nile virus infection. *One Health (Amst. Neth.)* **2016**, *2*, 88–94.
57. Eiden, M.; Gil, P.; Ziegler, U.; Rakotoarivony, I.; Marie, A.; Frances, B.; L'Amber, G.; Simonin, Y.; Foulongne, V.; Groschup, M.H.; et al. Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *61*, 151–154.
58. Scheuch, D.E.; Schafer, M.; Eiden, M.; Heym, E.C.; Ziegler, U.; Walther, D.; Schmidt-Chanasit, J.; Keller, M.; Groschup, M.H.; Kampen, H. Detection of Usutu, Sindbis, and Batai viruses in mosquitoes (diptera: Culicidae) collected in Germany, 2011–2016. *Viruses* **2018**, *10*, 12.
59. Jöst, H.; Bialonski, A.; Maus, D.; Sambri, V.; Eiden, M.; Groschup, M.H.; Gunther, S.; Becker, N.; Schmidt-Chanasit, J. Isolation of Usutu virus in Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 551–553.
60. Cadar, D.; Bosch, S.; Jöst, H.; Börstler, J.; Garigliany, M.M.; Becker, N.; Schmidt-Chanasit, J. Putative lineage of novel African Usutu virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1647–1650.
61. Vaux, A.G.; Gibson, G.; Hernandez-Triana, L.M.; Cheke, R.A.; McCracken, F.; Jeffries, C.L.; Horton, D.L.; Springate, S.; Johnson, N.; Fooks, A.R.; et al. Enhanced West Nile virus surveillance in the North Kent marshes, UK. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 91.
62. Amraoui, F.; Atyame-Nten, C.; Vega-Rua, A.; Lourenco-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; Failloux, A.B. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 2–5.
63. Camp, J.V.; Bakonyi, T.; Soltesz, Z.; Zechmeister, T.; Nowotny, N. *Uranotaenia unguiculata* Edwards, 1913 are attracted to sound, feed on amphibians, and are infected with multiple viruses. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 456.
64. Kemenesi, G.; Dallos, B.; Oldal, M.; Kutas, A.; Foldes, F.; Nemeth, V.; Reiter, P.; Bakonyi, T.; Banyai, K.; Jakab, F. Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary. *Virus Dis.* **2014**, *25*, 500–503.
65. Pachler, K.; Lebl, K.; Berer, D.; Rudolf, I.; Hubalek, Z.; Nowotny, N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 2119–2122.

66. Robinson, M.C. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1955**, *49*, 28–32.
67. Amraoui, F.; Failloux, A.B. Chikungunya: An unexpected emergence in Europe. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *21*, 146–150.
68. Vazeille, M.; Moutailler, S.; Coudrier, D.; Rousseaux, C.; Khun, H.; Huerre, M.; Thiria, J.; Dehecq, J.S.; Fontenille, D.; Schuffenecker, I.; et al. Two chikungunya isolates from the outbreak of la Réunion (Indian ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLOS ONE* **2007**, *2*, e1168.
69. Tomasello, D.; Schlagenhauf, P. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. *Travel Med. Infect. Dis.* **2013**, *11*, 274–284.
70. Grandadam, M.; Caro, V.; Plumet, S.; Thiberge, J.M.; Souares, Y.; Failloux, A.B.; Tolou, H.J.; Budelot, M.; Cosserrat, D.; Leparç-Goffart, I.; et al. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 910–913.
71. European Center for Disease Prevention and Control. *2016 Chikungunya Virus Disease*; European Center for Disease Prevention and Control: Stockholm, Sweden, 2018.
72. Calba, C.; Guerbois-Galla, M.; Franke, F.; Jeannin, C.; Auzet-Caillaud, M.; Grard, G.; Pigaglio, L.; Decoppet, A.; Weicherding, J.; Savaill, M.C.; et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, july to september 2017. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 5–10.
73. Venturi, G.; Di Luca, M.; Fortuna, C.; Remoli, M.E.; Riccardo, F.; Severini, F.; Toma, L.; Del Manso, M.; Benedetti, E.; Caporali, M.G.; et al. Detection of a chikungunya outbreak in central Italy, august to september 2017. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 17–00646.
74. European Center for Disease Prevention and Control. *Dengue Annual Epidemiological Report 2016*; European Center for Disease Prevention and Control: Stockholm, Sweden, 2018.
75. European Center for Disease Prevention and Control. *Zika Virus Infection*; European Center for Disease Prevention and Control: Stockholm, Sweden, 2018.
76. Bhatt, S.; Gething, P.W.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Farlow, A.W.; Moyes, C.L.; Drake, J.M.; Brownstein, J.S.; Hoen, A.G.; Sankoh, O.; et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* **2013**, *496*, 504–507.
77. La Ruche, G.; Souares, Y.; Armengaud, A.; Peloux-Petiot, F.; Delaunay, P.; Despres, P.; Lenglet, A.; Jourdain, F.; Leparç-Goffart, I.; Charlet, F.; et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, september 2010. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 19676.
78. Marchand, E.; Prat, C.; Jeannin, C.; Lafont, E.; Bergmann, T.; Flusin, O.; Rizzi, J.; Roux, N.; Busso, V.; Deniau, J.; et al. Autochthonous case of dengue in France, october 2013. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, 20661.
79. Dick, G.W.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520.
80. Boyer, S.; Calvez, E.; Chouin-Carneiro, T.; Diallo, D.; Failloux, A.B. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes Infect.* **2018**, *20*, 646–660.
81. Faye, O.; Freire, C.C.; Iamarino, A.; Faye, O.; de Oliveira, J.V.; Diallo, M.; Zanotto, P.M.; Sall, A.A. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2636.
82. Woodall, J. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending december 1963. *Proc. E. Afr. Acad.* **1964**, *2*, 141–146.
83. Weissenböck, H.; Bakonyi, T.; Rossi, G.; Mani, P.; Nowotny, N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 274–277.
84. Cadar, D.; Lühken, R.; van der Jeugd, H.; Garigliany, M.; Ziegler, U.; Keller, M.; Lahoreau, J.; Lachmann, L.; Becker, N.; Kik, M.; et al. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 11–17.
85. Buckley, A.; Dawson, A.; Moss, S.R.; Hinsley, S.A.; Bellamy, P.E.; Gould, E.A. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2807–2817.
86. Garigliany, M.M.; Marlier, D.; Tenner-Racz, K.; Eiden, M.; Cassart, D.; Gandar, F.; Beer, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Desmecht, D. Detection of Usutu virus in a bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) and a great spotted woodpecker (*Dendrocopos major*) in north-west Europe. *Vet. J.* **2014**, *199*, 191–193.
87. Lim, S.M.; Geervliet, M.; Verhagen, J.H.; Muskens, G.; Majoor, F.A.; Osterhaus, A.; Martina, B.E.E. Serologic evidence of West Nile virus and Usutu virus infections in Eurasian coots in the Netherlands. *Zoonoses Public Health* **2018**, *65*, 96–102.

88. Ziegler, U.; Jöst, H.; Muller, K.; Fischer, D.; Rinder, M.; Tietze, D.T.; Danner, K.J.; Becker, N.; Skuballa, J.; Hamann, H.P.; et al. Epidemic spread of Usutu virus in southwest Germany in 2011 to 2013 and monitoring of wild birds for Usutu and West Nile viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15*, 481–488.
89. Buchebner, N.; Zenker, W.; Wenker, C.; Steinmetz, H.W.; Sos, E.; Lussy, H.; Nowotny, N. Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC Vet. Res.* **2013**, *9*, 153.
90. Vittecoq, M.; Lecollinet, S.; Jourdain, E.; Thomas, F.; Blanchon, T.; Arnal, A.; Lowenski, S.; Gauthier-Clerc, M. Recent circulation of West Nile virus and potentially other closely related flaviviruses in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 610–613.
91. Nikolay, B.; Diallo, M.; Boye, C.S.; Sall, A.A. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1417–1423.
92. Pecorari, M.; Longo, G.; Gennari, W.; Grottola, A.; Sabbatini, A.; Tagliazucchi, S.; Savini, G.; Monaco, F.; Simone, M.; Lelli, R.; et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, august-september 2009. *Eurosurveillance* **2009**, *14*, 15–17.
93. Nikolay, B. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: How much do transmission cycles overlap? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *109*, 609–618.
94. Cle, M.; Salinas, S.; Lecollinet, S.; Beck, C.; Gutierrez, S.; Baldet, T.; Vande Perre, P.; Foulongne, V.; Simonin, Y. Usutu virus: The phantom menace. *Méd. Sci.: M/S* **2018**, *34*, 709–716.
95. Camp, J.V.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N. Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 46.
96. Smithburn, K.C.; Hughes, T.P.; Burke, A.W.; Paul, J.H. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1940**, *s1-20*, 471–492.
97. Rudolf, I.; Betasova, L.; Blazejova, H.; Venclikova, K.; Strakova, P.; Sebesta, O.; Mendel, J.; Bakonyi, T.; Schaffner, F.; Nowotny, N.; et al. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 452.
98. Murgue, B.; Murri, S.; Triki, H.; Deubel, V.; Zeller, H.G. West Nile in the Mediterranean basin: 1950–2000. In *West Nile Virus: Detection, Surveillance, and Control*; White, D.J., Morse, D.L., Eds.; New-York Academy of Sciences: New-York, NY, USA, 2001, pp. 117–126.
99. Balenghien, T.; Fouque, F.; Sabatier, P.; Bicout, D.J. Horse-, bird-, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 936–946.
100. Van Den Bossche, D.; Cnops, L.; Meersman, K.; Domingo, C.; van Gompel, A.; van Esbroeck, M. Chikungunya virus and West Nile virus infections imported into Belgium, 2007–2012. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 2227–2236.
101. Bahuon, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Bournez, L.; Leblond, A.; Beck, C.; Hars, J.; Leparç-Goffart, I.; L'Ambert, G.; Paty, M.C.; Cavalerie, L.; et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* **2016**, *35*, 811–824.
102. Ziegler, U.; Lühken, R.; Keller, M.; Cadar, D.; van der Grinten, E.; Michel, F.; Albrecht, K.; Eiden, M.; Rinder, M.; Lachmann, L.; et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antivir. Res.* **2019**, *162*, 39–43.
103. European Center for Disease Prevention and Control. Weekly Updates: 2018 West Nile Fever Transmission Season. Available Online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018> (accessed on 1 February 2019).
104. Vogels, C.B.; Goertz, G.P.; Pijlman, G.P.; Koenraadt, C.J. Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e96.
105. 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*, 281–286.
106. Di Luca, M.; Severini, F.; Toma, L.; Boccolini, D.; Romi, R.; Remoli, M.E.; Sabbatucci, M.; Rizzo, C.; Venturi, G.; Rezza, G.; et al. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 6–9.
107. Gutierrez-Lopez, R.; Bialosuknia, S.M.; Ciota, A.T.; Montalvo, T.; Martinez-de la Puente, J.; Gangoso, L.; Figuerola, J.; Kramer, L.D. Vector competence of *Aedes caspius* and *Ae. albopictus* mosquitoes for Zika virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 346–348.
108. European Center for Disease Prevention and Control. *Aedes albopictus*—Current Known Distribution: June 2018. Available Online: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-june-2018> (accessed on 22 March, 2019).

109. Koban, M.B.; Kampen, H.; Scheuch, D.E.; Frueh, L.; Kuhlisch, C.; Janssen, N.; Steidle, J.L.M.; Schaub, G.A.; Werner, D. The Asian bush mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Europe, 17 years after its first detection, with a focus on monitoring methods. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 109.
110. European Center for Disease Prevention and Control. *Aedes japonicus*—Current Known Distribution: June 2018. Available online: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-japonicus-current-known-distribution-june-2018> (accessed on 22 March 2019).
111. European Center for Disease Prevention and Control. *Aedes koreicus*—Current Known Distribution: May 2018. Available Online: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-koreicus-current-known-distribution-may-2018> (accessed on 22 March 2019).
112. Dekoninck, W.; Hendrickx, F.; Vasn Bortel, W.; Versteirt, V.; Coosemans, M.; Damiens, D.; Hance, T.; de Clercq, E.M.; Hendrickx, G.; Schaffner, F.; et al. Human-induced expanded distribution of *Anopheles plumbeus*, experimental vector of West Nile virus and a potential vector of human malaria in Belgium. *J. Med. Entomol.* **2011**, *48*, 924–928.
113. Rabel, P.O.; Planitzer, C.B.; Farcet, M.R.; Orlinger, K.K.; Ilk, R.; Barrett, P.N.; Kreil, T.R. Increasing West Nile virus antibody titres in central European plasma donors from 2006 to 2010. *Eurosurveillance* **2011**, *16*, 19812.
114. Linke, S.; Muehlen, M.; Niedrig, M.; Ellerbrok, H.; Kaiser, A.; Fiedler, W.; Sonnenberg, K.; Alpers, K.; Stark, K.; Pauli, G. Assessing the exposure of German and Austrian bird ringers to West Nile virus (Flavivirus) and evaluating their potential risk of infection. *J. Ornithol.* **2008**, *149*, 271–275.
115. Michel, F.; Fischer, D.; Eiden, M.; Fast, C.; Reuschel, M.; Muller, K.; Rinder, M.; Urbaniak, S.; Brandes, F.; Schwehn, R.; et al. West Nile virus and Usutu virus monitoring of wild birds in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 16.
116. Murgue, B.; Murri, S.; Zientara, S.; Durand, B.; Durand, J.P.; Zeller, H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 692–696.
117. Del Giudice, P.; Schuffenecker, I.; Vandebos, F.; Counillon, E.; Zellet, H. Human West Nile virus, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 1885–1886.
118. Buckley, A.; Dawson, A.; Gould, E.A. Detection of seroconversion to West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus in UK sentinel chickens. *Virology* **2006**, *3*, 71.
119. Lecollinet, S.; Blanchard, Y.; Manson, C.; Lowenski, S.; Laloy, E.; Quenault, H.; Touzain, F.; Lucas, P.; Eraud, C.; Bahuon, C.; et al. Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, eastern France, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2225.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Résumé de l'article N°2 :

Introduction : Les émergences ou ré-émergences d'arbovirus sont en augmentation en Europe. Habituellement confinés aux pays tropicaux ou subtropicaux, leur risque d'apparition en Europe (en particulier dans les pays d'Europe occidentale) a longtemps été considéré comme relativement faible. Dans un contexte de changement global, avec une augmentation des déplacements, les arbovirus peuvent plus facilement se développer en dehors de leur aire de répartition historique. Au cours des deux dernières décennies, des arbovirus tels que ceux de la dengue, de Zika ou de chikungunya ont réalisé des incursions dans les pays européens, provoquant des infections humaines autochtones. Les hôtes vertébrés sensibles et les vecteurs compétents peuvent interagir, dans des conditions environnementales et climatiques appropriées, pour provoquer des épidémies. Les connaissances sur la compétence vectorielle des espèces autochtones et leur répartition restent cependant limitées. En tant que telles, les espèces thermophiles incapables d'hiverner sont moins susceptibles de s'établir dans les pays du nord de l'Europe, car l'isotherme annuel baisse au gré de la septentrionalisation. À l'heure actuelle, *Aedes albopictus* est considéré comme le vecteur des foyers autochtones de dengue et de chikungunya en France. Si la compétence vectorielle des espèces invasives est largement étudiée, seules quelques études sont disponibles sur la compétence des espèces autochtones. Les moustiques autochtones compétents pourraient avoir le potentiel de contribuer ou de provoquer des épidémies locales, s'ajoutant au risque lié aux espèces envahissantes.

Dans ce travail bibliographique, nous avons étudié la compétence des vecteurs pour le virus de la dengue (DENV), le virus Zika (ZIKV), le virus chikungunya (CHIKV), le virus du Nil occidental (WNV) et le virus Usutu (USUV) en fonction de la répartition géographique des moustiques dans huit pays d'Europe occidentale (France hors Corse, Belgique, Allemagne, Royaume-Uni, Irlande, Pays-Bas, Luxembourg et Suisse).

Résultats et discussion : La France métropolitaine possède une faune culicidienne composée de 57 espèces recensées sur le territoire, ce qui en fait le pays le plus riche en biodiversité pour les moustiques. Neuf espèces sont ubiquitaires dans la zone d'étude : *Aedes cinereus* (ou *Ae. geminus*), *Aedes cantans*, *Aedes punctor*, *Aedes rusticus*, *Anopheles claviger s.s.*, *Anopheles plumbeus*, *Coquillettidia richiardii*, *Culex pipiens s.l.* et *Culiseta annulata*.

La compétence vectorielle de cinq espèces d'*Aedes* et de trois espèces de *Culex* a été caractérisée par des infections expérimentales. Pour les espèces du genre *Aedes*, deux sont

compétentes pour DENV (*Aedes japonicus japonicus* et *Aedes detritus*), trois sont compétentes pour CHIKV (*Aedes japonicus japonicus*, *Aedes caspius*, *Aedes detritus*), deux pour le ZIKV (*Aedes japonicus japonicus*, *Aedes albopictus*) et deux sont compétentes pour WNV (*Aedes japonicus japonicus*, *Aedes detritus*). Pour les espèces du genre *Culex*, les trois espèces considérées (*Culex modestus*, *Culex pipiens*, *Culex torrentium*) sont compétentes pour transmettre le WNV. Seule la compétence de *Culex pipiens* pour USUV a été caractérisée.

Discussion : L'Europe du Nord-Ouest est à risque d'arbovirus émergents ou réémergents. À ce jour, *Ae. albopictus* et *Ae. japonicus* sont les principales espèces qui pourraient représenter un risque de transmission des arbovirus considérés dans notre zone d'intérêt. En effet, les populations autochtones d'*Ae. albopictus* et *Ae. japonicus* peuvent transmettre les CHIKV, DENV, ZIKV.

Ce travail met en évidence que les espèces envahissantes représentent les candidats les plus probables pour la circulation du CHIKV, du DENV et du ZIKV dans notre zone d'intérêt. À ce jour, deux espèces invasives sont établies dans notre région : *Ae. Albopictus* et *Ae. japonicus*. *Aedes albopictus* a été introduit pour la première fois en France en 2000 et est établi depuis 2004. Il est maintenant répandu et abondant dans le sud du pays. Il est également signalé comme établi dans le nord-est de la France, en Allemagne, en Suisse, aux Pays-Bas ainsi qu'en Belgique et au Royaume-Uni. De même, *Ae. japonicus* est bien établi en Belgique, en France, au Luxembourg, en Allemagne, aux Pays-Bas et en Suisse. Autre espèce pouvant bientôt être introduite en France métropolitaine, *Ae. koreicus* est implantée en Allemagne, en Suisse et en Belgique. Alors que les espèces invasives profitent de la mondialisation (transport accru des biens et des personnes) pour se développer, les espèces indigènes connaissent également des bouleversements écologiques et contribuent à augmenter le risque d'émergence d'arboviroses. Ces dernières années, *An. plumbeus* a ajouté à ses sites strictement naturels de reproduction des sites artificiels (105), ce qui a conduit à considérer son rôle potentiel en tant que vecteur du WNV.

Alors que la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* pour les cinq virus considérés dans cette étude a été largement examinée, les moustiques indigènes européens (*Anopheles*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Uranotaenia*) ont été peu étudiés. Le rôle des espèces ornithophiles, telles que *Cs. morsitans*, et les espèces opportunistes (les moustiques qui piquent aussi bien les mammifères que les oiseaux ou même les amphibiens) comme *An. plumbeus* ou *Ae. geniculatus*, est encore inconnue, en particulier dans la transmission de l'USUV et du WNV.

Anopheles plumbeus, cependant, a été testé compétent pour WNV et *Ae. geniculatus* pour CHIKV et WNV.

Pour l'USUV et le WNV, l'enchevêtrement des populations de moustiques avec les populations aviaires est nécessaire pour maintenir le cycle enzootique. Les dernières années ont montré une forte augmentation des cas de WNV. Bien que des criblages sérologiques et moléculaires soient régulièrement effectués dans les populations humaines et aviaires, l'analyse des populations de moustiques est moins systématique. De plus, les anticorps anti-WNV sont plus répandus chez les oiseaux migrateurs, tandis que les USUV sont plus répandus chez les oiseaux résidents. L'USUV est plus fréquemment retrouvé chez les moustiques que le WNV.

Ces récents épisodes rappellent nos lacunes dans nos connaissances sur la compétence vectorielle des espèces indigènes et envahissantes telles que qu'*Ae. vexans*, *Ae. japonicus* et d'autres espèces d'*Aedes* pour ZIKV, CHIKV et DENV; *Anopheles plumbeus*, *Ae. geniculatus*, *Cs. annulata* et *Cx. torrentium* pour USUV et WNV. À l'avenir, il conviendrait de surveiller les espèces autochtones qui pourraient devenir préoccupantes si leur compétence vectorielle était démontrée pour ces virus.

5.2. Détection sur les populations sauvages

Les screenings effectués dans le cadre de cette thèse (97 pools regroupant 1671 individus) se sont tous révélés négatifs. Cependant, les faibles effectifs des lots analysés ne permettent pas d'exclure une circulation à bas bruit du virus Usutu dans la région.

5.3. Résultats des infections expérimentales

Les expérimentations de compétence vectorielle des moustiques autochtones du nord de la France pour le WNV nécessitent une expérimentation complémentaire (titrage des abdomens de *Cx. pipiens* ardennais à refaire pour vérification des taux d'infection). Les expérimentations concernant USUV n'ont malheureusement pas encore abouti, du fait d'un problème de taille rencontré avec les cellules utilisées pour le titrage. Le titrage de virus nécessite une bonne permissivité des cellules utilisées, ainsi qu'une bonne reproductibilité. Malheureusement, les titrages préliminaires effectués sur les cellules dont nous disposons (cellules Vero CCL81) montrent une différence de deux logs entre le titre viral théorique et le titre retrouvé. Nous avons essayé de changer de cellules, mais les résultats ne sont pas constants. Afin de ne pas perdre les données des infections par USUV sur les populations d'*Anopheles* et de *Culex*, nous allons réaliser la recherche du virus dans les différents compartiments du moustique (abdomen, thorax, tête et salive) par RT-PCR. Bien que cette méthode ne puisse nous donner d'information sur l'infectivité du virus retrouvé dans les différentes structures anatomiques, nous pourrons tout de même évaluer sa dissémination et sa transmission par nos échantillons. Les données issues des manipulations concernant le WNV sont détaillées dans l'article 3.

Article 3 en préparation pour soumission à Plos Neglected Tropical Diseases : West-Nile virus vector competence of Northern France populations of *Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* and *Culex pipiens*.

West-Nile virus vector competence of northern France populations of *Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* and *Culex pipiens*

Jean-Philippe Martinet^{1,2}, Marie Vazeille¹, Laurence Mousson¹, Chloé Bohers¹, Hubert Ferté^{2,3}, Jérôme Depaquit^{2,3}, Anna-Bella Failloux^{1,*}

¹Département de Virologie, Arbovirus et Insectes Vecteurs, Institut Pasteur, Paris, France

² Université de Reims Champagne-Ardenne, Faculté de Pharmacie, SFR Cap Santé, EA7510 ESCAPE – USC VECPAR, Reims, France

³ CHU de Reims, Hôpital Maison-Blanche, Laboratoire de Parasitologie, Reims, France

* corresponding author: Anna-Bella Failloux

E-mail: anna-bella.failloux@pasteur.fr

Abstract: West Nile virus (WNV) is a reemerging virus in mainland France where it is transmitted by *Culex modestus* and *Culex pipiens* mosquitoes. From its first detection in the Camargue region in 1964 and its return in 2000, WNV has extended its geographical distribution causing more and more cases in animals and humans. Although avian migratory routes and resting sites are present in the Grand-Est region, neither introduction nor circulation of WNV have ever been assessed. Whereas vector competence of *Cx. pipiens* populations from southern France is more documented, no data related to the vector competence of mosquito populations from northern France is available. We aim to test the hypothesis that the absence of vector competence of local mosquitoes could explain the absence of WNV in northern France. We collected populations of autochthonous mosquitoes (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* and *Culex pipiens*) in order to assess their vector competence for WNV. *Aedes rusticus* showed transmission as soon as seven days post-infection. If *Anopheles plumbeus* showed no transmission of WNV, two *Cx. pipiens* populations showed contrasted results. More studies on autochthonous mosquitoes from northern France is requested to improve our knowledge on the risk of emergence of WNV in temperate regions in Europe.

Author contributions: Conceptualization: JPM, MV, JD, HF, ABF; Investigation JPM, MV, LM, CB; Supervision: MV, ABF; Writing – Original Draft Preparation: JPM; Writing – Review & Editing: JPM, MV, LM, CB, HF, JD, ABF.

Introduction:

West-Nile virus (WNV) is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* and the family *Flaviviridae* (1). It belongs to the Japanese encephalitis antigenic complex and circulates between birds and mosquitoes of the *Culex* genera. The first detection of WNV in mainland France occurred in 1962 in the region of Camargue, in horses presented neurological disorders. WNV infection was first characterized in 1964 with isolation of the virus from *Culex modestus* mosquitoes and humans, and the virus circulated in southern France from 1964 to 1965 (2, 3). Between 1965 and 2000, only sporadic traces of WNV have been found. In September 2000, two cases of WNV equine encephalitis were reported (4). From September to November, a total of 131 horses presenting neurologic disorder led to 76 laboratory confirmed cases of WNV. Phylogenetic analysis showed that the circulating viral strain was belonging to the lineage 1 (4). WNV has since caused epidemics in southern France in 2003, 2004 and 2006 followed by a period of silence. In 2015, WNV re-emerged in the Camargue region, with 49 infected horses reported, and circulation of WNV was found in 2015, 2018 and 2019 (5). From the beginning of WNV circulation in mainland France, no trace of the virus was found outside of the southern area (Eastern Pyrenees, Hérault, Gard, Vaucluse, Var, Bouches du Rhône, Alpes maritimes and Corsica). Vectors involved in the viral circulation appears to be *Culex modestus* and *Culex pipiens*, the two most abundant mosquitoes in this area during summer (6). To date, northern France seems to be spared from WNV circulation. North-eastern France is on a migration route of birds and has several biotopes that could host these birds on their journey. If *Culex modestus* has not yet been found in this area (personal communication), *Culex pipiens* is well established and becomes abundant from June to October (7). As migrating birds can import WNV in the area, we hereby evaluate whether the absence of circulation of WNV is due to a low or null vector competence of local mosquitoes. We assessed vector competence of four populations belonging to three mosquito species (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* and *Culex pipiens*) captured in the field in north-eastern France for WNV lineage 1a.

Methods:

Ethics statement

The Institut Pasteur animal facility has received accreditation from the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live animals in compliance with the French and European regulations on care and protection of laboratory animals. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the Institut Pasteur. No specific permits were required for the described field studies in locations which are not protected in any way and did not involve endangered or protected species.

1. Mosquito collection and rearing

a. *Aedes rusticus*

Immature stages of *Ae. rusticus* (stage IV larvae) were collected in March 2020 in the Berru (Marne) locality. Larvae disposed in vials were transferred to the Institut Pasteur insectaria where batches of 200 individuals were set in pans, fed with yeast and left at 22°C, 60% relative humidity (RH). Every couple of days, pupae were transferred in cages for emergence. Emerged adults were fed on solutions of 10% sucrose *ad libitum* and left in cages for 10 days. F₀ was used for the experiment.

b. *Anopheles plumbeus*

Adults *Anopheles plumbeus* were captured in May 2020 in the vicinity of Beaumont-sur-Vesle (Marne) with mouth-capturators using the human-landing techniques. Individuals were transferred in cages to the Institut Pasteur insectaria at 22°C, 60% RH. F₀ were allowed to feed on mice according to our protocol. Pans with floating foam were disposed in cages in order to allow engorged specimen to lay eggs. Eggs were transferred in pans and stage I to IV larvae fed with yeast. Every couple of days, pupae were transferred in cages for emergence. Emerged adults were fed on solutions of 10% sucrose *ad libitum* and left in cages for 10 days. The F₂ was used for the experiment.

c. *Culex pipiens*

The *Cx. pipiens* populations used in this study was originated from two different locations. First, larvae of *Cx. pipiens* from Machault (Ardennes) were collected in September 2018. As the number of individuals was too low to perform direct experiments, F₀ were allowed to feed on mice according to our protocol. Eggs rafts were set in pans and stage I to IV larvae fed with cat food. Emerged adults were fed on solutions of 10% sucrose *ad libitum* and left in cages for 10 days. The F₃ was used for the experiment. Secondly, hibernating gravid females of *Cx. pipiens* were captured with mouth aspirators in a hibernating site in Verzy (Marne). Individuals

were transferred in cages to the Institut Pasteur insectaria at 22°C, 60% RH. Gravid females were allowed to lay eggs. Egg rafts were set in pans and stage I to IV larvae fed with cat food. Every couple of days, pupae were transferred in cages for emergence. Emerged adults were fed *ad libitum* on 10% sucrose solution and left in cages for 10 days. The F₂ was used for the experiment. Details about mosquito collection site are available in Figure 1 and Table 1.

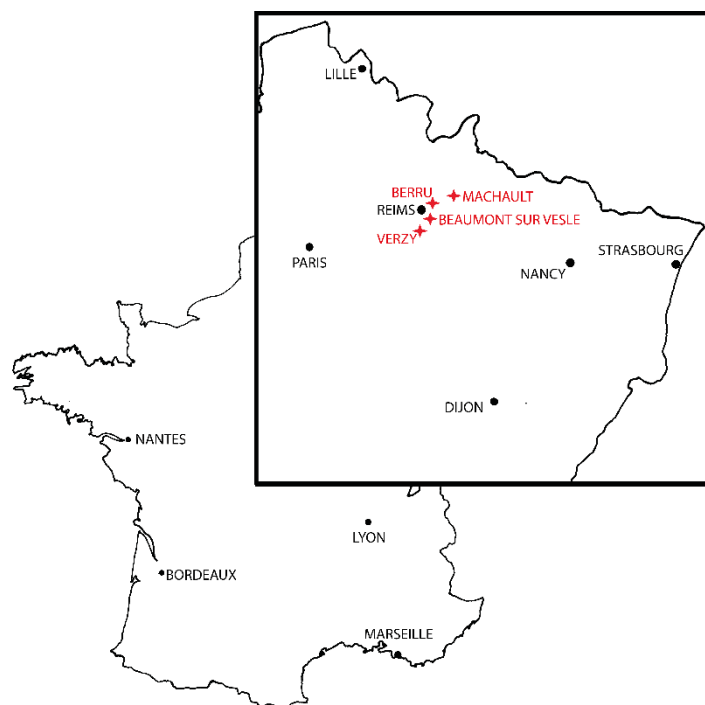


Figure 1: Sampling map of mosquito populations

Species	Collection site	Date of collection	Stage of collection	Generation used
<i>Ae. rusticus</i>	Berru	3/8/2020	Larvae	F ₀
<i>An. plumbeus</i>	Beaumont/Vesle	5/26/2020	Imago	F ₂
<i>Cx pipiens</i>	Machault	9/5/2018	Larvae	F ₃
<i>Cx. pipiens</i>	Verzy	10/28/2019	Imago	F ₂

Table 1: Details of mosquito populations

2. Mosquito preparation:

Seven to ten days-old females were starved for 24 hours prior to experiment in the BSL3 facility. They were maintained in a climatic chamber at 25°C, 80% RH on a 12h:12h photoperiod.

3. Virus preparation:

After isolation and passages on Vero cells, WNV isolated from an equine case (8) was produced on C6/36 mosquito cells. Aliquots were stocked at -80°C for further use.

