



Surveillance et contrôle du moustique tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) à Nice, sud de la France

Saïd Chaouki Boubidi

► To cite this version:

Saïd Chaouki Boubidi. Surveillance et contrôle du moustique tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) à Nice, sud de la France. Santé. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT118 . tel-01646538

HAL Id: tel-01646538

<https://theses.hal.science/tel-01646538>

Submitted on 23 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement,
Terre, Eau

Et de l'unité de recherche MIVEGEC

Spécialité : **BDI - Biologie des Interactions**

Présentée par **BOUBIDI SAÏD CHAOUKI**

**Surveillance et contrôle du moustique
tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) à Nice,
sud de la France.**

Soutenue le 15 décembre 2016 devant le jury composé de

Mr Frédéric Simard, (Directeur de recherche, IRD, Montpellier) Examineur et président
du jury

Mr Gérard Duvallet, (Professeur, Université de Montpellier) Examineur

Mr Arezki Izri, (Directeur de recherche, Hôpital Avicenne) Rapporteur
Mr Pascal Delaunay (Praticien Hospitalier – PhD, CHU de Nice) Rapporteur

Mr, Didier Fontenille (Directeur de recherche, Institut Pasteur du
Cambodge) Directeur de thèse



Résumé

Surveillance et contrôle du moustique tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) à Nice, sud de la France.

Le moustique tigre *Aedes albopictus*, pur produit de la mondialisation, s'est installé en Europe dans les années 1970, et en région PACA en 2004, grâce au transport intercontinental de ses œufs, capables de résister à la dessiccation et d'effectuer une diapause. Ce moustique est capable de transmettre 26 virus comme la dengue, le zika et le chikungunya. Le premier objectif du présent travail a été l'étude des aspects biologique d'*Ae. albopictus* dans son milieu naturel dans une région où il s'est implanté depuis plus de 10 ans, à Nice au sud-est de la France. Nous avons utilisé différentes méthodes de captures : les pièges pour adultes BGs[®], les pièges pondoirs avec une infusion de foin pour la récolte des œufs ainsi que la capture sur Homme, afin d'apprécier la densité de ce moustique, ses fluctuations spatiotemporelles et les taux de parturité des femelles. Les deux années de l'étude de la dynamique saisonnière ont montré un début d'activité des moustiques au mois d'avril atteignant un pic d'activité en Juillet-Août et diminuant par la suite jusqu'à ce que l'activité cesse au mois de novembre. Nous avons enregistré des taux de parturité élevés qui se sont stabilisés entre 0,52 et 0,71 entre le mois de juin et octobre respectivement. Ces taux de parturité indiquent un taux de survie élevé qui pourrait être encore supérieur à cause du comportement de *skip oviposition* des femelles *Ae. albopictus*. De plus, nous avons mis en évidence un taux important de femelles gravides (jusqu'à 44 %) capturées sur Homme indiquant une prise de repas multiples durant un même cycle gonotrophique. L'objectif principal de ce travail a été d'évaluer l'efficacité des pulvérisations spatiales à Ultra-Bas Volume (UBV) d'insecticides, la principale méthode utilisée dans le cas de foyers urbains. La population locale d'*Ae. albopictus* a montré une forte sensibilité à la deltaméthrine (le seul insecticide homologué pour lutter contre les moustiques adultes en France) bien que les mâles aient été beaucoup plus sensibles que les femelles. Une comparaison des résultats par application topique et par les tests en tube OMS a confirmé que cette différence était due à la plus petite taille des mâles par rapport aux femelles. Lors des six essais sur le terrain, on n'a obtenu aucun impact significatif des traitements UBV à la deltaméthrine sur les femelles, bien qu'il y ait eu une réduction significative des mâles. En revanche, le traitement par thermonébulisation autour d'un petit groupe de maisons a permis une quasi-élimination (95%) des moustiques mâles et femelles. Ces résultats apportent un élément de réponse sur les stratégies à mener en santé publique. Enfin, l'efficacité de plusieurs

formulations de peintures et de résines insecticides issues de la technologie de microencapsulation a été testée dans des conditions de laboratoire et de terrain. Les résultats ont été encourageants et les tests ont démontré que les peintures à base d'organophosphorés ont une rémanence de 2ans. Le but ultime était d'utiliser des pièges pondoires traités avec ces peintures insecticides comme une méthode de contrôle : en théorie, cette méthode vise l'exploitation du comportement de *skip oviposition* qui oblige les femelles à déposer leurs œufs sur plusieurs gîtes différents augmentant la probabilité pour que celles-ci rencontrent un piège pondoire traité avec l'insecticide. Lors d'un petit essai sur le terrain, cependant, aucun impact sur la population sauvage n'a été observé. Nous discutons de cette méthode ainsi que de son intérêt face à la menace toujours grandissante liée à la propagation continue de *Ae. albopictus* à travers le monde.

Mots clés : *Aedes albopictus*, biologie, UVB, Thermonebulisation, sensibilité aux insecticides, mâles, contrôle, peintures insecticides.

Abstract

Surveillance and control of the Tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in Nice, south of France.

The Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, first appeared in Europe in the 1970s, almost certainly a result of intercontinental transport of its dessication-resistant eggs. In the laboratory, the species is capable of transmitting 26 viruses including Yellow Fever, dengue, chikungunya and zika, although in the field it is not considered an efficient vector because it is not host-specific. The first objective of our studies was to monitor aspects of the biology of the species in Nice (southeastern France), where it has been established for more than 10 years. Infusion-baited ovitraps, B-G® adult traps and human landing captures were used to reveal seasonal population fluctuations, parous rates and other parameters. In two complete years of study, adult mosquitoes began to appear in April, reached a plateau in July-August and declined thereafter until activity ceased in November. Parous rates were stable from June to October (0,52 to 0,71%) indicating a balance between recruitment (eclosion) and mortality. During this period, daily survival probability was high although this may be an underestimate if the duration of the gonotrophic cycle is extended by skip oviposition. Up to 44% of females captured by landing capture were gravid, confirmation of multiple blood-meals per gonotrophic cycle. The main focus of the work was an assessment of the efficacy of Ultra-low Volume (ULV) space sprays, the principal method used in the event of urban outbreaks. The local population proved highly susceptible to deltamethrin (the only insecticide approved for adult mosquito control in France) although females were significantly less susceptible than males. A comparison of results by topical application and by the WHO tube test confirmed this difference is a function of size. In six separate field trials, there was no evidence of any impact of ULV deltamethrin on females although there was a significant reduction of males. By contrast, outdoor treatment of a small cluster of homes with a portable thermal fogger gave virtual elimination (ca. 95%) of both sexes. These results are clearly of public health significance. Lastly, the efficacy of several slow-release formulations of microencapsulated insecticide in paint was tested in laboratory and semi-field conditions. Results were encouraging and tests demonstrated that the paints remained effective for 24 months on plastic surface. The ultimate goal was to use paint-treated ovitraps as a control method: in theory, skip oviposition should ensure a high probability that ovipositing females will make contact with a treated trap on their rounds of suitable oviposition

sites. In a small field trial, however, no impact on the wild population was observed. This may have been because too few treated traps were deployed; further studies along these lines could prove worthwhile.

Key Words: *Aedes albopictus*, biology, ULV, Thermal fogging, insecticide susceptibility, males, control, insecticidal paints.

Intitulé et adresse du laboratoire de recherche

Direction Technique, EID Méditerranée 165 Avenue Paul-Rimbaud, 34184, Montpellier CEDEX.

Remerciements

Au bout de ces quatre années de thèse faites de satisfactions, de frustrations et d'aventures humaines, je tiens à remercier ceux qui ont participé de près ou de loin à cette excellente expérience que j'ai vécue :

Je remercie en premier lieu mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et toujours encouragés à aller le plus loin possible dans mes études, que dieu vous bénissent et vous accorde une longue vie pleine de satisfactions.

Je remercie également les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce modeste travail. Merci donc aux examinateurs de cette thèse Dr Frédéric Simard et Pr Gérard Duvallet, je remercie également Dr Pascal Delauney et Dr Arezki Izri pour avoir bien voulu évaluer ce travail entant que rapporteurs.

Un vif remerciement va à mon maître et Ami Pr Paul Reiter, qui m'a toujours soutenu et encouragé comme personne ne l'avais fait avant lui, nos discussions, bien que houleuses parfois, m'ont été d'un apport inestimable...*MERCI POUR TOUT.*

Un grand merci au Dr Didier Fontenille, pour m'avoir fait aimer l'entomologie médicale par la rigueur qui le caractérise et son efficacité en tant que chercheur et directeur de recherches. Merci de m'avoir fait confiance, merci d'avoir accepté de remplacer mon ancien codirecteur de thèse et merci pour tout l'enseignement reçu de toi où à partir de tes anciens élèves.

Je ne peux oublier de remercier Dr Thierry Baldet pour m'avoir assisté tout au long de ma thèse même en étant au Canada, nos discussions m'ont toujours captivé, tu garde toujours une place importante dans ma carrière d'entomologiste.

Je remercie vivement Mr Christophe Lagneau, pour ça présence continuelle surtout aux moments dures de mon parcours de thèse, je t'avoue que j'ai rarement rencontré quelqu'un dans ma vie avec des qualités de cœur aussi grandes, tu es une pièce maîtresse dans la réussite de ce travail, merci infiniment.

Je remercie également Dr Harrat Zoubir Chef de service Eco-épidémiologie parasitaire et Directeur Général de l'Institut Pasteur D'Alger, pour m'avoir encouragé et libéré de mon travail

au sein de son service pour que je puisse finaliser dans les meilleures conditions mon travail de thèse.

Bien entendu un grand merci à Mr Didier Amadou, Directeur Général de l'EID Méditerranée, qui suivait d'un œil attentif mon parcours au sein de son établissement et qui a toujours répondu positivement à toutes mes sollicitations.

Je tiens aussi à remercier Mr Didier Moulis, Directeur Technique au sein de l'EID Méditerranée pour m'avoir facilité mon travail de thèse.

Je ne peux oublier Mr Bernard Cadiou, responsable des agences EID Méditerranée des Alpes Maritimes et du Var, qui a toujours veillé à ce que mon parcours de thèse au sein de son agence se passe le mieux possible. Un dur au cœur tendre ...merci à toi.

Un grand merci à Mr Réda Tounsi, pour son efficacité et ces talents de coordinateur, surtout pour m'avoir facilité grandement mon travail au sein de l'EID Méditerranée.

Merci à Mr Joel Normand directeur administratif de l'EID Méditerranée pour avoir facilité mon recrutement pour ma thèse ainsi que plusieurs prolongations de mon contrat de travail !

Merci à Annie Sommer, Leslie Davrain, Sandrine Bouis, Stéphanie Dimeglio et Mme Germain pour m'avoir supporté avec toutes les formalités administratives liées à mon passage à l'EID Méditerranée.

Je remercie également mes collègues de l'EID Méditerranée : Charles, Romain, Marc, Albane, Philippe, Marie Laure, Guillaume, Grégory...sans oublier bien sûr Serge, Marie Christine, Laurent, Jean Jacques et Jean Michel.

Merci à Mme Sonia Nédir, Mme Rihane et Mr Boularas de la direction des ressources humaine de l'Institut Pasteur d'Algérie pour avoir facilité toutes mes démarches administratives liées à cette formation.

Un énorme merci à Mme Desportes-Jennings Laurence présidente de l'association de Saint Julien pour m'avoir grandement facilité mes captures de moustiques avec des pièges pondoires très malodorant ! Je remercie également Gloria pour son accueil canin très chaleureux....

Un grand Merci aux Andrews, les Wyss, les Soquet, les Nenert, les Tasone et les Gomez pour m'avoir ouvert la porte de leurs maisons afin que je puisse réaliser mes captures de moustiques.

Merci également au très sympathique Mr Hoireaux.

Je remercie les responsables du syndic de copropriétés des sites d'études et spécialement Mr Moons qui a toujours répondu positivement à toutes mes sollicitations.

Je souhaite également remercier mon meilleur étudiant Mr Raouf Amara Korba, pour son aide technique et ses divers talents. Merci Pirate !

Un grand merci à Mr Christophe Lagneau et mon amie Ghislaine Voguet qui est professeur de français à la retraite pour avoir fait en sorte que ce manuscrit soit rédigé avec un français correct.

Enfin je remercie ma sœur Chahynez et mon frère Youcef ainsi que la prunelle de mes yeux, mes enfants : Lina et Abdelhafid.

Je dédie ce travail à ma chère grand-mère Mama Dija et mon cher Oncle Hocine qui sont morts durant cette thèse, que dieu leurs accorde une paix éternelle.

Table Des Matières

Résumés	03
Remerciements	07
Table des Matières	10
Table des illustrations: Figures	12
Table des illustrations: Tableaux	13
 INTRODUCTION GENERALE	 14
 CHAPITRE I : Revue de la littérature	 18
Répartition d'<i>Aedes albopictus</i>	19
Dans le monde	19
En France	21
Principaux virus transmis par <i>Aedes albopictus</i>	23
Dengue	23
Chikungunya	24
Zika	25
Stratégie de ponte : « Skip Oviposition »	26
La lutte contre <i>Aedes albopictus</i>	28
Contrôle larvaire	28
Techniques de porte-à-porte de contrôle et réduction de la Source	28
Application directe de larvicides	28
Lutte biologique	30
Autodissemination	30
Éducation publique	31
Contrôle des adultes	32
Pièges pour moustiques adultes et surveillance	32
Pièges pondoires et surveillance	32
Méthodes de contrôle génétiques	33
La Technique des Insectes Stériles	34
Les mâles transgéniques	34
Wolbachia	35
Pulvérisation spatiale	35
La nébulisation à froid (UBV)	35
La thermo-nébulisation	36
Aspersion UBV versus Thermo-nébulisation	38
Taille et dynamique des gouttelettes d'insecticides	38
 CHAPITRE II : Dynamique saisonnière	 42
Introduction	43
Matériel et méthodes	43
Résultats	44
Discussion	47

CHAPITRE III : Sensibilité aux insecticides	49
Introduction de l'article 1	50
Article 1: " <i>Gender bias in insecticide susceptibility of Aedes albopictus is solely attributable to size.</i> "	52
Discussion article 1	56
CHAPITRE IV : Evaluations des aspersions spatiales d'adulticides	58
Introduction de l'article 2	59
Article 2: " <i>Efficacy of ULV and thermal aerosols of deltamethrin for control of Aedes albopictus in Nice, France.</i> "	61
Discussion article 2	74
CHAPITRE V : Evaluation de nouvelles méthodes de lutte, les pièges pondoirs létaux.	76
Introduction de l'article 3	77
Article 3: " <i>Evaluation of insecticidal paints and coatings applied to ovitraps for control of Aedes albopictus in Nice, France.</i> "	80
Discussion article 3	98
DISCUSSION GENERALE	101
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112

Tables des illustrations : Figures

CHAPITRE I

Figure 1: Femelle d' <i>Aedes albopictus</i>	21
Figure 2 : Répartition 2013, d' <i>Ae. albopictus</i> dans le monde	21
Figure 3 : Répartition 2016, d' <i>Ae. albopictus</i> en France métropolitaine	22
Figure 4 : (a) Nébulisateur à froid London Fogger 18-20 monté sur véhicule. (b) Thermonébulisateur portable PULSFOG K-10-SP	37
Figure 5 : Paramètres des tailles des gouttelettes : Le Diamètre Moyen Volumique (DMV), Diamètre Médian Numérique (DMN) (Source : WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5) ...	41