4. Experimental infection:

Females were exposed to an infectious blood-meal containing 1.4 mL of washed rabbit erythrocytes (New Zealand White rabbit, Charles River) collected the day before experiment and 700 µL of viral suspension supplemented with a phagostimulant (ATP) at a final concentration of 5 mM. For each population, 4–6 boxes of 60 mosquitoes each were exposed to the WNV (strain 1a) using Hemotek[®] system. The titer of infectious blood-meals was 10^{6.4} Plaque Forming Unit/mL (PFU/mL). After the infectious blood-meal, engorged females were anesthetized by cold, transferred to small containers and fed with 10% sucrose in a chamber maintained at 25°C, 80% RH on a 12h:12h photoperiod until dissection at planned days post-infection (dpi).

Infection, dissemination and transmission analysis:

For each population, batches of 20 to 24 mosquitoes were analyzed. For each dpi, Infection Rate (IR), Dissemination Rate (DR) and Transmission Rate (TR) were determined. Infection Rate is the proportion of females with infected abdomens. Dissemination Rate is the proportion of females in which the virus may have crossed the anatomic barrier of the midgut and is present in the general cavity. The Transmission Rate is the proportion of mosquitoes in which infective particles of virus can be found in the saliva. In order to assess these parameters, abdomen, thorax and head were individually ground in 300 µL of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS). Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 5 min and supernatant was stored at -80°C for further use. For salivation, mosquitoes were anesthetized, wings and legs removed, and the proboscis was inserted into a 20 µL tip containing 5 µL of FBS. After 20-30 min, FBS containing saliva was expelled in 0.2 mL tubes containing 45 µL of DMEM for titration.

As our mosquito populations originated from the field and were struggling with laboratory conditions such as depressurized atmosphere, we had to adapt our protocols to optimize the data collection.

Due to extra mortalities after the infectious blood meal, *Ae. rusticus* population was examined at only 7 dpi. *Anopheles plumbeus* population was analyzed at 7, 14 and 20 dpi. *Culex pipiens* originated from the Ardennes and Marne were analyzed at 10 and 14 dpi and 7 and 14 dpi respectively.

Virus titration:

Samples were titrated by the plaque forming unit method (PFU). Shortly, tenth-fold dilutions were distributed on six wells plates containing monolayers of Vero cells (CCL81) with several. The plates were incubated five days at 37°C, then the inoculum was removed, and the cells were fixed and stained using a safranin solution (0.5% in 10% formaldehyde and 10% ethanol). After washing, we looked for the presence of cytopathic effect.

Results:

a) Aedes rusticus

The feeding rate for *Ae. rusticus* was 47%. At 7 dpi, 30 females were analyzed for IR, DR and TR. Fifty percent of the mosquitoes (N=15) showed infected abdomens (IR=50%). On these infected specimens, four individuals showed viral dissemination (DR=13%). Virus was detected in the saliva of two individuals (TR=7%), showing effective transmission of WNV at 7 dpi. Data for IR, DR and TR are summarized in Figure 2.

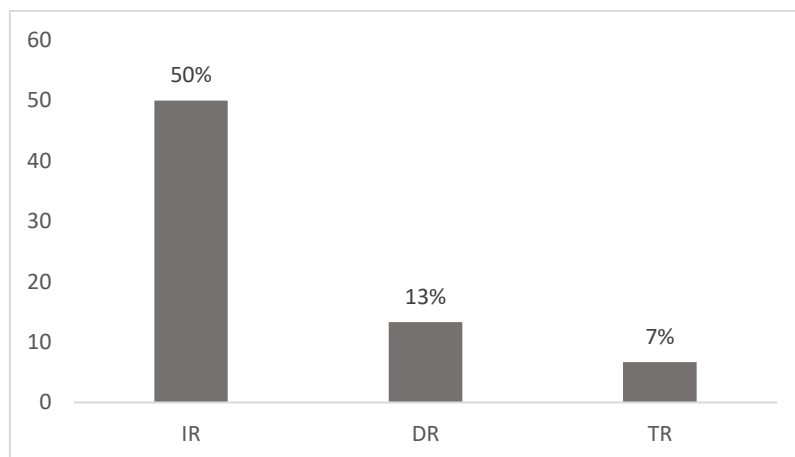


Figure 2: Infection Rate, Dissemination Rate and Transmission rate of WNV for *Aedes rusticus* at 7 dpi.

b) Anopheles plumbeus

Anopheles plumbeus showed a feeding rate of 79%. At 7 dpi, 21 females were analyzed versus 22 at 14 dpi and 17 at 20 dpi. Infection and Dissemination Rates were higher at 14 dpi than at 7 or 20 dpi (33% and 18% respectively). No transmission was observed for this species (Figure 3).

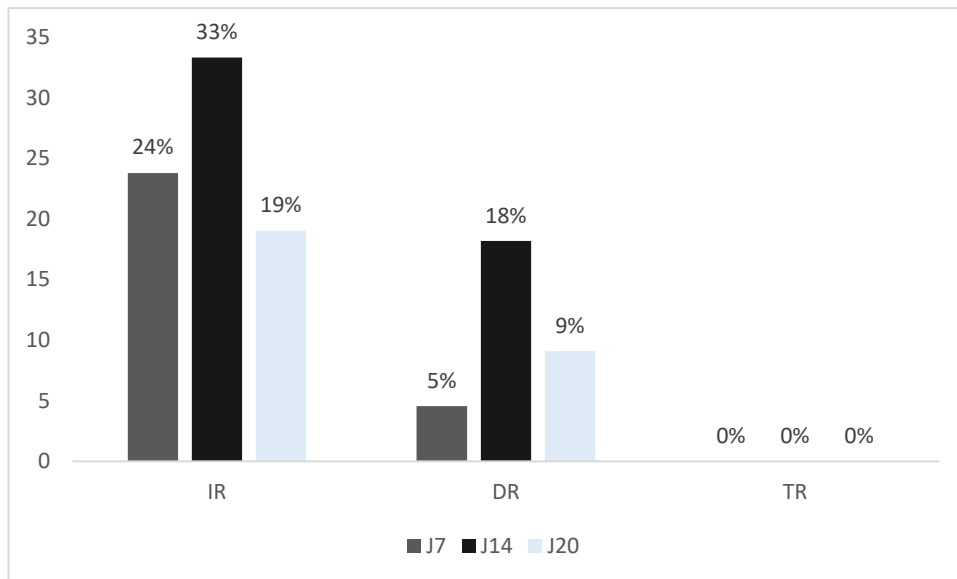


Figure 3: Infection Rate, Dissemination Rate and Transmission rate of WNV for *An. plumbeus* at 7, 14 and 20 dpi.

c) *Culex pipiens*

A total of 64 individuals were analyzed in the *Culex pipiens* population from Ardennes. At 10 dpi, 19% of the mosquitoes were infected and capable of viral dissemination and 24% at 14 dpi. At 10 dpi, one saliva were infectious versus two salivas at 14 dpi (Figure 4).

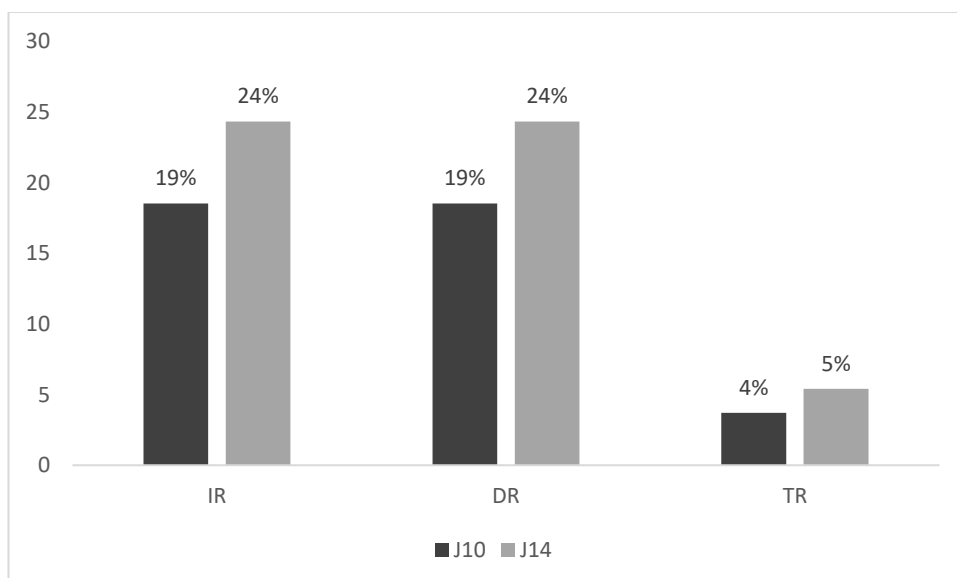


Figure 4 : Infection Rate, Dissemination Rate and Transmission rate of WNV for *Cx. pipiens* from Ardennes at 10 and 14 dpi.

For the *Cx. pipiens* mosquitoes originating from Marne, 14 females were analyzed at 7 dpi and 26 at 14 dpi. None of the specimens dissected at 7 dpi showed signs of infection. At 14 dpi, only two females were found infected, but no dissemination was found.

Discussion:

We assessed vector competence for four autochthonous populations and three species of north-eastern France (*Ae. rusticus*, *An. plumbeus* and *Cx. pipiens*).

Aedes rusticus is ubiquitous in northern France and is actually present in 8 countries of western Europe (9). This species is present from April to August and is a nuisance in forested areas as it is active all day in the shades. It is opportunistic, and can feed on man, mammals and birds (7). In our experiment, this species shows viral transmission as soon as 7 dpi indicating that the extrinsic incubation period (EIP) seems to be very short for this mosquito. In natural conditions, the poor vector competence of this species (TR 7%) could be compensated by the abundance of mosquitoes during the season and its opportunistic feeding behavior. Furthermore, the biotope of *Ae. rusticus* consists in forested areas and is in direct contact with bird populations of resting sites from the Grand-Est region (personal observation). The introduction of WNV via its reservoir in those areas could lead to the carriage of this virus by *Ae. rusticus*, and can cause local outbreaks which can be undetected. Due to its feeding behavior and vector competence, it could be considered as a neglected bridge species for the transmission of WNV. *Ae. rusticus* is the fourth *Aedes* species of north-eastern Europe competent to WNV (*Ae. caspius*, *Ae. detritus* and *Ae. japonicus*)(10-12). Concerning field data, we found no evidence of field-captured infected individuals in the literature (9).

Anopheles plumbeus is present in northern Europe where it was a local vector for the transmission of malaria (13). It is present from late spring to the end of September, and females are persistent biters feeding mostly on mammals (14). This species has been tested as competent for the transmission of WNV in Vermeil in 1960 (15). As knowledge on WNV lineages was quite limited in the 1960s, the identity of WNV lineage used was unclear but several data lean for a WNV strain of lineage 2 collected in Uganda (16). We found contradictory results; *An. plumbeus* was not competent for WNV1. More knowledge is required to determine the status of *An. plumbeus*. If competent, the risk for WNV to reach the northern regions of France is real (5). Screenings performed on *An. plumbeus* in Germany in 2007-2008 showed no evidence of WNV infected specimens (17).

Culex pipiens populations used in this work were collected in two different environments. *Culex pipiens* from Ardennes was collected in a rural area, at proximity of human habitations and domestic animals. The population from Marne was collected in a sylvatic environment often

visited by hikers. To our knowledge, no nuisance from this species in both sites, was reported. This is the first experiment using *Culex* populations from northern France beside mosquitoes from southern France where more data are available (12, 18). Populations from west-European countries (Germany, The Netherlands, Switzerland, United-Kingdom) were found experimentally capable to transmit WNV (19-22). Furthermore, circulation of WNV in Germany has been reported in 2018 (23). We found variable levels of competence of these populations for WNV (TR of 5%-6% for *Cx. pipiens* from Ardennes and 0% *Cx. pipiens* from Marne) highlighting the need for further investigations. As the capture sites are only 40 km apart, we suggest that WNV transmission depends on the mosquito population. Therefore, a finer sampling of *Culex* populations will help us in defining the risk of emergence of WNV in regions beyond Southern France where WNV is more actively detected.

References:

1. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods*. 2007;146(1-2):355-8.
2. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;951:117-26.
3. J.P. HCPRMJE. Isolement en France du virus West-Nile à partir de malades et du vecteur *Culex modestus* Ficalbi. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1964;259:2.
4. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(4):692-6.
5. Beck C, Leparac Goffart I, Franke F, Gonzalez G, Dumarest M, Lowenski S, et al. Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens*. 2020;9(11).
6. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(5):643-50.
7. Schaffner E. AG, Geoffroy Bernard, Hervy Jean-Paul, Rhaïem A., Brunhes Jacques. The mosquitoes of Europe : an identification and training programme. In: Paris (FRA) ; Montpellier : IRD ; EID, 1 CD ROM (Didactiques). ISBN 2-7099-1485-9, editor.: IRD/EID; 2001.
8. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(4):692-6.
9. Martinet JP, Ferte H, Failloux AB, Schaffner F, Depaquit J. Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review. *Viruses*. 2019;11(11).
10. Veronesi E, Paslaru A, Silaghi C, Tobler K, Glavinic U, Torgerson P, et al. Experimental evaluation of infection, dissemination, and transmission rates for two West Nile virus strains in European *Aedes japonicus* under a fluctuating temperature regime. *Parasitol Res*. 2018;117(6):1925-32.
11. Blagrove MS, Sherlock K, Chapman GE, Impoinvil DE, McCall PJ, Medlock JM, et al. Evaluation of the vector competence of a native UK mosquito *Ochlerotatus detritus* (*Aedes detritus*) for dengue, chikungunya and West Nile viruses. *Parasit Vectors*. 2016;9:452.
12. Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, Schaffner F, Zeller H, Reiter P, et al. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(5):589-95.
13. Kruger A, Rech A, Su XZ, Tannich E. Two cases of autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous *Anopheles plumbeus*. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2001;6(12):983-5.
14. Becker NP, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Madon, M.B.; Dahl, C.; Kaiser, A. Mosquitoes and Their Control. 2nd ed. Heidelberg 2010.
15. Vermeil C. LJ, Reeb E. Survival and transmission of West Nile virus by various arthropods. *Bull Soc Pathol Exot*. 1960;53:300-6.
16. Dekoninck W, Hendrickx F, Vasn Bortel W, Versteirt V, Coosemans M, Damiens D, et al. Human-induced expanded distribution of *Anopheles plumbeus*, experimental vector of West Nile virus and a potential vector of human malaria in Belgium. *J Med Entomol*. 2011;48(4):924-8.
17. Timmermann U, Becker N. Mosquito-borne West Nile virus (WNV) surveillance in the Upper Rhine Valley, Germany. *J Vector Ecol*. 2010;35(1):140-3.
18. Balenghien T, Vazeille M, Reiter P, Schaffner F, Zeller H, Bicout DJ. Evidence of laboratory vector competence of *Culex modestus* for West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc*. 2007;23(2):233-6.
19. Fros JJ, Geertsema C, Vogels CB, Roosjen PP, Failloux AB, Vlak JM, et al. West Nile virus: High transmission rate in north-western European mosquitoes indicates its epidemic potential and warrants increased surveillance. *Plos Neglect Trop Dis*. 2015;9(7):e0003956.

20. Vogels CBF, Goertz GP, Pijlman GP, Koenraadt CJM. Vector competence of northern and southern European *Culex pipiens pipiens* mosquitoes for West Nile virus across a gradient of temperatures. *Med Vet Entomol.* 2017;31(4):358-64.
21. Wagner S, Mathis A, Schonenberger AC, Becker S, Schmidt-Chanasit J, Silaghi C, et al. Vector competence of field populations of the mosquito species *Aedes japonicus japonicus* and *Culex pipiens* from Switzerland for two West Nile virus strains. *Med Vet Entomol.* 2018;32(1):121-4.
22. Leggewie M, Badusche M, Rudolf M, Jansen S, Börstler J, Krumkamp R, et al. *Culex pipiens* and *Culex torrentium* populations from Central Europe are susceptible to West Nile virus infection. *One health* (Amsterdam, Netherlands). 2016;2:88-94.
23. Ziegler U, Lühken R, Keller M, Cadar D, van der Grinten E, Michel F, et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Res.* 2019;162:39-43.

Résumé de l'article N°3 :

Introduction : Le virus du Nil occidental (WNV) est un arbovirus appartenant au genre *Flavivirus* et à la famille des *Flaviviridae*. Il appartient au complexe antigénique de l'encéphalite japonaise et circule entre les oiseaux et les moustiques du genre *Culex*. La première apparition du WNV en France métropolitaine a eu lieu en 1962 dans la région de Camargue, lorsque les chevaux présentaient des troubles neurologiques. Cependant, l'infection par le VNO a été caractérisée pour la première fois en 1964 par l'isolement du virus des moustiques *Culex modestus* et des humains, et le WNV a circulé dans le sud de la France de 1964 à 1965. Entre 1965 et 2000, seules des traces sporadiques du WNV ont été trouvées. En septembre 2000, deux cas d'encéphalite équine à WNV ont été signalés. De septembre à novembre, un total de 131 chevaux présentant un trouble neurologique a conduit à 76 cas confirmés de WNV en laboratoire. L'analyse phylogénétique a montré que la souche virale circulante appartenait à la lignée 1. Le WNV a depuis provoqué des épidémies dans le sud de la France en 2003, 2004 et 2006 avant d'entrer en pause. En 2015, le WNV est réapparu en Camargue, avec l'infection de 49 chevaux. Une circulation a été observée en 2015, 2018 et 2019. Dès le début de la circulation du virus en France métropolitaine, aucune trace de lui n'a été retrouvée en dehors de la zone sud (Pyrénées-Orientales, Hérault, Gard, Vaucluse, Var, Bouches du Rhône, Alpes maritimes et Corse). Les vecteurs impliqués dans la circulation virale semblent être *Culex modestus* et *Culex pipiens*, les deux moustiques les plus abondants dans cette zone pendant l'été. À ce jour, le nord de la France semble épargné par la circulation du WNV. Cependant, son émergence à des latitudes équivalentes aux nôtres comme en Allemagne en 2018 peut nous alerter sur le fait qu'une émergence du WNV pourrait être possible dans le nord de la France. Le nord-est de la France est sur une route de migration des oiseaux et dispose de plusieurs biotopes qui pourraient accueillir ces oiseaux lors de leur migration. Si nous n'avons personnellement n'a pas encore trouvé *Culex modestus* dans cette zone, *Culex pipiens* est bien implanté et apparaît abondant de juin à octobre. Comme les oiseaux migrateurs peuvent importer le virus dans la zone, nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle l'absence d'émergence virale est due à un manque de compétence vectorielle des moustiques locaux. Nous avons évalué la compétence des vecteurs pour trois espèces de moustiques (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* et *Culex pipiens*) capturées sur le terrain dans le nord-est de la France pour la lignée 1 du WNV.

Résultats : À 7 jours post-infection, 30 femelles d'*Aedes rusticus* ont été analysées pour la mesure des taux d'infection, de dissémination et de transmission. Cinquante pour cent des moustiques (N = 15) présentaient des abdomens infectés (IR = 50%). Sur ces spécimens infectés, quatre individus ont montré une dissémination (DR = 13%). Des effets cytopathogènes ont été observés dans la salive de deux individus (TR = 7%), montrant une transmission efficace du WNV à 7 jours post-infection.

Anopheles plumbeus a montré un taux de gorgement de 79%. À 7 jours post-infection, 21 femelles ont été analysées contre 22 à 14 jours et 17 à 20 jours post-infection. Les taux d'infection et de dissémination étaient plus élevés à 14 jours qu'à 7 ou 20 jours post-infection (33% et 18% respectivement). Aucune transmission n'a été observée pour cette espèce.

Au total, 64 individus ont été analysés dans la population de *Culex pipiens* originaire des Ardennes. À 10 jours post-infection, 19% des moustiques ont montré des signes d'infection et de dissémination, 24% à 14 jours. À 10 jours post-infection, une salive a provoqué un effet cytopathique sur les cellules Vero, et deux salives à 14 jours post-infection.

Pour le *Cx. pipiens* originaires de la Marne, 14 femelles ont été analysées à 7 jours post-infection et 26 à 14 jours. Aucun des échantillons analysés à 7 jours n'a montré de signes d'infection. À 14 jours, seules deux femelles ont été trouvées infectées, mais aucune dissémination n'a été trouvée.

Discussion : Nous avons évalué la compétence vectorielle pour quatre populations de trois espèces de populations de moustiques autochtones du nord-est de la France (*Ae. rusticus*, *An. plumbeus* et *Cx. pipiens*).

Aedes rusticus est omniprésent dans le nord de la France et est actuellement présent dans 8 pays d'Europe occidentale. Cette espèce est présente d'avril à août et est une nuisance dans les zones boisées car elle est active toute la journée. Elle est opportuniste et peut piquer homme, mammifères et oiseaux. Dans nos expérimentations, cette espèce montre des signes de transmission virale dès 7 jours après infection. Bien que les titres viraux dans la salive ne soient pas élevés, la période d'incubation extrinsèque semble très courte pour ce moustique. Dans des conditions naturelles, la faible compétence vectorielle de cette espèce pourrait être compensée par l'abondance des moustiques pendant la saison et son mode d'alimentation qui s'est révélé très opportuniste. De plus, le biotope d'*Ae. rusticus* est constitué de zones boisées et est en contact direct avec les populations d'oiseaux des aires de repos de la région Grand-Est (observation personnelle). L'introduction du WNV via son réservoir dans ces zones pourrait

entraîner le portage de ce virus par les populations d'*Ae. rusticus*, et peut provoquer des épidémies locales qui pourraient ne pas être détectées. En raison de son comportement alimentaire et de sa compétence vectorielle, cette espèce pourrait être considérée comme une « bridge species » pour la transmission du WNV. Il s'agit de la quatrième occurrence de compétence vectorielle pour le WNV par les espèces du genre *Aedes* du nord-est de l'Europe avec *Ae. caspius*, *Ae. detritus* et *Ae. japonicus*.

Anopheles plumbeus est présent dans le nord de l'Europe où il était un vecteur local de transmission du paludisme. Il est présent de la fin du printemps à la fin septembre, et les femelles sont des piqueuses persistantes qui se gorgent principalement sur mammifères. Cette espèce a été testée comme compétente pour la transmission du WNV par Vermeil en 1960. Comme dans les années 60, une faible connaissance des lignées de WNV était disponible, nous ne pouvons pas être sûrs de la lignée utilisée dans cette expérience. Comme décrit dans l'article, la souche virale a été obtenue auprès du Dr Haddow. Une recherche documentaire dans le «Bulletin de la Société de Pathologie Exotique» montre que le Dr Haddow était en poste en Ouganda à l'époque, et nous supposons que la souche virale provenait de là. D'autres articles de ce journal montrent plus de détails sur la souche virale (par exemple, le nombre de passages sur des souris). Sur la base de ces éléments, on peut s'attendre à ce que la souche virale appartienne à la lignée 2. Comme il s'agit du seul article disponible sur la compétence vectorielle d'*An. plumbeus* pour le WNV, il est cité dans les travaux de préparation où le risque d'émergence du WNV est évalué. L'absence de compétence vectorielle pour *An. plumbeus* pour WNV1 dans notre expérience ne peut infirmer les conclusions de Vermeil. Si la compétence d'*An. plumbeus* pour WNV2 était avérée, cela deviendrait une préoccupation certaine car cette lignée a été retrouvée en circulation en France métropolitaine en 2018. En effet, avant 2018, les émergences du WNV en France métropolitaine ont toutes été imputées à la lignée 1.

Les populations de *Culex pipiens* utilisées dans ce travail ont été collectées dans deux environnements différents. Les *Culex pipiens* des Ardennes ont été collectés dans une zone rurale, avec une présence humaine et animale concomitante. La population de la Marne a été collectée en milieu selvatique avec occasionnellement des activités humaines telles que la randonnée. Dans les deux sites, aucune nuisance due à cette espèce n'a été signalée à notre connaissance. Ces deux populations ont des compétences vectorielles différentes pour le WNV, avec une compétence limitée pour la population ardennaise et absente pour la population marnaise. La compétence variable de ces populations pour la transmission du WNV nous montre la nécessité de poursuivre les recherches sur cette espèce dans le nord de la France. Les

sites de capture étant distants de seulement 40 km, nous constatons ici que la transmission du WNV est très dépendante de la population de moustiques. Par conséquent, les expériences de compétence vectorielle réalisées sur des populations provenant de sites éloignés doivent être prises en compte mais leurs résultats ne sont pas extrapolables à l'ensemble des populations.

Discussion et perspectives

Le travail présenté dans ce manuscrit est un travail préliminaire. En effet, il s'imbrique dans une dynamique d'acquisition de connaissances concernant une zone peu étudiée du point de vue de la transmission de virus par les moustiques, à savoir la région Grand-Est. Cette région peut sembler *a priori* de faible intérêt pour l'étude des compétences vectorielles. Elle n'est pas concernée par la circulation d'arboviroses telle que la dengue ou le chikungunya, contrairement au sud de la France où des cas de transmission autochtones pour ces deux virus ont déjà été rapportés. Elle semble exempte de circulation pour le West-Nile, du fait qu'aucun isolement n'a été effectué ni chez l'Homme, ni chez l'animal et ni chez de potentiels vecteurs. Pour ces pathogènes, leur émergence semble étroitement corrélée au climat méditerranéen. Cependant, la circulation au cours de ces six dernières années du virus Usutu a suscité dans la communauté entomologique un regain d'intérêt pour la France septentrionale. Ce virus, qui a émergé en Europe dans le début des années 2000, s'est répandu sur des territoires où les surveillances entomologiques semblaient peu justifiées. Son expansion foudroyante de 2018 est encore inexplicée. Si l'on ne peut pour l'instant pas appréhender ce virus dans la totalité de ses composantes épidémiologiques (réservoirs incriminés, mode de dispersion), le préalable pour identifier son vecteur est d'inventorier les espèces présentes dans la zone. Nous avons dans la limite de nos possibilités apporté une contribution à l'inventaire entomologique de la région. Nous avons pu observer l'expansion géographique d'espèces jusqu'alors peu recensées dans la région (*Anopheles plumbeus*, *Culex hortensis*) ayant certes des intérêts épidémiologiques variable pour les virus West-Nile et Usutu. Une fois identifiées les espèces en présence, nous avons choisi sur la base de la littérature ainsi que sur notre curiosité de terrain de tester la compétence vectorielle d'espèces peu étudiées (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus*). Ces expériences ont démontré une possible compétence vectorielle d'*Ae. rusticus*, espèce ubiquiste en Europe de l'Ouest, considérée certes comme une nuisance mais jamais évoquée comme possible vecteur. En revisitant 60 ans après les premières expérimentations de la compétence d'*Anopheles plumbeus*, nous voyons des différences de compétences possiblement dues aux caractéristiques des différentes souches virales employées, mais aussi possiblement dues aux différences entre les populations d'une même espèce.

Ces données préliminaires doivent d'être approfondies. En multipliant les populations de moustiques de différentes origines, en diversifiant les lignées virales avec lesquelles nous les

infectons, notre connaissance des cycles épidémiologiques possibles dans notre région se verront dévoilés peu à peu.

C'est l'objectif du projet ayant débuté en septembre dernier. Ce projet, MosquiTwo, financé par l'ANSES au sein d'un appel d'offre générique, a pour but d'évaluer la circulation naturelle ainsi que les compétences vectorielles de moustiques de la région (*Anopheles plumbeus*, *Culex pipiens*, *Culiseta annulata*) pour les virus West-Nile et Usutu. Ce projet de trois ans permettra de surveiller et d'évaluer la circulation avérée ou hypothétique de ces deux virus dans la région. Les outils utilisés seront les mêmes que ceux employés ici et avec des partenaires permettant notamment d'approfondir et de diversifier les captures sur le terrain. Les techniques de screenings par RT-PCR ainsi que les infections expérimentales restent des outils indispensables pour ce travail. Aussi la portabilité accrue d'appareillages permettant de faire du Next Generation Sequencing pourraient permettre de transposer cette technique de la paillasse au terrain, est d'augmenter la réactivité en cas de détection virale.

En Entomologie comme en Epidémiologie, Tout commence sur l'observation du terrain. Notre souhait est que ce projet permettra d'obtenir des éléments complémentaires sur le potentiel ou non de la circulation des virus West-Nile et Usutu dans le Grand-Est.

Conclusion

Les travaux d'inventaire menés dans le cadre de cette thèse ont permis de compléter les données de présence pour les moustiques de la région grand-est. En effet, une cartographie des espèces présentes dans la région permet dans le cadre d'un changement global d'être plus réactif dans le cadre d'une émergence éventuelle de virus zoonotiques.

Même si les travaux de screening n'ont pas permis de mettre en évidence la circulation silencieuse des virus WNV et USUV, nous ne pouvons exclure leur circulation au sein des moustiques autochtones. S'il semble peu probable que le virus West Nile circule à bas bruit, il n'en est pas de même pour le virus Usutu dont les caractéristiques épidémiologiques semblent très différentes de celle de West Nile, pourtant deux virus phylogénétiquement très proche du virus de l'encéphalite japonaise. Les vecteurs de ces deux virus sont présents et abondants au sein de notre zone d'étude, et les expérimentations d'infection menées sur ces populations de vecteurs ont permis de mettre à jour la compétence vectorielle de *Culex* et d'*Aedes* autochtones de notre région.

En ce qui concerne *Anopheles plumbeus*, les données obtenues au cours de ce travail peuvent sembler rassurantes. Cette espèce a été décrite comme compétente pour transmettre le virus West Nile au sein d'expérimentations menées dans les années 1960 (106). Or, ces expérimentations ne précisaient pas quelle lignée virale a été utilisée. Les expérimentations que nous avons menées ont été effectués avec la lignée 1a du virus, isolé lors d'un épisode de circulation virale en Camargue en 2000 (92). Il semblerait que la souche virale utilisée dans les expérimentations de Vermeil appartienne à la lignée 2, d'origine africaine. Cette notion de compétence vectorielle d'*An. plumbeus* a été considérée comme la possibilité de circulation du virus West Nile dans les pays septentrionaux tels que la Grande-Bretagne. Aussi nous pouvons émettre l'hypothèse d'une éventuelle compétence vectorielle de cette espèce pour la lignée 2 d'après les informations issues de la littérature. Si cette espèce ne peut pas transmettre de virus de la lignée 1, rien ne confirme l'absence de sa compétence vis à vis de ce virus *sensu lato* du fait ces dernières années de l'apparition d'une introgression de la lignée 2 du virus West Nile en France métropolitaine où historiquement ne circulait que la lignée 1. En raison de ses préférences tropicales et de son changement d'habitat vers des zones de plus en plus anthropisées, *Anopheles plumbeus* est une espèce qui mériterait d'être étroitement surveillée. Des expériences

complémentaires doivent être menées afin de d'affirmer ou d'infirmer sa compétence vectorielle vis-à-vis de la lignée 2 du virus West Nile.

C'est à notre connaissance la première mise en évidence de la compétence vectorielle d'*Aedes rusticus* pour WNV. Cette compétence peut être un facteur majeur dans la circulation du virus en raison des caractéristiques de cette espèce : abondance dans la région, tendance majoritairement forestière et son caractère hautement anthropophile. C'est une espèce opportuniste qui peut se gorger aussi bien sur les mammifères que les oiseaux, et donc peut servir de trait d'union entre les réservoirs aviaires et les populations humaines. Si sa compétence est faible vis à vis du virus, elle peut être contrebalancée par les gros effectifs présents au cours de la saison. Elle ne pique pas directement les réservoirs connus du WNV mais son comportement et sa faible sélectivité d'hôte au niveau du repas sanguin peuvent faire de cette espèce un vecteur secondaire du virus. Le fait majeur à retenir de la compétence vectorielle de cette espèce pour ce virus est sa faible période d'incubation extrinsèque qui réduit la période à 7 jours post infection. Le faible effectif de moustiques utilisé dans notre étude et la difficulté de maintenir ces populations en élevage au sein du laboratoire P3 nous incitent à reconduire des travaux sur cette espèce en espérant de disposer d'effectifs suffisants pour conduire une cinétique d'infection sur cette espèce et tester la compétence vectorielle de cette espèce vis-à-vis d'autres lignées du virus West Nile.

Une surveillance des populations d'*Ae. rusticus* aux confins du lac du Der-Chantecoq, spot de passage d'un grand nombre d'oiseaux migrateurs, va se justifier dans un futur proche suite aux possibilités d'introduction répétée de souches de virus West Nile sur le territoire métropolitain..

Concernant les compétences vectorielles des populations de *Culex* testées dans notre thèse, elles laissent apparaître une réceptivité variable des différentes populations au sein de la région Grand-Est. Cependant ces populations sont très présentes au cours des saisons estivales et, à notre connaissance, aucune opération de régulation n'est effectuée pour lutter contre leur nuisance. En effet nous sommes dans une région ne nécessitant pas la mise en place d'opérations systématiques de démoustication du fait de l'absence supposée d'espèces invasives vectrices de virus anthroponotiques. Concernant l'éducation des populations qui représente le premier axe de lutte anti vectorielle, ce volet mériterait à être amplifié en région Grand-Est.

Références

1. Succo T, Leparc-Goffart I, Ferre JB, Roiz D, Broche B, Maquart M, et al. Autochthonous dengue outbreak in Nimes, South of France, July to September 2015. *Euro Surveill.* 2016;21(21):5-11.
2. La Ruche G, Souares Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Despres P, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(39):19676.
3. Paty MC, Six C, Charlet F, Heuze G, Cochet A, Wiegandt A, et al. Large number of imported chikungunya cases in mainland France, 2014: a challenge for surveillance and response. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* 2014;19(28):20856.
4. Beck CL, S.;Lacour,S.; Moutailler,S.;Bournez, L.; Martin-Latil, S.; Leparc-Goffart,I. Virus de l'encéphalite à tique (TBEV) : Mise en évidence de cas humains en France liés à une contamination alimentaire, point sur le cycle de transmission de cette maladie et situation en Europe. Plateforme ESA: ESA; 2020 28/09/2020.
5. Schaffner F, Karch S. Première observation d'*Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en France métropolitaine. *Comptes Rendus Acad Sci.* 2000;323(4):373-5.
6. Delaunay P, Mathieu B, Marty P, Fauran P, Schaffner F. [Chronology of the development of *Aedes albopictus* in the Alpes-Maritimes Department of France, from 2002 to 2005]. *Med Trop (Mars).* 2007;67(3):310-1.
7. Krupa E, Schaffner F, Bender C, Mathieu B. Progression du moustique tigre en France : surveillance transfrontalière dans le Grand-Est. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2020;2020(524):53-61.
8. Authority ECfDPaCaEFS. Mosquito maps Stockholm: ECDC; 2020 [Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>].
9. Romi R, Sabatinelli G, Savelli LG, Raris M, Zago M, Malatesta R. Identification of a North American mosquito species, *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae), in Italy. *J Am Mosq Control Assoc.* 1997;13(3):245-6.
10. Beier JC, Travis M, Patricoski C, Kranzfelder J. Habitat segregation among larval mosquitoes (Diptera: Culicidae) in tire yards in Indiana, USA. *J Med Entomol.* 1983;20(1):76-80.
11. Scholte EJ, Den Hartog W, Braks M, Reusken C, Dik M, Hessels A. First report of a North American invasive mosquito species *Ochlerotatus atropalpus* (Coquillett) in the Netherlands, 2009. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* 2009;14(45).
12. Freier JE, Beier JC. Oral and transovarial transmission of La Crosse virus by *Aedes atropalpus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1984;33(4):708-14.
13. Tanaka KM, K.;Saugstad, E. S. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae) Contributions of the American Entomological Institute. 1979;16:1-987.
14. Krebs T, Bindler P, L'Ambert G, Toty C, Perrin Y, Jourdain F. First establishment of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera: Culicidae) in France in 2013 and its impact on public health. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology.* 2014;39(2):437-40.
15. Schaffner F, Chouin S, Guilloteau J. First record of *Ochlerotatus* (Finlaya) *japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in metropolitan France. *J Am Mosq Control Assoc.* 2003;19(1):1-5.

16. Schaffner F, Kaufmann C, Heggin D, Mathis A. The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe. *Med Vet Entomol.* 2009;23(4):448-51.
17. Versteirt V, Schaffner F, Garros C, Dekoninck W, Coosemans M, Van Bortel W. Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *J Med Entomol.* 2009;46(6):1464-7.
18. ECDC. *Aedes japonicus* - current known distribution: June 2018 [Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-japonicus-current-known-distribution-june-2018>].
19. Martinet JP, Ferte H, Failloux AB, Schaffner F, Depaquit J. Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review. *Viruses.* 2019;11(11).
20. Versteirt V, De Clercq EM, Fonseca DM, Pecor J, Schaffner F, Coosemans M, et al. Bionomics of the established exotic mosquito species *Aedes koreicus* in Belgium, Europe. *J Med Entomol.* 2012;49(6):1226-32.
21. Ciocchetta S, Prow NA, Darbro JM, Frentiu FD, Savino S, Montarsi F, et al. The new European invader *Aedes (Finlaya) koreicus*: a potential vector of chikungunya virus. *Pathog Glob Health.* 2018;112(3):107-14.
22. Werner D, Zielke DE, Kampen H. First record of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in Germany. *Parasitol Res.* 2016;115(3):1331-4.
23. Steinbrink A, Zotzmann S, Cunze S, Klimpel S. *Aedes koreicus*-a new member of the genus *Aedes* establishing in Germany? *Parasitol Res.* 2019;118(3):1073-6.
24. Borucki MK, Kempf BJ, Blitvich BJ, Blair CD, Beaty BJ. La Crosse virus: replication in vertebrate and invertebrate hosts. *Microbes Infect.* 2002;4(3):341-50.
25. Moomau C, Musalgaonkar S, Khan YA, Jones JE, Dinman JD. Structural and Functional Characterization of Programmed Ribosomal Frameshift Signals in West Nile Virus Strains Reveals High Structural Plasticity Among cis-Acting RNA Elements. *The Journal of biological chemistry.* 2016;291(30):15788-95.
26. Cle M, Salinas S, Lecollinet S, Beck C, Gutierrez S, Baldet T, et al. [Usutu virus: the phantom menace]. *Médecine/Sciences.* 2018;34(8-9):709-16.
27. De Madrid AT, Porterfield JS. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *The Journal of general virology.* 1974;23(1):91-6.
28. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(5):643-50.
29. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1167-73.
30. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, Haaland KY, Harrington JA, Harnar JB, et al. West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol.* 2006;60(3):286-300.
31. Schuler LA, Khaitsa ML, Dyer NW, Stoltenow CL. Evaluation of an outbreak of West Nile virus infection in horses: 569 cases (2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2004;225(7):1084-9.
32. Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vazquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):920-2.
33. Perez-Ramirez E, Llorente F, Del Amo J, Fall G, Sall AA, Lubisi A, et al. Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: discrimination between three pathogenicity categories. *The Journal of general virology.* 2017;98(4):662-70.
34. Fall G, Di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CCM, Loucoubar C, et al. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(11):e0006078.

35. Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc-Goffart I, et al. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(11):6049-83.
36. Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY, Schneider BS, Smith DR, et al. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *J Virol*. 2005;79(13):8339-47.
37. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;951:117-26.
38. J.P. HCPRMJE. Isolement en France du virus West-Nile à partir de malades et du vecteur *Culex modestus* Ficalbi. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1964;259:2.
39. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(4):692-6.
40. Bahuon C, Marcillaud-Pitel C, Bournez L, Leblond A, Beck C, Hars J, et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Rev Sci Tech*. 2016;35(3):811-24.
41. Control ECoDPa. Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018 [Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018>].
42. Beck C, Leparc Goffart I, Franke F, Gonzalez G, Dumarest M, Lowenski S, et al. Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens*. 2020;9(11).
43. Woodall J. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. *Proc E Afr Acad*. 1964;2:141-6.
44. Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses*. 2015;7(1):219-38.
45. Hernandez-Triana LM, de Marco MF, Mansfield KL, Thorne L, Lumley S, Marston D, et al. Assessment of vector competence of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):381.
46. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(7):652-6.
47. Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(2):274-7.
48. Cadar D, Lühken R, van der Jeugd H, Garigliany M, Ziegler U, Keller M, et al. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Euro Surveill*. 2017;22(4):11-7.
49. Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 10):2807-17.
50. Garigliany MM, Marlier D, Tenner-Racz K, Eiden M, Cassart D, Gandar F, et al. Detection of Usutu virus in a bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) and a great spotted woodpecker (*Dendrocopos major*) in north-west Europe. *Vet J*. 2014;199(1):191-3.
51. Lim SM, Geervliet M, Verhagen JH, Muskens G, Majoor FA, Osterhaus A, et al. Serologic evidence of West Nile virus and Usutu virus infections in Eurasian coots in the Netherlands. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(1):96-102.
52. Ziegler U, Jöst H, Müller K, Fischer D, Rinder M, Tietze DT, et al. Epidemic Spread of Usutu Virus in Southwest Germany in 2011 to 2013 and Monitoring of Wild Birds for Usutu and West Nile Viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015;15(8):481-8.

53. Buchebner N, Zenker W, Wenker C, Steinmetz HW, Sos E, Lussy H, et al. Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC Vet Res.* 2013;9:153.
54. Vittecoq M, Lecollinet S, Jourdain E, Thomas F, Blanchon T, Arnal A, et al. Recent circulation of West Nile virus and potentially other closely related flaviviruses in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(8):610-3.
55. Nikolay B. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2015;109(10):609-18.
56. Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(11):1417-23.
57. Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottola A, Sabbatini A, Tagliazucchi S, et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* 2009;14(50).
58. Eiden M, Gil P, Ziegler U, Rakotoarivony I, Marie A, Frances B, et al. Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect Genet Evol.* 2018;61:151-4.
59. Beck CG, G., Eraud C.; Decors, A.; Desvaux, S.; Zientara, S. Bilan de la circulation du virus Usutu en France au 27 août 2018. <https://www.plateforme-esa.fr/article/bilan-de-la-circulation-du-virus-usutu-en-france-au-27-aout-2018>; ESA; 2018.
60. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O, et al. Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(5):875-8.
61. Arnold P. *Biologie et écologie des moustiques d'Alsace.*: Université de Strasbourg; 1983.
62. Schaffner F. Nouvelle clé de détermination pour les imagos femelles de genre *Aedes* du Nord-Est de la France (Diptera, Culicidae). *Bull Soc Entomol Fr.* 1993;98(1):29-34.
63. Möhrig W. *Die Culiciden Deutschlands. Untersuchungen zur Taxonomie, Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken.* Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie. 1970;55(3).
64. Schaffner E. AG, Geoffroy Bernard, Hervy Jean-Paul, Rhaiem A., Brunhes Jacques. *The mosquitoes of Europe : an identification and training programme.* In: Paris (FRA) ; Montpellier : IRD ; EID, 1 CD ROM (Didactiques). ISBN 2-7099-1485-9, editor.: IRD;EID; 2001.
65. Gunay FP, M.; Robert, V. *MosKeyTool, an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean Region.* 2.1 ed2017.
66. Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(41):14812-7.
67. Bonfield JK, Smith K, Staden R. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(24):4992-9.
68. Bahnck CM, Fonseca DM. Rapid Assay to Identify the Two Genetic Forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and Hybrid Populations. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2006;75(2):251-5.
69. Reeves LE, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(8):e0006767.
70. Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology.* 2004;71(1):5-16.
71. Rohlf FJ, Slice D. Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Systematic Zoology.* 1990;39(1):40-59.

72. Dujardin JPS, D.E. Contributions of morphometrics to medical entomology. In: Tibayrens M, editor. *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*: John Wiley's & Sons 2007. p. 433-46.
73. Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Ocampo N, Dujardin JP. Wing shape of dengue vectors from around the world. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2010;10(2):207-14.
74. Laurito M, Almirón WR, Ludueña-Almeida FF. Discrimination of four *Culex* (*Culex*) species from the Neotropics based on geometric morphometrics. *Zoomorphology*. 2015;134(3):447-55.
75. Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MA. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(6):1246-52.
76. Boukraa S, de La Grandiere MA, Bawin T, Raharimalala FN, Zimmer JY, Haubruge E, et al. Diversity and ecology survey of mosquitoes potential vectors in Belgian equestrian farms: A threat prevention of mosquito-borne equine arboviruses. *Prev Vet Med*. 2016;124:58-68.
77. Wilke AB, Christe Rde O, Multini LC, Vidal PO, Wilk-da-Silva R, de Carvalho GC, et al. Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161643.
78. Harbach RE, Knight KL. *Taxonomists' glossary of mosquito anatomy* Marlton, New Jersey: Plexus Publishing, Inc.; 1980. 415 p.
79. Schaffner F. *Les Culicidés de Haute-Alsace : Systématique et Taxonomie*: Université Louis Pasteur de Strasbourg; 1992.
80. Dujardin JPSDE. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2008;8(6):875-90.
81. Virginio F, Oliveira Vidal P, Suesdek L. Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids. *Parasit Vectors*. 2015;8:159.
82. Chaiphongpachara T. Comparison of Landmark- and Outline-Based Geometric Morphometrics for Discriminating Mosquito Vectors in Ratchaburi Province, Thailand. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6170502.
83. Lorenz C, Suesdek L. Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013;89(5):928-31.
84. Rohlf F. The tps series of software. *Hystrix*. 2017.
85. Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour*. 2011;11(2):353-7.
86. Team R. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Boston, MA: RStudio, Inc.; 2019.
87. Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*. 2001;4(1):9.
88. Bookstein FLS, D. *Morphometric Tools for Landmark Data. Geometry and Biology.*: Cambridge University Press, Cambridge/New York/Port Chester/Melbourne/Sydney; 1993. 512 p.
89. Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. 2007;7(4):467-77.
90. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *Journal of clinical*

virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2006;36(3):177-82.

91. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods*. 2007;146(1-2):355-8.
92. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(4):692-6.
93. Becker NP, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Madon, M.B.; Dahl, C.; Kaiser, A. *Mosquitoes and Their Control*. 2nd ed. Heidelberg 2010.
94. Dekoninck W, Hendrickx F, Vasn Bortel W, Versteirt V, Coosemans M, Damiens D, et al. Human-induced expanded distribution of *Anopheles plumbeus*, experimental vector of West Nile virus and a potential vector of human malaria in Belgium. *J Med Entomol*. 2011;48(4):924-8.
95. Ferté H, Marchais R, Léger N. Contribution à l'inventaire des moustiques de la Champagne (France) espèces nouvelles pour les départements de l'Aisne, de l'Aube et de la Marne. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 1989;64(5):396-8.
96. Nattero J, Piccinali RV, Macedo Lopes C, Hernandez ML, Abraham L, Lobbia PA, et al. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):412.
97. Hidalgo K, Dujardin JP, Mouline K, Dabire RK, Renault D, Simard F. Seasonal variation in wing size and shape between geographic populations of the malaria vector, *Anopheles coluzzii* in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop*. 2015;143:79-88.
98. Vargas REM, Ya-umphan P, Phumala-Morales N, Komalamisra N, Dujardin JP. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infect Genet Evol*. 2010;10(4):580-5.
99. Morales Vargas RE, Phumala-Morales N, Tsunoda T, Apiwathnasorn C, Dujardin JP. The phenetic structure of *Aedes albopictus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;13:242-51.
100. Wilk-da-Silva R, de Souza Leal Diniz MMC, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing morphometric variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from different urban built environments. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):561.
101. Lorenz C, Marques TC, Sallum MA, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors*. 2012;5:257.
102. Börstler J, Lühken R, Rudolf M, Steinke S, Melaun C, Becker S, et al. The use of morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*. 2014;39(1):204-12.
103. Sauer FG, Jaworski L, Erdbeer L, Heitmann A, Schmidt-Chanasit J, Kiel E, et al. Geometric morphometric wing analysis represents a robust tool to identify female mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Germany. *Sci Rep*. 2020;10(1):17613.
104. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev*. 2015;4:1.
105. Schaffner F, Thiery I, Kaufmann C, Zettor A, Lengeler C, Mathis A, et al. *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential malaria vector? *Malar J*. 2012;11:393.
106. Vermeil C. LJ, Reeb E. Survival and transmission of West Nile virus by various arthropods. *Bull Soc Pathol Exot*. 1960;53:300-6.

Données préliminaires sur l'observation de Mermithidae infestant des moustiques du genre *Aedes*

On mermithids parasitizing French mosquitoes

Jean-Philippe Martinet^{1,2}, Issam Aatif¹, Hubert Ferté¹ and Jérôme Depaquit¹

1 Université de Reims Champagne-Ardenne, Faculté de Pharmacie,
ANSES, SFR Cap Santé, EA7510 ESCAPE – USC VECPAR,
51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France

2 Pasteur Institute, Department of Virology, Arboviruses and Insect Vectors, Paris, France

ORCID of the author(s) :

Jean-Philippe MARTINET: 0000-0003-2754-0165

Issam AATIF:

Hubert FERTE: 0000-0003-1836-0701

Jérôme DEPAQUIT: 0000-0001-6995-0088

Corresponding author:

Jean-Philippe Martinet (e-mail: j.martinet.p@gmail.com)

EA7510 “ESCAPE” – USC ANSES “VECPAR”,

Faculté de Pharmacie,

Université de Reims Champagne-Ardenne,

51 rue Cognacq-Jay,

51096 Reims cedex,

FRANCE

Highlights

- We isolated mermithids from three French *Aedes* species
- It is the second report of mermithids from French mosquitoes
- They could belong to the same species than that isolated from African *Anopheles*

Abstract

We report from Northern France the infection of 12 mosquito females belonging to the species *Aedes cantans*, *Ae. communis* and *Ae. rusticus* by mermithids closely related to specimens previously isolated from Senegalese *Anopheles gambiae*. The sequencing of partial 18S rDNA shows a 100% sequence homology for all the processed specimens. However, it does not provide a reliable identification of the worms due to the dearth of available data in Genbank.

These specimens are closely related to *Strelkovimermis spiculata* but it could belong to other genera never sequenced in the past i.e. *Empidomermis*, the only mermithid recorded from mosquitoes in France

Graphical abstract



Keywords

mermithids, mosquito, Aedes.

1. Introduction

Mermithids nematodes are obligate endoparasites of *Arthropoda*, especially insects. *Mermithids* are considered to be host specific, usually at the host-species or to the family-species level (Poinar, 1979). The species parasitizing mosquitoes have probably be the most studied one, taking into account they can be used as biological agents able to control the host populations (Platzer, 1981; Paily et al., 2013; Abagli et al., 2019; di Battista et al., 2020).

In France, there is a lack of data related to the presence of mosquito mermithids, except the description of a new species from *Aedes detritus* in South of France (Doucet et al., 1979).

During a program related to mosquito arbovirus, mosquitoes were sampled in Northern France. We reported Mermithids in different mosquito species analyzed by sequencing of a part of their 18 S ribosomal DNA.

2. Material and Methods

2.1. Material

In an epidemiological program focusing on mosquito arbovirus, mosquito larvae were sampled in 2019 in two selected localities from North-Eastern France: Berru on April, 1st (49.267533 N 4.133583 E) and in the vicinity of the Der-Chantecoq lake on April 16th (48.576553 N 4.692353 E).

Water puddles located in sylvatic environments were sampled by hand and the collected larvae were placed in jars containing water from the source, then immediately transported to the laboratory where larvae were placed in two labelled cages waiting the emergence of the adults. Each population was then monitored daily in the laboratory.

2.2. Methods

2.2.1. Mosquitoes processing

Mosquitoes were anesthetized by cold, morphologically identified at the species level using MosKeyTool taxonomic key (Gunay & Robert, 2017).

Legs were used for molecular identification. DNA was extracted with the DNeasy Blood and Tissue extraction kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instruction. Polymerase Chain Reaction performed on a 648 bp fragment of the COI gene thanks to the primers LEPF1 (5'-TTTCTACAAATCATAAAGATATTGG-3') and LEPR1 (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') according to the experimental conditions proposed by Hebert et al. (2004).

2.2.2. Mermithids processing

The anterior and posterior parts of each worm were cut off and cleared in Amman lactophenol between slide and cover slide. These specimens are available upon request to the authors. Pictures were taken using the Stream Essentials software version 1.7 and a DP-26 video camera connected to a SZX10 stereomicroscope (Olympus, Japan).

Genomic DNA was extracted from the middle part of the worm. The molecular identification of Mermithids was obtained by amplification and sequencing of partial 18S rDNA thanks to cycles and primers Merm forward 5'-CAAGGACGAAAGTTAGAGGTTC-3' and Merm reverse 5'-GGAAACCTTGTTACGACTTTTA-3' proposed by Kobylinski et al (2012).

In order to amplify COI mtDNA, we also tried to use several couples of primers obtained in the literature (St Onge et al., 2008) or designed by alignment of sequences from other mermithids obtained from GenBank and making consensus primers. The forward primers were

5'-ARAACAAAATGAAAGTG-3';

5'-AGTTAATAACATAGTAATAGC-3';

5'-ACKACAAARTAKGTRTCATG-3'.

The reverse primers selected were

5'-ATTYTWCTGYBTTTGG-3';

5'-CCTGARGTWTAYRTWYTAATT-3';

5'-ATAATTTTTTTTTATRGTTATACC-3'.

All these primers were combined and tested at hybridization temperatures ranging from 40°C to 55°C.

2.2.3. Molecular analysis

Amplicons were sequenced through Sanger technology (Genewiz, Germany). On the one hand, sequences were compared to existing GenBank sequences with the BLAST algorithm (Altschul et al, 1990) and identification was considered accurate above 99% of similarity.

On the other hand, sequences were edited and aligned using the software Muscle (Edgar, 2004). The GTR+G model of molecular evolution was determined with ModelTest-NG (Darriba et al., 2020) and the phylogenetic tree was constructed using Maximum Likelihood (ML) method thanks to MEGA7 (Kumar et al., 2016).

3. Results

3.1 Mosquitoes

The population of mosquito larvae caught in Berru included 45 females (12 *Aedes cantans*, one *Ae. communis* and 32 *Ae. rusticus*) whereas the population of Der-Chantecoq lake included 55 *Ae. rusticus* females.

In the first population, six females were infected by Mermithids: five *Ae. cantans* and one *Ae. communis* representing a global prevalence of 13.33%.

In the second population, six females were infected by Mermithids (figure 1) for a prevalence of 10.9%.

The identification of the infected mosquitoes was done according to morphological characters as well as by showing more than 99% of similarity with the reference sequences (MT001361, MT0013359 and MT731111 for *Ae. cantans*; MT149960 for *Ae. communis*; MK403533 for *Ae. rusticus*).

Sequences of mosquitoes sequenced in the present study are available in Genbank under accession numbers XXXXXX to XXXXXX.

3.2 Mermithids

The observation of the parasite larval stages emphasized a posterior part with a straight spur (figure 1).

We analyzed an alignment of 750 bp of partial 18S rDNA sequences and compared with homologous sequences available in Genbank. The sequences we obtained from the Mermithids isolated from the 12 infected females are all similar (100% homology: no variability observed). They are available in Genbank under accession numbers XXXXXX to XXXXXX.

The BLAST analyze shows the closest sequence is that of a Mermithid isolated from some *Anopheles gambiae* from Senegal (99.21% homology with sequence KC243312) followed by several sequences of *Strelkovimermis spiculatus* (95.67% homology).

THE ML tree obtained is shown on figure 2.

The DNA amplifications carried out on COI were unfortunately all unsuccessful.

4. Discussion and Conclusion

A reliable morphological identification of Mermithids has to be performed on adults, which constitutes a free stage of these parasites. Unfortunately, in the present study, we were not able to observe such stages and consequently, a reliable identification cannot be performed on the stages we observed. According to Nickle (1972), the parasites we observed could belong to several genera.

According to 18S rDNA sequences, our specimens are very closely to specimens isolated from Senegalese mosquitoes malaria vectors *Anopheles gambiae* (Kobylinski et al., 2012) which remained unidentified according to i) the difficult identification of parasites stages using morphological characters and ii) to the lack of matching with other sequences available in GenBank.

The specimens we processed in the present study exhibit 6 mutations versus these Senegalese mermithids (GenBank accession number KJ636371), meaning they are 99.21% homologous. Taking into account that 18S rDNA is a highly conserved molecular marker, we can conclude that the mermithids isolated from several *Aedes* French species could belong to the same species but we cannot yet conclude they belong to the same species than those isolated from African *Anopheles*. Unfortunately, our assays to amplify COI mtDNA all failed, despite several repeats. Finally, we conclude they could belong to the same species or to a very closely related one. There are no *Empidomermis*, *Culicimermis*, *Hydromermis*, or *Perutilimermis* 18 S rDNA entries in GenBank, therefore the exact identification remains impossible.

To date, no field record of any *Strelkovimermis* species has occurred in France. To our knowledge, the only available report of a mermithid nematode from French mosquitoes is related to the original description of *Empidomermis riouxi* from *Aedes detritus* in South of France (Doucet et al., 1979). We cannot exclude, based on our results, that the specimens processed in the present study could belong to this species.

The dearth of available data prohibits positive identification of the parasites we processed as previously encountered for mermithid parasitism of bees (Tripodi & Strange, 2018). However, taking into account the importance of these nematodes in the biocontrol of mosquitoes, our work will inform future investigations on the mermithids

5. References

Abagli, A.Z., Alavo, T.B.C., Perez-Pacheco, R., Platzer, E.G., 2019. Efficacy of the mermithid nematode, *Romanomermis iyengari*, for the biocontrol of *Anopheles gambiae*, the major malaria vector in sub-Saharan Africa. *Parasit. Vectors.* 22;12(1): 253. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3508-6>.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A.M., Stamatakis, A., Morel, B., Flouri, T. 2020. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Mol. Biol. Evol.* 37 : 291-294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>.

Di Battista, C.M., Fischer, S., Campos, R.E., 2020. Susceptibility of the floodwater mosquito *Aedes albifasciatus* from eggs of different dormancy times to the nematode parasite *Strelkovimermis spiculatus*. *Med Vet Entomol.*;34: 432-439. <https://doi.org/10.1111/mve.12460>.

Doucet, M.M., Laumond, C., Bain, O., 1979. *Empidomermis riouxi* n. sp. (Nematoda, Mermithidae). *Ann Parasitol Hum Comp.* 54: 341-351. <https://doi.org/10.1051/parasite/1979543341>.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

Gunay FP, M.; Robert, V. MosKeyTool, an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean Region. 2.1 ed2017. Available at www.medilabsecure.com/moskeytool

Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgurator*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 14812-14817, <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>

Kobylinski, K.C., Sylla, M., Black IV, W., Foy, B.D. 2012. Mermithid nematodes found in adult *Anopheles* from southeastern Senegal. *Parasit. Vectors.* 28;5:131. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-131>.

Nickle, W.R. 1972. A Contribution to our Knowledge of the Mermithidae (Nematoda). *J. Nematol.* 4: 113-146.

Paily, K.P., Chandhiran, K., Vanamail, P., Kumar, N.P., Jambulingam, P. 2013. Efficacy of a mermithid nematode *Romanomermis iyengari* (Welch) (Nematoda: Mermithidae) in controlling tree hole-breeding mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in a rubber plantation area of Kerala, India. *Parasitol Res.* 112(3): 1299-304. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3265-3>.

Platzer, E.G. 1981. Biological control of mosquitoes with mermithids. *J. Nematol.* 13: 257-262.

Poinar, G. O., Jr. 1979. Nematodes as biological control for insects.

CRC Press, Boca Raton.

St-Onge, M., LaRue, B., Charpentier, G., 2008. A molecular revision of the taxonomic status of mermithid parasites of black flies from Quebec (Canada). *J. Invertebr. Pathol.* 98: 299-306. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.04.001>.

Tripodi, A.D., Strange, J.P., 2018. Rarely reported, widely distributed, and unexpectedly diverse: molecular characterization of mermithid nematodes (Nematoda: Mermithidae) infecting bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) in the USA. *Parasitology* 145, 1558–1563. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000410>

6. Figure captions

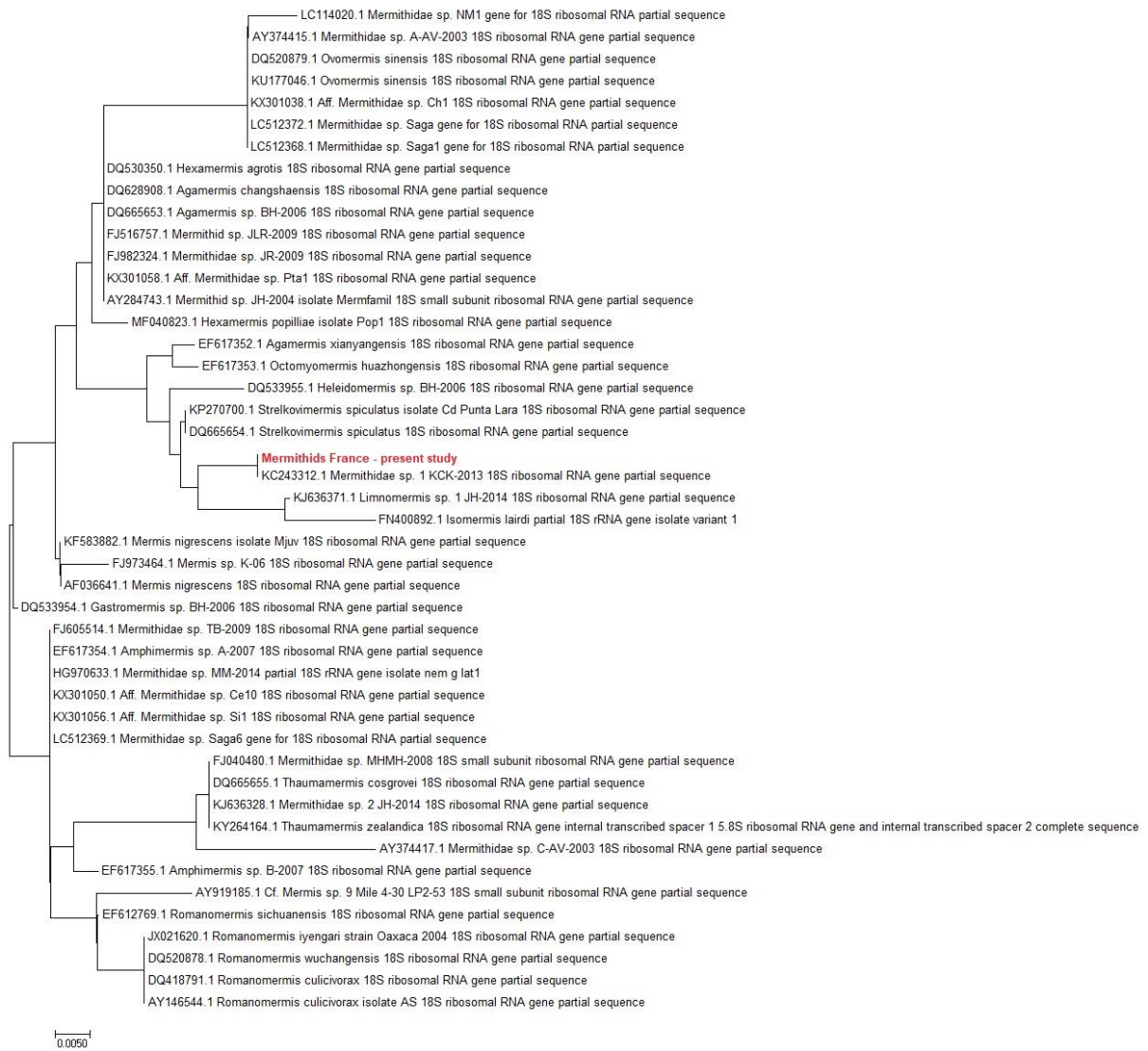


Figure 1: maximum-likelihood tree based on partial 18S rDNA sequences available in Genbank including the sequence of mermithids processed in the present study (in red).