CHAPITRE II

Figure 1 : Dynamique saisonnière des femelles d' <i>Ae. albopictus</i> capturées par les pièges adultes BG et des œufs collectés par les pièges pondoires (PP), Villeneuve-oubet, France, 2013	45
Figure 2 : Dynamique saisonnière des femelles d' <i>Ae. albopictus</i> , capturées par la méthode de capture sur Homme (HLC) et des œufs collectés par les pièges pondoires (PP), Villeneuve-Loubet, France, 2014	46
Figure 3 : Comparaison de la dynamique saisonnière des œufs (A), récoltés au moyen de pièges pondoires et des adultes d' <i>Ae. albopictus</i> (B) récoltés avec les BG Sentinel (lignes rouges) avec la dynamique prédite par le modèle développé par Tran et al. (2013) basé sur les précipitations et les fluctuations de températures observées en 2013 (lignes noires) dans la région de Nice	46
Figure 4 : Corrélation entre la densité des captures en fonction de l'emplacement des pièges à Vaugrenier Présidence, Villeneuve Loubet. Les points jaunes correspondent aux pièges pondoires et les points verts aux pièges pour adultes (BG Sentinel). La taille des symboles indique le nombre maximum d'œufs collectés	47
Figure 5 : Corrélation entre le nombre d'œufs capturés et la végétation arborée (Spearman $r = -0,47$, $p < 0,05$)	47

CHAPITRE V

Figure 1: description of the Lethal Ovitrap. (Photo Boubidi SC)	83
Figure 2: Schematic description of the Phase II room experiment	83
Figure 3: Approach I site, Vaugrenier Présidence, Villeneuve Loubet, Nice; Blue dots: LOs; Yellow dots ovitraps; Red stars: BGs adults traps	84
Figure 4: Approach II site, Chemin de Saint Jumien, Biot, Nice; Black dots: LOs; Yellow dots ovitraps; Red stars: BGs adults traps	84
Figure 5: Mortality (%) with treated (blue bars) and untreated (red bars) ovitraps	87
Figure 6: Mortality of gravid females of <i>Aedes albopictus</i> according to decreasing number of OP based los	87
Figure 7: Residual effects. Paint applied directly to cement had poor persistence (black line) but when a primer was applied (black paint without insecticide) there was still 100% kill after 2 years. No primer was required on plastic	88
Figure 8. Results of monitoring of eggs (A) and females (B) before and after the placement of the LOs in approach I sites and GLMM binomial analysis of the abundance of eggs (C) and females (D)	89
Figure 9. Results of monitoring of eggs (A) and females (B) before and after the placement of the LOs in approach II sites and GLMM binomial analysis of the abundance of eggs (C) and females (D)	90

Table des illustrations : tableaux

CHAPITRE I

Tableau 1 : répartition mondiale 2016, d' <i>Ae. Albopictus</i>	20
--	----

Tableau 2 : Comparaison entre nébulisation à froid et à chaud	39
--	----

CHAPITRE VI

S5 Table : Biological interpretation of the variables and results of the GLMM Analysis.....	70
--	----

S6 Table. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on egg's abundance	71
--	----

S7 Table. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on female's abundance	72
---	----

S8 Table. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on parity rate's abundance	73
--	----

S9 Table. Explained variance (deviance) for the results of the GLM analysis on the influence of treatment on <i>Ae. Albopictus</i> females and eggs abundance.....	73
---	----

CHAPITRE V

S1 Table: Biological interpretation of the variables and results of the GLMM Analysis	93
--	----

S2 Table: Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the LOs on egg's and female's abundance in both approaches I and II	94
---	----

Introduction générale

La mondialisation ou globalisation, bien que source de développement et de bien-être, a de nombreuses conséquences. En effet, si elle a permis d'accélérer les échanges entre les hommes, elle a permis aussi le déplacement de certaines espèces animales et végétales y compris les pathogènes en dehors de leur zone géographique originelle.

L'un des déplacements le plus spectaculaire est celui du moustique tigre asiatique *Aedes albopictus*. Ce moustique est considéré comme l'une des espèces animales les plus invasives au monde (*Global Invasive Species Database*) (Bradshaw *et al.*, 2016). *Ae. albopictus* est originaire d'Asie où il a été décrit par Skuse en 1894 à Calcutta, en Inde (Huang, 1968 ; Knight & Stone, 1977). Sa conquête invasive a réellement commencé après la guerre du Vietnam, avec l'intensification des échanges commerciaux entre les pays, essentiellement par le biais du commerce des pneus usagés (Reiter *et al.*, 1987). Longtemps considéré comme vecteur secondaire (Lambrechts *et al.*, 2010) *Ae. albopictus* a gagné ses « gallons » en 2005/2006 lors de l'épidémie de Chikungunya de l'Ile de la Réunion. Cette arbovirose a touché les 40% de l'Ile causant 203 morts et 244 000 cas symptomatiques (Renault *et al.*, 2007). En effet, *Ae. albopictus* est compétent pour transmettre au laboratoire au moins 26 virus différents comme le virus de la dengue, du chikungunya et du Zika (Paupy, 2010).

Les deux facultés adaptatives majeures de ce redoutable vecteur est sa forte plasticité écologique et sa capacité à entrer en diapause. Elles lui ont permis de s'adapter à des régions éco-climatiques contrastées. Cette espèce a colonisé à l'heure actuelle cinq continents (Bonizzoni *et al.*, 2013) et continue son expansion à travers le monde et elle a été incriminée à de multiples reprises comme vectrice des virus chikungunya, dengue et Zika.

Aedes aegypti était autrefois commun dans plusieurs parties de l'Europe, mais, pour des raisons non comprises, il est maintenant limité à plusieurs petits foyers le long de la côte de la Mer Noire en Russie et dans les pays voisins (Akiner *et al.*, 2016). En revanche, *Ae. albopictus*, une espèce asiatique, est apparu en Europe en 1979 (Adhami & Reiter, 1998) et s'est propagé rapidement à travers le continent. Cette espèce s'est établie actuellement dans 26 pays européens, ainsi que dans plusieurs pays dans le Moyen-Orient et plus récemment en Afrique du Nord, en Algérie (Izri *et al.*, 2011 ; Benallal *et al.*, 2016) et au Maroc (Bennouna *et al.*, 2016) et. Une épidémie importante de 250 cas autochtones de chikungunya en Italie (Rezza *et al.*, 2007) et plusieurs autres cas en France (Delisle *et al.*, 2014) ainsi que des cas de dengue en France (Giron *et al.*, 2015) et en Croatie (Gjenero-Margan *et al.*, 2010) témoignent de sa

capacité à transmettre ces virus en Europe. Face à l'absence de vaccins efficaces et d'antiviraux, la maîtrise de la transmission des arboviroses repose essentiellement sur le contrôle des populations de vecteurs, principalement par l'utilisation d'insecticides chimiques.

La nébulisation spatiale d'insecticides, à partir d'un thermo-nébulisateur manuel ou d'un nébulisateur à froid monté sur véhicule (UBV : Ultra Bas Volume), est largement utilisée pour lutter contre les populations d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* et est souvent considérée comme la méthode de choix en cas d'urgence de santé publique visant à stopper rapidement la transmission de la maladie (Bonds, 2012).

Le but du traitement est de pulvériser des gouttelettes d'insecticide dans les biotopes de ces moustiques pour en réduire la densité à un seuil où la transmission d'arboviroses n'est plus possible.

Ces traitements insecticides, bien que très décevants contre *Ae. aegypti* à cause de son comportement endophile (se « repose » à l'intérieur des maisons) réduisant le contact avec les gouttelettes insecticides, sont susceptibles d'avoir un meilleur impact contre *Ae. albopictus* qui est exophile (se « repose » à l'extérieur des maisons) et donc plus exposé (Hawley, 1988).

Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité des pulvérisations UBV et, dans une moindre mesure, celle des pulvérisations par thermonébulisation (Britchet *et al.*, 2010). Dans la littérature, l'impact de ces deux méthodes a été évalué en utilisant essentiellement des moustiques en cage, placés dans des espaces ouverts et sur la trajectoire du nébulisateur (Bengoa *et al.*, 2014 ; Clark *et al.*, 1989). Ces méthodes d'évaluation génèrent obligatoirement un biais et ne reflètent pas la situation naturelle où les moustiques ne sont pas emprisonnés dans des cages, forcés d'entrer en contact avec le nuage insecticide (Reiter, 2014).

La sensibilité du moustique tigre par rapport aux insecticides adulticides est en cours d'investigation en France et des cas de résistance vis-à-vis de certains insecticides (malathion, téméphos, DDT, etc.) ont été décrits dans le monde (Ranson *et al.*, 2008). Néanmoins, l'évaluation de la sensibilité de la population de moustiques cibles à l'égard de l'insecticide est un pré-requis indispensable à l'évaluation des méthodes de nébulisation spatiale adulticide.

La propagation continue de *Ae. albopictus* ainsi que les maladies dont il peut être responsable à travers le monde démontrent l'échec des méthodes de lutte antivectorielle engagées jusqu'à présent. La situation actuelle exige l'élaboration de nouveaux moyens de lutte

plus efficaces. Plusieurs méthodes plus sélectives et moins polluantes sont à l'étude comme la Technique des Insectes Stériles (TIS) et celles utilisant des moustiques transgéniques (Dyck *et al.*, 2005), l'utilisation de symbiontes *Wolbachia* (Hoffmann *et al.*, 2011), l'auto-dissémination d'un régulateur de croissance (pyriproxifène) (Caputo *et al.*, 2012) ainsi que les pièges pondoires létaux. Cette dernière méthode nous a semblé prometteuse. A l'instar de la méthode d'auto-dissémination, celle-ci consiste en l'exploitation d'un trait biologique qui est la ponte séquentielle (*skip oviposition*) qui caractérise le comportement des femelles de certains moustiques comme *Ae. albopictus* et qui fait que ces dernières ne pondent pas leurs œufs, issus d'un même cycle gonotrophique, dans un seul gîte mais dans plusieurs (Reiter *et al.*, 2007).

Cette méthode a été utilisée par plusieurs auteurs et a prouvé son efficacité (Lok *et al.*, 1977 ; Perich *et al.*, 2003 ; Sithiprasasna, 2003), néanmoins elle n'a pas été améliorée et standardisée pour être utilisée à large échelle en santé publique. Dans le cadre de cette thèse, les résultats expérimentaux obtenus, centrés sur la biologie et le contrôle d'*Ae. albopictus*, sont présentés en quatre chapitres:

- étude de la dynamique saisonnière d'*Ae. albopictus* dans le sud-est de la France ainsi que les taux de parturité de cette population.
- évaluation de la sensibilité des mâles et femelles *Ae. albopictus* vis-à-vis de la deltaméthrine.
- évaluation de l'efficacité de deux méthodes d'aspersion spatiale, la pulvérisation UBV et la thermo-nébulisation sur des populations de moustiques sauvages.
- évaluation d'une nouvelle approche pour le contrôle des moustiques, les pièges pondoires létaux.

La discussion replacera ces résultats dans un contexte opérationnel de santé publique, pouvant permettre une meilleure gestion de la transmission des arboviroses.

CHAPITRE I

Revue de la littérature

Répartition d'*Aedes albopictus*

Dans le monde

Aedes albopictus, plus connu sous son nom vernaculaire de « moustique tigre », à cause d'une alternance de taches blanches et sombres sur le corps (figure 1), a pu coloniser tous les continents, excepté l'Antarctique, en l'espace de 40 ans (figure 2). Son aire d'origine correspondait à la région de l'Asie du Sud-est élargie à la portion sud de la Chine, à une partie du Japon, à la Corée ainsi qu'à la péninsule indienne limitée au nord par la chaîne de l'Himalaya. Au Japon, la distribution est large sur l'île Honshu (Kobayashi *et al.*, 2002) et en Corée, elle atteint la latitude de Séoul (38° N). *Ae. albopictus* est décrit pour la première fois sur l'île de la Réunion dans les années 1900s (Delatte *et al.*, 2008). Au sein de l'Océan Pacifique, c'est-à-dire à l'est de son aire originelle d'implantation. Le moustique est présent à Hawaï dès la fin du XIX^{ème} siècle et s'installe à Guam lors de la Seconde Guerre mondiale (Gratz, 2004).

Alors qu'*Ae. albopictus* restait localisé de façon stable en ces régions (Asie, Océan Indien et Océan Pacifique), on assista, dès les années 1980, à une expansion des lieux d'observation de ce moustique. C'est en Europe, en Albanie plus précisément, qu'il fut signalé en 1979 (Adhami & Reiter, 1998). Aux USA, il fut signalé pour la première fois en 1983 (Reiter & Darsie, 1983), son implantation durable a commencé au Texas en 1985. Actuellement, ce moustique s'est installé dans une trentaine d'états continentaux des USA. Sur le reste du continent américain, il s'est installé au Brésil dès 1986, ainsi qu'au Mexique en 1988 et dans d'autres pays d'Amérique latine et dans les îles des caraïbes (Tableau 1).

En 1990, il est remarqué en Australie, à Darwin (Territoire du Nord) et au Queensland. En Afrique, *Ae. albopictus* fut d'abord rapporté en Afrique du Sud en 1989 où des mesures immédiates empêchèrent son implantation. Deux ans plus tard, il était trouvé au Nigéria où il pullulait. En Afrique centrale, *Ae. albopictus* a été enregistré au Cameroun en 2000 puis s'est développé rapidement au sud du pays, atteignant les pays limitrophes que sont la Guinée Equatoriale et le Gabon. *Ae. albopictus* a également été signalé en Algérie en 2010 (Izri *et al.*, 2011) mais son installation effective n'a été constatée qu'en 2015 au nord-ouest du pays (Benallal *et al.*, 2016). Le Maroc a également rapporté son installation en 2016 (Bennouna *et al.*, 2016).

Tableau 1 : répartition mondiale 2016, d'*Ae. albopictus* (source ECDC)

Europe	Moyen-Orient	Asie et Australie	Amérique du Nord, Centrale et Caraïbes	Amérique du Sud	Afrique
Albanie, Belgique (non établi), Bosnie-Herzégovine, Bulgarie, Croatie, République tchèque (pas établi), France (Corse comprise), l'Allemagne (non établi), la Grèce, l'Italie (y compris la Sardaigne et la Sicile), Malte, Monaco , le Monténégro, les Pays-Bas (pas établi), Saint-Marin, Serbie, Slovénie, Espagne, Suisse, Turquie et Vatican.	Israël, le Liban, la Syrie.	l'Australie, le Japon, la Nouvelle-Zélande (pas établi), de nombreuses îles de l'océan Pacifique et l'océan Indien et l'Asie du Sud.	Barbade (non établie), Îles Caïmans, Costa Rica, Cuba, République dominicaine, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexique, Nicaragua, Panama, Trinidad (pas établie), États-Unis.	Argentine, Bolivie (pas établi), Brésil, Colombie, Paraguay, Uruguay, Venezuela.	Algérie, Maroc, Cameroun, Guinée équatoriale, Gabon, Madagascar, Nigeria, Afrique du Sud (pas établi).