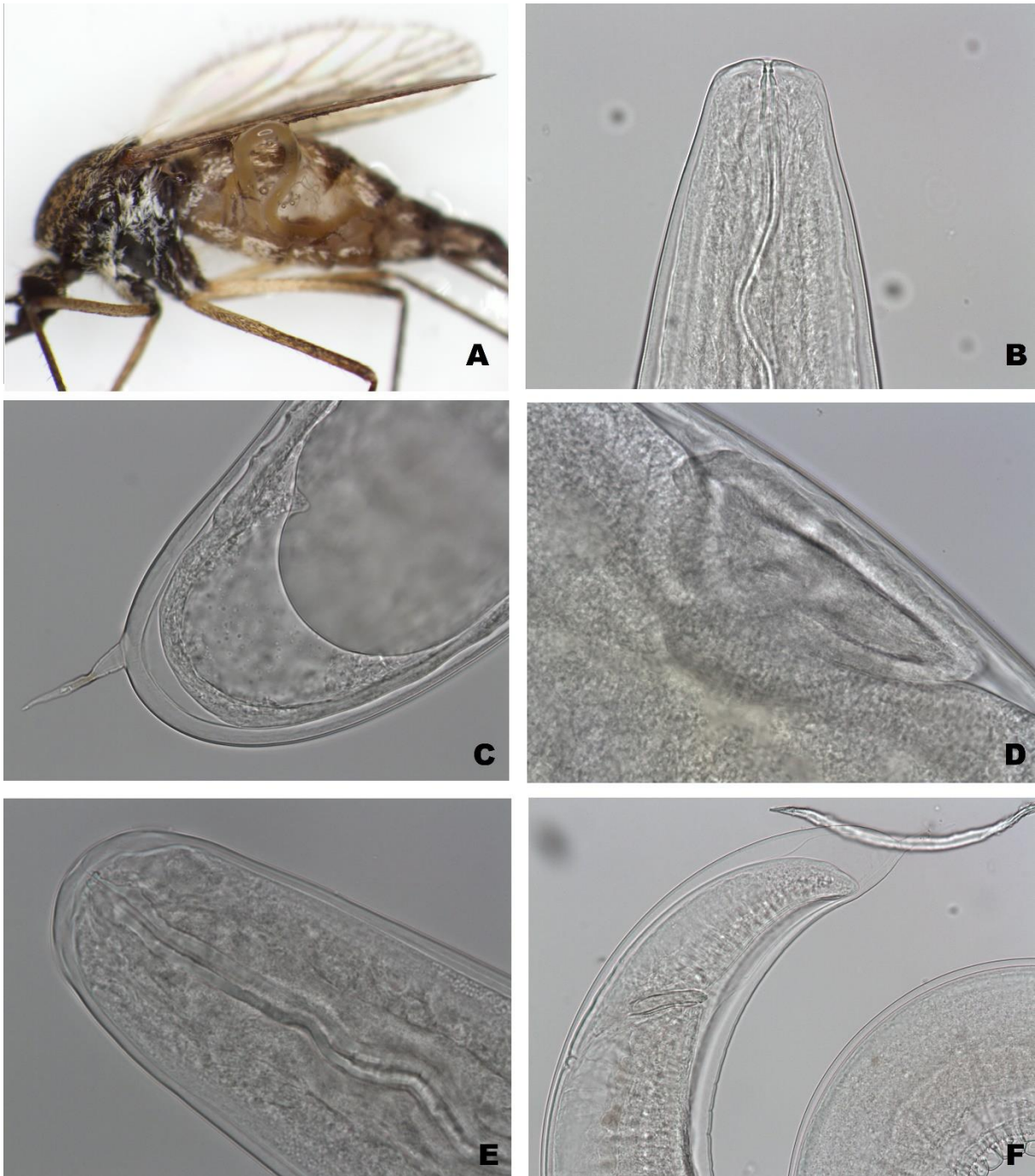


Figure 2: *Aedes rusticus* parasitized by a Mermithid (A) and microphotographies of mermithids specimens at parasite stages isolated from *Ae. rusticus*. B, E: head, C, F: tail showing details, exhibiting a spur, D: vagina.

Annexes

Annexe 1 : Gîtes de captures

Référence gîte	Lieux de capture	Détail	Type de gîte	Adultes (A) ou Larves (L)	Latitude	Longitude	Type de milieu
1	Oeting	Lotissement	Egout	A L	49.168360	49.168360	Urbain
2	Reims	Bâche	Collection d'eau	L	49.253724	4.019492	Urbain
		Parking	Bouche égout	L	49.242256	4.066819	Urbain
		Fontaine parc	Fontaine	L	49.238567	4.053500	Urbain
		Bassin par public	Bassin permanent avec brassage	L	49.253039	4.020678	Urbain
3	St Brice Courcelles	Jardin en ville	Capture sur humain	A L	49.258149	3.989406	Urbain
			Pièges pondoir	L	49.258149	3.989406	Urbain
4	Boult aux Bois	Jardin campagne	Mare permanente	L	49.430243	4.838670	Rural
		Cave	Cave habitation	A	49.430297	4.838619	Intérieur
5	Machault	Jardin campagne	Cuve de récupération d'eau de pluie avec matières organiques	A L	49.354776	4.497298	Rural
6	Annéville	Forêt proche parc	Mare temporaire	L	49.244551	6.141867	Selvatique
7	Beaumont sur Vesle	Sous-bois	Proche jardins municipaux	A	49.173953	4.193291	Selvatique
		Jardin municipal	Cuve de récupération d'eau de pluie	L	49.173299	4.193755	Rural

			avec matières organiques				
		Sous-bois	Mare temporaire	L	49.174251	4.192989	Selvatique
8	Berru	Forêt bas	Mare temporaire	A L	49.267533	4.133583	Selvatique
		Forêt haut	Mare temporaire	A L	49.262167	4.142623	Selvatique
9	Boult aux Bois	Forêt	Mare temporaire	A L	49.423165	4.835998	Selvatique
10	Chalons sur Vesle	Sous-bois	Sous-bois sec	A	49.288435	3.924521	Selvatique
11	Courlondon	Sous-bois	Trou d'arbre	L	49.322405	3.737927	Selvatique
		Sous-bois	Ornière	L	49.322335	3.737605	Selvatique
12	Germaine	Forêt	Ornière	L	49.111577	4.030096	Selvatique
13	Lac du Der	Forêt	Marais	A L	48.576553	4.692353	Selvatique
		Forêt	Mare temporaire	A L	48.574945	4.696332	Selvatique
		Etang	Mares	A L			Selvatique
14	Saint Léonard	Sous-bois entrée	Bidon de récupération d'eau de pluie sans matières organiques	A L	49.223266	4.089945	Selvatique
		Mare Ouest	Mare temporaire	A L	49.222037	4.089124	Selvatique
		Bras mort	Bras stagnant	A L	49.219159	4.084989	Selvatique
		Marais	Plaine inondée temporaire	A L	49.222466	4.082975	Selvatique
		Fossé	Fossé	A L	49.222599	4.083675	Selvatique
		Bois Est	Forêt	A L	49.224029	4.083736	Selvatique
15	St Imoges	Fossé	Fossé	L	49.107450	3.967986	Selvatique
		Forêt	Ornière	L	49.107232	3.962340	Selvatique
16	Trépail	Sous-bois	Crayères	A	49.110079	4.176804	Intérieur
17	Verzy	Sous-bois	Mare temporaire	A L	49.140818	4.156953	Selvatique

		Sous-bois	Bunker	L	49.140978	4.156046	Intérieur
--	--	-----------	--------	---	-----------	----------	-----------

Annexe 2 : Pools de moustiques screenés (Région, 2018)

N° Lot	Espèces	Date de prélèvement	Lieu	N
1	<i>Aedes rusticus</i>	23/05/18	Der	30
2	<i>Aedes rusticus</i>	23/05/18	Der	22
3	<i>Aedes rusticus</i>	31/05/18	Berru	30
4	<i>Aedes rusticus</i>	31/05/18	Berru	30
5	<i>Aedes rusticus</i>	31/05/18	Berru	30
6	<i>Aedes rusticus</i>	31/05/18	Berru	30
7	<i>Aedes rusticus</i>	31/05/18	Berru	7
8	<i>Aedes rusticus</i>	31/05/18	Berru	30
9	<i>Aedes rusticus</i>	06/06/18	Leu	30
10	<i>Aedes cinereus</i>	06/06/18	Leu	2
11	<i>Aedes communis</i>	31/05/18	Berru	1
12	<i>Aedes communis</i>	23/05/18	Der	6
13	<i>Aedes cinereus</i>	31/05/18	Berru	30
14	<i>Aedes annulipes</i>	25/07/18	Leu	28
15	<i>Aedes cantans</i>	25/07/18	Leu	30
16	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
17	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
18	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
19	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
20	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
21	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
22	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
23	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
24	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
25	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
26	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
27	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
28	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
29	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
30	<i>Aedes cantans</i>	03/05/18	Berru	21
31	<i>Aedes cantans</i>	23/05/18	Berru	30
32	<i>Aedes cantans</i>	23/05/18	Berru	30
33	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
34	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
35	<i>Aedes cantans</i>	23/05/18	Der	17
36	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	10
37	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
38	<i>Aedes cantans</i>	06/06/18	Leu	30
			Total :	984

Annexe 3 : Pools de moustiques screenés (Oeting, 2019)

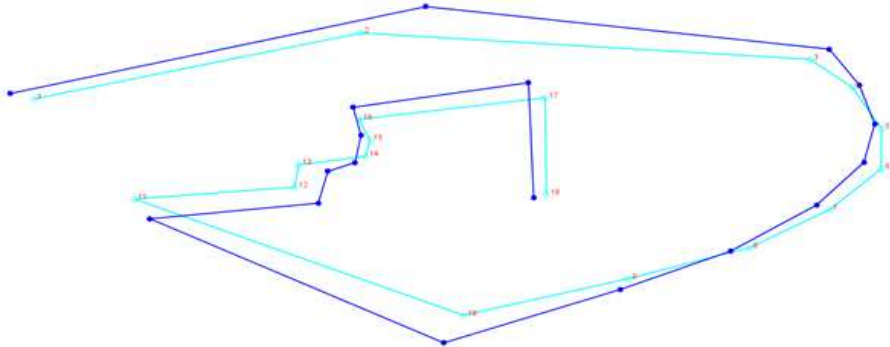
N° Lot	Espèces	Date de prélèvement	Lieu	N
1	<i>Culex pipiens</i>	14/08/2019	CDC gîte 6	20
2	<i>Culex pipiens</i>	15/08/2019	CDC gîte 6	20
3	<i>Culex pipiens</i>	16/08/2019	CDC gîte 6	20
4	<i>Culex pipiens</i>	17/08/2019	CDC gîte 6	20
5	<i>Culex pipiens</i>	18/08/2019	CDC gîte 6	20
6	<i>Culex pipiens</i>	19/08/2019	CDC gîte 6	20
7	<i>Culex pipiens</i>	20/08/2019	CDC gîte 6	20
8	<i>Culex pipiens</i>	21/08/2019	CDC gîte 6	20
9	<i>Culex pipiens</i>	22/08/2019	CDC gîte 6	20
10	<i>Culex pipiens</i>	23/08/2019	CDC gîte 6	20
11	<i>Culex pipiens</i>	24/08/2019	CDC gîte 6	20
12	<i>Culex pipiens</i>	25/08/2019	CDC gîte 6	20
13	<i>Culex pipiens</i>	26/08/2019	CDC gîte 6	20
14	<i>Culex pipiens</i>	27/08/2019	CDC gîte 6	20
15	<i>Culex pipiens</i>	28/08/2019	CDC gîte 6	20
16	<i>Culex pipiens</i>	29/08/2019	CDC gîte 6	20
17	<i>Culex pipiens</i>	30/08/2019	CDC gîte 6	20
18	<i>Culex pipiens</i>	31/08/2019	CDC gîte 6	20
19	<i>Culex pipiens</i>	01/09/2019	CDC gîte 6	20
20	<i>Culex pipiens</i>	02/09/2019	CDC gîte 6	20
21	<i>Culex pipiens</i>	03/09/2019	CDC gîte 6	20
22	<i>Culex pipiens</i>	04/09/2019	CDC gîte 6	20
23	<i>Culex pipiens</i>	05/09/2019	CDC gîte 6	20
24	<i>Culex pipiens</i>	06/09/2019	CDC gîte 6	17
25	<i>Culex pipiens</i>	07/09/2019	BG terrasse 1	20
26	<i>Culex pipiens</i>	08/09/2019	BG terrasse 1	20
27	<i>Culex pipiens</i>	09/09/2019	BG terrasse 1	20
28	<i>Culex pipiens</i>	10/09/2019	BG terrasse 1	20
			Total :	557

Annexe 4 : Pools de moustiques screenés (Amnéville)

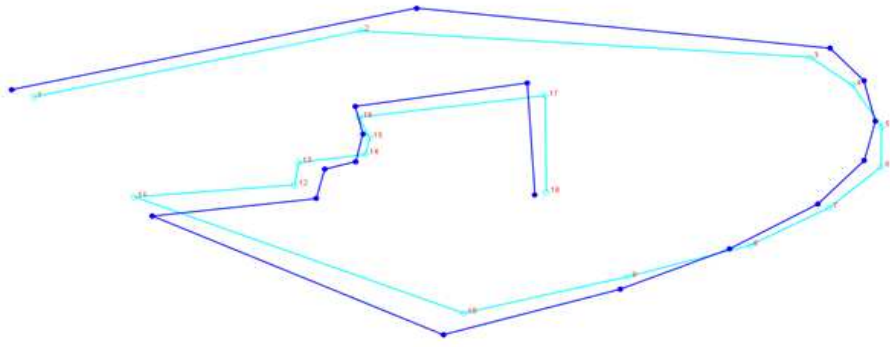
Les effectifs à un individu correspondent à des femelles gorgées.

N° Lot	Espèces	Date de prélèvement	Lieu	N
A1	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Volières laponnes	10
A2	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Volières laponnes	10
A3	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Volières laponnes	10
A4	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Volières laponnes	10
A5	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A6	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A7	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A8	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A9	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A10	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A11	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A12	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A13	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
A14	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	1
P1	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	20
P2	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	20
P3	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	20
P4	<i>Culex pipiens</i>	11/07/2019	Grotte lemmings	20
			Total :	130

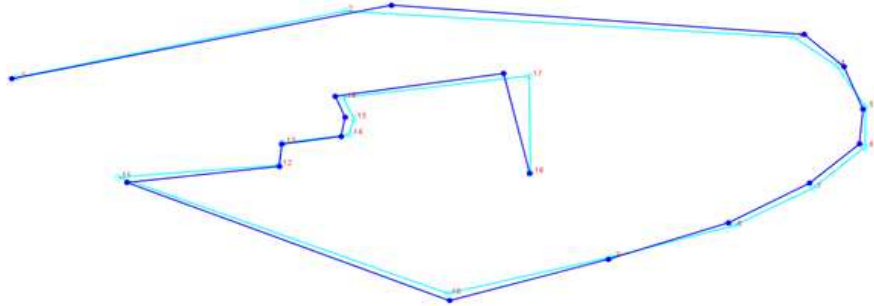
Annexe 5 : Comparaison des positions des landmarks par couples d'espèces du genre *Aedes*