Figure 1 : Femelle d'*Aedes albopictus* (Source: <http://cirs.ucr.edu>)

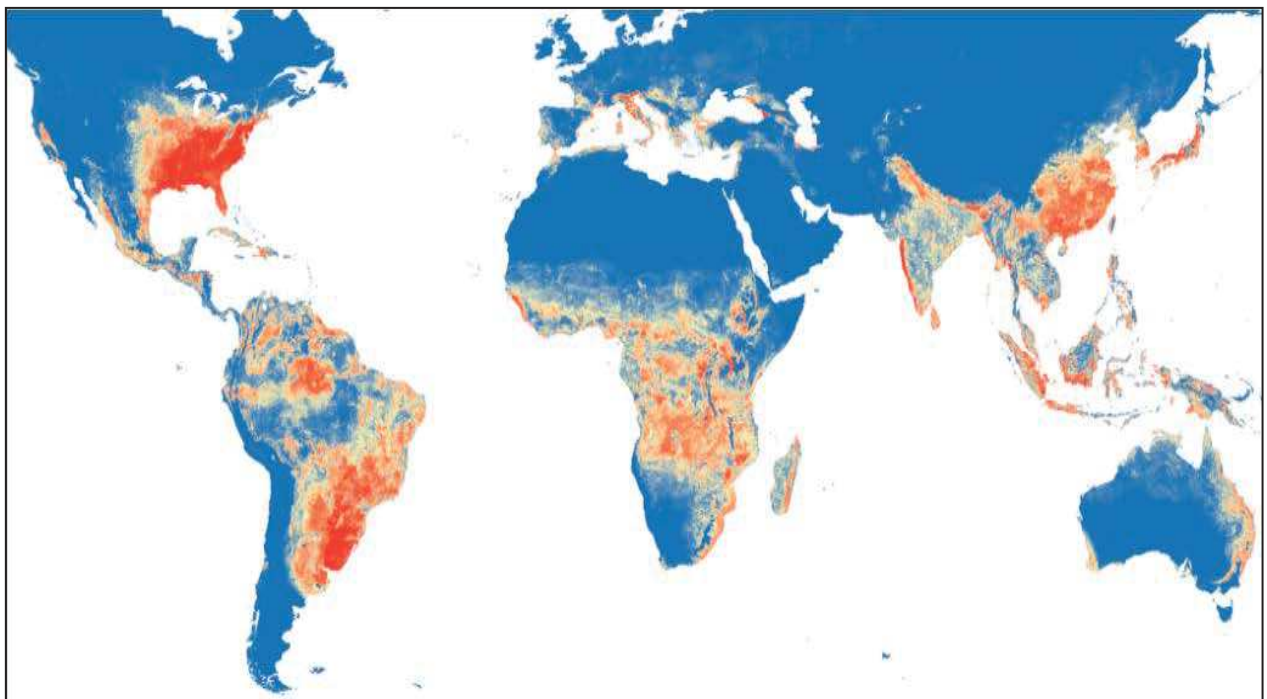


Figure 2. Carte globale de la distribution prédite d'*Ae. albopictus* (probabilité d'occurrence)
(source : Kraemer *et al.*, 2015).

En France

Depuis 1999 et afin d'anticiper l'installation d'*Ae. albopictus*, une surveillance est organisée en France métropolitaine (Schaffner *et al.*, 2000). Initialement signalé en Normandie en 1999 sur des sites d'importation de pneus, *Ae. albopictus* ne s'était pas installé durablement (Schaffner *et al.*, 2000). C'est en 2004 que son introduction définitive a été mise en évidence à Menton, Alpes-Maritimes (Delaunay *et al.*, 2007). En 2015, il est considéré comme endémique dans 29 départements : Alpes-Maritimes, Var, Bouche-du-Rhône, Alpes-de-Haute-Provence,

Gard, Hérault, Vaucluse, Lot-et-Garonne, Pyrénées-Orientales, Aude, Haute-Garonne, Rhône, Ardèche, Drôme, Isère, Gironde, Saône-et-Loire, Savoie, Tarn, Vendée, Ain, Bas-Rhin, Dordogne, Landes, Lot, Pyrénées-Atlantiques, Tarn-et-Garonne, Val-de-Marne, Haute-Corse, Corse-du-Sud et a été également signalé en Alsace et en Ile-de-France (figure 3).

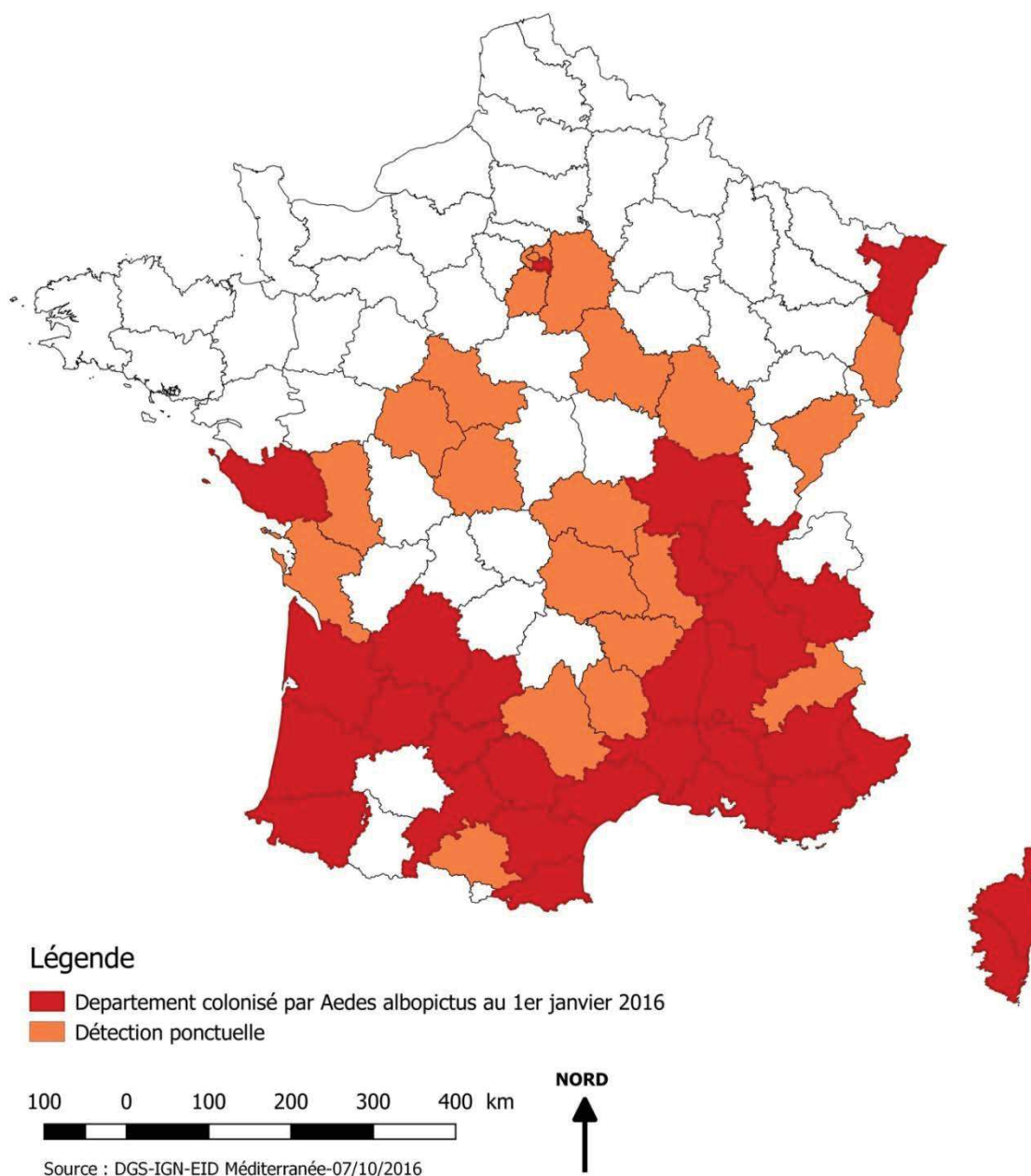


Figure 3 : Répartition 2016, d'*Ae. albopictus* en France métropolitaine (source EID Méditerranée).

Principaux virus transmis par *Aedes albopictus*

La dengue

La dengue est de loin l'arbovirose la plus importante et un problème majeur de santé publique dans la plupart des régions tropicales et certaines régions subtropicales. Selon les estimations les plus récentes, environ 390 millions de personnes sont infectées chaque année et 96 millions présentent des symptômes de la maladie (Bhatt *et al.*, 2013).

Le DENV est un flavivirus à ARN monocaténaire à polarité positive et divisé en quatre sérotypes distincts : DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Une personne infectée par l'un des sérotypes sera immunisée à vie pour celui-ci mais pourra encore être infectée par les autres sérotypes (Gubler, 1998). Si aucun traitement n'est actuellement disponible dans le commerce, le développement récent d'un vaccin efficace contre les sérotypes DENV-1 à 4 offre de nouvelles perspectives pour enrayer l'expansion de la maladie (Wilder-Smith, 2014 ; Guy *et al.*, 2016).

Cette maladie virale est transmise majoritairement par les moustiques du sous-genre *Stegomyia*. Le réservoir urbain du virus est constitué par l'homme et le vecteur infecté. C'est une maladie généralement d'évolution bénigne dans sa forme commune, dite fièvre dengue classique, mais elle peut revêtir un caractère sévère avec mise en jeu du pronostic vital.

Ae. aegypti a été le vecteur des épidémies les plus importantes dans les régions tropicales, subtropicales et même tempérées avec plus d'un million de cas en Grèce et 1500 cas mortels en 1928-1929 (Papaevangelou, 1977). D'autres espèces telles qu'*Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, membre du complexe *Ae. scutellaris* et *Ae. niveus* sont considérées comme vecteurs secondaires (Cire Antilles-Guyane, 2007).

À l'heure actuelle, *Ae. albopictus* est devenu un vecteur de plus en plus important car il peut facilement s'adapter à de nouveaux environnements, y compris en régions tempérées. La propagation de cette espèce à des pays jusque-là indemnes a créé l'opportunité pour les virus de la dengue d'entrer dans de nouvelles zones géographiques et générer des cas d'arboviroses (Barniol *et al.*, 2011). Cependant, il reste un contributeur mineur dans les infections de la dengue humaine. La transmission de la dengue reste insidieuse et compliquée à évaluer dans la

majorité des cas car de nombreux cas sont peu symptomatiques ou asymptomatiques (Reiter, 2010).

En France métropolitaine, le virus de la dengue est un sujet de grande préoccupation avec des cas autochtones rapportés à plusieurs reprises depuis 2010 (La Ruche *et al.*, 2010 ; Marchand *et al.*, 2013 ; Giron *et al.*, 2015). En Août et Septembre 2015, sept cas de dengue 1(DENV-1) autochtones ont également été rapportés confirmant ainsi les craintes des experts entomologistes et épidémiologistes (Reiter, 2006 ; Fontenille *et al.*, 2007).

Chikungunya

Le virus du Chikungunya (CHIKV) est un alphavirus transmis par les moustiques et provoque de la fièvre, une arthralgie sévère, invalidante et souvent chronique (Lark *et al.*, 2014). Le virus circule dans un cycle enzootique en Afrique entre les moustiques vivant dans les forêts et les primates non-humains (Jupp *et al.*, 1990). Le nombre de cas rapportés de chikungunya varie beaucoup en fonction des années. Par exemple, l'épidémie qui a touché l'Inde et les Iles de l'Océan Indien en 2006 a engendré plus de 1500 000 cas (Ravi, 2006 ; Arankalle *et al.*, 2007). Ce virus a été isolé en 1952 en Tanzanie (Robinson, 1955). En Asie, où le premier foyer a été signalé en 1958 en Thaïlande, CHIKV a historiquement été maintenu dans un cycle urbain transmis à l'homme par le moustique *Ae. aegypti* et, dans une moindre mesure, *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2011). Le virus a été détecté comme l'agent étiologique des épidémies sporadiques en Afrique et en Asie et, depuis 2004, il a élargi sa distribution géographique dans les îles de l'Océan Indien, en Italie, en France et dans les Amériques.

Le CHIKV est également réapparu en Asie du Sud-est depuis 2006, causant environ 1,3 million de cas humains (Powers *et al.*, 2007). En 2004, le CHIKV appartenant à la lignée de l'Afrique du Sud s'est propagé de Lamu et Mombasa vers les zones côtières du Kenya (Kariuki Njenga *et al.*, 2008) et aux Comores et plus tard, à d'autres îles de l'Océan Indien, y compris La Réunion. Là, le vecteur prédominant *Ae. albopictus* transmet préférentiellement un variant du CHIKV avec un changement d'un seul acide aminé, une alanine (A) par une valine (V), au niveau de l'acide aminé 226 d'une glycoprotéine E1 ECSA de l'Océan Indien (Schuffenecker *et al.*, 2006). Le variant E1-226V est plus efficacement transmis par *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2007 ; Vazeille *et al.*, 2007), avec une infection initiale au niveau des cellules épithéliales du mésentéron qui est 40 fois plus élevée (Tsetsarkin *et al.*, 2009). La sélection du

variant E1-226V se produit à l'infection initiale du tube digestif, ce qui conduit à une dissémination virale élevée (Arias-Goeta *et al.*, 2013). Une série de quatre mutations adaptatives supplémentaires dans le gène E2 a également été mise en évidence plus récemment dans la transmission du CHIKV par *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2014). En 2005-2006, le virus s'est étendu aux îles voisines de l'Océan Indien, y compris Mayotte, Maurice et Madagascar, où le CHIKV E1-A226V est principalement transmis par *Ae. albopictus* (Ratsitorahina *et al.*, 2008 ; Bagnyet *et al.*, 2009). Par la suite, le CHIKV de l'Océan Indien a été introduit en Inde (Yergolkar *et al.*, 2006) et les îles environnantes, Sri-Lanka (Kularatne *et al.*, 2009) et Maldives. En Afrique, le variant CHIKV E1-226V a également été impliqué au Cameroun (Peyrefitte *et al.*, 2007), au Gabon (Paupy *et al.*, 2012) et au Congo (Mombouli *et al.*, 2013). Ce variant a également causé la première épidémie européenne de CHIKV en Italie en 2007 (Rezza *et al.*, 2007). En septembre 2010, deux cas autochtones de CHIKV ont été signalés dans le sud-est de la France métropolitaine (Gould *et al.*, 2010 ; Grandadam *et al.*, 2011) ainsi que 11 cas transmis localement en 2014 (Delisle *et al.*, 2015) encore une fois avec *Ae. albopictus* comme vecteur (Delaunay *et al.*, 2009 ; Rua-Vega *et al.*, 2013).

Zika

Le virus Zika (ZIKV; famille des Flaviviridae, genre Flavivirus) a d'abord été isolé à partir d'un singe rhésus dans la forêt Zika de l'Ouganda en 1947 (Dick *et al.*, 1959). Depuis lors, il est apparu en dehors de son aire naturelle de répartition, en Afrique et en Asie: sur l'île de Yap (Micronésie) en 2007 (Duffy *et al.*, 2009), en Polynésie française en 2013 (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015), en Nouvelle-Calédonie en 2014 (Tognarelli *et al.*, 2015), sur l'île de Pâques en 2014 (Musso *et al.*, 2014), les îles Cook en 2014 (Musso *et al.*, 2015) et, plus récemment, au nord du Brésil en mai 2015 (Zanluca *et al.*, 2014 ; Campos *et al.*, 2015), puis dans de nombreux pays des Amériques et Caraïbes, avec au moins 26 pays touchés par la transmission de ce virus. Ce virus est maintenant importé en Asie, où il génère des foyers locaux.

Le ZIKV est composé de trois grandes lignées : Afrique de l'Est, Afrique de l'Ouest, Asiatique (Faye *et al.*, 2014). Le génotype asiatique est responsable de l'expansion actuelle de ZIKV dans les Amériques (Faye *et al.*, 2014 ; Haddow *et al.*, 2012). Bien que les rapports indiquent que la plupart des infections produisent des signes/symptômes comme l'éruption cutanée, la fièvre, l'arthrite ou l'arthralgie et la conjonctivite, les récentes infections ont été associées à des maladies neurologiques ou auto-immunes plus graves avec des complications telles que le syndrome de Guillain-Barré (Oehler *et al.*, 2014) et des microcéphalies qui se

manifestent par une croissance anormalement faible de la boîte crânienne et du cerveau chez le fœtus. Ce virus a un fort potentiel d'expansion géographique dans des pays où les moustiques *Aedes* spp. sont présents notamment les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*.

Le ZIKV, à l'instar du DENV et le CHIKV, est un virus urbain, qui est transmis préférentiellement par des moustiques urbains comme *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Les principaux vecteurs selvatiques de ZIKV en Afrique sont les moustiques *Aedes* spp. Des isollements viraux ont été signalés à partir d'*Ae. africanus* et *Ae. apicoargenteus* (McCrae *et al.*, 1982), *Ae. luteocephalus* (Fagbami *et al.*, 1979), *Ae. furcifer* et *Ae. taylori* (Monlun *et al.*, 1993), et *Ae. vittatus* (Diallo *et al.*, 2014). La transmission à l'homme s'effectue généralement par *Ae. aegypti* qui est compétent pour transmettre ZIKV dans la nature et au laboratoire (Li MI *et al.*, 2012). Des isollements de ZIKV ont été effectués à partir de cette espèce sur le terrain (Diallo *et al.*, 2014 ; Marchette *et al.*, 1969 ; Akoua-Koffi *et al.*, 2001). Cependant, la transmission de ZIKV par les *Ae. aegypti* africains a été, de façon inattendue, faible à nulle (Diagne *et al.*, 2015), ce qui souligne l'importance de la délimitation génétique des populations de moustiques en terme de compétence vectorielle (Tesh *et al.*, 1976 ; Failloux *et al.*, 2002). En outre, *Ae. albopictus* a également été montré comme un vecteur efficace de ZIKV au laboratoire (Wong *et al.*, 2013), avec des isollements viraux de moustiques recueillis sur le terrain (Grard *et al.*, 2007, Wong *et al.*, 2013), mais les *Ae. albopictus* du sud de la France métropolitaine sont peu compétents pour ce virus (Jupille *et al.*, 2016).

Stratégie de ponte : « *Skip Oviposition* »

Les moustiques femelles utilisent des signaux sensoriels pour évaluer les gîtes de ponte (Thorsteinson *et al.*, 1960 ; Wallis *et al.*, 1954) et elles déposent leurs œufs en réponse à des stimuli spécifiques (Strickman *et al.*, 1980 ; Bentley *et al.*, 1989 ; Ponnusamy *et al.*, 2008 ; Ponnusamy *et al.*, 2015).

Les larves d'*Aedes albopictus* se développent dans des environnements qui varient en termes de disponibilité des gîtes larvaires propices (Walker *et al.*, 1991). La concurrence pour des ressources limitées peut entraîner une mortalité larvaire (Mori, 1979). La compétition intraspécifique au sein de cette espèce, au stade larvaire, peut être forte et il a été démontré qu'elle affecte la taille du corps et le comportement adaptatif des adultes face à leur environnement (Juliano, 2009 ; Yoshioka *et al.*, 2012). En conséquence, la mortalité des larves

dépendant de la densité est un facteur important de régulation des populations de ce genre de moustique (Service, 1985).

Pour atténuer la concurrence des larves pour les ressources alimentaires limitées, les moustiques peuvent disperser leurs œufs sur plusieurs gîtes. Ce comportement a été observé chez plusieurs espèces. Mogi et Mokry (1980) ont observé que les femelles de *Wyeomyia smithii* (Coquillett) déposent leurs œufs dans plusieurs gîtes pendant un cycle gonotrophique et décrivent ce comportement comme une oviposition séquentielle (skip oviposition). Les femelles d'*Ae. aegypti* (L.) distribuent leur lots d'œufs d'une façon séquentielle sur plusieurs gîtes (Christophers, 1960 ; Fay et Perry, 1965 ; Reiter, 2007). Ainsi, la progéniture se développera dans des conditions favorables avec le moins de concurrence possible pour les nutriments (Harrington et Edman 2001).

Le *skip oviposition* a été rapporté chez *Ae. albopictus* (Skuse) dans plusieurs études (Rozeboom *et al.*, 1973 ; Makiya, 1976 ; Takagi *et al.*, 1995 ; Rozilawati *et al.*, 2007), les chercheurs ont constaté que le nombre d'œufs collectés par gîte larvaire était souvent beaucoup plus faible que la moyenne du nombre d'œufs produit par cycle gonotrophique.

A Samoa, en Océanie, 20,5 œufs (8,3-37,3) étaient déposés en moyenne à chaque fois dans des pièges pondoires (Buxton *et al.*, 1927). A Trinidad, 15% des pièges pondoires trouvés positifs contenaient un ou deux œufs seulement (Chadee *et al.*, 1991). A Porto Rico, Reiter *et al.*, (1995) rapportent que, sur 1000 pièges pondoires utilisés avec une infusion de foin, la majorité d'entre eux avaient reçu un seul œuf par période de 24 h (34/1000) et que 140 contenaient 10 œufs ou moins. Dans les études de dispersion de l'espèce *Ae. aegypti* à Puerto Rico (Reiter *et al.*, 1995a), des femelles préalablement gorgées de sang contenant du rubidium ont été relâchées sur terrain. Les titres de rubidium dans les œufs collectés dans les pièges pondoires ont montrés un petit nombre d'œufs marqués par piège, la majorité contenant cinq œufs ou moins. Les mêmes constations ont été rapportées par des études similaires à Singapour (Liew *et al.*, 2004).

Parallèlement, la surveillance des œufs et des adultes révèle le point faible de la dynamique des populations locales d'*Ae. albopictus*. Ce comportement de *skip oviposition* constitue un atout en faveur de l'utilisation des pièges pondoires létaux et de la technique d'autodissémination (Entwistle, 2011).

La lutte contre *Aedes albopictus*

Contrôle larvaire

La réduction de la source et le porte-à-porte

Bien que la réduction de la source ait été déclarée comme étant l'outil le plus efficace pour le contrôle des espèces *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (Hawley, 1988 ; Estrada-Franco et Craig 1995 ; WHO/TDR, 2009), la méthode est difficile à mettre en œuvre et à maintenir car elle nécessite une forte collaboration communautaire. Cette méthode peut être obtenue par l'enlèvement des récipients d'eau qui est souvent combiné avec des traitements larvicides des récipients qui ne peuvent être éliminés ou vidés.

Certaines études ont montré que la réduction de la source est coûteuse et demande beaucoup de main-d'œuvre et du temps (Zhou *et al.*, 2009 ; Rao, 2010 ; Fonseca *et al.*, 2013) et qu'elle pourrait ne pas être efficace si elle n'est pas combinée avec d'autres méthodes de contrôle (Wheeler *et al.*, 2009). Des chercheurs du New Jersey, USA (Fonseca *et al.* 2013) ont supprimé les populations d'*Ae. albopictus* (75% d'adultes en moins par rapport à un site non traité) en combinant la réduction de la source avec les traitement adulticides (UBV). En Chine, la réduction de la source quotidienne dans une aire de loisirs a donné lieu à une réduction de 50% de la population d'*Ae. albopictus* pour une durée de 2 à 3 semaines (Zhou *et al.*, 2009). Au Pérou, cependant, en ciblant les conteneurs les plus productifs, les chercheurs n'ont atteint une réduction que de 15 % (Wong *et al.*, 2012).

Quel que soit le succès de la réduction de la source, cette méthode présente un inconvénient non négligeable si elle est utilisée seule. En effet, l'élimination des gîtes potentiels entraînerait inévitablement une dispersion plus importante des femelles gravides qui sont capables d'effectuer une rétention des œufs jusqu'à trouver un gîte de ponte propice. Ce constat a été corroboré par une étude réalisée par Farjana *et al.*, (2013) qui ont montré au laboratoire, que seulement 10 % des femelles *Ae. aegypti* effectuaient une rétention d'œufs tandis que 66,5% étaient obtenues chez des femelles *Ae. albopictus*.

Application directe de larvicides

La variété des habitats larvaires et leur omniprésence dans les environnements péri-domestiques, couplé avec les questions d'accès et les coûts de main-d'œuvre, limite

l'efficacité de cette méthode. Les applications directes de larvicides peuvent être effectuées à la main ou à l'aide d'équipements motorisés (Nelder *et al.*, 2010 ; Ritchie *et al.*, 2010 ; Farajollahi *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2014 ; Achee *et al.*, 2015). Bien que les larvicides soient des produits efficaces, abordables et facilement disponibles pour lutter contre les moustiques *Aedes*, cette approche fait face aux mêmes obstacles que la stratégie du porte-à-porte. Les biocides utilisés en traitement larvicide peuvent être regroupés en deux catégories principales, les insecticides chimiques ou de synthèse et les insecticides d'origine biologique ou bioinsecticides.

Parmi les insecticides chimiques, on peut citer le téméphos, un organophosphoré qui perturbe l'activité de l'enzyme cholinestérase et conduit à la paralysie ou la mort. Mais cette substance active n'est plus autorisée sur le marché européen car non soutenue par son fabricant dans le cadre du processus de réhomologation instaurée en 1998 avec l'adoption de la directive n°98/8/CE de mise sur le marché des biocides. Toujours commercialisés en Europe, il existe également des régulateurs de croissance d'insectes tels que le pyriproxifène et le S-méthoprène, des mimétiques de l'hormone juvénile, et le diflubenzuron, un benzoylurée inhibiteur de synthèse de la chitine.

Les bioinsecticides regroupent essentiellement les agents de contrôle d'origine microbienne, le *Bacillus thuringiensis ser israelensis* H14 (Bti) et *Lysinibacillus sphaericus* (LSPH anciennement *Bacillus sphaericus*). Le spinosad, seul représentant de la famille des Naturalytes, composé de spinosyn A et D dérivés par fermentation de l'actinomycète du sol *Saccharopolyspora spinosa*, peut être également rangé dans cette catégorie.

Ne répondant pas à la définition de biocides et ne nécessitant pas d'être homologués en tant que tels, car agissant davantage comme barrière physique, les huiles de surface et les films monomoléculaires ont également des effets larvicides et nymphicides. En se propageant à la surface de l'eau pour former un film mince, ils empêchent les échanges gazeux, conduisant à l'asphyxie des stades aquatiques immatures. Un grand nombre d'expériences en laboratoire et sur le terrain ont permis de démontrer l'efficacité et, le cas échéant, la persistance d'action de ces larvicides dans les gîtes urbains. Cependant, l'efficacité de ces traitements en termes d'impact sur la transmission d'agents pathogènes est controversée (Estrada-Franco et Craig 1995 ; Reiter *et al.*, 1997 ; Bonizzoni *et al.*, 2013 ; Boyce *et al.*, 2013 ; Gubler *et al.*, 2014 ; Achee *et al.*, 2015 ; Baldacchino *et al.*, 2015).

Lutte biologique

Les méthodes de lutte biologique utilisent une variété de prédateurs aquatiques, parasites ou agents pathogènes pour cibler les populations de moustiques dans le but de supprimer les populations, tout en réduisant le recours aux insecticides. Les agents de lutte biologique contre les *Aedes* incluent les poissons larvivores tels que *Gambusia* spp. (Walton, 2007), les insectes prédateurs tels que les larves prédatrices de moustiques du genre *Toxorhynchites* (Focks, 2007), les larves de moucheron appartenant aux familles Corethrellidae et Chaoboridae (Mogi, 2007), et d'invertébrés, comme les copépodes cyclopoïdes du genre *Macrocyclus* Claus et *Mesocyclops* G. O. Sars (Kay *et al.*, 2002 ; Marten et Reid, 2007). En outre, les parasites et les agents pathogènes tels que les microsporidies (Andreadis, 2007), les grégarines (Tseng, 2007), les mermithidénématodes (Platzer, 2007), les virus pathogènes de moustiques (Becnel et White, 2007) et les champignons entomopathogènes (Darbro *et al.*, 2012) ont également montré une efficacité contre ces moustiques. Malgré le fait que ces méthodes soient très bien acceptées par les habitants, il est à noter que leur utilisation à large échelle et sur le long terme est très difficile à mettre en place du fait du nombre important des gîtes ainsi que de la difficulté d'y accéder.

L'autodissémination d'insecticide

La méthode d'autodissémination d'insecticide exploite un comportement biologique des moustiques qui effectuent une ponte séquentielle « *skip oviposition* », le fait que les femelles gravides de ces moustiques se posent sur plusieurs gîtes pour pondre leurs œufs, favorise le dépôt d'insecticides si elles en sont contaminées (Itohet *et al.*, 1994 ; Dell Chism et Apperson, 2003 ; Gaugler *et al.*, 2012 ; Gedenet Devine, 2012 ; Wang *et al.*, 2014 ; Mains *et al.*, 2015). Le choix du pyriproxifène est lié au fait qu'il agit à des concentrations particulièrement faibles.

Cet analogue d'hormone est par ailleurs considéré comme présentant un risque toxicologique réduit (CL50 = 0,012 ppb ; OMS, 2009) au point d'être recommandé par l'OMS dans l'eau potable pour lutter contre les moustiques.

Précédemment testée avec succès contre différents insectes (Itoh *et al.*, 1994 ; Furlong *et al.*, 1995 ; Dell Chism et Apperson, 2003 ; Baxter *et al.*, 2008 ; Caputo *et al.*, 2012), l'autodissémination a été démontré pour la première fois sur les moustiques dans des conditions de laboratoire par Itoh *et al.*, (1994) et confirmé ultérieurement par Dell Chism et Apperson, (2003). Des expériences de terrain effectuées par Devine *et al.* (2009) au Pérou ont démontré que les femelles gravides d'*Ae. aegypti* contaminées avec le pyriproxifène transféraient des

concentrations létales dans les gîtes larvaires entraînant une inhibition de l'ordre de 42-98 % de l'émergence des adultes. Les expériences menées par Devine *et al.*, (2009) ont fourni la preuve de principe et ont conduit à des recherches plus poussées sur les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Caputo *et al.*, (2012) ont également obtenu une diffusion significative du pyriproxifène à partir d'une station revêtue d'une poudre de ce dernier dans des conditions de terrain, prouvant qu'une dissémination large dans les gîtes larvaires pouvait être obtenue en utilisant uniquement une petite quantité de ce produit. Une autre composante de la méthode d'autodissémination consisterait donc à exploiter les moustiques mâles pour transférer le pyriproxifène, soit directement sur les habitats larvaires soit indirectement par contact sexuel avec les femelles pendant l'accouplement. Les mâles *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* sont en effet attirés par les gîtes de pontes afin d'y rencontrer les femelles pour les inséminer. La transmission du pyriproxifène à partir de mâles contaminés vers les femelles a par ailleurs été enregistré au laboratoire (Gaugler *et al.*, 2012).

Mains *et al.* (2015) ont tenté d'exploiter ce comportement en utilisant des mâles préalablement contaminés au pyriproxifène au laboratoire. Les mâles ont ainsi pu transférer une dose létale de ce larvicide au niveau des gîtes larvaires après un contact avec les femelles lors de l'accouplement ou en se posant directement sur les gîtes larvaires.