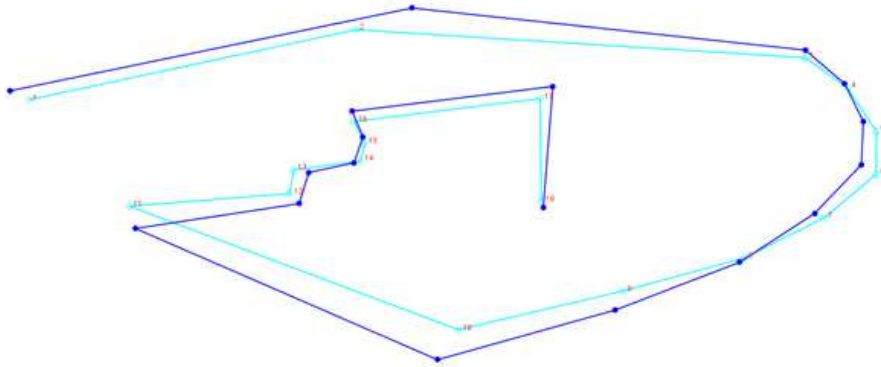
Aedes albopictus vs *Aedes annulipes*



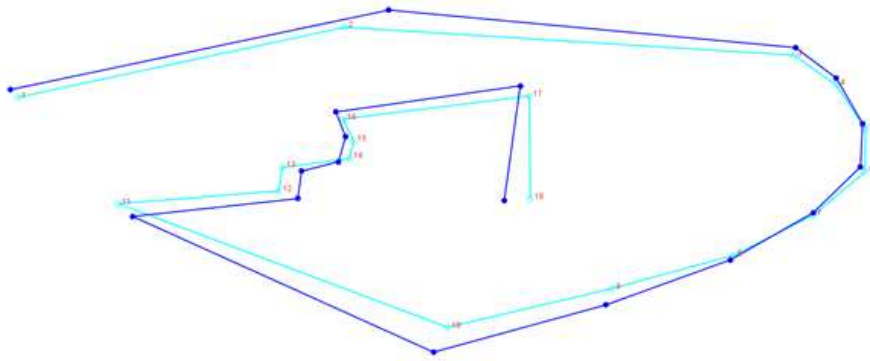
Aedes albopictus vs *Aedes cantans*



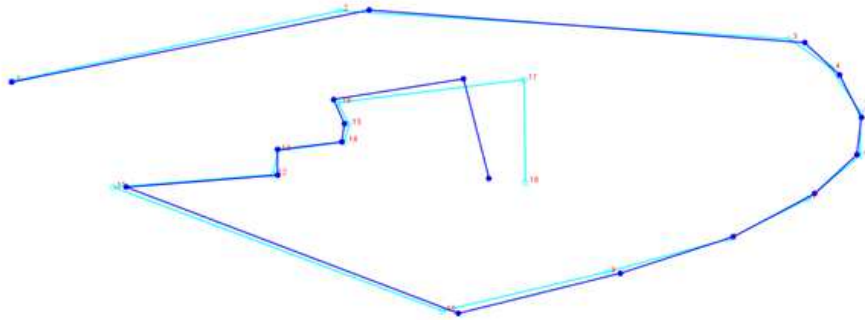
Aedes albopictus vs *Aedes cinereus*



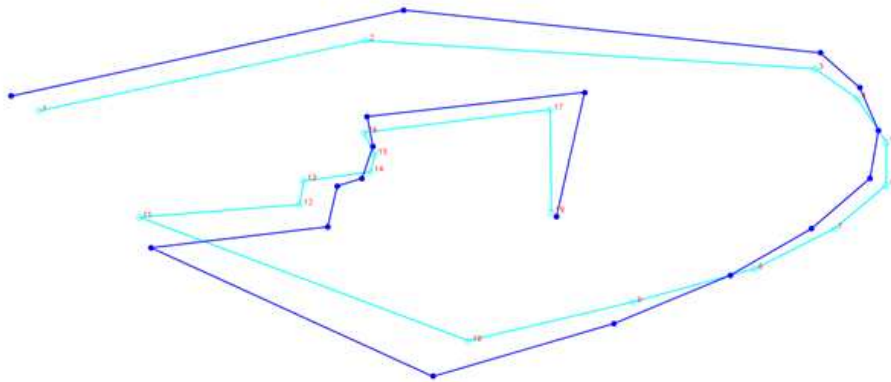
Aedes albopictus vs Aedes communis



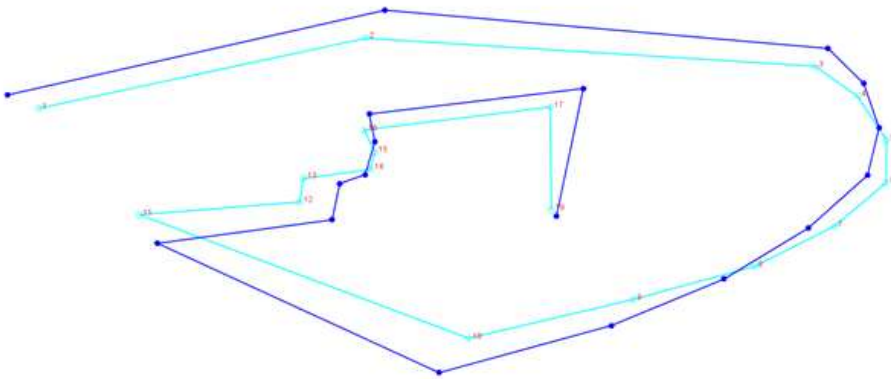
Aedes albopictus vs Aedes geniculatus



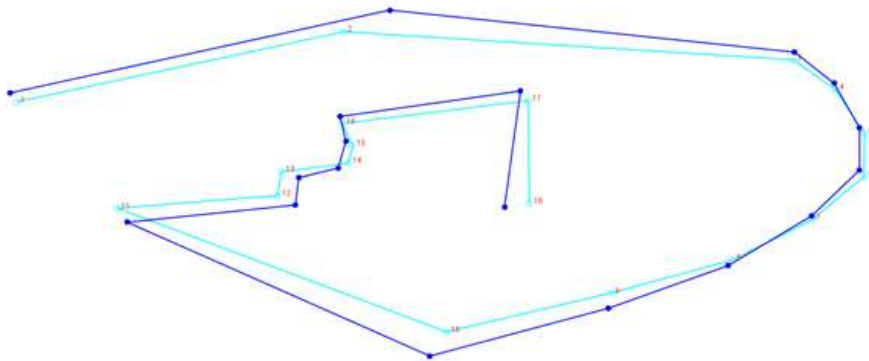
Aedes albopictus vs Aedes japonicus



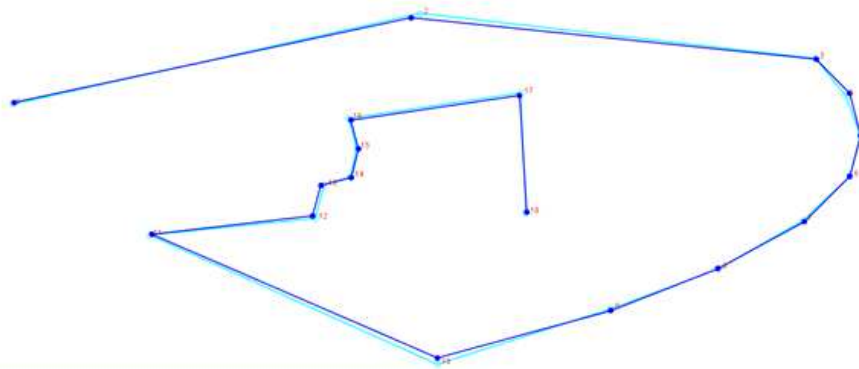
Aedes albopictus vs Aedes refiki



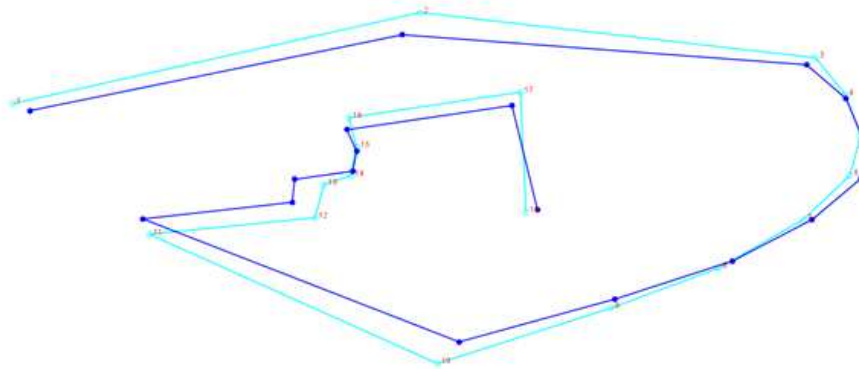
Aedes albopictus vs Aedes rusticus



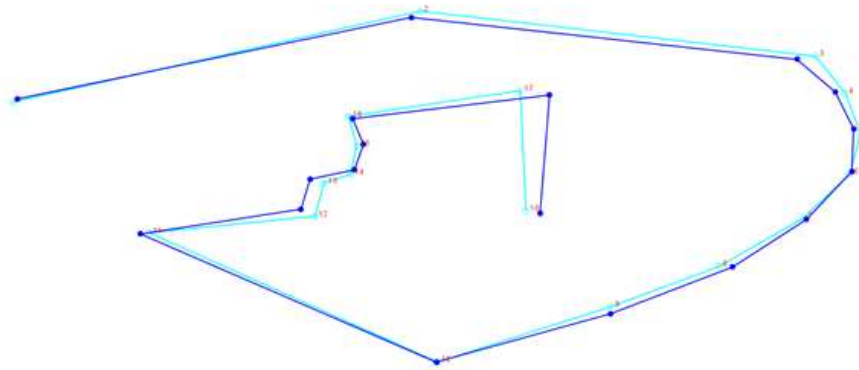
Aedes albopictus vs Aedes sticticus



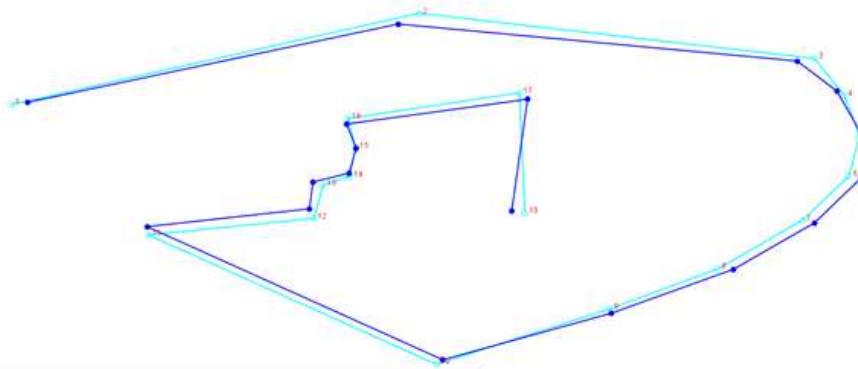
Aedes annulipes vs Aedes cantans



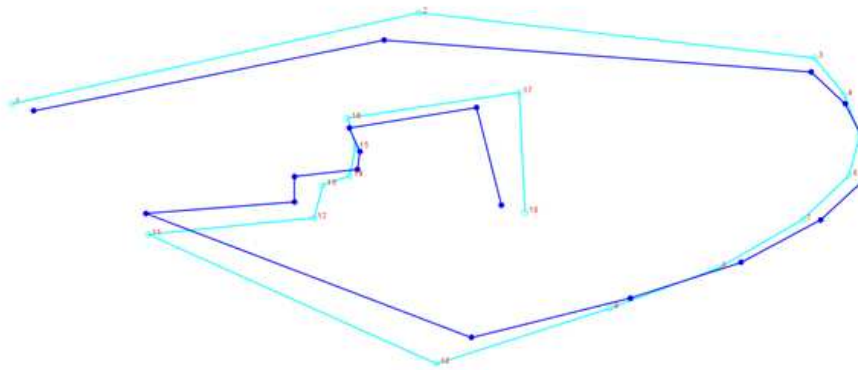
Aedes annulipes vs Aedes cinereus



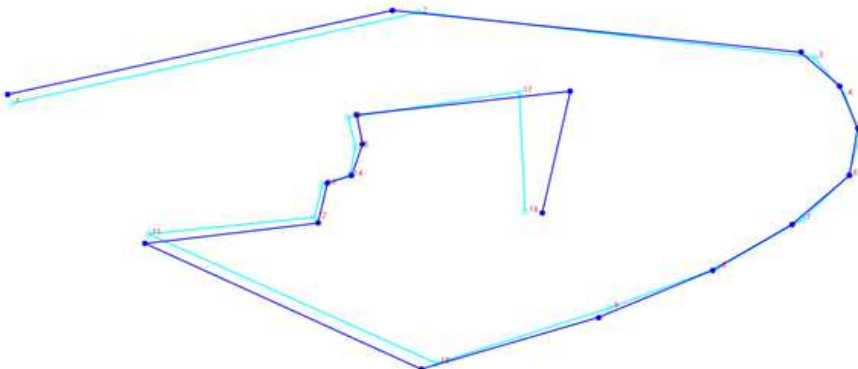
Aedes annulipes vs Aedes communis



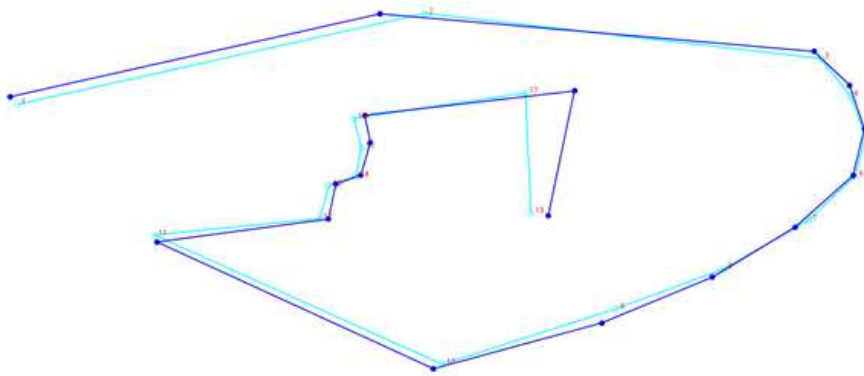
Aedes annulipes vs *Aedes geniculatus*



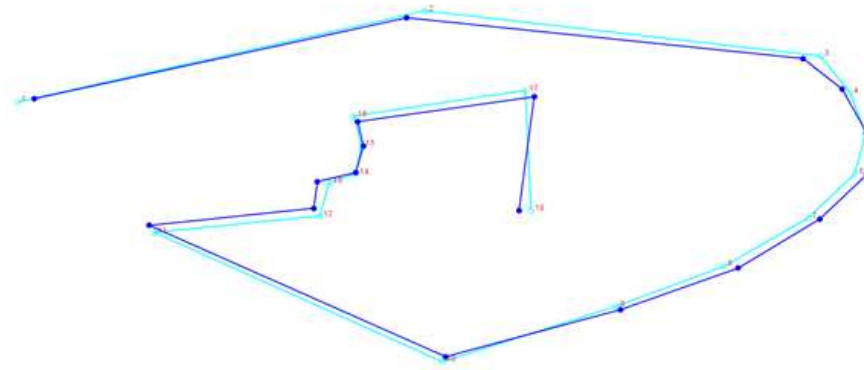
Aedes annulipes vs *Aedes japonicus*



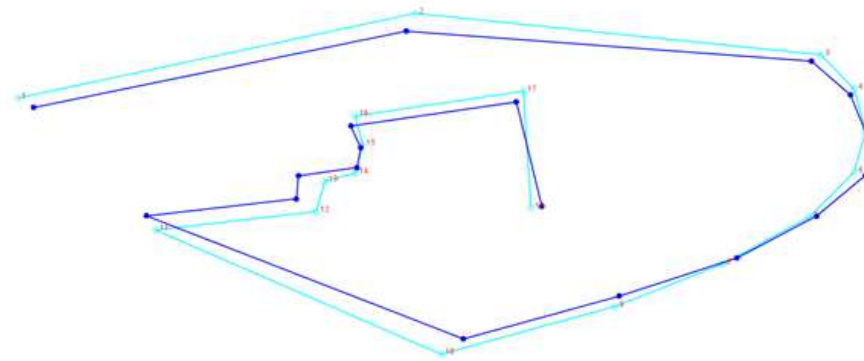
Aedes annulipes vs *Aedes refiki*



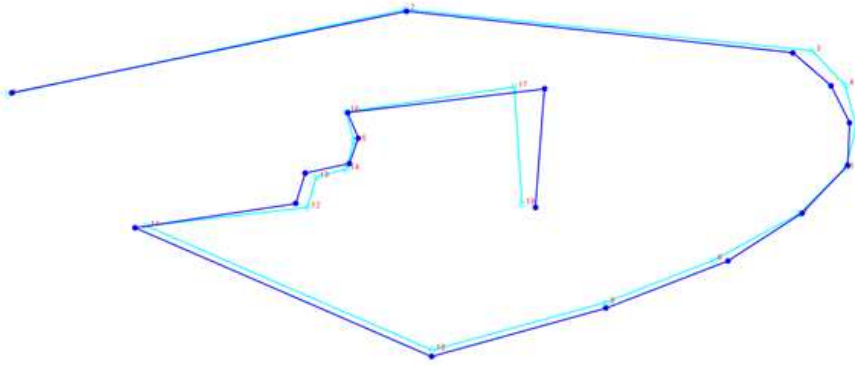
Aedes annulipes vs Aedes rusticus



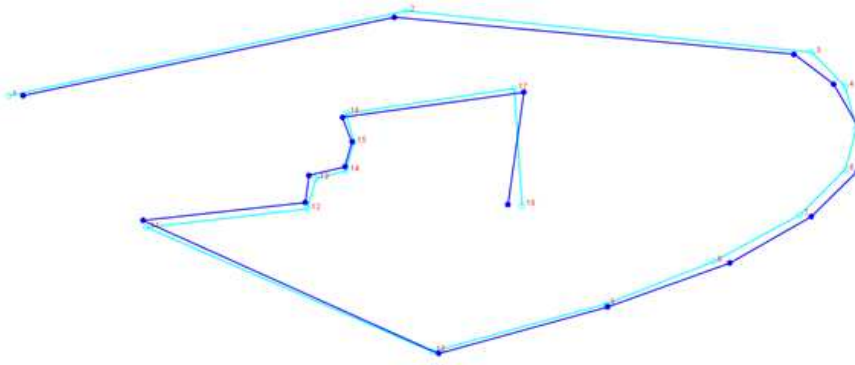
Aedes annulipes vs Aedes sticticus



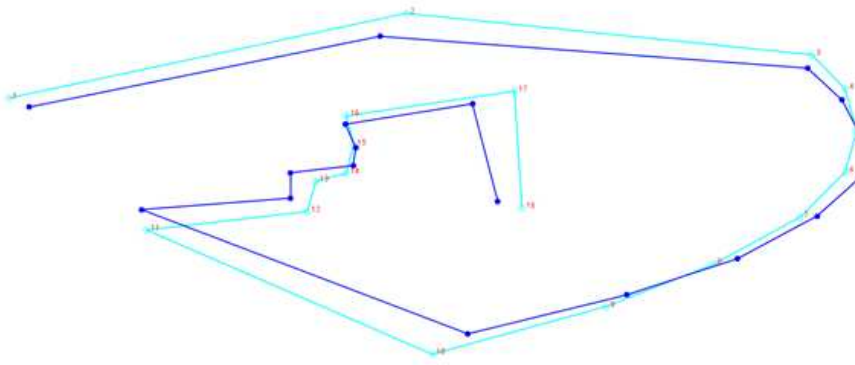
Aedes cantans vs Aedes cinereus



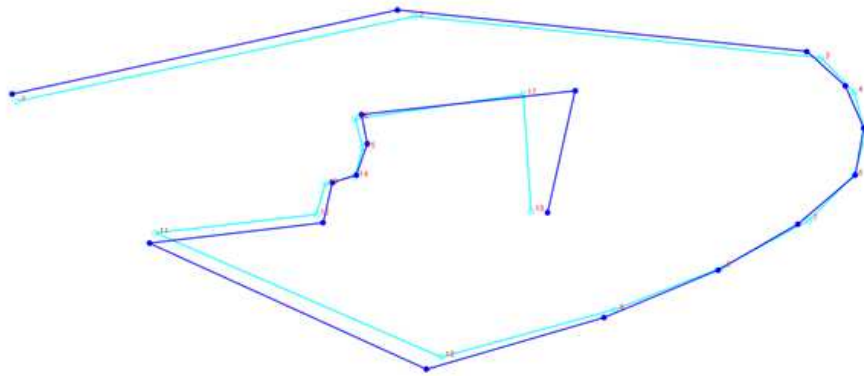
Aedes cantans vs Aedes communis



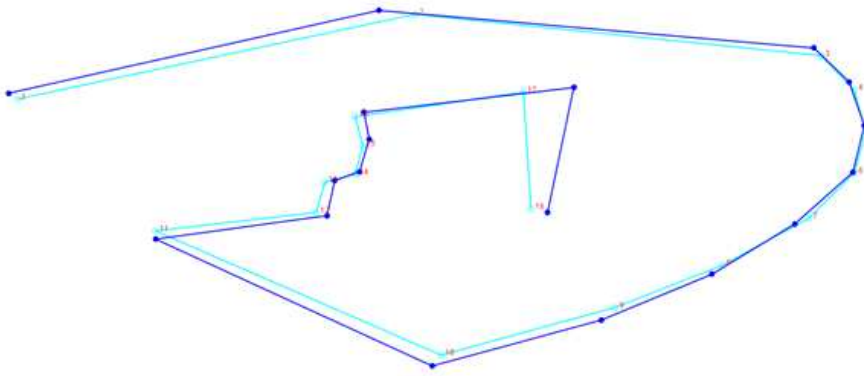
Aedes cantans vs Aedes geniculatus



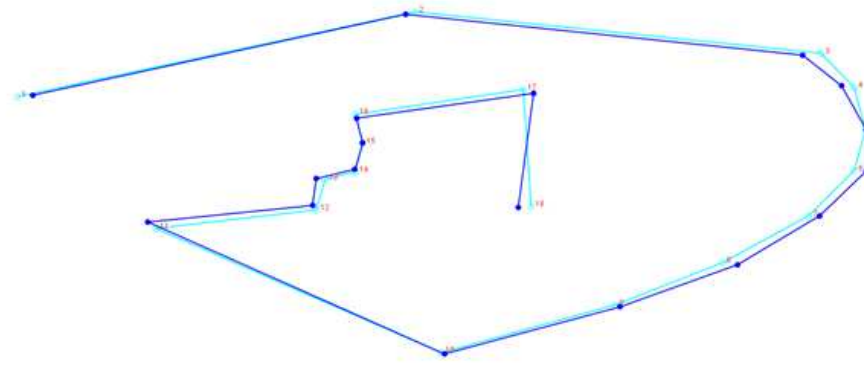
Aedes cantans vs Aedes japonicus



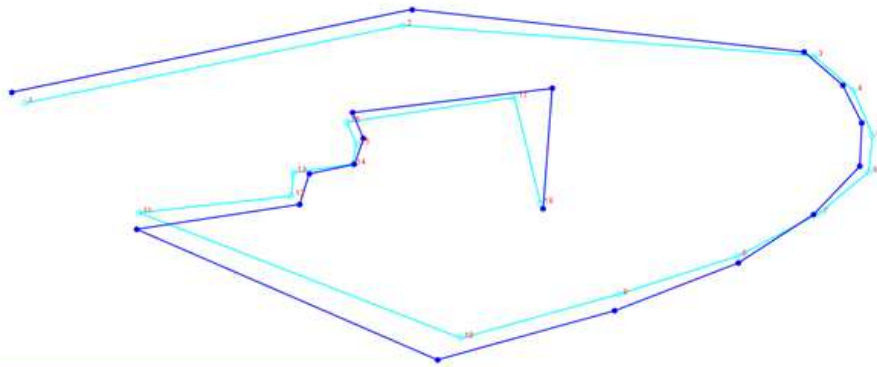
Aedes cantans vs Aedes refiki



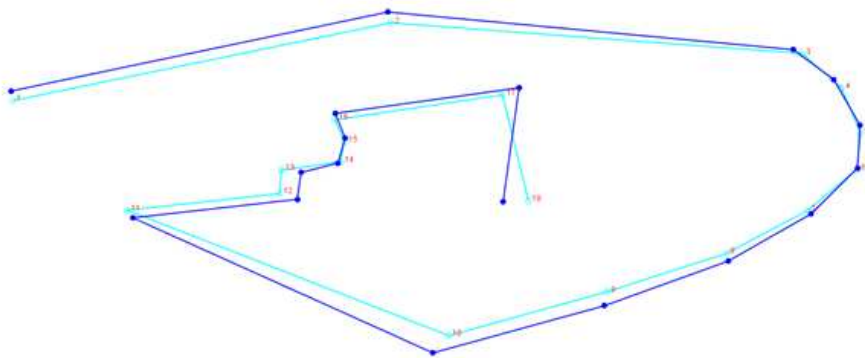
Aedes cantans vs Aedes rusticus



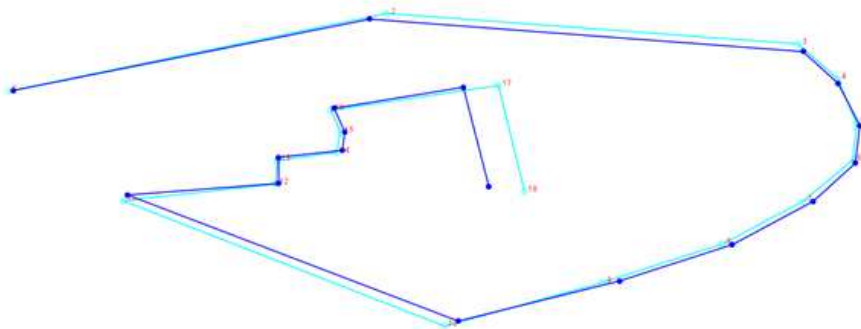
Aedes cantans vs Aedes sticticus



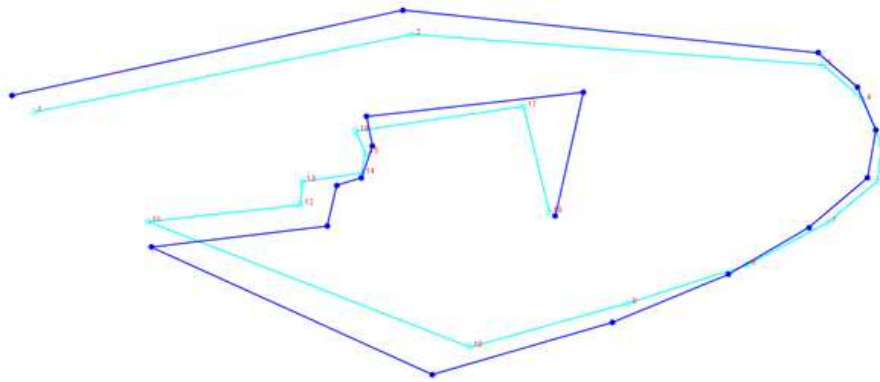
Aedes cinereus vs Aedes communis



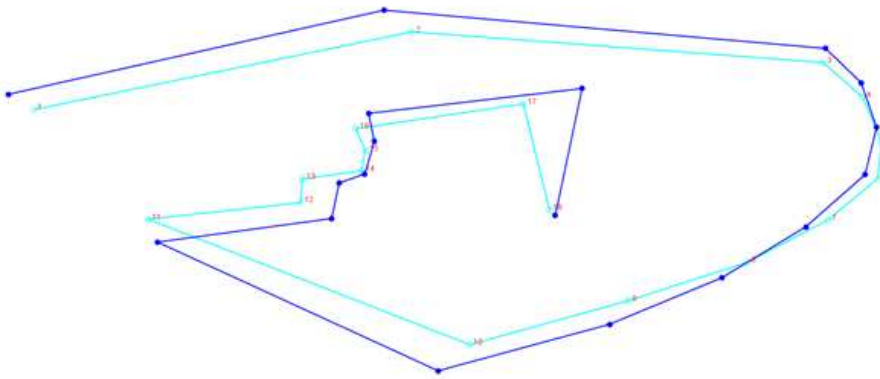
Aedes cinereus vs Aedes geniculatus



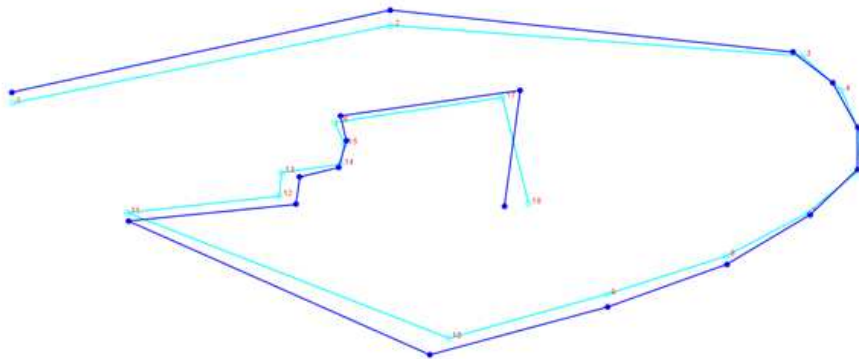
Aedes cinereus vs Aedes japonicus



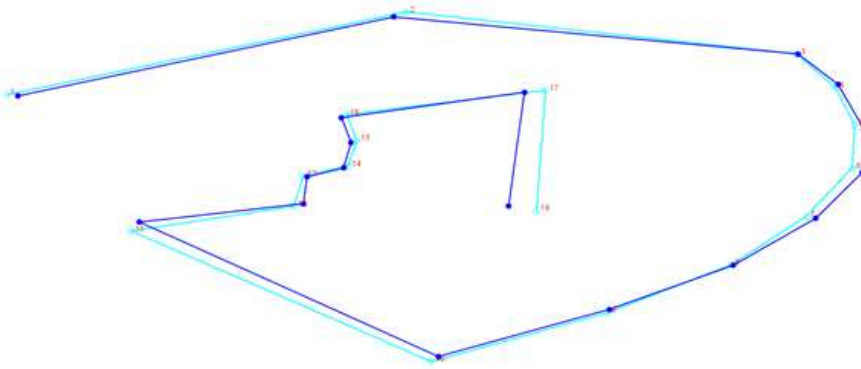
Aedes cinereus vs *Aedes refiki*



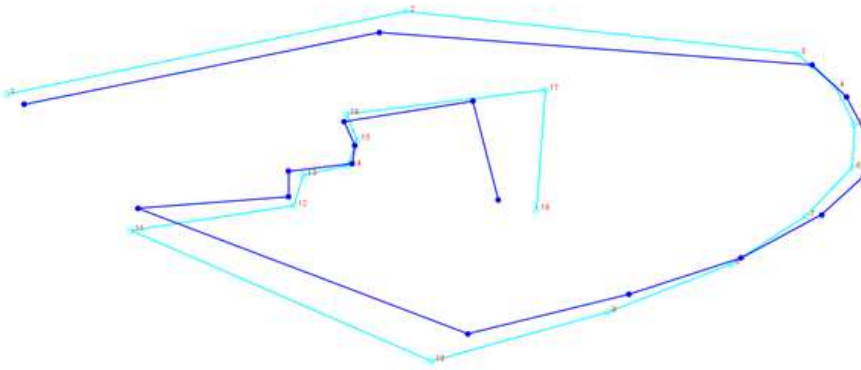
Aedes cinereus vs *Aedes rusticus*



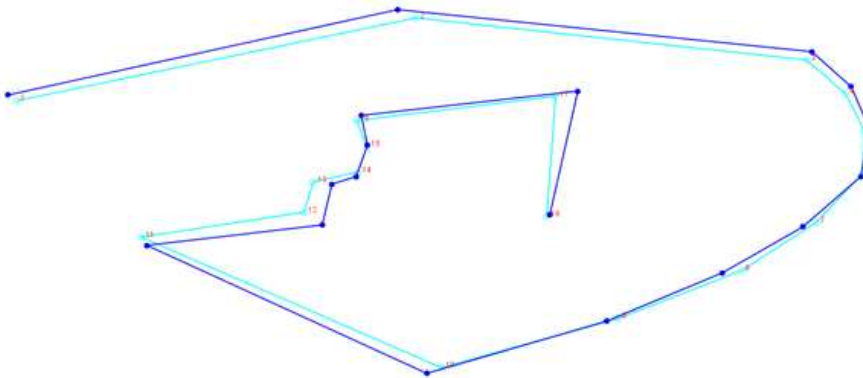
Aedes cinereus vs *Aedes sticticus*



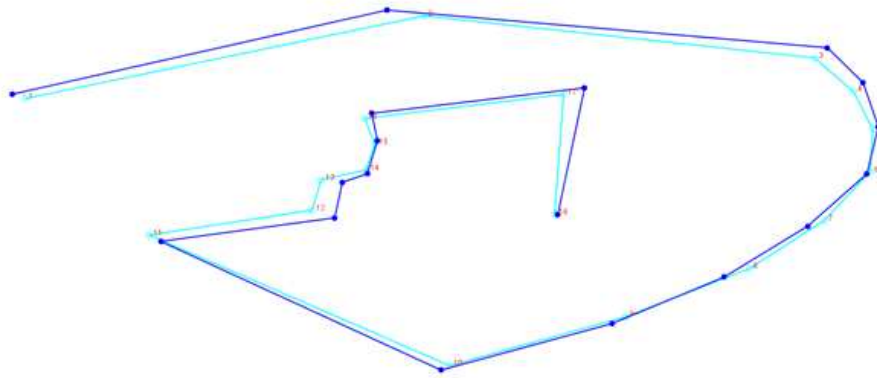
Aedes communis vs Aedes geniculatus



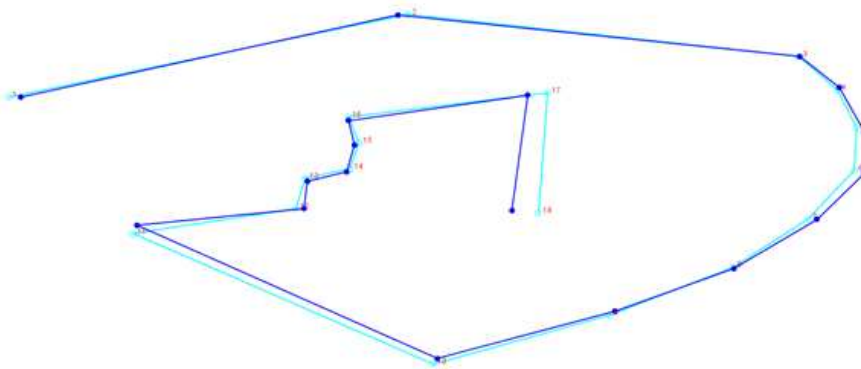
Aedes communis vs Aedes japonicus



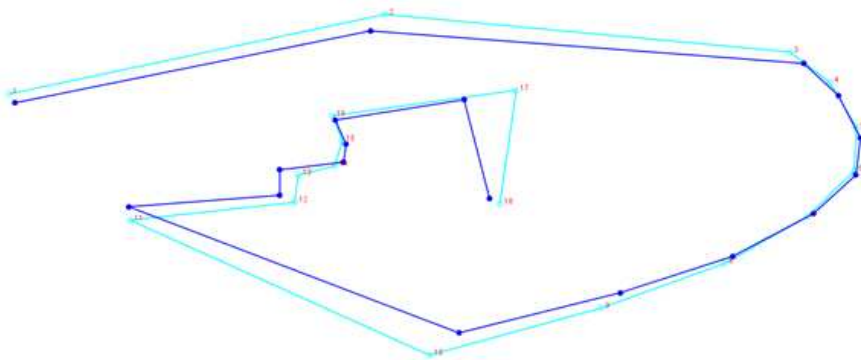
Aedes communis vs Aedes refiki



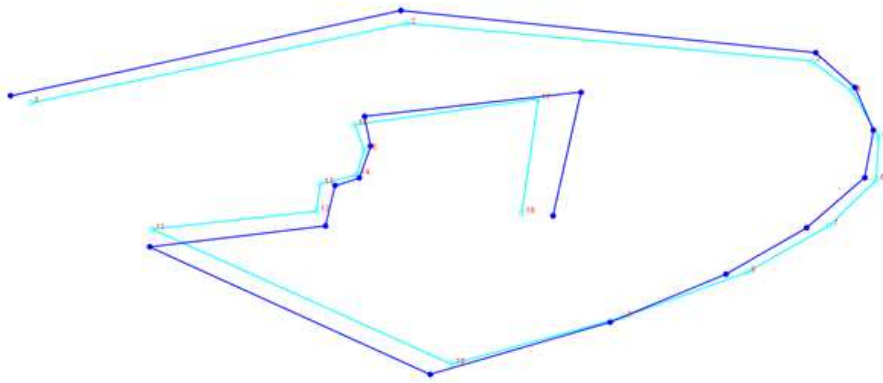
Aedes communis vs Aedes rusticus



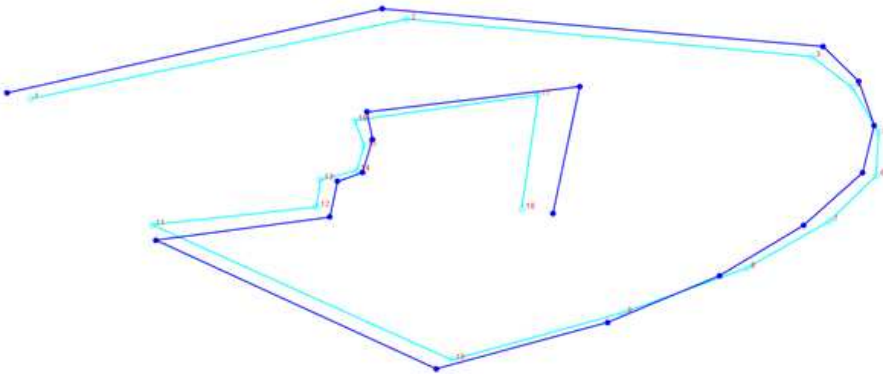
Aedes communis vs Aedes sticticus



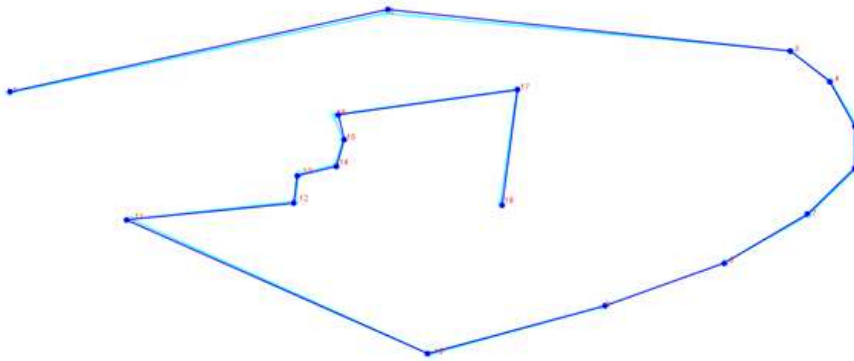
Aedes geniculatus vs Aedes japonicus



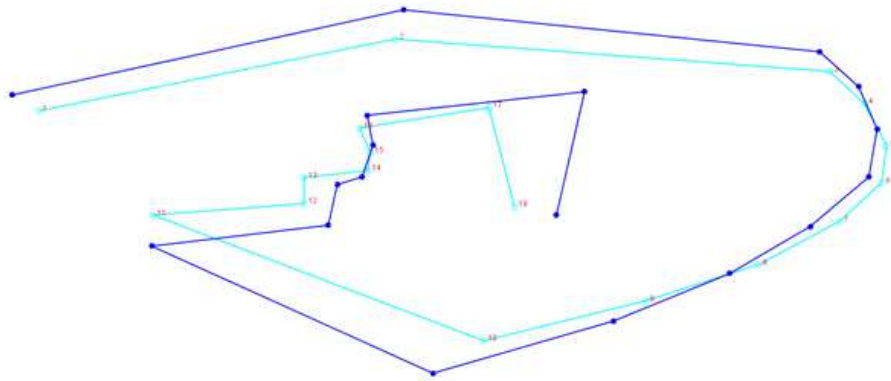
Aedes geniculatus vs Aedes refiki



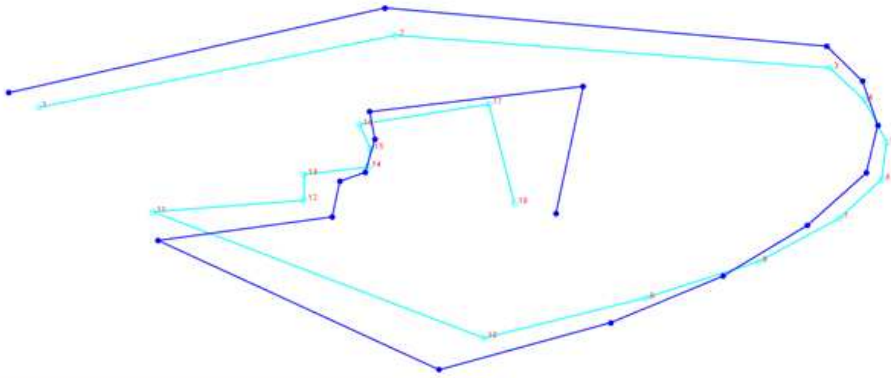
Aedes geniculatus vs Aedes rusticus



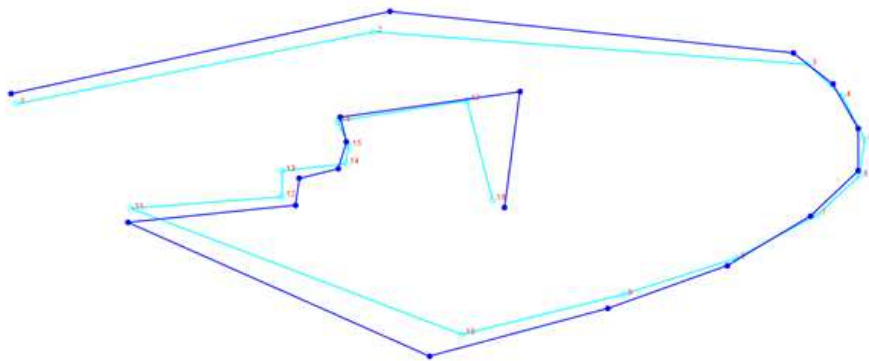
Aedes geniculatus vs Aedes sticticus



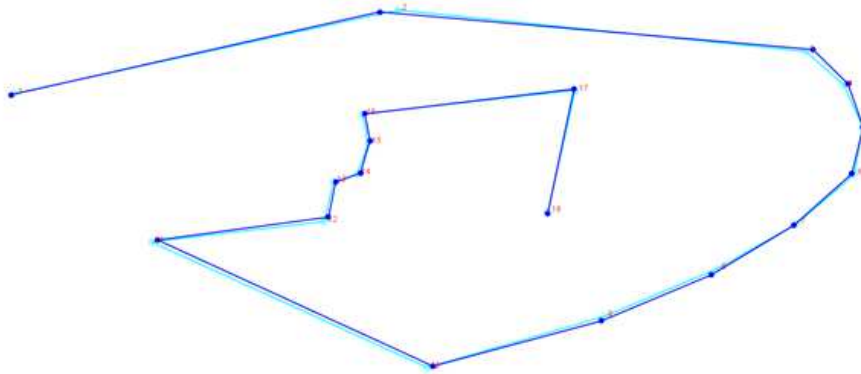
Aedes japonicus vs Aedes refiki



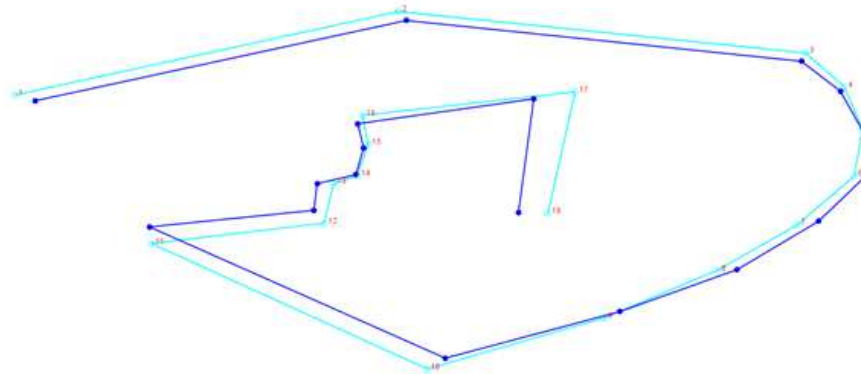
Aedes japonicus vs Aedes rusticus



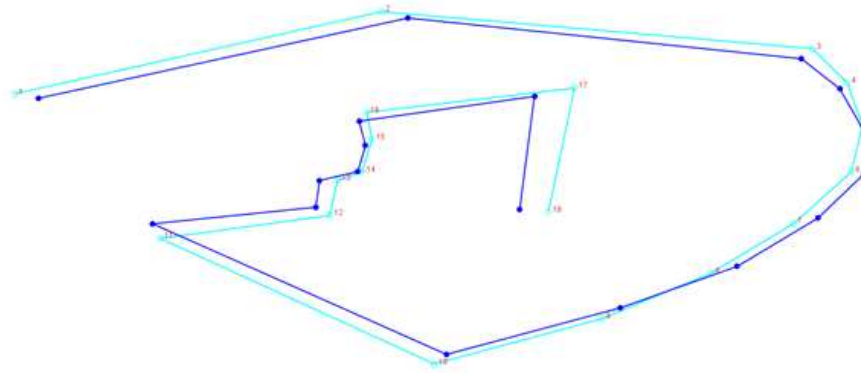
Aedes japonicus vs Aedes sticticus



Aedes refiki vs Aedes rusticus

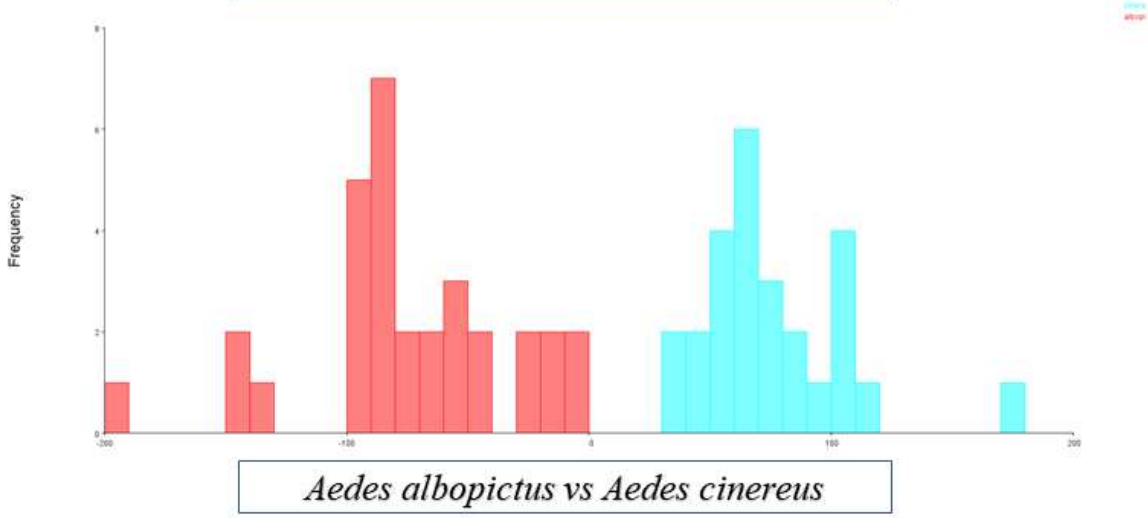
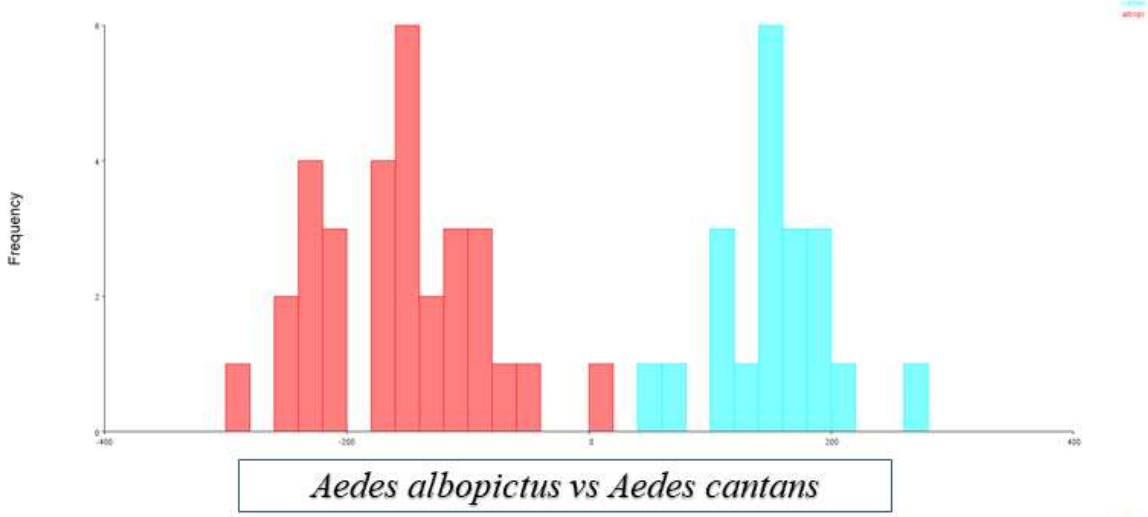
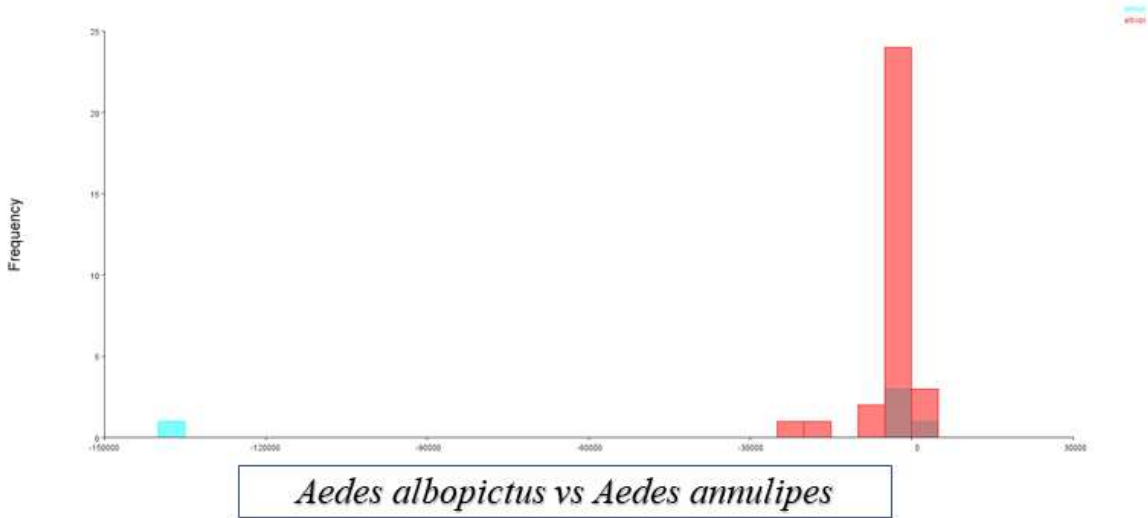