Éducation publique

Les principaux sites de production larvaire d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti* se trouvent chez les habitants eux-mêmes. L'éducation de la population visant à participer à la réduction du nombre de gîtes propices au développement de ces moustiques est donc primordiale. Il s'agit de faire adopter des comportements dont les objectifs peuvent être de réduire à la fois la nuisance et le risque de transmission des arbovirus. Des gestes simples peuvent être utilisés pour réduire les habitats larvaires anthropiques dans le périmètre des propriétés privées. Mais il peut également s'agir d'utiliser des mesures de protection personnelle (répulsifs, vêtements imprégnés d'insecticide, etc.) afin d'éviter les piqûres de moustiques. Des études antérieures en Indonésie (Soedarmo, 1994) et en Thaïlande (Phanthumachinda *et al.*, 1985) ont montré que des responsables en charge de l'éducation active des nouveaux résidents d'une communauté, ont réussi à réduire de manière significative les indices larvaires. Une étude au Texas a montré que les élèves du secondaire ont eu un grand succès dans l'enseignement des membres de leur communauté sur les questions de santé publique (Warner *et al.*, 2005). Cependant, il demeure essentiel que le public soit engagé et concerné, parce que le contrôle des moustiques exige la

participation de tous et qu'une collaboration communautaire est cruciale pendant les épidémies d'arbovirus.

Contrôle et surveillance des adultes

Pièges pour le contrôle des moustiques adultes et la surveillance

Historiquement, la surveillance des espèces *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* s'est focalisé sur les stades immatures en utilisant les indices entomologiques tels que l'indice de Breteau et l'indice Maison (Jatanasen, 1967 ; Harris *et al.*, 2000 ; Gubler, 2002). Cependant, mis à part l'indice nymphal, les indices précédemment cités n'ont pas donné de bonnes corrélations avec les populations adultes (Focks et Chadee, 1997 ; Unlu *et al.*, 2013). Ce n'est que récemment que la surveillance des moustiques du genre *Stegomyia* a recours essentiellement au piégeage des moustiques adultes, notamment au moyen des pièges de la marque Biogents Sentinel (BGS, Biogents AG, Regensburg, Allemagne) (Meeraus *et al.*, 2008 ; Farajollahi *et al.*, 2011 ; Unlu *et al.*, 2014b).

Ces pièges, bien qu'adaptés aux moustiques diurnes comme *Ae. albopictus*, ont montré quelque faiblesse en termes de nombre de moustiques capturés, néanmoins leur efficacité a été améliorée en utilisant différents attractifs comme le dioxyde de carbone et des souris (Lacroix *et al.*, 2009; Roiz *et al.*, 2016).

La surveillance du moustique *Ae. albopictus* effectuée au moyen de pièges BGs fournit une évaluation plus directe de l'abondance des adultes, mais permet surtout l'évaluation de l'efficacité des méthodes de contrôle (Tan *et al.*, 2011 ; Farajollahi *et al.*, 2012 ; Fonseca *et al.*, 2013 ; Unlu *et al.*, 2014a).

Pièges pondoirs pour le contrôle et la surveillance

La surveillance des *Aedes* est également réalisée à l'aide de pièges pondoirs. Un piège pondoir se présente généralement sous forme d'un seau en plastique d'une contenance variant entre 0,5 et 3 l, rempli aux 2/3 avec de l'eau et d'un carré de polystyrène flottant à la surface qui servira de support de ponte (Fay et Eliason, 1966). D'autres supports de ponte peuvent être utilisés comme le papier de ponte (Germination paper ; Anchor Paper, Co., Minneapolis, Minnesota) qui est tapissé sur toute la face interne des pièges pondoirs.

La méthode des pièges pondoires exploite le comportement singulier des *Aedes* urbains à pondre dans les récipients artificiels générés par l'Homme. Ces gîtes artificiels sont d'autant plus attractifs qu'ils sont remplis d'une eau riche en nutriments obtenue en faisant infuser des plantes (Reiter *et al.*, 1991 ; Trexler *et al.*, 1998).

Cette méthode est très utilisée depuis des décennies pour la surveillance des moustiques invasifs tels qu'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* en raison de leur conception simple et le faible coût de leur mise en œuvre (Bellini *et al.*, 1996 ; Abramides *et al.*, 2011 ; Carrieri *et al.*, 2011 ; Norzahira *et al.*, 2011 ; Fonseca *et al.*, 2013 ; Achee *et al.*, 2015 ; Suter *et al.*, 2016).

Une autre variante récente des pièges pondoires, utilisée pour le contrôle des moustiques adultes, est celle des pièges pondoires létaux ou autocides, qui combinent la stimulation de la ponte avec un effet léthal due à la présence d'un insecticide sur la paroi du piège pondoire. Certains de ces dispositifs utilisent des bandes de ponte imprégnées ou traitées avec un insecticide. D'autres utilisent des pièges pondoires collants (*Sticky traps*) qui incluent une surface adhésive qui piège les moustiques dès leur atterrissage sur la paroi du seau. Bien que l'efficacité de ces pièges pondoires létaux dépende de plusieurs facteurs comme leur densité sur le terrain, certaines études ont suggéré qu'ils ont été efficaces pour réduire les populations sauvages d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (Perich *et al.*, 2003 ; Rapley *et al.*, 2009 ; Zeichner et Debboun, 2011 ; Barrera *et al.*, 2014). Néanmoins, avant d'envisager de réduire significativement voire de supprimer des populations de moustiques d'une zone traitée par cette méthode, il reste à l'optimiser en améliorant l'attractivité des stimuli de ponte et des signaux visuels, en choisissant le type d'insecticide et sa concentration la plus efficaces et la densité appropriée des pièges pondoires par unité de surface.

Méthodes de contrôle génétique

Bien que les insecticides chimiques et les biopesticides mentionnés ci-dessus restent les principaux outils utilisés contre les *Aedes* urbains, des préoccupations actuelles se posent en ce qui concerne leur biosécurité, le coût, la perception du public, l'efficacité, ainsi que leurs impacts environnementaux. Des méthodes de contrôle alternatives, en particulier celles regroupées sous le terme générique de lutte génétique, sont d'un immense intérêt. Ces méthodes pourraient fournir potentiellement des stratégies nouvelles et sélectives, spécifiques au contrôle des espèces grâce à l'introduction d'un trait héritable dans la population cible entraînant sa suppression de la zone traitée (Alphey, 2014). Les trois méthodes les plus utilisées à l'heure

actuelle comprennent la technique des insectes stériles (TIS), une variante du TIS basée sur la libération des insectes portant un gène létal dominant (RIDL) et l'induction de l'incompatibilité cytoplasmique (CI) par les symbiontes *Wolbachia*.

La Technique des Insectes Stériles

La technique TIS remonte à plus de 50 ans lorsque l'entomologiste américain Edward Knippling, en effectuant une étude sur la mouche *Cochliomyia hominivorax*, a été le premier à réaliser que la fertilité des insectes femelles pouvait être manipulée par accouplement avec des mâles stériles (Knippling, 1955). Ces mâles sont stérilisés au laboratoire par irradiation ou au moyen de produits chimiques agressifs, avant leur libération en grand nombre sur le site concerné où ils vont entrer en compétition avec les mâles sauvages fertiles et s'accoupler aléatoirement avec des femelles sauvages et ainsi les stériliser. Cependant, cette méthode rencontre de nombreux problèmes logistiques (production en masse, la séparation des mâles et des femelles avant le relâché, etc.) et doit souvent prendre en compte la réduction de la *fitness* des mâles stériles sur le terrain (Dame *et al.*, 2009 ; Alphey *et al.*, 2013).

Bien que cette technique ait été utilisée avec succès contre plusieurs ravageurs agricoles et vétérinaires (Klassen et Curtis, 2005), des essais sur le terrain contre les moustiques ont rencontré des succès variables (Lowe *et al.*, 1980 ; Benedict *et al.*, 2003). Les meilleurs résultats contre les moustiques ont été atteints dans des situations insulaires isolées (Patterson *et al.*, 1970). En outre, des essais préliminaires en Italie ont montré qu'une libération hebdomadaire de 900 à 1600 mâles stérilisés par hectare induit un niveau de stérilité significatif dans les populations locales d'*Ae. albopictus* (Bellini *et al.*, 2013).

Les mâles transgéniques

La technique TIS a été améliorée par la méthode utilisant des mâles transgénique RIDL. Contrairement à la première technique, les mâles ne sont pas stérilisés mais se voient incorporer un transgène létal et dominant qui est très actif au stade larvaire en produisant une protéine dont l'accumulation est toxique et entraîne la mort de la larve au stade L4 (Thomas *et al.*, 2000). L'expression de ce transgène peut être réprimée au laboratoire en présence de tétracycline. Cette méthode présente un moindre coût concernant la *fitness* des mâles transgéniques dont la compétitivité au laboratoire n'a pas montré une différence significative avec les mâles non transgéniques (Boubidi *et al.*, non publié). Bien que les questions de réglementation et de perception défavorable du public aient jusqu'à présent interdit l'utilisation des techniques de

contrôle RIDL aux Etats-Unis et en Europe, des études ont été menées dans les Îles Caïman et au Brésil. Dans les Îles Caïman, 80% de suppression d'*Ae. aegypti* a été atteint (Harris *et al.*, 2012), alors qu'au Brésil, cette méthode a permis une réduction des populations d'*Ae. aegypti* sur le terrain de l'ordre de 95% (Carvalho *et al.*, 2015).

Wolbachia

Une autre méthode de contrôle exploite un groupe diversifié d'organismes intracellulaires appelés *Wolbachia* (Calvitti *et al.*, 201 ; Zug & Hammerstein, 2012 ; McGraw & O'Neill, 2013 ; Lambrechts *et al.*, 2015). Ces bactéries sont maternellement transmises et provoquent une incompatibilité cytoplasmique (IC) chez les moustiques.

Dans les îles du Pacifique Sud, des moustiques de l'espèce *Ae. polynesiensis*, vecteur majeur de la filariose lymphatique dans cette région, infectés par *Wolbachia*, ont été utilisés pour réduire les populations sauvages de cette espèce (Chambers *et al.*, 2011 ; O'Connor *et al.*, 2012). En outre, plusieurs souches de *Wolbachia* (WRI, wMelPop, WPIP, WMEL) ont été microinjectées avec succès dans *Ae. albopictus*, ouvrant la voie pour une lutte par IC au sein de populations sauvages de cette espèce (Dobson *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2006 ; Blagrove *et al.*, 2012 ; 2013 ; Calvitti *et al.*, 2012). Et plus important encore, les infections avec certaines souches de *Wolbachia* peuvent entraîner une réduction de la durée de vie des adultes *Ae. albopictus* et les rendre réfractaires à l'infection par le virus de la dengue (Hoffmann *et al.*, 2011 ; Andrews *et al.*, 2014) limitant ainsi leur capacité vectorielle parce qu'ils ne peuvent pas vivre assez longtemps pour transmettre avec succès les arbovirus tels que DENV (McMeniman *et al.*, 2009). En outre, cette même souche de *Wolbachia* peut réduire les taux d'infection et de réplication du virus de la dengue chez *Ae. aegypti*, ce qui contribue à la réduction du risque de transmission de ce virus (Moreira *et al.*, 2009 ; Walker *et al.* 2011).

Méthodes de lutte adulticide par traitement spatial

La nébulisation à froid à UBV

La nébulisation spatiale d'insecticides à ultra-bas volume (UBV) est largement utilisée pour lutter contre les populations d'*Aedes* urbains. Elle est souvent considérée comme le mode d'épandage de choix en particulier en cas d'urgence sanitaire afin de stopper rapidement la transmission de la maladie (Reiter, 2014).

Le traitement spatial d'adulticides est une technique utilisée depuis plus de 60 ans et est considéré comme une arme essentielle contre les insectes nuisibles et les insectes vecteurs d'agents pathogènes (Britch *et al.*, 2010). Par définition, une application UBV (*ultra low volume* ou ULV, en anglais) correspond à un volume de liquide épandu (bouillie de pulvérisation) inférieure à 5l/ha. On parle également de bas volume (>5 l/ha et ≤ 20 l/ha) (*low volume* ou LV), etc.

La première utilisation en santé publique de ce type de traitement a été réalisée en Afrique contre la mouche tsé-tsé en utilisant le DDT (Yeo & Thompson, 1954). Les premières pulvérisations UBV étaient aériennes et à visée agricole pour le contrôle de divers insectes ravageurs de plantes (Messenger, 1963).

Le succès de la pulvérisation UBV par voie aérienne a conduit au développement des technologies d'épandage par voie terrestre (Edmunds *et al.*, 1958). Cette méthode a été adaptée et améliorée pour faire face à la transmission de maladies vectorielles, en particulier par Mount *et al.*, (1967a ; 1967b) et Lofgren (1970 ; 1973). En conséquence, ces technologies ont dominé cette approche et continuent à être utilisées dans le monde entier (figure 4a).

La méthode d'épandage UBV par nébulisation permet de produire à partir d'un réseau routier un nuage d'insecticide dont la dynamique et la dispersion dépendent en grande partie de la taille des gouttelettes produites, de la configuration de la zone traitée ainsi que des conditions météorologiques au moment du traitement (Reiter, 2014).

La nébulisation à chaud

La technique de la nébulisation à chaud ou thermo-nébulisation trouve son origine dans les générateurs de fumée développés par les militaires américains dans les années 1940s (LaMer *et al.*, 1947).

Un thermo-nébulisateur est un dispositif qui utilise le gaz d'échappement chaud du moteur en tant que mécanisme pour produire un brouillard sans dégradation de la substance active de l'insecticide (figure 4b). Ces appareils utilisent généralement des produits à base d'huile, mais peuvent également permettre d'appliquer des produits à base aqueuse moyennant un adaptateur. Ils produisent une gamme de gouttelettes de très petite taille. Le spectre de gouttelettes générées se situe entre 0 et 40 μm , avec 80 à 90 % des gouttelettes dont le diamètre varie entre 10 à 25 μm en fonction du type de la buse et de la formulation utilisée. La taille médiane des gouttelettes

des nébulisateurs thermiques est généralement de 15 μm ou moins, la taille exacte dépend de plusieurs facteurs, y compris la nature particulière du solvant utilisé dans le mélange (Mabbett, 2003 ; 2004).

Le brouillard est généralement très visible en raison de la présence d'un adjuvant de bouillie, généralement un solvant organique ou une huile (par exemple, l'huile paraffinique), ou de l'adjonction d'un traceur tel que le propylène glycol. Cette visibilité du nuage d'insecticide peut aider l'opérateur à surveiller le déplacement du nuage insecticide et à s'assurer de sa bonne répartition. Il existe de nombreux types et marques de thermo-nébulisateurs sur le marché (Swingfog®, Pulsfog®...). Les premières marques ont été créées en Allemagne et aux Etats-Unis à la fin de la Seconde Guerre Mondiale.

Les thermo-nébulisateurs sont généralement plus petits, plus légers, portables, et moins coûteux (Mabbett, 2006) que les nébulisateurs à froid. Matthews (1979) a fourni une description détaillée des divers types d'équipement de nébulisation. Cette méthode a été largement utilisée pour lutter contre les moustiques dans le monde (Brown, 1968 ; Buzicky, 1968 ; Berry, 1971 ; Taylor et Schoof, 1971 ; Rathburn, 1972 ; Mount *et al.*, 1975 ; Linley et Jordan, 1992 ; Rose, 2001).



Figure 4 : (a) Nébulisateur à froid London Fogger 18-20 monté sur véhicule. (Photo EID Méditerranée).
(b) Thermonébulisateur portable PULSFOG K-10-SP. (Photo EID Méditerranée).

La nébulisation à froid *versus* thermo-nébulisation

Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de la nébulisation à froid UBV et, dans une moindre mesure, celle de la thermonébulisation contre des moustiques mais seulement sept études ont comparés ces deux méthodes (Mount *et al.*, 1968 ; Mount *et al.*, 1970 ; Taylor et Schoof, 1971 ; Rathburn et Boike, 1972 ; Phanthumachinda *et al.*, 1976 ; Wirat *et al.*, 1982 ; Linley et Jordan, 1992).

La plupart des évaluations rapportées dans la littérature ont été effectuées en utilisant des moustiques dans des cages et dans des espaces ouverts, en l'absence de tout obstacle tels que les murs ou la végétation (Bonds, 2010). Dans ce cas de figure, les moustiques sont directement exposés aux gouttelettes du nuage insecticide. Si elle permet de mesurer effectivement l'efficacité du produit et de déterminer la largeur d'andain dans un espace ouvert, cette méthode ne permet pas de connaître l'efficacité du traitement en milieu urbain et en conditions opérationnelles réelles. Le moustique *Ae. albopictus* est confiné généralement dans une végétation plus ou moins dense, à l'abri de la lumière du soleil (Bengoa *et al.*, 2014), qui peut provoquer sa dessiccation (Hawley, 1988). Certaines études ont en effet démontré qu'il y avait une réduction de l'efficacité des traitements par nébulisation dans les résidences comportant une végétation entourant les maisons dans les zones périurbaines ou urbaines (Reddy *et al.*, 2006 ; Taylor & Schoof, 1971 ; Curtis & Mason, 1988 ; Mount, 1998 ; Barber *et al.*, 2007).

La pénétration des gouttelettes d'insecticide à l'intérieur de la végétation est difficile lorsque l'on opère par nébulisation à froid UBV depuis la voirie (Tableau 2). Les gouttelettes insecticides rencontrent généralement un nombre important d'obstacles avant d'atteindre leur cible. L'orientation des rues, la juxtaposition des maisons ainsi que l'intense végétation qui entoure ces dernières génèrent des schémas complexes de flux d'air (Reiter, 2014). Cependant, la plupart de ces obstacles sont évités en recourant à la thermonébulisation manuelle, car le nuage insecticide est pulvérisé au plus proche de la végétation susceptible d'abriter les populations du moustique tigre. De la même manière, Curtis et Mason (1988) ont noté que la réduction de la vitesse du vent à l'intérieur de la végétation réduirait l'efficacité de l'épandage et peut être un facteur contribuant à la réduction de la mortalité des moustiques.

Taille et dynamique des gouttelettes d'insecticide

L'un des paramètres les plus importants à prendre en compte lors de ce type de traitement, que ce soit en lutte antivectorielle ou contre les insectes nuisants, est la taille des gouttelettes.

La thermonébulisation et la nébulisation à froid vont produire des nuages insecticides composés de centaines de millions de gouttelettes insecticides (Bonds, 2012). La taille des gouttelettes générées par les nébulisateurs doit avoir un diamètre compris entre 2 et 16 μm pour pouvoir coller sur le corps, les ailes et les antennes des moustiques en vol tel qu'il a été démontré par Lofgren *et al.* (1973) en utilisant la microscopie électronique à balayage. Mount *et al.*, (1996) rapportent que la taille optimale d'une gouttelette pour lutter contre les moustiques adultes en traitement spatial UBV au sol est comprise entre 5 et 25 μm de diamètre.

Tableau 2. Comparaison entre nébulisation à froid et à chaud.

Thermonébulisation	Nébulisation à froid
Avantages	Avantages
• Courte durée d'application en raison d'un débit plus élevé (L/heure). • Brouillard dense et visible. • Concentration plus faible de la substance active. • Effet psychologique sur les personnes (quelque chose est fait pour lutter contre les moustiques). • Les gens, en repérant le nuage, peuvent mieux éviter le contact direct avec l'insecticide. • L'application se fait au plus près du biotope des moustiques.	• Peu ou pas de traceur (solvant organique) • Par conséquent, la réduction du volume de bouillie (L/ha, mais dose de substance active identique) • Peu ou pas d'odeur causée par le solvant organique. • Niveau de bruit plus faible. • Plusieurs hectares sont traités en quelques minutes. • Peu de personnel requis.
Inconvénients	Inconvénients
• Coût des solvants organiques (traceurs). • Odeur associée à l'insecticide utilisé. • Haut niveau de bruit des machines. • L'opération nécessite une certaine expérience. • L'application est longue à réaliser et très fatigante. • Nécessite un personnel qualifié.	• Le brouillard est à peine visible, donc l'observation du déplacement du brouillard est plus aléatoire. • Les gens peuvent moins facilement éviter le nuage de brouillard. • Effet psychologique moins important (le nuage est peu visible à moins d'y incorporer un traceur). • Une plus forte concentration de la substance active. • Nécessite des conditions d'application rigoureuses.

La vitesse à laquelle chutent les gouttelettes est déterminée par la masse de la gouttelette. Par exemple, une gouttelette de 20 μm de diamètre tombera à 0,012 m par seconde, prenant 14 min pour tomber d'une hauteur de 10 m en l'absence de vent, alors qu'une gouttelette de 100

μm tombe à 0,279 m par sec et ne mettra que 36 secondes pour tomber de la même hauteur. Les gouttelettes dont la taille est supérieure à 30 μm de diamètre sont moins efficaces car elles ne se maintiennent pas en suspension suffisamment longtemps.

Les gouttelettes de moins de 5 μm de diamètre sont plus exposées à l'évaporation et n'entrent pas facilement en contact avec les insectes volants, car ces derniers, lorsqu'ils sont en vol, créent une turbulence de l'air qui va éloigner les petites gouttelettes (WHO, 2003).

La taille des gouttelettes dans un nuage insecticide est exprimée en Diamètre Moyen Volumique (DMV), exprimé en microns. C'est le nombre médian qui divise les aérosols aspergés en deux parties égales en volume, contenant pour moitié des gouttelettes plus petites que ce diamètre, et pour l'autre moitié des gouttelettes plus volumineuses.

Le Diamètre Médian Numérique (DMN) est la valeur qui divise les aérosols en deux parties égales par le nombre de gouttelettes, dont la moitié des gouttelettes sont plus petites et l'autre moitié plus grandes Figure (figure 6).

Avec la mise en œuvre des nouvelles exigences concernant l'utilisation d'adulticides en 2006, ces paramètres ont changé. Le diamètre-volume (Dv) a désormais remplacé le diamètre médian volumique (DMV). Le Dv est un nombre décimal dont la valeur est comprise entre 0 et 1 et qui relie la proportion en volume du nuage au diamètre de la gouttelette. Le Dv pour la taille des gouttelettes à laquelle 50 % du volume de pulvérisation est composé de gouttelettes correspondant à un diamètre plus petit et égal à Dv (0,5), ce qui représente la même valeur que le DMV. Le Dv (0,1) est le diamètre correspondant à 10 % des gouttelettes du nuage insecticide possédant ce diamètre ou un diamètre inférieur. Il en est de même pour la valeur de 50 % [Dv (0,5)] et 90 % [Dv (0,9)]. La combinaison de Dv (0,1), Dv (0,5) et Dv (0,9) fournit une compréhension de la répartition de la taille des gouttelettes. Les tailles optimales des gouttelettes pour une nébulisation à froid UBV depuis la voirie ont une Dv (0,5) de 12 à 20 μm .

Les gouttelettes d'insecticide sont exposées à un certain nombre de facteurs pouvant affecter leur trajectoire en direction de leurs cibles :

- *La vitesse du vent.* Elle doit être optimale et inférieure à 1–4 m/sec (~3,6–15 km/h) comme recommandé par l'OMS (WHO, 2003) car une vitesse supérieure pourrait déplacer le nuage insecticide en dehors de la zone à traiter. De plus, les moustiques

seront cachés, à l'abri du vent et ne seront pas en vol ce qui diminuera les chances de contact avec les gouttelettes.

- *La distance par rapport à la cible.* Plus la distance entre le nébulisateur et la cible est importante, plus la cible sera difficile à atteindre, les obstacles seront plus nombreux, la déviation par rapport à la trajectoire augmentera et les gouttelettes seront plus exposées aux effets de l'évaporation et de la sédimentation (Reiter et Nathan, 2001). De plus, la distance augmente l'effet de dilution du nombre de gouttelettes car si le nombre de celles-ci est de quelques millions à la sortie de la buse du nébulisateur, elles ne seront plus que quelques centaines quelques mètres plus loin et leur nombre tendra vers zéro plus on s'éloigne de la buse du nébulisateur.
- *L'heure de la nébulisation.* Ce paramètre est très important si on veut optimiser l'efficacité du traitement car il faut tenir compte de la période d'activité de l'espèce de moustique cible. L'épandage doit s'opérer pendant cette période car un moustique qui vole est plus susceptible d'entrer en contact avec les gouttelettes d'insecticide qu'un moustique au repos (Bonds, 2012).

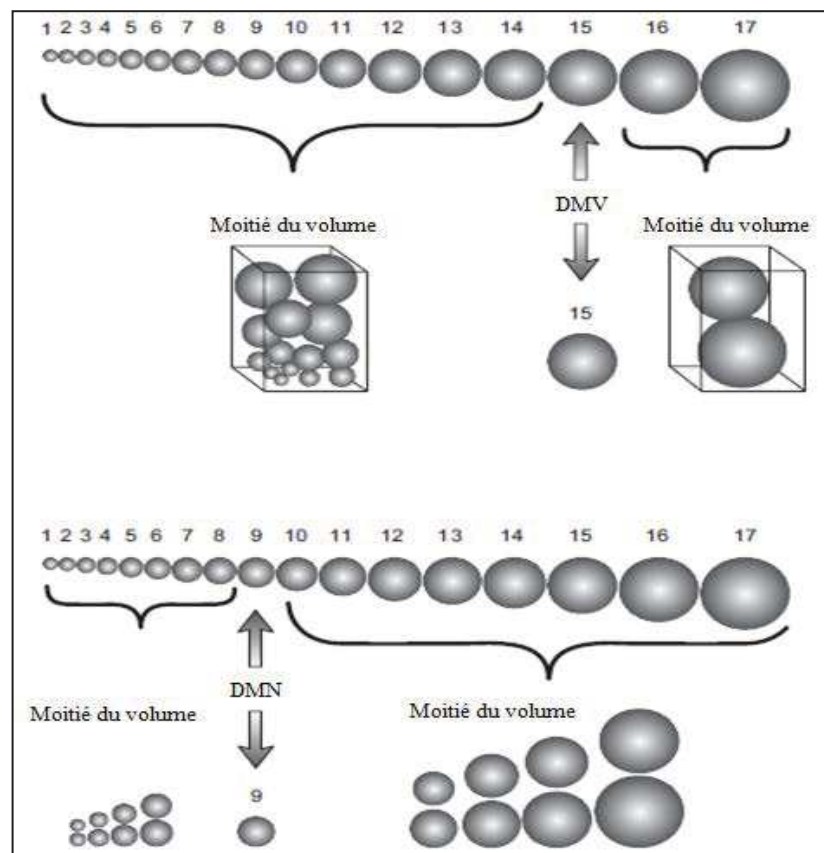


Figure 5 : Paramètres des tailles des gouttelettes : Le Diamètre Moyen Volumique (DMV), Diamètre Médian Numérique (DMN) (Source : WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5).

CHAPITRE II

Dynamique saisonnière

Introduction

Originaire d'Asie du Sud-est, *Ae. albopictus* a envahi les zones tempérées grâce à sa faculté de survivre l'hiver par la production d'œufs pouvant résister à de très faibles températures et qui sont programmés génétiquement pour effectuer une diapause.

L'étude de la dynamique des populations d'un arthropode vecteur est primordiale afin d'estimer la densité vectorielle en fonction des fluctuations tout le long de la période d'activité pour organiser au mieux la lutte antivectorielle nécessaire.

La dynamique saisonnière d'une espèce de moustique est étroitement liée aux facteurs climatiques. L'enclenchement de processus physiologiques tels que la diapause fait partie des conséquences de l'effet de la température et de la longueur du jour sur le métabolisme du moustique (Lacour *et al.*, 2015).

La dynamique des populations d'*Ae. albopictus* dans la région de la Côte d'Azur présente une forte variabilité saisonnière. Les premiers œufs de l'année sont déposés généralement au début du mois de mai. La densité des moustiques est maximale fin juin-début juillet, et fin août-début septembre, selon les années et les villes comme rapporté par Romi *et al.*, (2006) en Italie. L'activité des pontes commence à diminuer entre la mi-septembre et la mi-octobre, avec une activité résiduelle jusqu'à novembre ou décembre.

Méthode d'étude

Trois méthodes de captures ont été utilisées : 1) captures des œufs aux pièges pondoirs (PP), 2) captures aux pièges BG Sentinelles pour moustiques adultes, et 3) capture sur Homme (*Human Landing Count* ou HLC). Tous les pièges ont été géo-localisés, ainsi que les habitations et les espaces boisés.

La première saison d'étude de la dynamique des populations a débuté au mois d'avril jusqu'au mois de novembre 2013. Les captures des œufs d'*Ae. albopictus* ainsi que celles des adultes ont été réalisées au moyens de 20 pièges pondoirs et de 7 pièges BGs respectivement. Ces pièges ont été placés au niveau d'un quartier résidentiel composé d'une centaine de maisons (résidence Vaugrenier Présidence à Villeneuve-Loubet, à la périphérie de Nice). Le relevé des pièges pondoirs se faisait d'une façon hebdomadaire et les œufs d'*Ae. albopictus* étaient

comptés pour chaque piège. Les pièges BGs ont été relevés après 24 h, deux fois par semaine, les moustiques ont été identifiés et comptés.

La seconde saison d'étude s'est étalée du mois d'avril à novembre 2014 dans la même résidence mais avec des méthodes de capture différentes. Nous avons utilisé la méthode de HLC deux jours de suite chaque semaine. La capture des moustiques qui atterrissent sur le corps se fait au moyen d'un aspirateur à bouche et cela pendant 5 séances d'une heure consécutives par jour, 4 heures avant le coucher du soleil et une heure après. La deuxième méthode de capture utilisée est celle des pièges pondoires comme décrit précédemment.

Durant les deux saisons toutes les femelles capturées par HLC et BGs ont été disséquées afin de calculer le taux de parturité. Les œufs ont été conservés en insectarium, comptés et en partie utilisés pour l'élevage afin d'évaluer la sensibilité aux tests insecticides de la population étudiée (voir chapitre suivant).

Les données obtenues ont été comparées à un modèle de dynamique des populations développées par Tran *et al.* (2013) en fonction des fluctuations de température et de pluviométrie observées de 2008 à 2011.

Résultats

En nous basant sur un suivi de deux saisons, nous avons observé de fortes variations saisonnières de la population d'*Ae. albopictus*, avec une activité des adultes d'environ 6 mois et une diapause au stade d'œuf le restant de l'année.

La première année d'étude (2013) de la dynamique saisonnière a montré un pic de la densité des œufs au mois de juillet et un pic de la densité des femelles d'*Ae. albopictus* au mois d'août (figure 1). Nous avons pu capturer 165511 œufs, pendant 38 jours de piègeage, et 784 femelles ont été collectées durant 29 jours de piègeage et ont été disséquées afin d'estimer le taux de parturité de celles-ci. Le taux de femelles pares est élevé ainsi que celui des femelles gravides qui a atteint 47 % des captures au mois d'octobre 2013. Au cours de la deuxième année d'étude (2014) de la dynamique saisonnière, nous avons remarqué qu'il y avait une concordance des taux de captures, que ce soit pour les œufs ou bien pour les adultes, avec un maximum de captures au mois de septembre (figure 2).