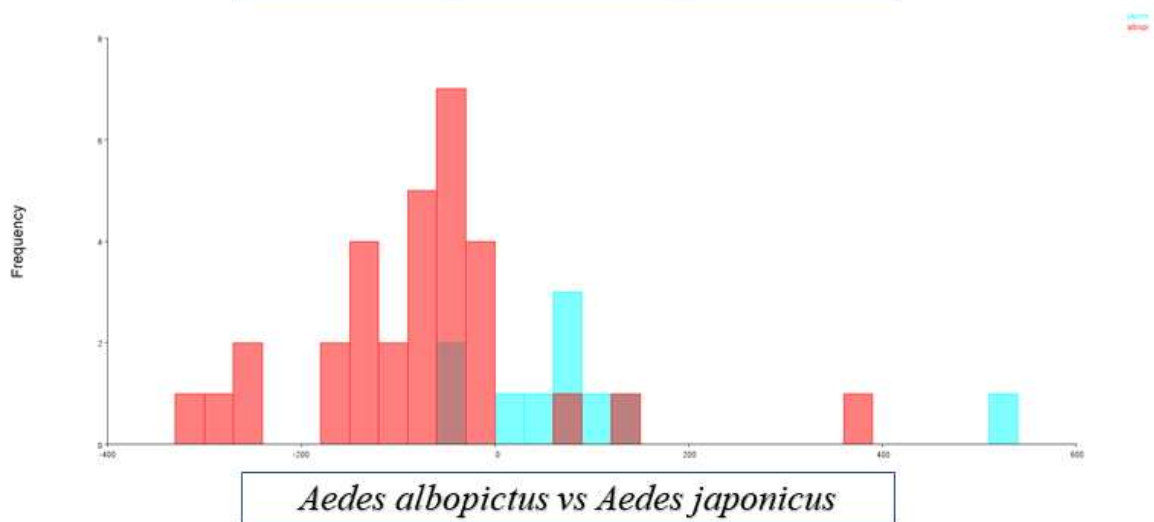
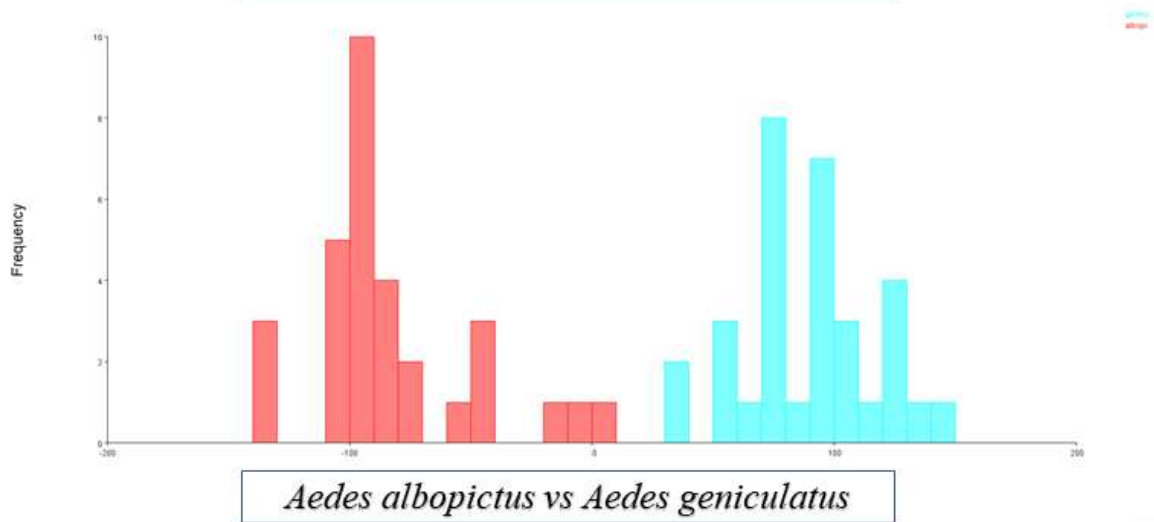
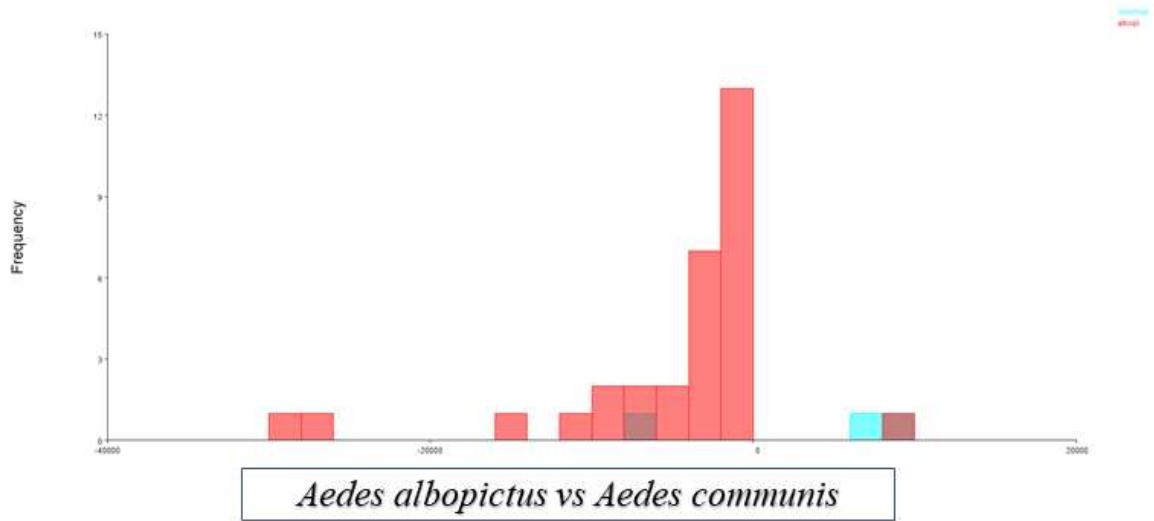
Aedes refiki vs Aedes sticticus

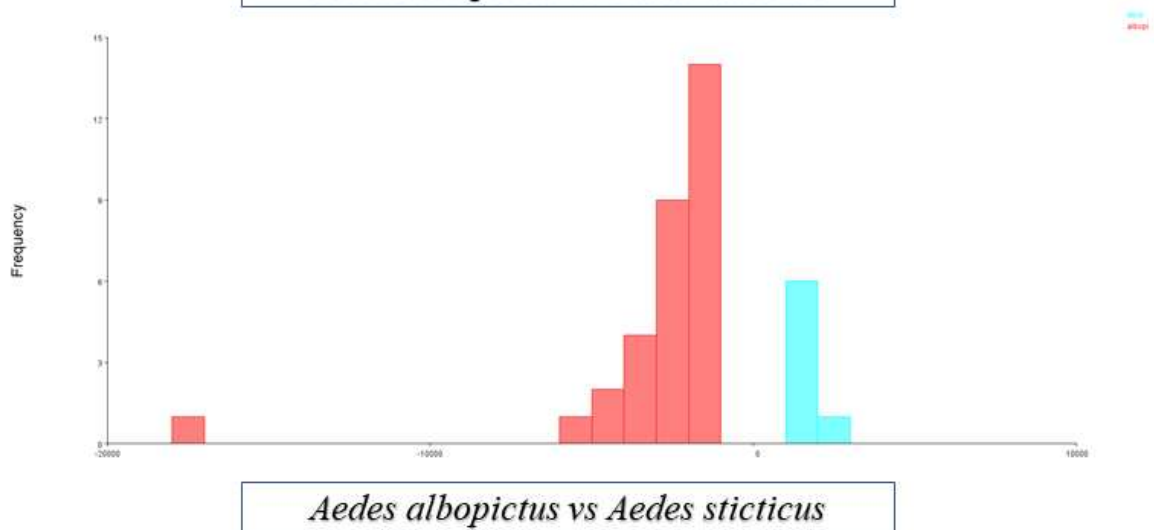
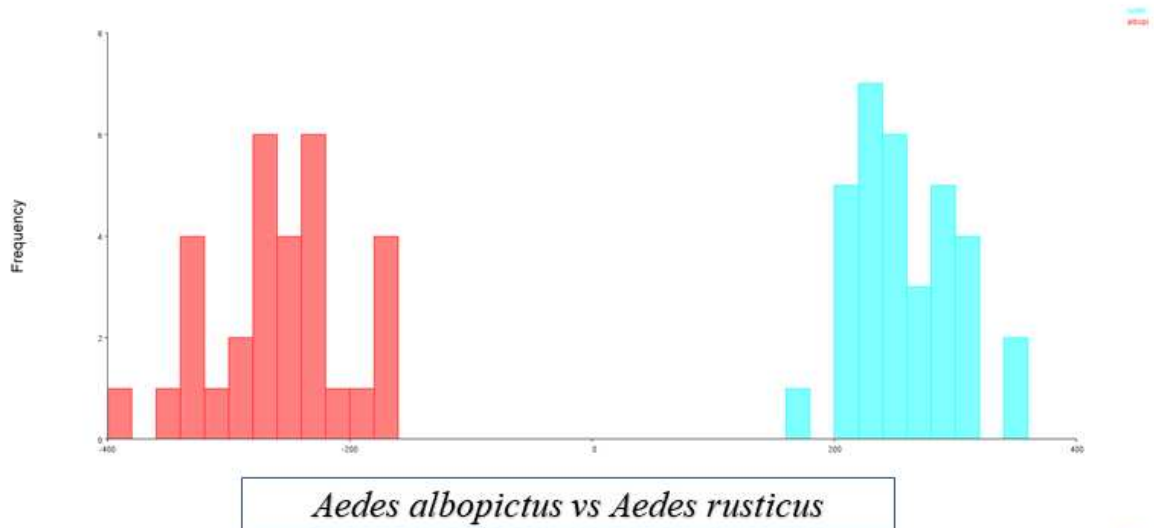
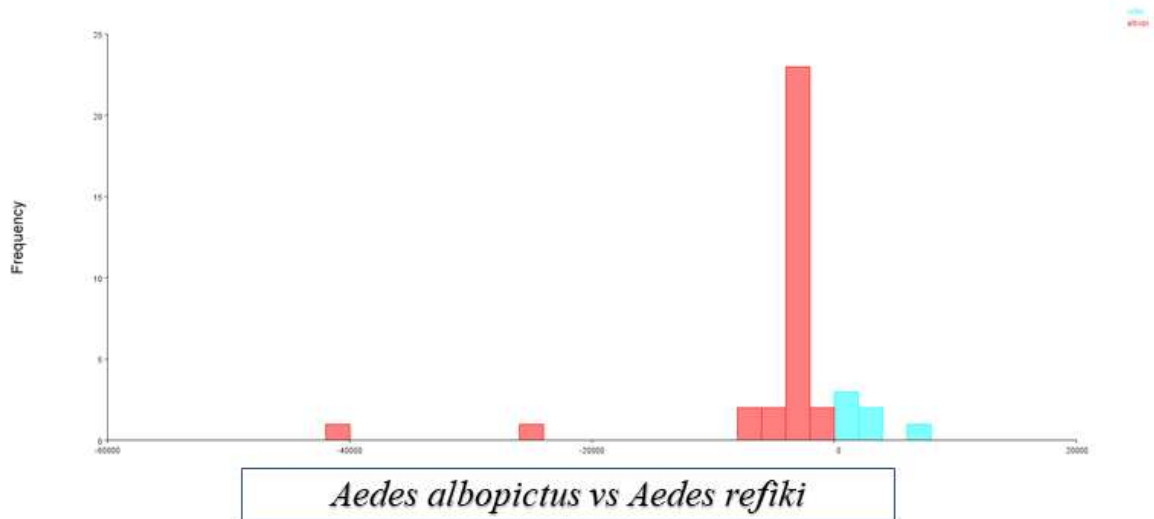


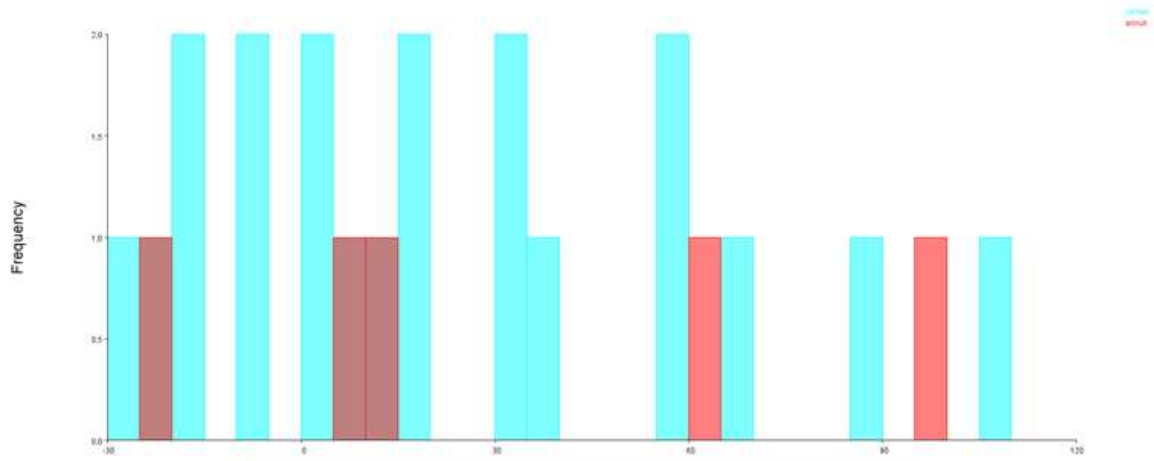
Aedes rusticus vs Aedes sticticus

Annexe 6 : Validation croisée des CVA pour les espèces du genre *Aedes*

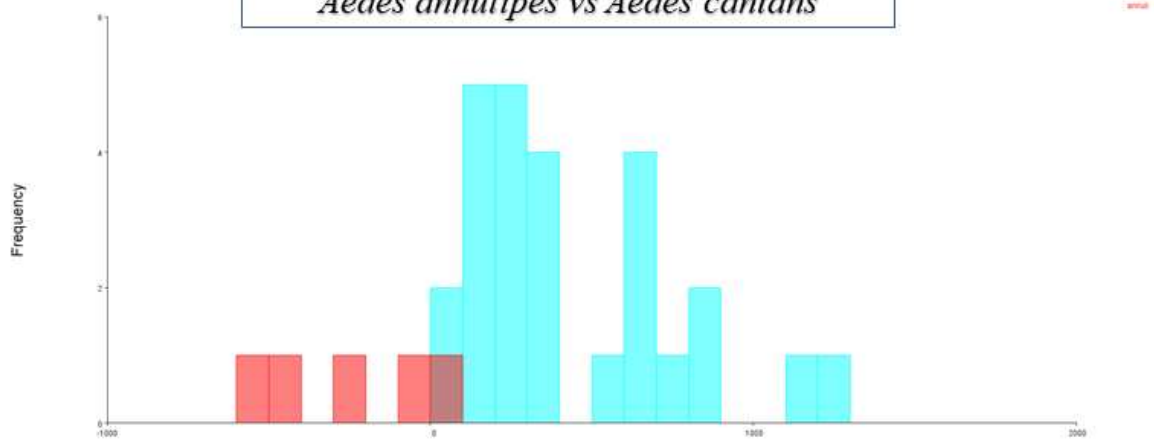




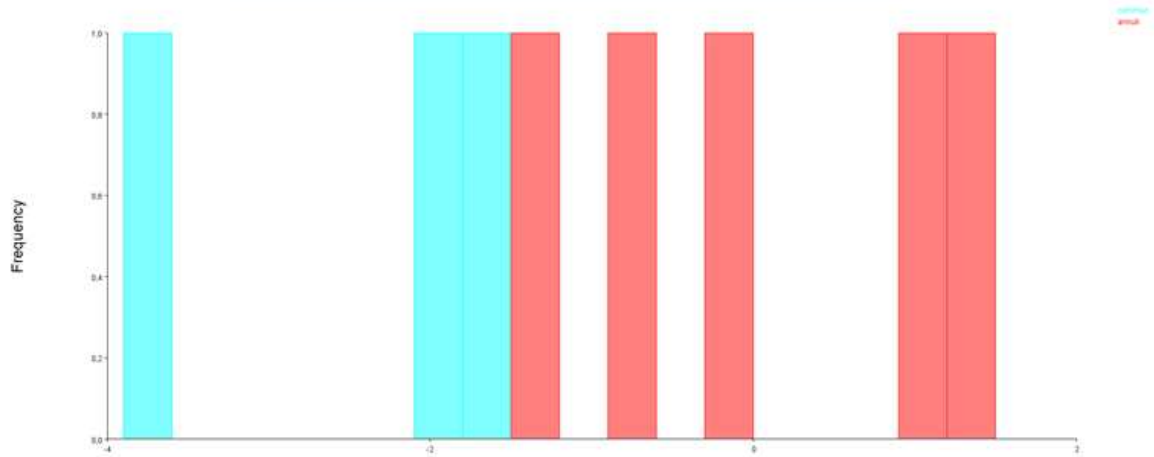




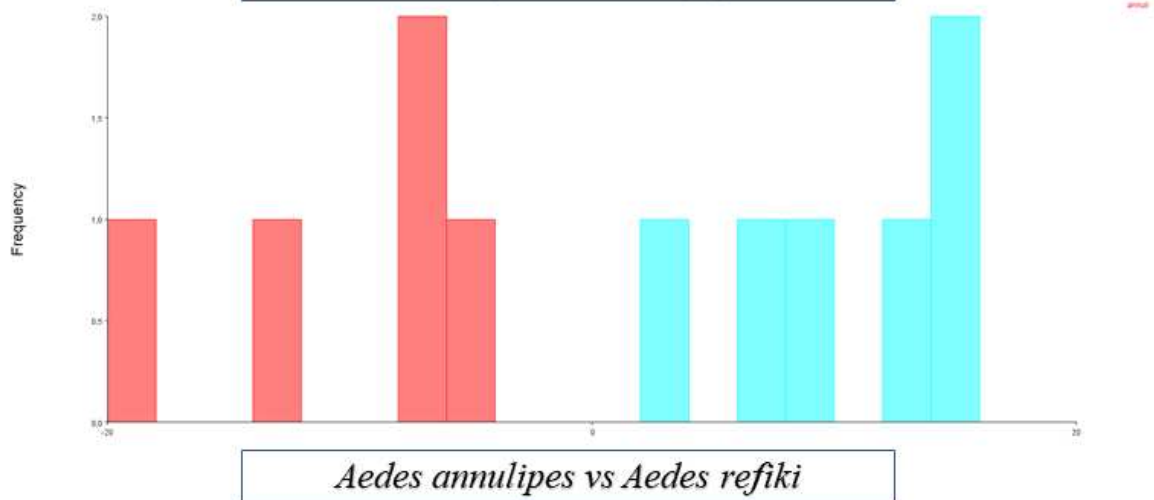
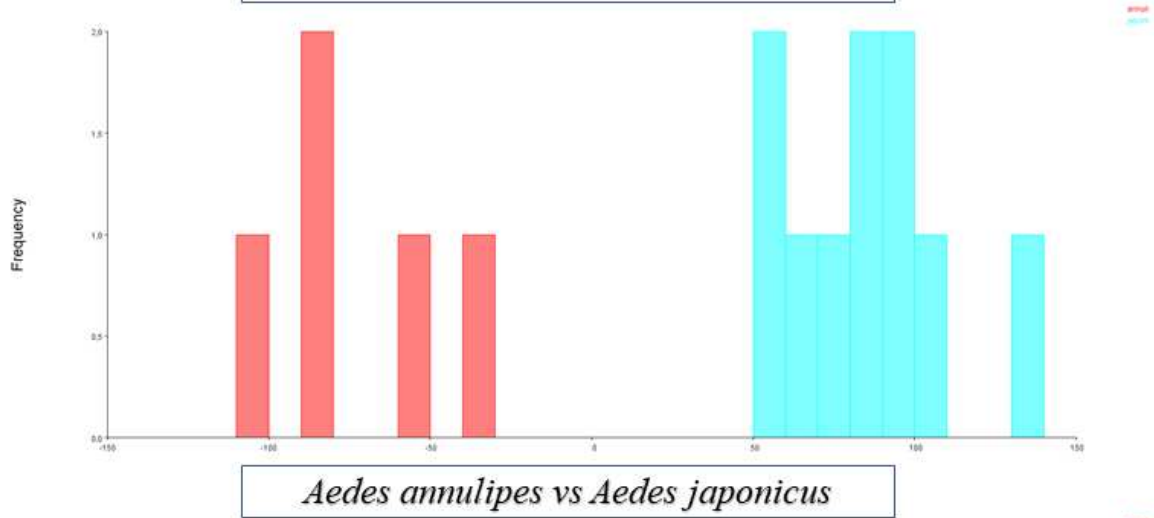
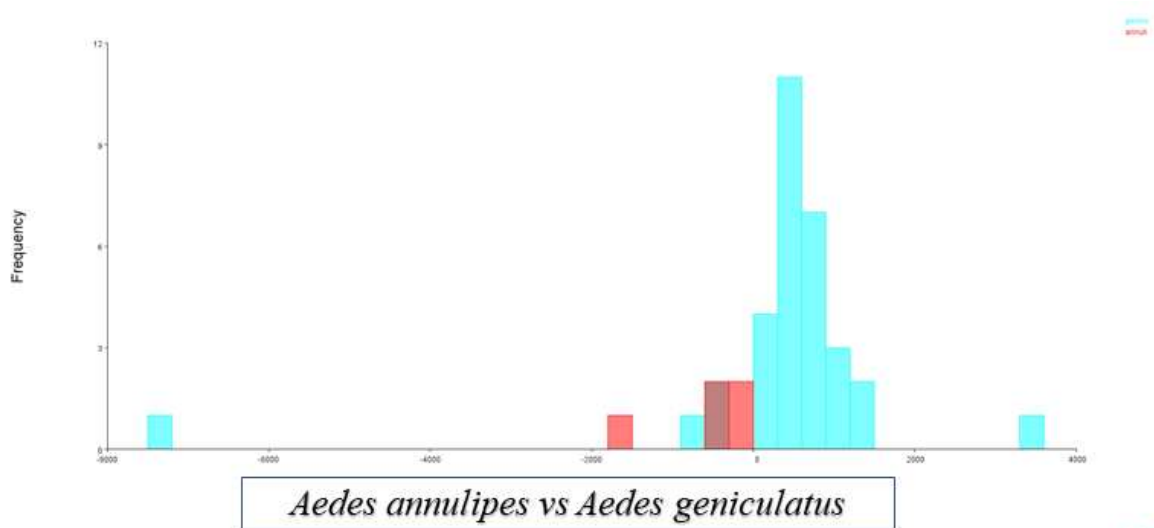
Aedes annulipes vs *Aedes cantans*

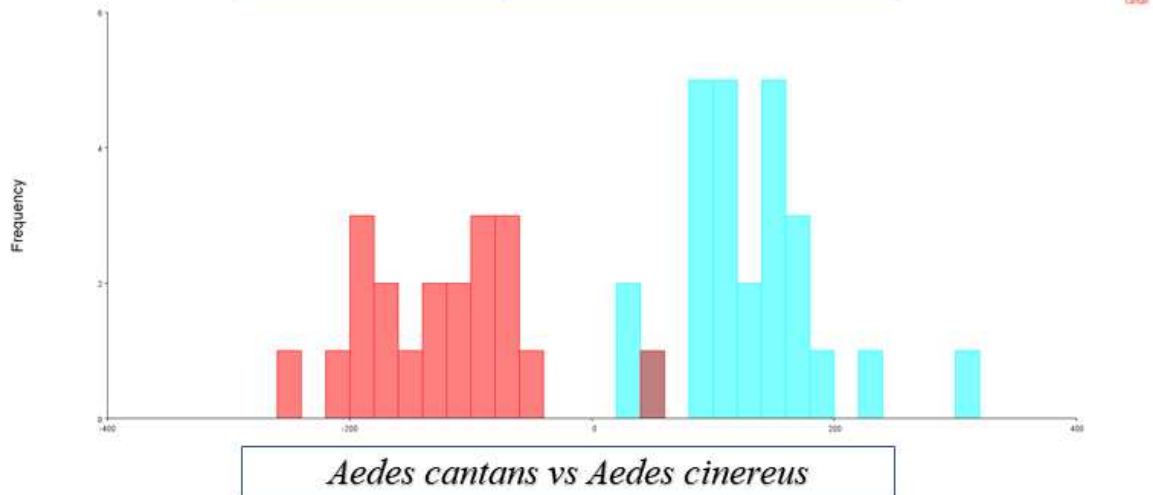
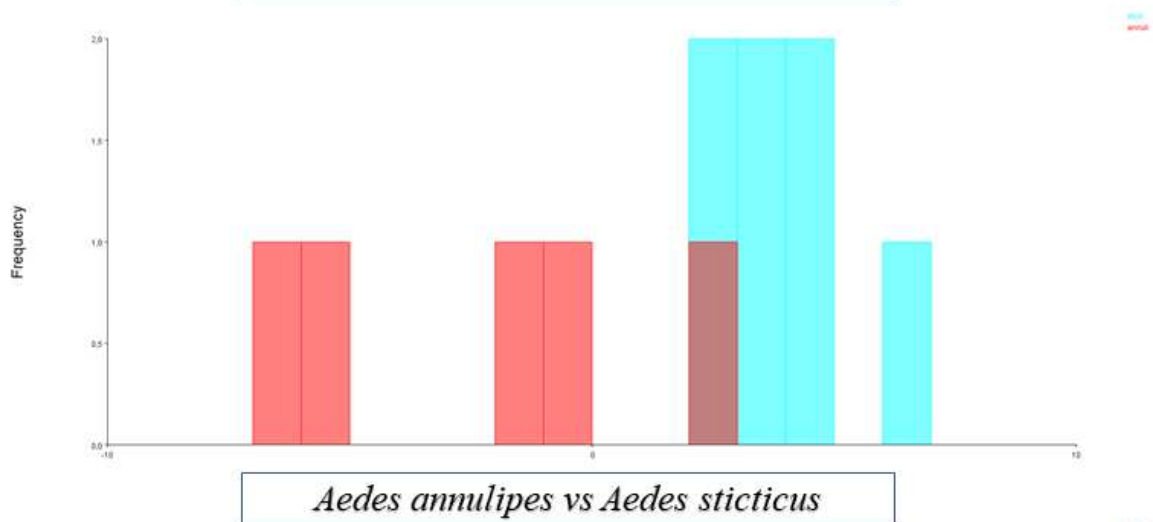
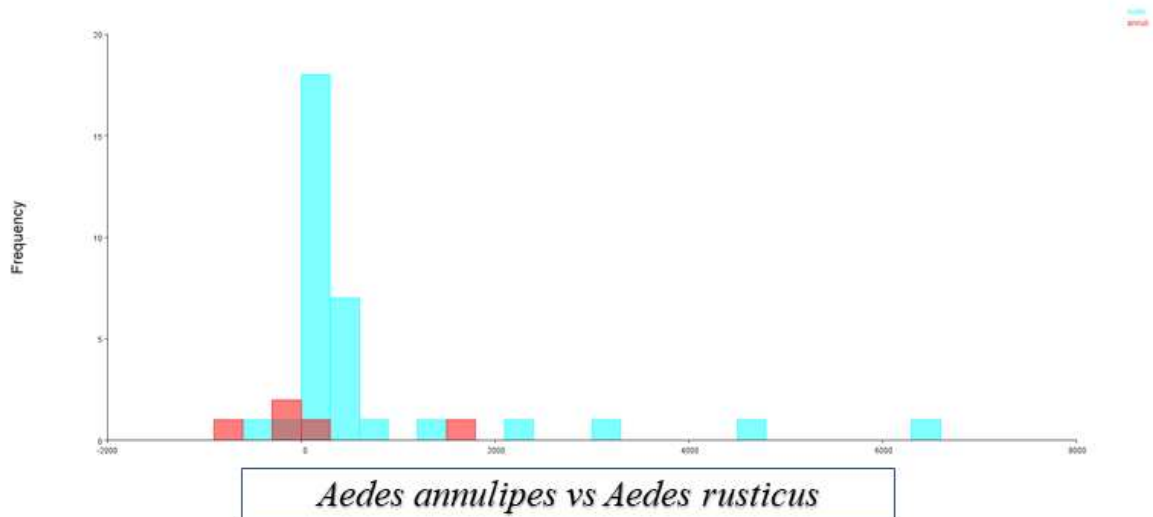