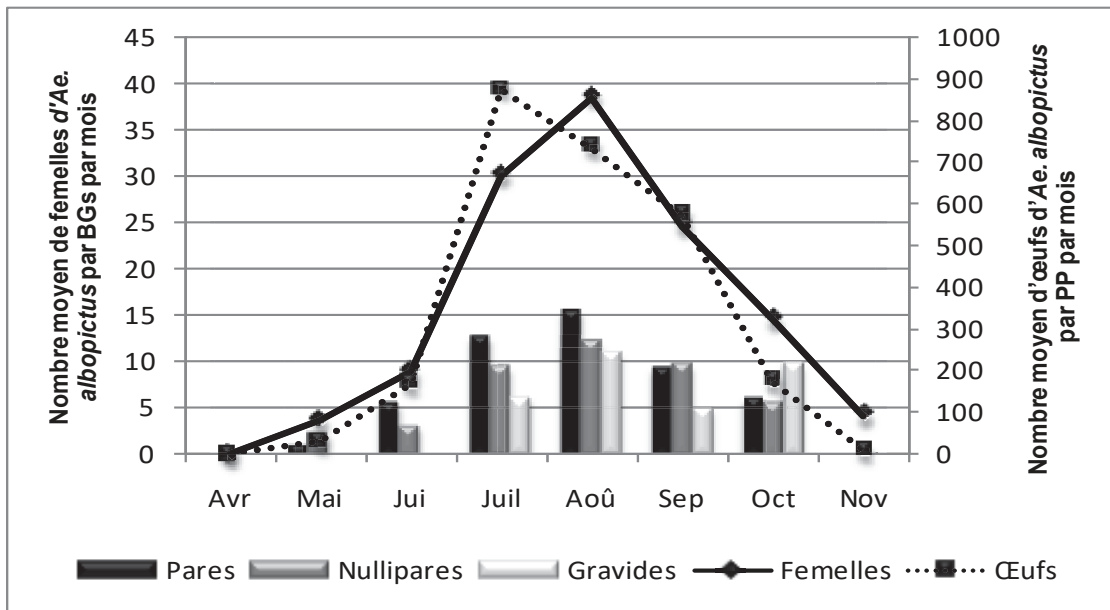


Figure 1 : Dynamique saisonnière des femelles d'*Ae. albopictus* capturées par les pièges adultes BGs et des œufs collectés par les pièges pondoirs (PP), Villeneuve-Loubet, France, 2013.

Durant cette année, 221530 œufs ont été récoltés, durant 42 jours de piègeage et 657 femelles ont été capturées et disséquées pendant 33 jours de piègeage. Les captures sur Homme ont également montré une forte densité d'*Ae. albopictus* dont les taux de piqûres ont atteint 60piqûres/heure/homme.

Les 1441 femelles capturées durant les deux saisons d'activité d'*Ae. albopictus* en 2013 et 2014 nous montrent des taux de parturité assez élevés entre les mois de juin à octobre allant de 50 à 60 % en 2013 concernant les femelles capturées au BGs et de 52 à 71 %, concernant les femelles capturées sur Homme en 2014. Les taux de femelles gravides venant piquer l'homme sont importants, atteignant 44% des captures au mois d'octobre.

Nos résultats, s'appuyant sur le modèle développé par Tran *et al.* (2013) montrent que la densité des populations d'œufs (Figure 3A) et d'adultes (Figure 3B) d'*Ae. albopictus* semble être essentiellement influencée par la température (Alto et al, 2001) (Spearman R = 0,94 et Spearman R = 0,63, respectivement) et l'arrosage artificiel assurant la disponibilité de gîtes de ponte même en l'absence de précipitation, comme c'est le cas à Nice durant l'été.

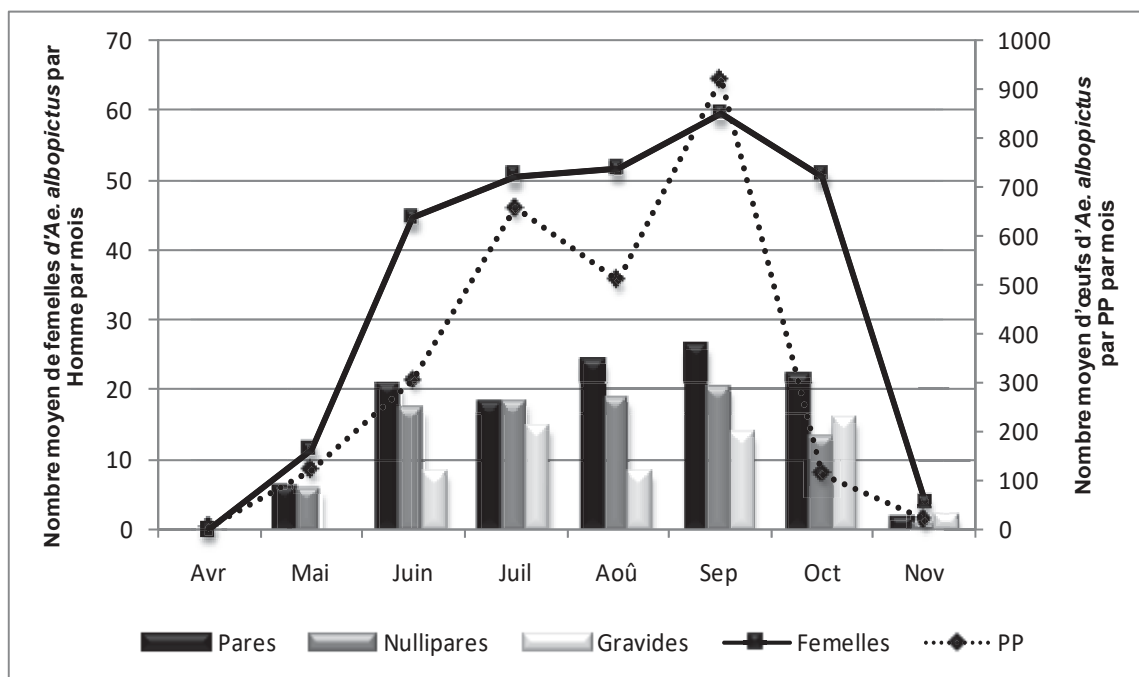


Figure 2 : Dynamique saisonnière des femelles d'*Ae. albopictus*, capturées par la méthode de capture sur Homme (HLC) et des œufs collectés par les pièges pondoirs (PP), Villeneuve-Loubet, France, 2014.

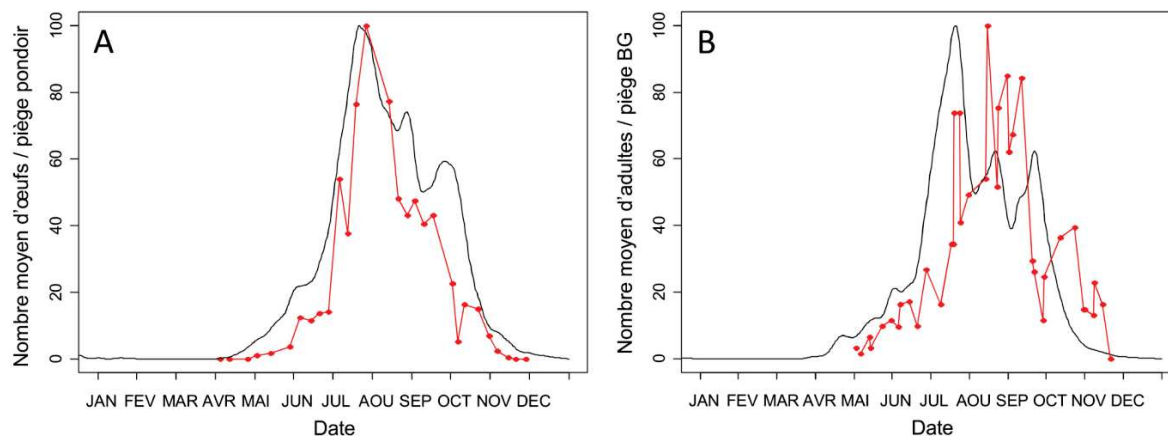


Figure 3 : Comparaison de la dynamique saisonnière des œufs (A), récoltés au moyen de pièges pondoirs et des adultes d'*Ae. albopictus* (B) récoltés avec les BG Sentinel (lignes rouges) avec la dynamique prédite par le modèle développé par Tran et al. (2013) basé sur les précipitations et les fluctuations de températures observées en 2013 (lignes noires) dans la région de Nice.

L'analyse de la répartition spatiale des résultats de nos piégeages (Figure 4) montre une association entre le nombre d'œufs relevés dans les pièges pondoirs et la proximité avec des zones arborées, ce qui suggère une préférence des adultes pour pondre dans les gîtes proches des zones de végétation les plus denses. La corrélation est significative entre le maximum

d'œufs observés et la distance du piège par rapport à la végétation arborée (Spearman $r = -0,47$, $p < 0,05$) (figure 5).

Discussion

Nos résultats sur la dynamique saisonnière des populations d'*Ae. albopictus* observée dans la région de Nice montrent *i*) une corrélation significative avec les données climatiques, essentiellement la température prenant en compte l'arrosage dû aux activités humaines, *i*) un lien étroit entre la densité de la végétation et l'activité de ponte des femelles, *iii*) une variation des taux de parturité au cours du temps.

La dynamique saisonnière d'*Ae. albopictus* dans le sud de la France montre un profil similaire à ceux observés pour d'autres régions d'Europe comme l'Italie (Romi *et al.*, 2008, DiLuca *et al.*, 2001) et l'Espagne (Roiz *et al.*, 2010).

En ce qui concerne la distribution spatiale des populations d'*Ae. albopictus* en milieu urbain et périurbain, les moustiques adultes se reposent et se reproduisent à proximité des habitations humaines (Toma *et al.* 2003, Romi *et al.*, 2006). Les formes immatures (larves et nymphes) prolifèrent dans des récipients artificiels contenant de l'eau tels que les pneus, les soucoupes sous les pots de fleurs, les urnes funéraires, les vases, les seaux, les boîtes de conserve, les pièges à sable, les gouttières obstruées, les arrosoirs, les bols d'eau pour les animaux domestiques, etc. (WHO/TDR, 2009).

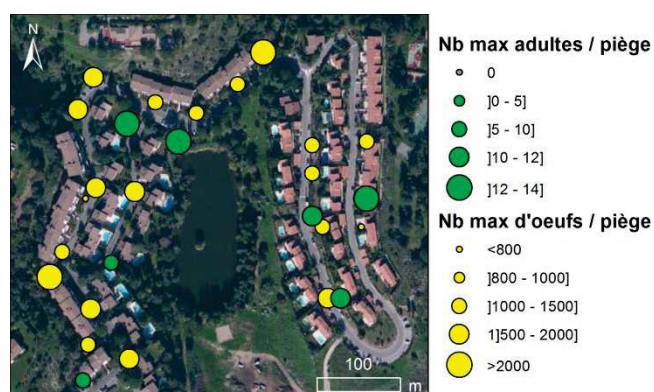


Figure 4 : Corrélation entre la densité des captures en fonction de l'emplacement des pièges à Vaugrenier Présidence, Villeneuve Loubet. Les points jaunes correspondent aux pièges pondoirs et les points verts aux pièges pour adultes (BG Sentinel). La taille des symboles indique le nombre maximum d'œufs collectés.

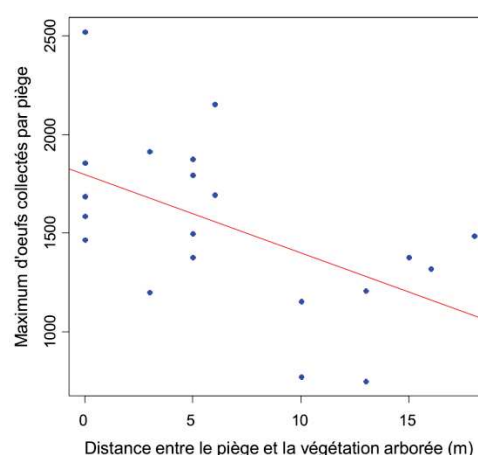


Figure 5 : Corrélation entre le nombre d'œufs capturés et la végétation arborée (Spearman $r = -0,47$, $p < 0,05$).

Nous avons également démontré par nos captures d'adultes grâce aux pièges BGs et surtout HLC que les femelles *Ae. albopictus*, bien qu'elles soient gravides, ont un comportement de recherche d'hôte. Deux types de repas sanguin multiples ont été identifiés : les repas sanguin supplémentaires qui sont nécessaire aux femelles qui ont eu peu de nourriture au stade larvaire et un repas de sang interrompu à cause de la défense de l'hôte (Clements, 1999).

L'alimentation multiple dans un même cycle gonotrophique peut augmenter le risque de transmission de maladie en augmentant la fréquence des contacts avec des hôtes (Garrett-Jones, 1964; Garrett-Jones & Shidrawi, 1969; Dye, 1986; Delatte *et al.*, 2010).

Notre étude permet ainsi de préciser les lieux et les périodes d'activités d'*Ae. albopictus* dans un exemple d'une zone tempérée (Nice) et ces résultats peuvent être utilisés efficacement pour prédire la dynamique des populations d'*Ae. albopictus* (Cros *et al.*, 2014) et évaluer l'efficacité des différentes stratégies de lutte.

Chapitre III

Sensibilité aux insecticides

Introduction de l'article 1

Aedes albopictus est devenue l'une des principales espèces nuisibles dans le sud de la France. Elle est à l'origine des cas autochtones sporadiques de dengue et de chikungunya. Le contrôle des populations de moustiques vecteurs est, sans aucun doute, le meilleur outil pour limiter la charge de ces maladies.

La problématique est d'une importance cruciale en raison de la haute capacité de ce moustique à se propager et à envahir l'habitat humain dans le monde entier. Dans des conditions épidémiques, l'application d'insecticides sous forme de pulvérisations spatiales est la méthode de choix pour limiter rapidement la densité des moustiques dans la zone ciblée (Bonds, 2012).

La surveillance en laboratoire de la sensibilité aux insecticides des vecteurs ciblés est essentielle pour le succès de ces mesures de contrôle. En outre, l'importance de ces évaluations est d'autant plus grande qu'il n'y a plus en Europe que quelques substances actives autorisées pour les traitements anti-adultes (la deltaméthrine et les pyréthrinés naturels) mais surtout qu'elles appartiennent toutes à la seule famille des pyréthrinés, accroissant le risque d'apparition de phénomènes de résistance. Cet état de fait est contraire au principe d'une gestion raisonnée de la résistance prônant l'alternance d'au moins deux insecticides au mode d'action différent (Read *et al.*, 2009 ; Penilla *et al.*, 2007).

Pour l'heure, *Aedes albopictus* est encore sensible vis-à-vis des pyréthrinés en particulier dans les pays tempérés (Romi *et al.*, 2003 ; Marcombe *et al.*, 2014). Les cas de résistance rapportés chez cette espèce ailleurs dans le monde concernent principalement les insecticides DDT, malathion et té méphos (Kushwah *et al.*, 2015 ; Ishak *et al.*, 2015).