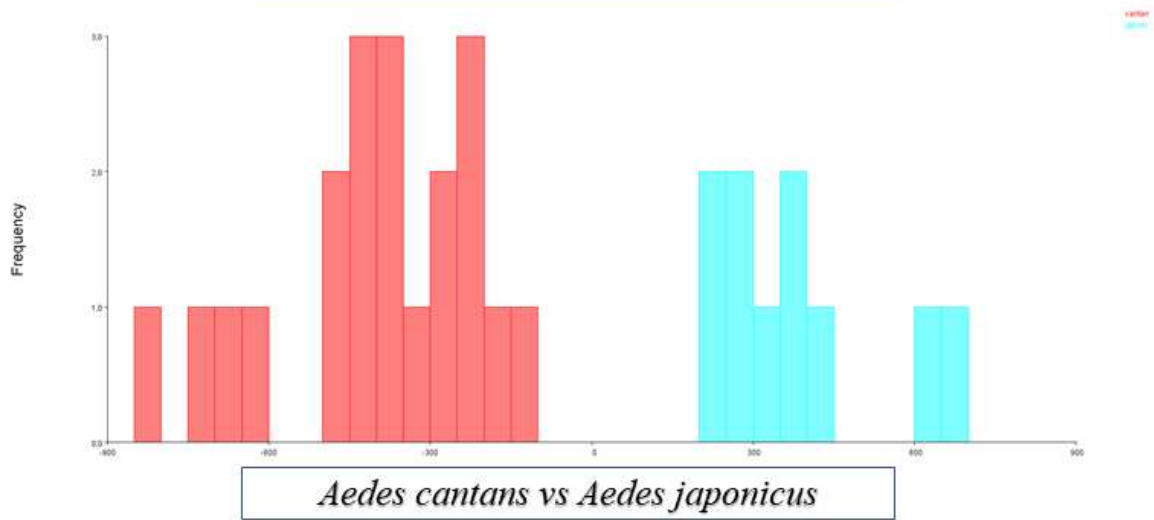
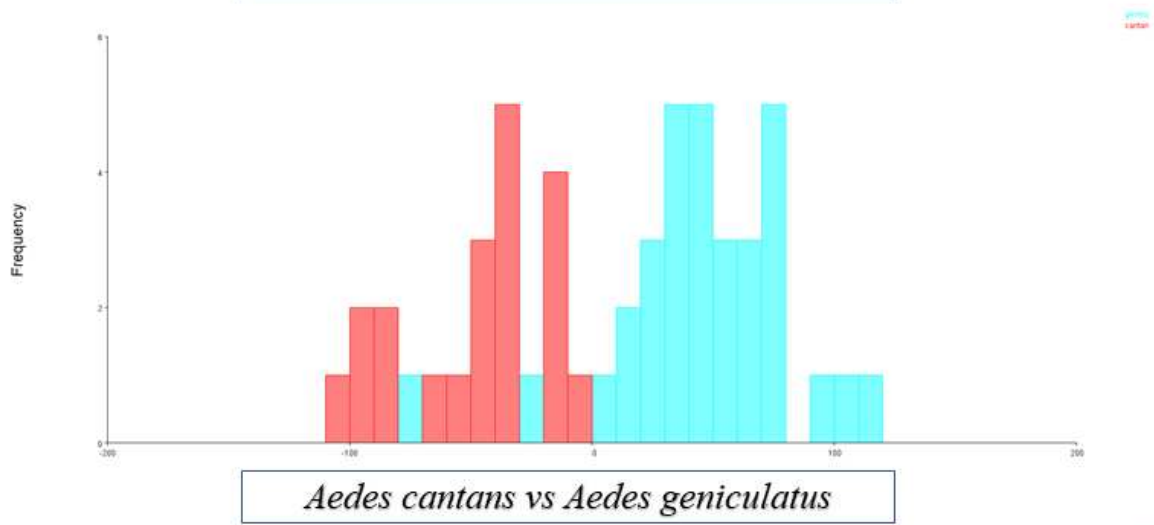
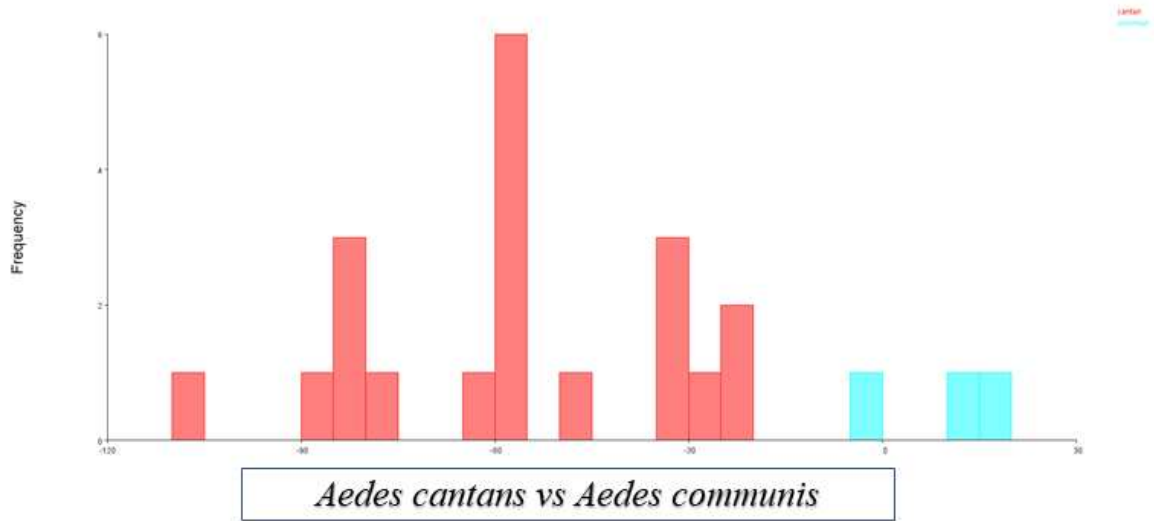
Aedes annulipes vs *Aedes cinereus*

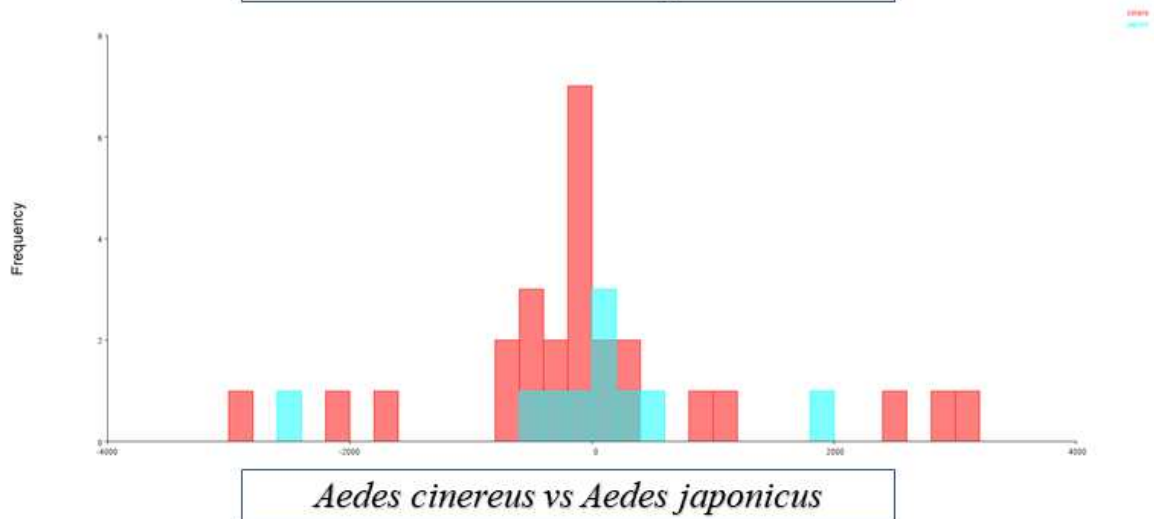
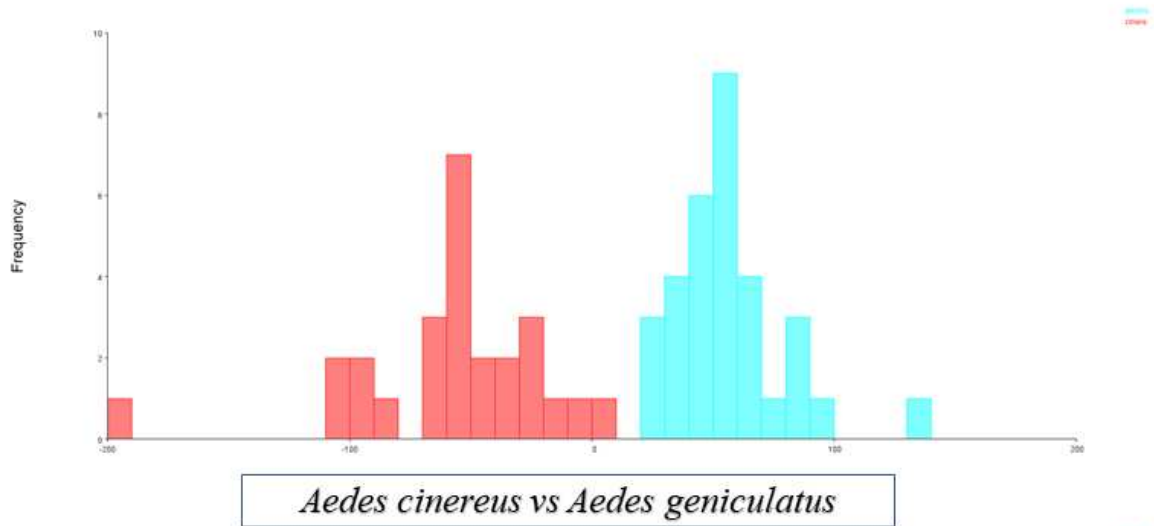
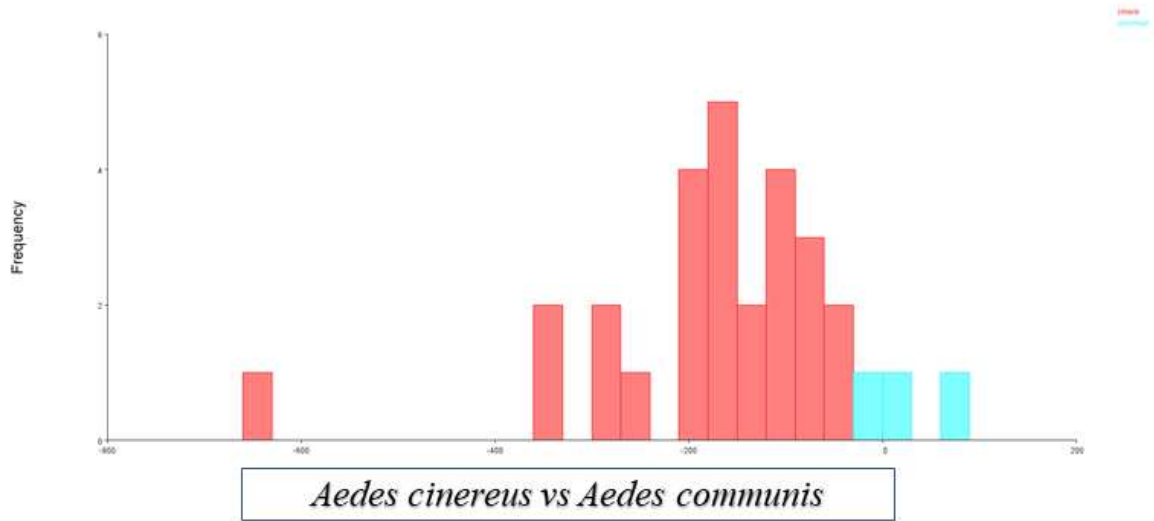


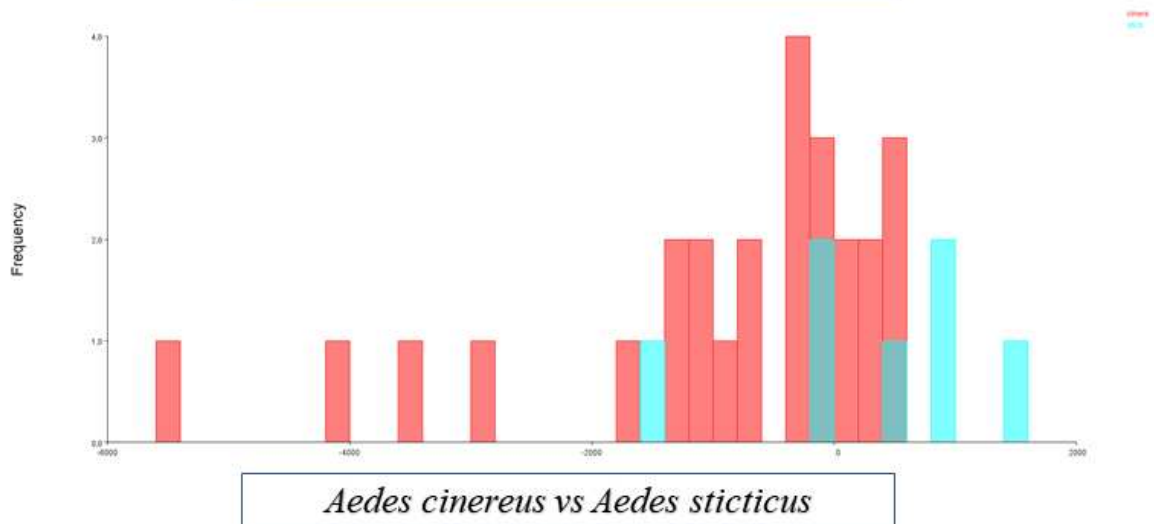
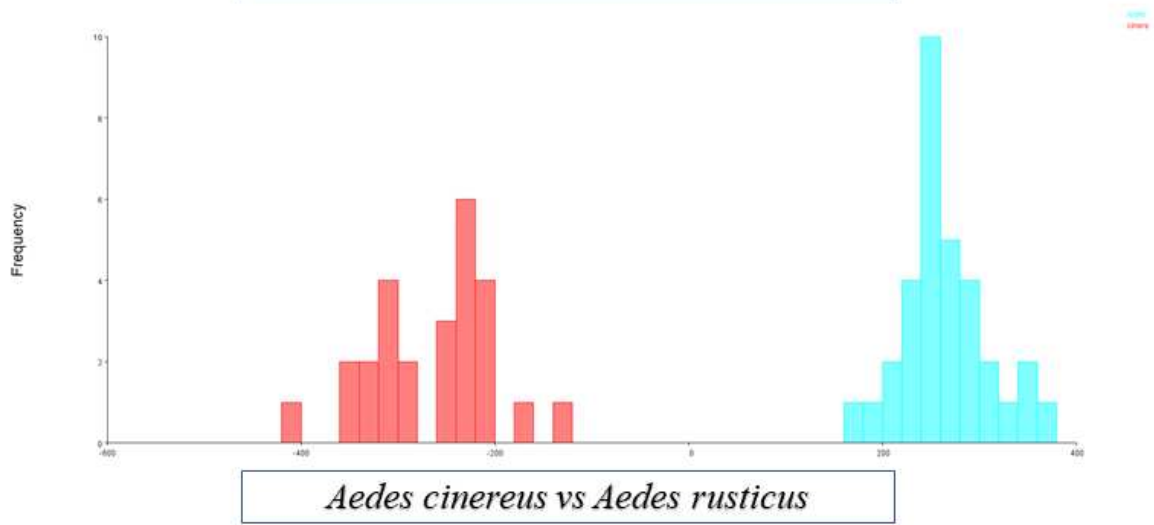
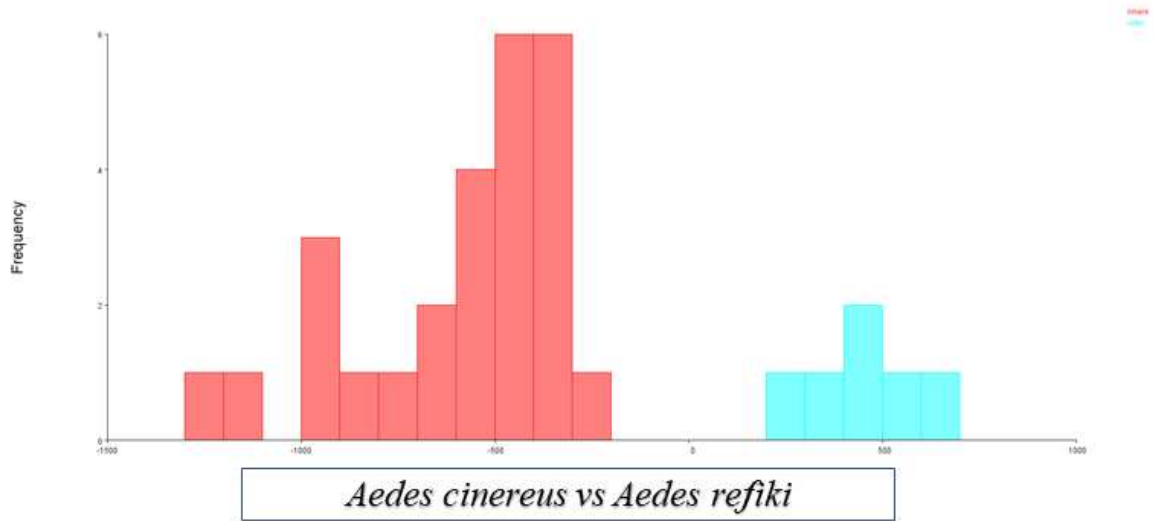
Aedes annulipes vs *Aedes communis*

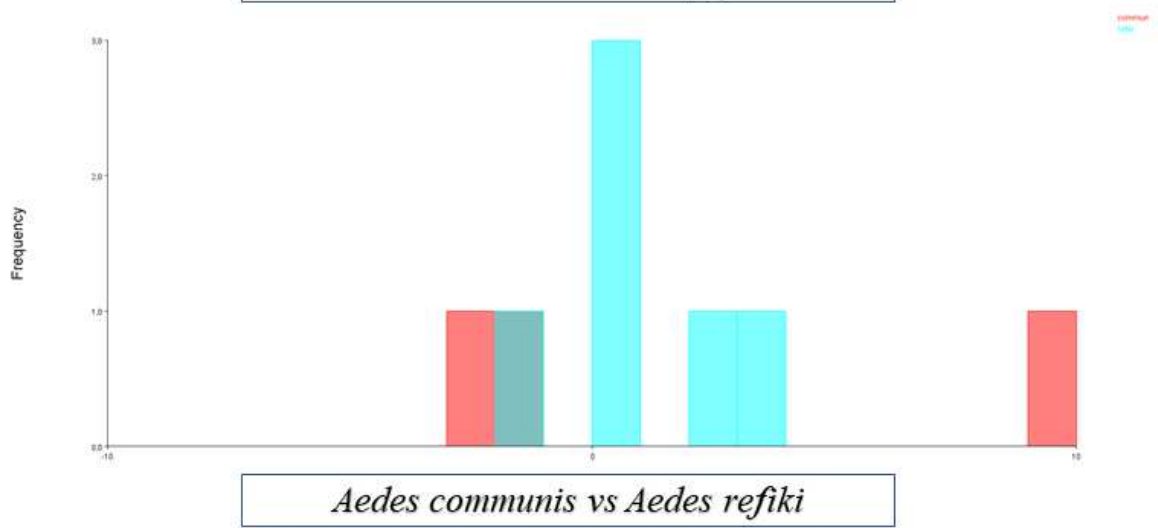
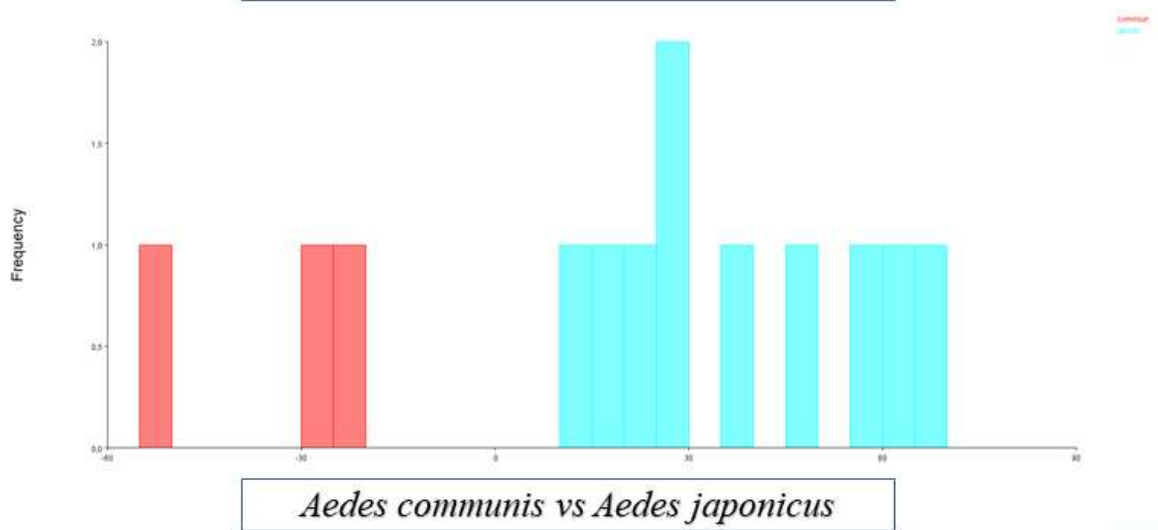
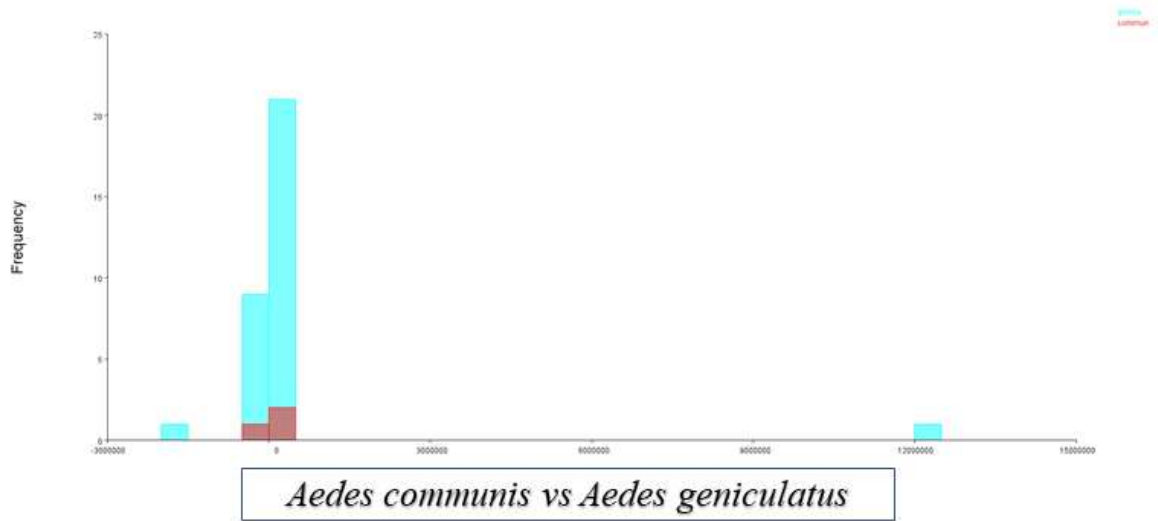


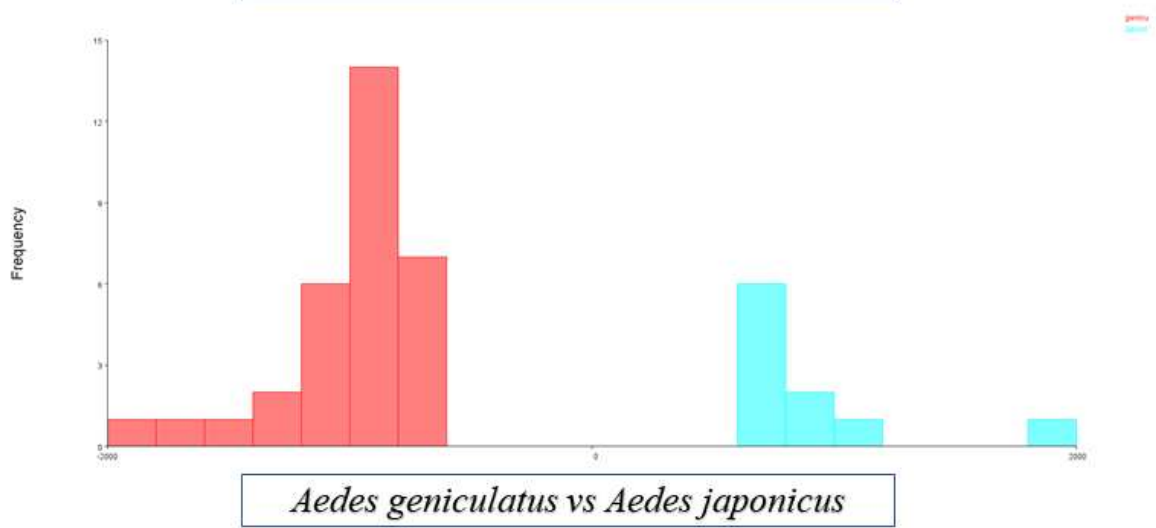
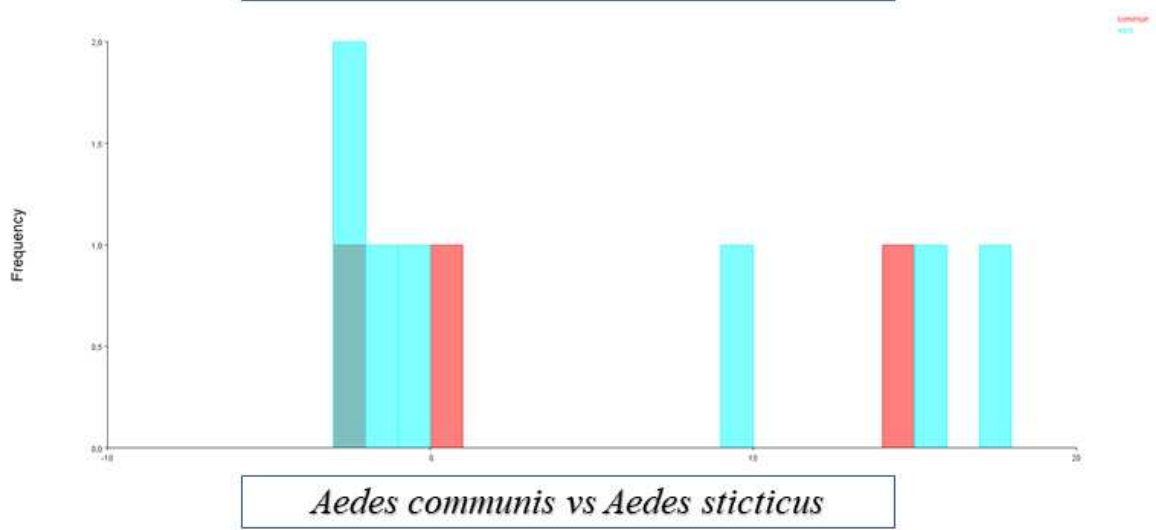
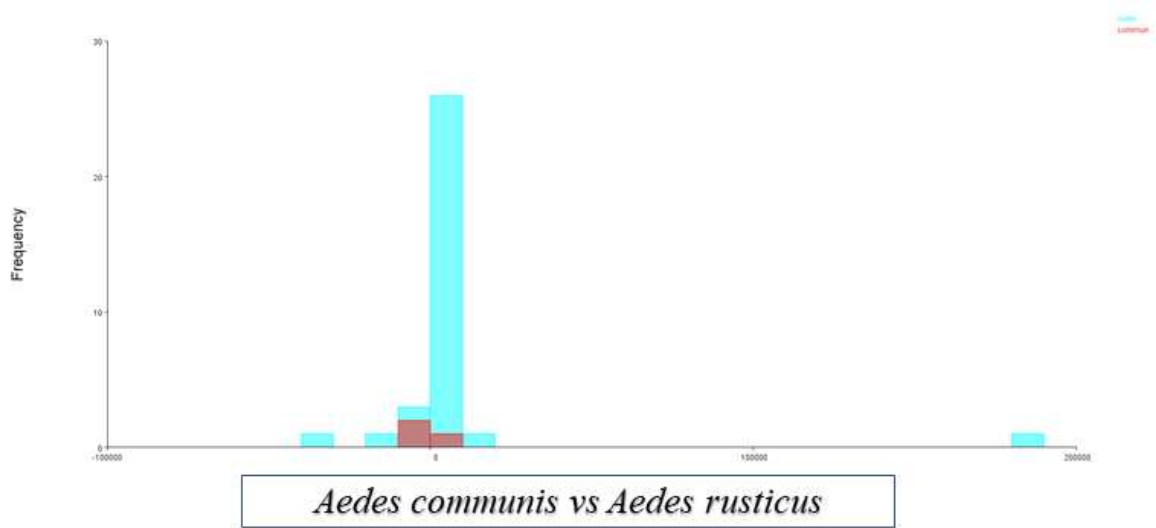


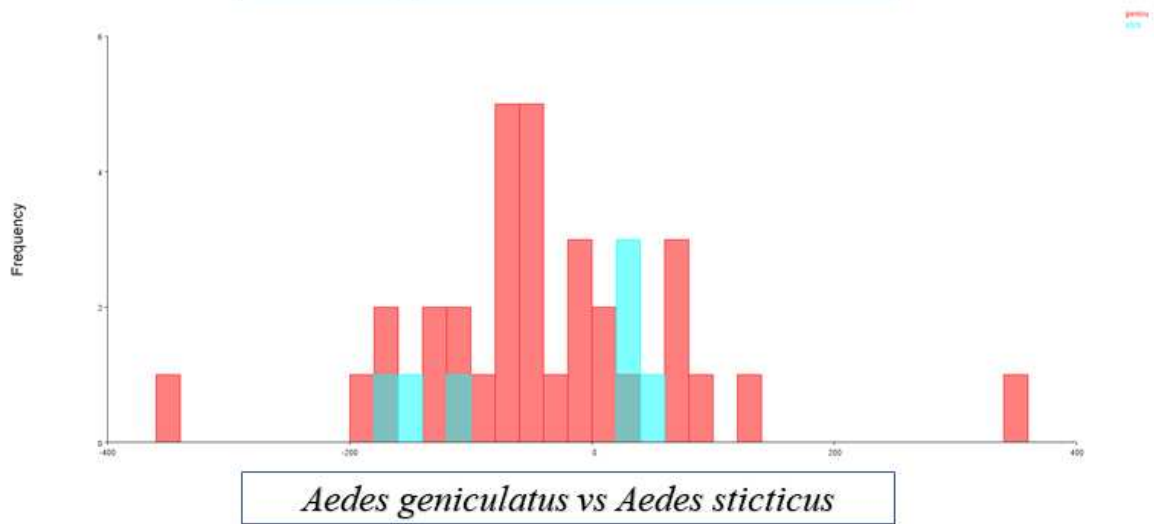
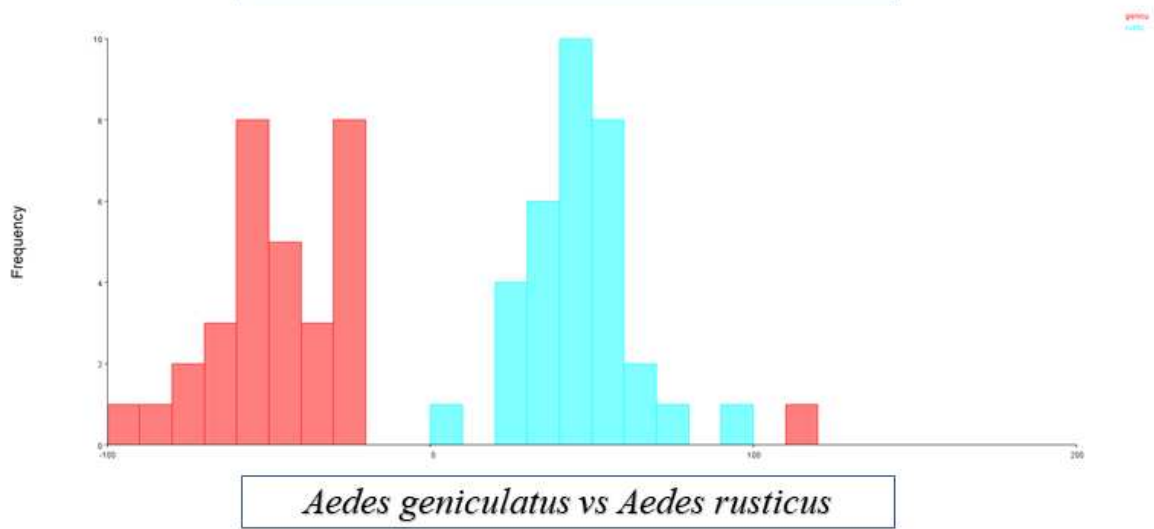
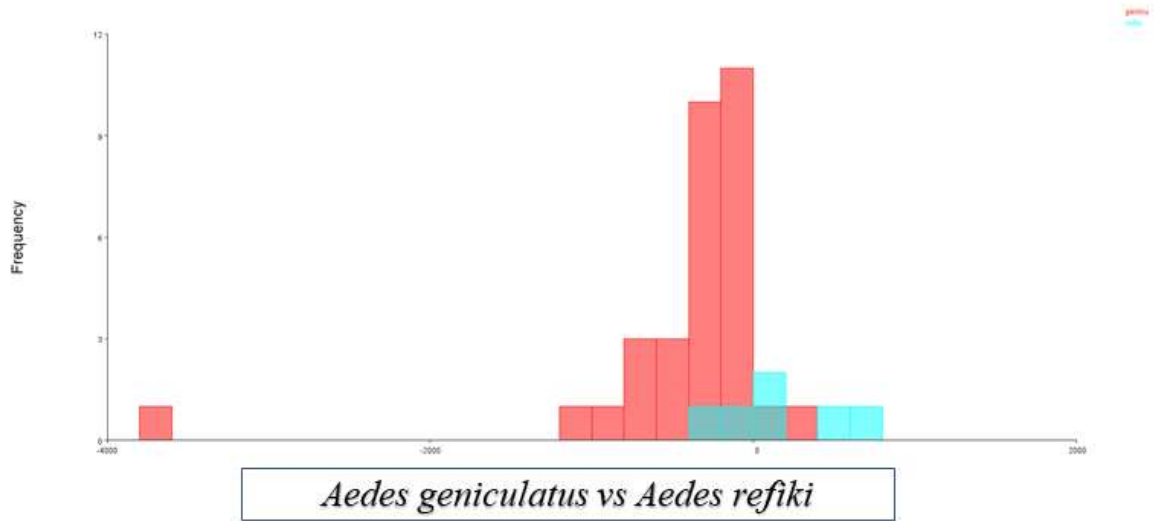


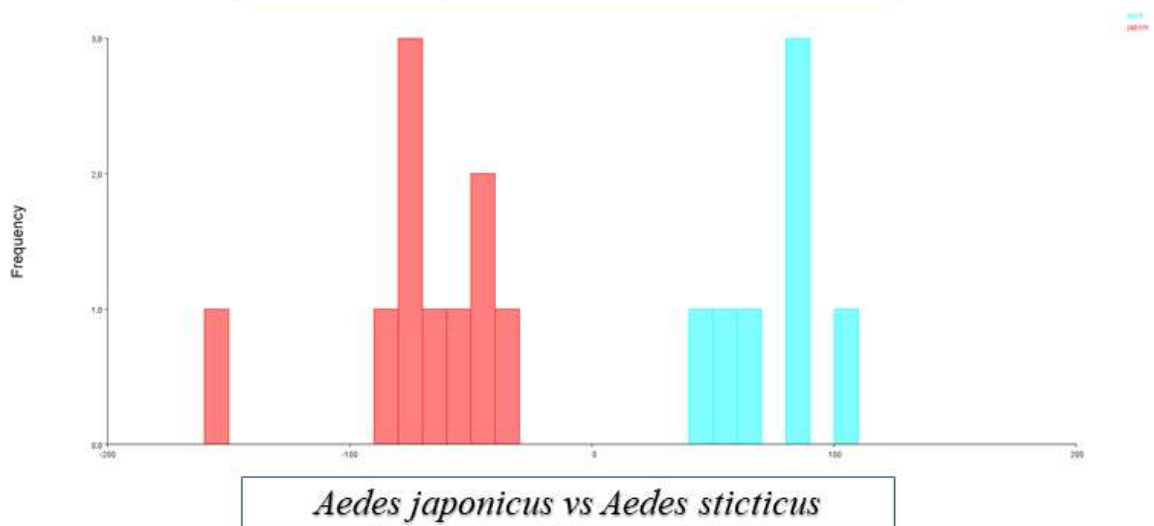
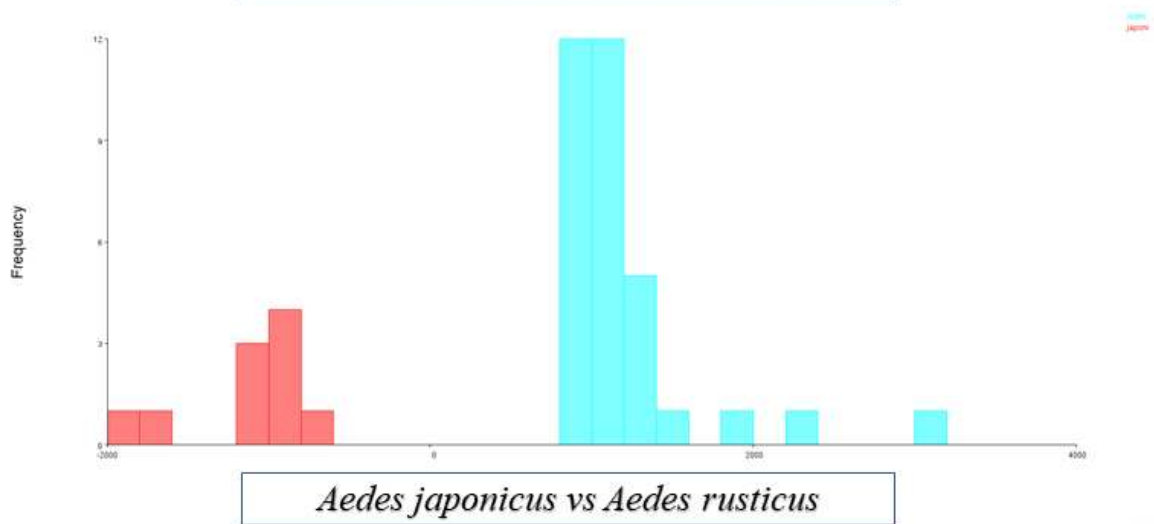
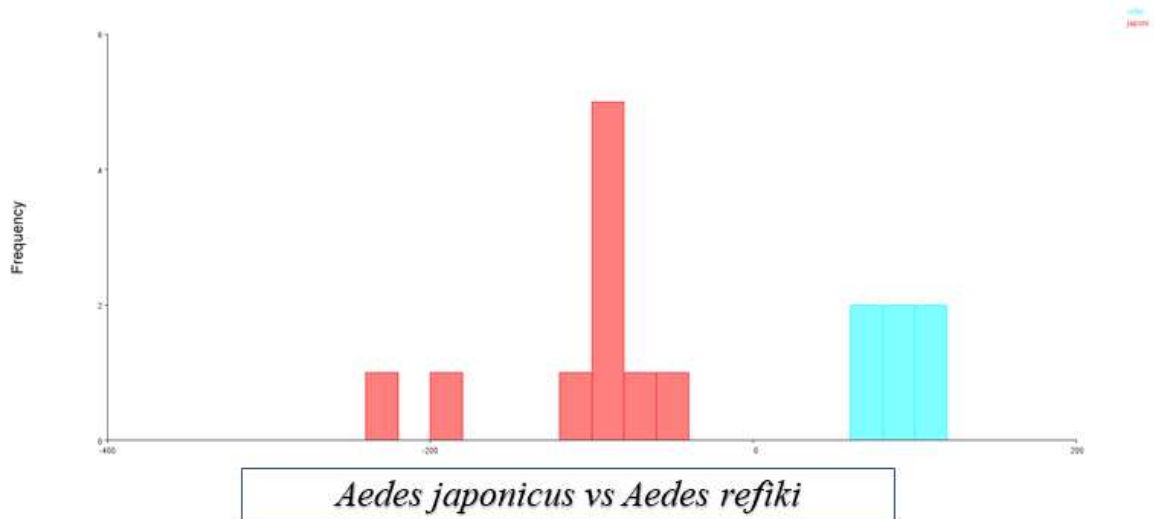


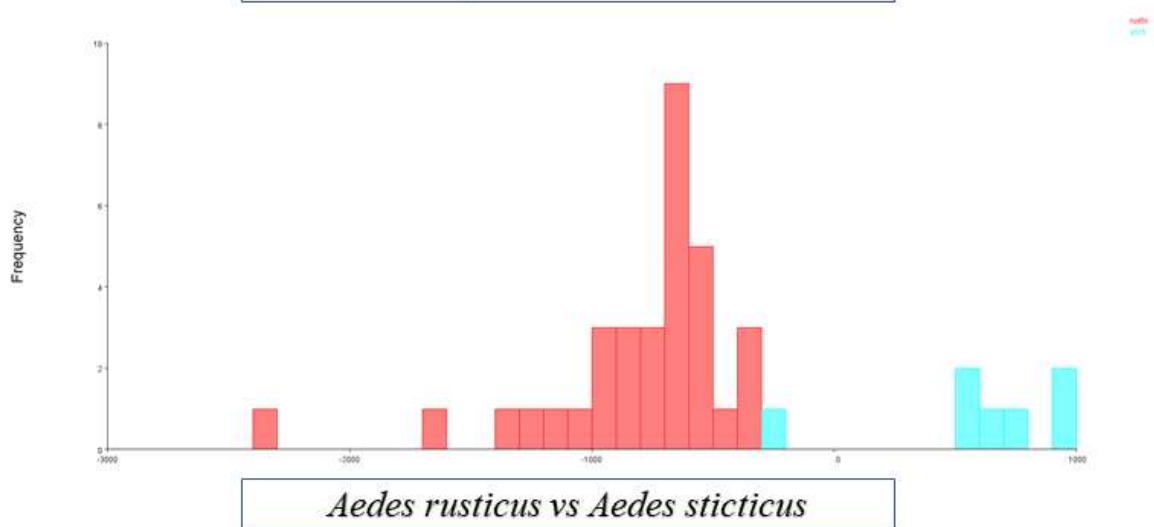
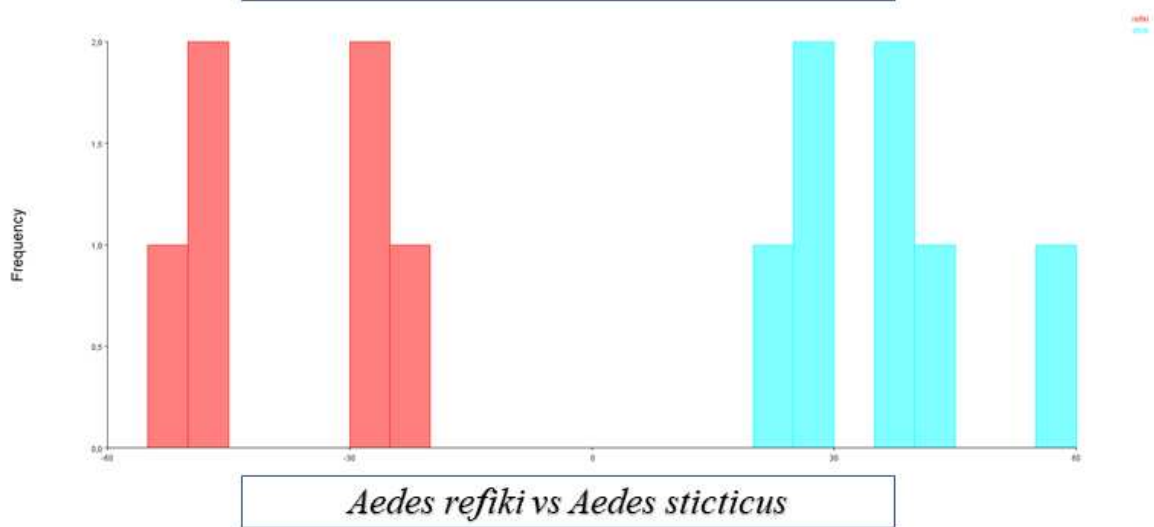
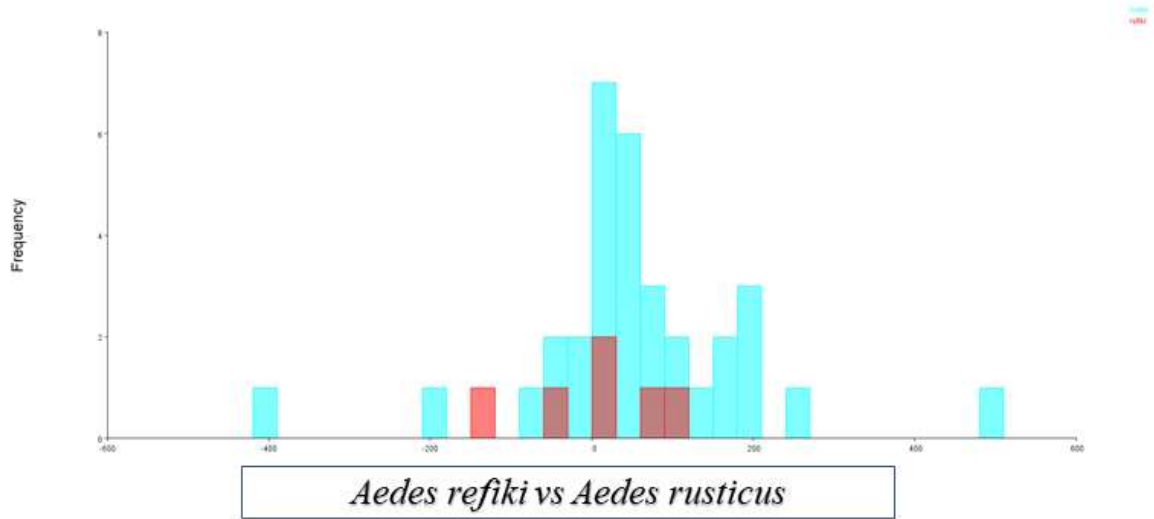




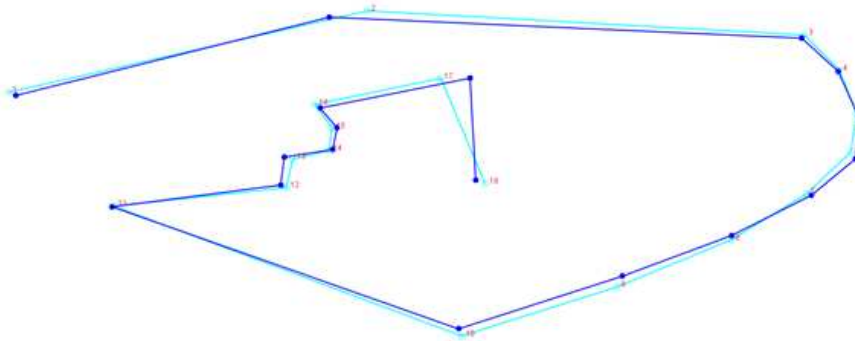




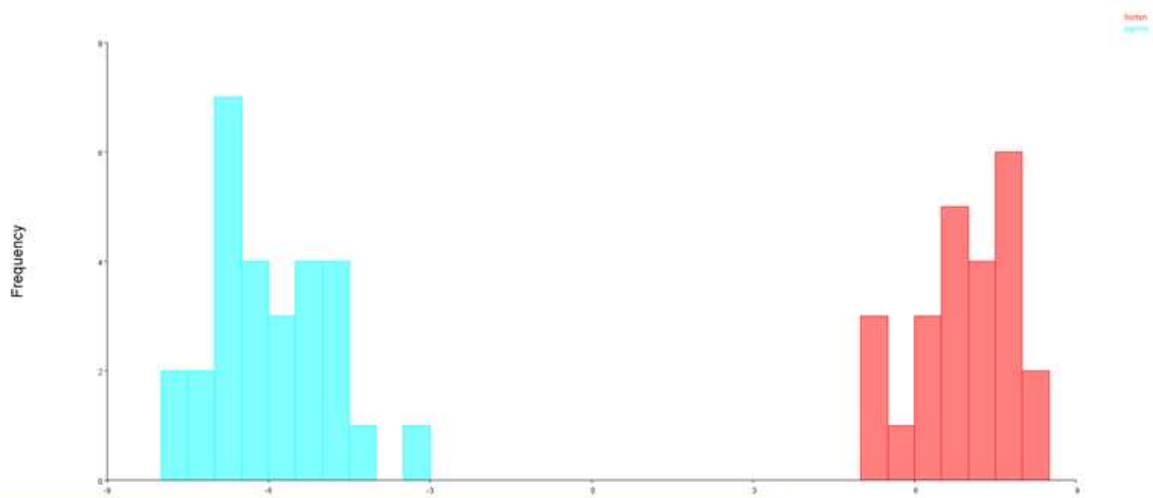




Annexe 7 : comparaison des positions des landmarks validation croisée des ACV pour les espèces du genre *Culex*

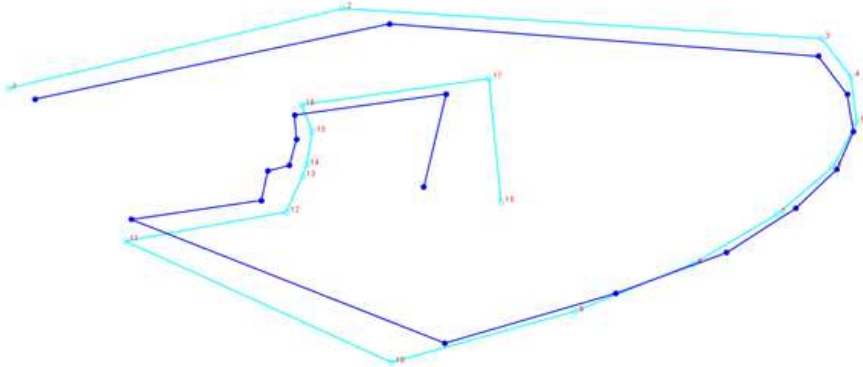


Culex pipiens vs *Culex hortensis*

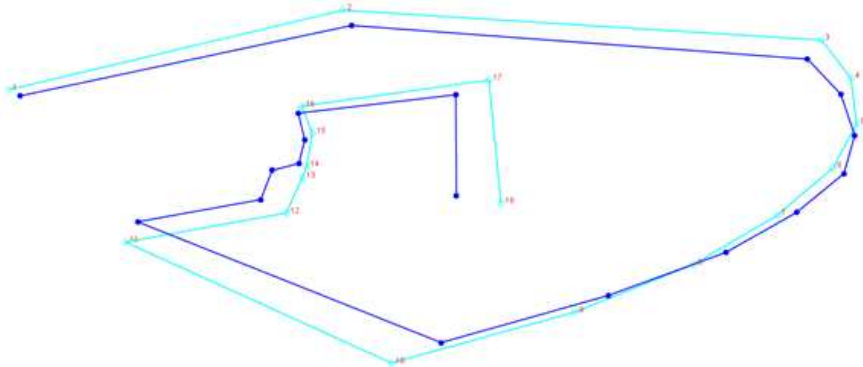


Culex pipiens vs *Culex hortensis*

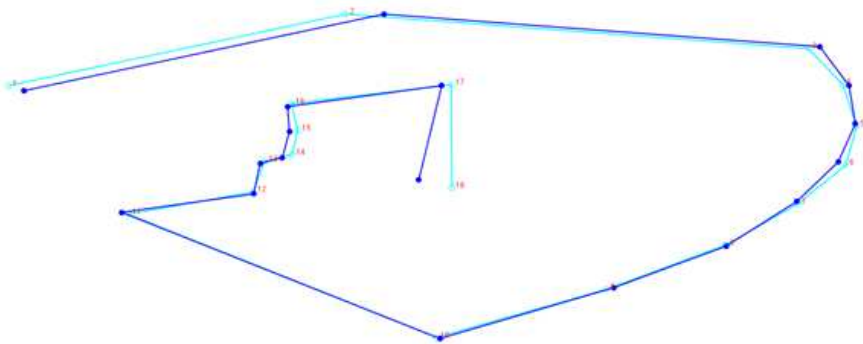
Annexe 8 : comparaison des positions des landmarks validation croisée des ACV pour les espèces du genre *Culiseta*



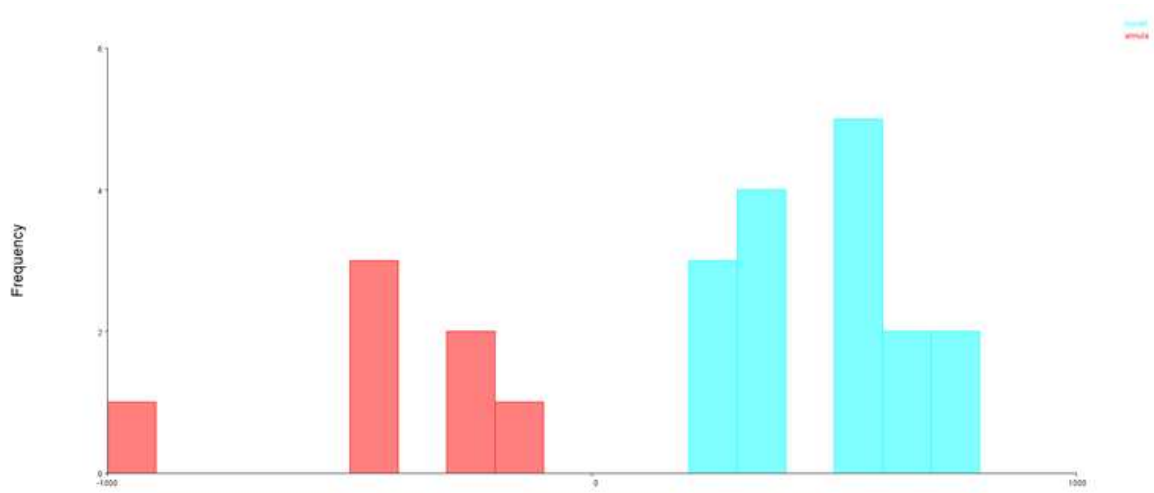
Culiseta annulata vs Culiseta morsitans



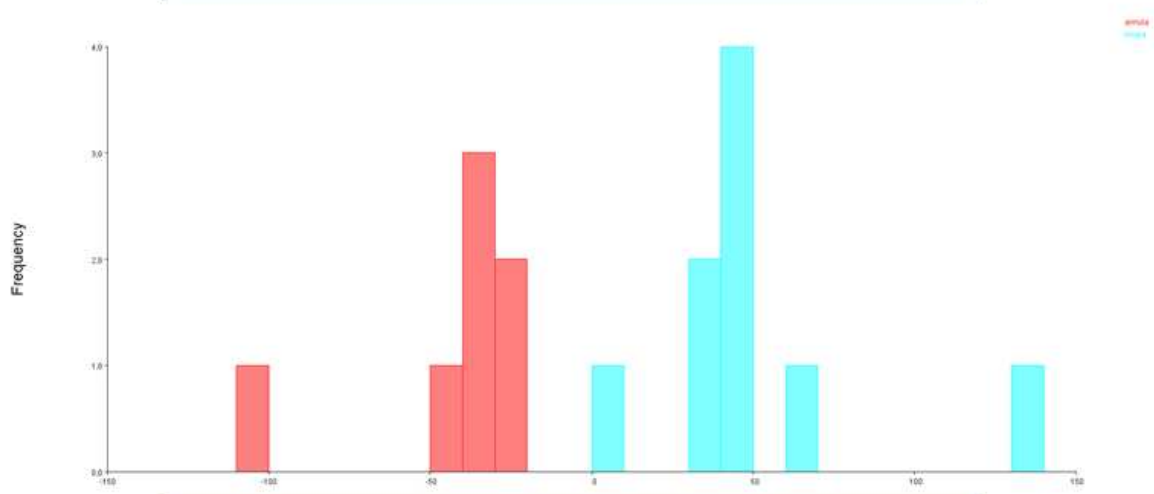
Culiseta annulata vs Culiseta longiareolata



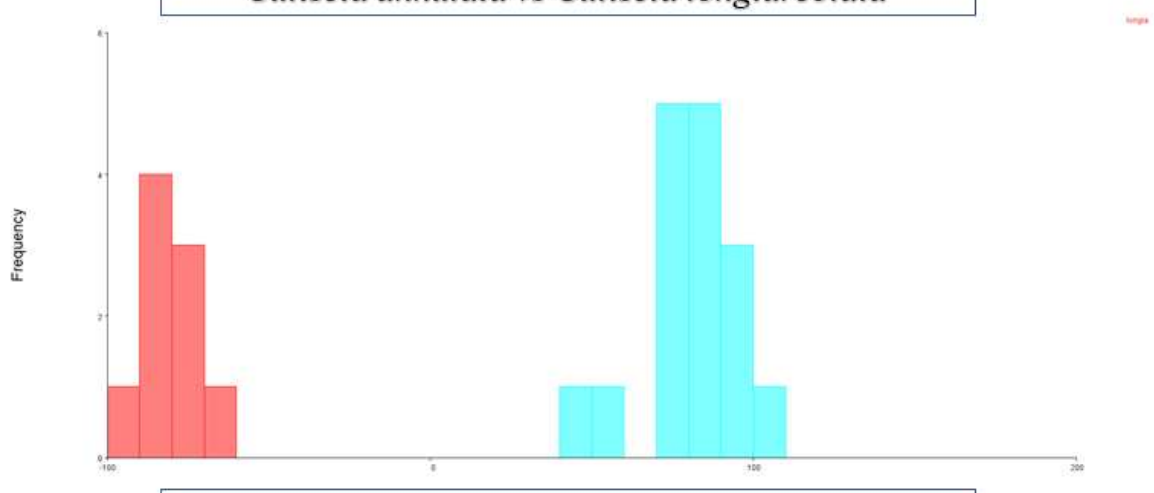
Culiseta longiareolata vs Culiseta morsitans



Culiseta annulata vs *Culiseta morsitans*



Culiseta annulata vs *Culiseta longiareolata*



Culiseta longiareolata vs *Culiseta morsitans*

Les moustiques de la région Grand-Est : biodiversité et compétence vectorielle pour des virus zoonotiques

Depuis les années 1960, la France métropolitaine a subi des émergences et des réémergences des virus Usutu (USUV) et West-Nile (WNV). Ces arbovirus (Arthropod Borne viruses) ont pour réservoir les populations aviaires et sont transmises par un moustique vecteur du genre *Culex*. En France, le WNV a connu plusieurs émergences dont la fréquence s'accroît depuis les années 2000. A ce jour, la circulation de ce virus est limitée au sud de la France, s'étendant depuis son foyer historique situé dans la région de la Camargue. Régulièrement, des cas humains sont détectés. Son vecteur *Culex pipiens* est ubiquitaire sur le territoire. Le virus Usutu a quant à lui émergé en France métropolitaine en 2015, causant des épisodes de mortalité aviaires chez des espèces sensibles telles que le merle (*Turdus merula*) ou encore la chouette lapone (*Strix nebulosa*). Usutu s'est rapidement disséminé sur le territoire métropolitain, touchant des populations aviaires résidentes de la région Grand-Est. Dans ce contexte, nous avons poursuivi des travaux d'inventaires des moustiques de la région pour actualiser les données de présence. Dans un premier temps nous avons voulu apporter notre contribution à l'identification des espèces autochtones par une approche dite de géomorphométrie alaire (Wing Geometric Morphometrics ou WGM), technique qui s'est avérée fiable dans notre contexte régional. Nous avons revu l'ensemble des infections expérimentales réalisées sur des populations de moustiques originaires d'Europe de l'Ouest. Dans cette optique, nous avons testé la compétence vectorielle de trois espèces de moustiques endémiques dans la région Grand-Est pour WNV et USUV (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* et *Culex pipiens*). Les données acquises par ces expérimentations pourront permettre à l'avenir une meilleure préparation et une meilleure prise en charge d'une hypothétique émergence de WNV ou d'USUV dans la région Grand-Est.

Moustiques, Compétence vectorielle, Géomorphométrie, virus du Nil occidental, virus Usutu

Mosquitoes of the Grater East region : biodiversity and vector competence for zoonotic arboviruses

Since the 1960s, metropolitan France has undergone the emergence and re-emergence of the Usutu (USUV) and West-Nile (WNV) viruses. These arboviruses (Arthropod Borne viruses) circulate between avian populations reservoir and their vector (mosquito belonging to the *Culex* genus). In France, WNV has experienced several emergences, with accelerated frequency since the 2000s. To date, the circulation of this virus is limited to the south of France, extending from its historic area located in the region of Camargue. Regularly, human cases are detected. Its *Culex pipiens* vector is ubiquitous in France. The Usutu virus emerged in metropolitan France in 2015, causing episodes of bird mortality in sensitive species such as blackbird (*Turdus merula*) or the great gray owl (*Strix nebulosa*). Usutu quickly spread across metropolitan territory, affecting bird populations resident of the Grand-Est region. In this context, we carried out inventory work on mosquitoes in the region in order to update the presence data. In order to improve the responsiveness of the sampling in the event of an emergence in the region, we applied identification techniques known as Wing Geometric Morphometrics (WGM) to our samples. This technique has proven to be reliable in classifying mosquito species. We reviewed all the experimental infections performed on mosquito populations originating from Western Europe. Finally, we tested the vector competence of three endemic mosquito species in the Grand-Est region for WNV and USUV (*Aedes rusticus*, *Anopheles plumbeus* and *Culex pipiens*). The data acquired by these experiments may allow better preparation and better management of a hypothetical emergence of WNV or USUV in the Grand-Est region in the future.

Mosquitoes, Vector competence , Wing Geometric Morphometrics, West-Nile virus, Usutu virus

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Entomologie médicale et vétérinaire

Université de Reims Champagne-Ardenne

ESCAPE – EA 7510

UFR Médecine-Pharmacie

51, rue Cognacq-Jay

51100 REIMS