Habituellement, l'évaluation de la sensibilité aux insecticides est focalisée sur les femelles en raison de leur rôle dans la transmission d'agents pathogènes biologiques. Les mâles ne sont pas des vecteurs et donc ils sont négligés lors de ces évaluations. La nécessité de faire face à cette lacune, très évidente dans la connaissance des populations de vecteurs, est apparue compte tenu du fait du développement de nouvelles méthodes de contrôle génétique basées sur le principe du relâché de mâles stériles.

L'application de ces méthodes demande des informations plus précises que celles qui sont disponibles en ce qui concerne la densité, la dispersion, l'activité d'accouplement et la longévité des mâles (Muirhead-Thomson, 1968). Reiter (2014) au Venezuela et Unlu (2014) en

Amérique du Nord avaient obtenus un effet létal significatif sur les mâles sauvages d'*Ae. aegypti* après un traitement par pulvérisation spatiale UBV.

Dans cette étude, nous rapportons le statut de sensibilité à la deltaméthrine des mâles et des femelles d'une population d'*Ae. albopictus* originaire de Nice, en utilisant la technique des applications topiques et celle des papiers imprégnés d'insecticide (*WHO Tube Test*).

Cette étude a été menée comme une condition préalable à l'évaluation de l'efficacité des traitements UBV par nébulisation à froid et par thermonébulisation sur les populations naturelles d'*Ae. albopictus*.

Gender Bias in Insecticide Susceptibility of *Aedes albopictus* is Solely Attributable to Size

Author(s): Saïd C. Boubidi , Marie Rossignol , Fabrice Chandre , Reda Tounsi , Christophe Lagneau , Didier Fontenille , and Paul Reiter

Source: Journal of the American Mosquito Control Association, 32(3):251-253.

Published By: The American Mosquito Control Association

DOI: <http://dx.doi.org/10.2987/16-6560.1>

URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.2987/16-6560.1>

BioOne (www.bioone.org) is a nonprofit, online aggregation of core research in the biological, ecological, and environmental sciences. BioOne provides a sustainable online platform for over 170 journals and books published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

SCIENTIFIC NOTE

GENDER BIAS IN INSECTICIDE SUSCEPTIBILITY OF *AEDES ALBOPICTUS* IS SOLELY ATTRIBUTABLE TO SIZE

SAÏD C. BOUBIDI,^{1,2} MARIE ROSSIGNOL,³ FABRICE CHANDRE,³ REDA TOUNSI,¹ CHRISTOPHE LAGNEAU,¹ DIDIER FONTENILLE^{3,4} AND PAUL REITER⁵

ABSTRACT. Despite an extensive literature on mosquitoes, remarkably little attention has been paid to males. Current interest in control by release of transgenic males begs attention to this bias. It is well known that males are more susceptible to insecticides than females when determined by the standard World Health Organization (WHO) bioassay, and field observations have shown a higher impact of ultra-low-volume (ULV) space sprays. It is generally assumed that these differences are due to the smaller size of males and/or greater physiological susceptibility. We compared susceptibility by WHO bioassay and by topical application. There was a significant difference between the sexes in terms of dose effect and knockdown by the WHO test, but no significant difference by weight-adjusted topical application. We conclude that greater susceptibility of males is solely a function of their size and suggest that a ULV treatment before the release of transgenic males would greatly increase their competitive ratio versus wild mosquitoes and thus their impact as a control measure.

KEY WORDS *Aedes albopictus*, insecticide susceptibility, male size, mosquito control, sterile insect technique

An immense literature dating back more than a century is available on all aspects of the biology and control of mosquitoes, yet remarkably little attention has been paid to males (Doyle et al. 2009), unquestionably because they are not directly involved in disease transmission. Current interest in vector control by mass release of transgenic males (Carvalho et al. 2015, Gantza et al. 2015) begs greater attention to this bias. Here we report on a widely accepted but little-investigated observation: males are more susceptible to insecticides.

Field trials on the efficacy of ultra-low-volume (ULV) space sprays of malathion against *Ae. aegypti* (L.) in Venezuela showed a negligible impact on females, whereas males were virtually eliminated (Reiter 2014). A similar contrast was reported for impact of a pyrethroid formulation against *Ae. albopictus* (Skuse) in the United States (Unlu et al. 2014), and we have observed the same phenomenon in field trials of ULV deltamethrin against *Ae. albopictus* in Mediterranean France (S. C. Boubidi, unpublished data). This difference could be due to one or more of the following hypotheses: 1) males are genetically more susceptible to insecticides, 2) males are smaller and therefore more sensitive to the

insecticide, 3) male flight activity is greater, and 4) male anatomy is more likely to pick up particles, particularly on the antennal fibrillae.

We compared the susceptibility of male and female *Ae. albopictus* by 2 methods: the WHO susceptibility bioassay and topical application (WHO 2009). Mosquitoes were reared from eggs collected by ovitrap in a heavily infested city (Nice) in Mediterranean France. Larvae, 200 per liter, fed Tetramin fish food (Tetramin Tropical Flakes; Spectrum Brands, Blacksburg, VA). Two- to 5-day-old F₁ adults were anaesthetized with CO₂ and separated by sex on a refrigerated plate before topical applications.

For the WHO bioassay, exposure tubes of the standard test kit were lined with filter paper, impregnated with technical grade deltamethrin (99.8%) (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany), and diluted in acetone and silicone oil (2:1 by volume) at 8 concentrations from 0.0005% to 0.05% AI. For each dilution, 4 batches of 25 2–4-day-old mosquitoes were introduced and held for 30 min. Knockdown was recorded every 5 min during this period, after which the mosquitoes were transferred to the recovery tubes at 27 ± 2°C and 80 ± 10% RH. Mortality was recorded after 24 h; a 10% honey solution was available during this period. A batch of 25 mosquitoes held in an exposure tube lined with clean filter paper served as control.

For the topical applications, 50 mosquitoes were weighed to determine mean weight per mosquito. Eight dilutions of deltamethrin in acetone, from 0.0013753 ng/mg of mosquito to 0.0880281 ng/mg, were applied by micro-capillary (0.1 µl) to the upper part of the pronotum of mosquitoes anaesthetized with CO₂. The same volume of pure acetone, applied

¹ EID Méditerranée, Agence des Alpes Maritimes, Montpellier, France.

² Département de Biologie, Institut Pasteur, Algiers, Algeria.

³ UMR Mivegec, IRD, CNRS et Université de Montpellier, Montpellier, France.

⁴ Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia.

⁵ Unité Insectes et Maladies Infectieuses, Institut Pasteur, Paris, France.

Table 1. Susceptibility to deltamethrin of male and female *Aedes albopictus*: 1) lethal doses by WHO susceptibility bioassay, 2) lethal doses by topical application, and 3) knockdown times by WHO susceptibility bioassay.

Gender	WHO susceptibility bioassay lethal doses			Topical application (dose adjusted for weight)			WHO susceptibility bioassay knockdown times		
	LD ₅₀ (95% CI)	LD ₉₅ (95% CI)	LD ₅₀ (ng/mg)	LD ₉₅ (ng/mg)	LD ₅₀ (95% CI)	LD ₉₅ (95% CI)	KD ₅₀ (min) (95% CI)	KD ₉₅ (min) (95% CI)	
<i>Aedes albopictus</i> ♀	0.00273 (0.00228–0.00325)	0.01978 (0.01388–0.03287)	0.01147 (0.00794–0.01531)	0.05701 (0.03611–0.14515)	16 (15.5–16.5)	24.7 (23.2–26.6)			
<i>Aedes albopictus</i> ♂	0.00075 (0.00058–0.00097)	0.00518 (0.00333–0.01021)	0.00875 (0.00616–0.01202)	0.07992 (0.04824–0.17865)	7.8 (7.4–8.2)	13.4 (12.4–14.9)			
<i>Aedes aegypti</i> ♀ (Bora)	0.00276 (0.00234–0.00326)	0.01734 (0.0124–0.02768)	0.01176 (0.00849–0.01525)	0.05074 (0.03366–0.11584)	16.3 (15.6–17.2)	26.3 (23.8–30.3)			
<i>Aedes aegypti</i> ♂ (Bora)	0.00131 (0.00098–0.00183)	0.00896 (0.00538–0.02008)	0.00953 (0.00651–0.01328)	0.07790 (0.04785–0.16886)	7.5 (6.8–8.3)	13.9 (12–17.2)			

to 2 samples of 25 mosquitoes, served as control. The treated mosquitoes were transferred to plastic cups and mortality recorded 24 h after the exposure.

For both methods, a batch of 25 mosquitoes (males and females) of a susceptible reference strain originating in French Polynesia (Bora Bora) was used as control. Four replicates were conducted for each trial. Dose-mortality responses were analyzed using R software (R Core Team 2013). This script computes the dosages giving 50% and 95% kill and their confidence intervals. The algorithm is modified from Johnson et al. (2013), which accounts for heterogeneity of the data (Finney 1971). Mortality in controls was taken into account, using the correction from Abbott's formula (Abbott 1925).

There was a clear difference in results obtained by the 2 assay methods (Table 1). With the WHO bioassay, there was a significant difference in susceptibility between males and females in terms of dose effect (LD₅₀ 0.00075 vs. 0.00273; LD₉₅ 0.00518 vs. 0.01978, $P < 10^{-5}$) and knockdown (KD₅₀ 7.7 vs. 16; KD₉₅ 13.4 vs. 24.7, $P < 10^{-5}$). By contrast, there was no significant difference ($P = 0.17$) when determined by weight-adjusted topical application (Table 1).

We conclude that the greater vulnerability of males in the laboratory is a function of their smaller size. This does not rule out that one or more of the other factors mentioned above contribute to the reduction of males observed in the field. Our findings may have practical significance: when transgenic males are released in the field they are in competition with wild males. Models infer that an initial ratio of 10:1 of transgenic versus wild males is required for optimal impact on the wild population (Harris et al. 2011, Megan et al. 2011).

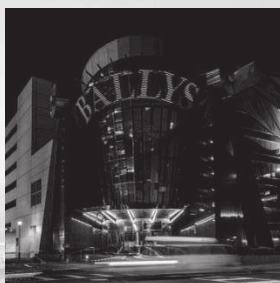
This necessarily involves release of a large number of transgenic males, but, by inference, the impact of successive releases will increase as the wild population (males and females) declines. In this context we suggest that a massive reduction of wild males by a ULV treatment before release of the transgenic males (irrespective of the impact on females) would greatly elevate the impact of such releases as a control measure.

The research was funded by the European Commission under the 7th Framework, Grant Agreement Number: 282589 (Wilder-Smith et al. 2012).

REFERENCES CITED

- Abbott W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267.
- Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnell CA, Alphey L, Malavasi A, Capurro ML. 2015. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* 9(7):e0003864.
- Doyle MA, Kline DL, Allan SA, Kaufman PE. 2009. Efficacy of residual bifenthrin applied to landscape

- vegetation against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 25:179–183.
- Finney DJ. 1971. *Probit analysis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Gantza VM, Jasinskieneb N, Tatarenkovab O, Fazekasb A, Maciasb VM, Biera E, James AA. 2015. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 49:6736–6743.
- Harris AF, Nimmo D, McKemey AR, Kelly N, Scaife S, Donnelly CA, Beech C, Petrie WD, Alphey L. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnol* 29:1034–1037.
- Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* 8:e54092.
- Megan R, Nimmo D, Betz J, Gong HF, James A, Alphey L, Black WC 4th. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA* 12:4772–4775.
- R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation.
- Reiter P. 2014. Surveillance and control of dengue vectors. In: Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farra J, eds. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. 2nd ed. Wallingford, UK: CAB International. p 484–521.
- Unlu I, Farajollahi A, Rochlin I, Crepeau T, Strickman D, Gaugler R. 2014. Differences in male-female ratios of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) following ultra-low volume adulticide applications. *Acta Trop* 137:201–205.
- WHO [World Health Organization] 2009. *Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications*. Geneva, Switzerland: WHO.
- Wilder-Smith A, Renhorn KE, Tissera H, Abu Bakar S, Alphey L, Kittayapong P, Lindsay S, Logan J, Hatz C, Reiter P, Rocklov J, Byass P, Louis V, Tozan Y, Massad E, Tenorio A, Lagneau C, L'Ambert G, Brooks D, Wegerdt J, Gubler D. 2012. Dengue tools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. *Glob Health Action* 5.



JOIN US!



The 104th annual meeting of the
New Jersey Mosquito Control Association
 will take place from **March 15 - 17, 2017**
 at **Bally's Hotel in Atlantic City, NJ!**

Discussion article 1

L'objectif principal de notre étude est l'estimation de l'état de la sensibilité d'*Ae. albopictus* qui est actuellement le moustique vecteur le plus important dans le sud de la France. Les deux sexes d'*Ae. albopictus* ont été testés et ont montré une forte sensibilité à la deltaméthrine ce qui correspond aux résultats des rares évaluations réalisées dans les régions à climat tempéré (Romi *et al.*, 2003 ; Marcombe *et al.*, 2014). Cependant et malgré une sensibilité similaire obtenue par la méthode des applications topiques, les tests en tubes OMS ont révélé que les femelles *Ae. albopictus* nécessitent une CL50 significativement plus élevée que pour les mâles. Deplus, le KDT50, à doses égales, était également moindre pour les mâles que pour les femelles. Cette différence n'est sans doute pas causée par une sensibilité génétique différente entre mâles et femelles face à la deltaméthrine mais est probablement due à la taille des mâles inférieure à celle des femelles, ce qui les rend plus sensibles que les femelles à une même dose d'insecticide. Concernant la méthode des applications topiques, les doses létales DL50 et DL90 sont exprimées en nanogrammes de substance active (s.a.) par milligramme de poids vif demoustique et par conséquence, les résultats obtenus ont révélé que la DL50 était la même pour les deux sexes.

La mise en évidence d'une efficacité plus forte sur les mâles des nébulisations spatiales UBV à base de deltaméthrine confirme les observations faites par Reiter *et al.*(2014) au Venezuela et par Unlu *et al.*(2014) en Amérique du Nord.

Il est possible que la taille des mâles, inférieure à celle des femelles, ne soit pas la seule explication. Le comportement peut jouer un rôle supplémentaire. Dans une étude précédente (données non publiées), nos observations sur le comportement d'accouplement des moustiques libérés dans une cage cubique (1m³) transparente en Plexiglas ont montré que le temps de vol des mâles est significativement plus élevé que celui des femelles. Les femelles se dirigeaient directement vers une chaussette, fraîchement imprégnés de l'odeur humaine et suspendue au niveau la partie supérieure de la cage, se posaient dessus et commençaient les tentatives de prises de repas de sang. Malgré qu'ils volaient directement vers l'appât, les mâles, à la différence des femelles, ne s'y posaient pas. Ils volaient à proximité de l'appât afin d'agripper une femelle dès son décollage pour s'accoupler avec elle. La plus longue durée de vol des mâles pourrait les exposer davantage aux gouttelettes d'insecticide en suspension dans l'air. Les antennes très plumeuses des mâles peuvent jouer également un rôle dans la capture et l'absorption d'un

nombre plus important de gouttelettes par unité de surface du corps que chez les femelles. Lofgren *et al.* (1973) ont montré que des gouttelettes allant de 2 à 16 µm de diamètre se posaient préférentiellement sur les ailes et les antennes des moustiques qui volent dans le nuage d'aérosols UVB.

Notre étude montre que les mâles sont une cible de choix que nous devons prendre en compte en particulier lors de l'utilisation des méthodes de contrôle innovantes telles que les Techniques de l'Insecte Stérile (Unlu *et al.*, 2014). Il est estimé qu'un ratio de 10:1 de mâles stériles par rapport aux mâles sauvages est nécessaire pour obtenir un effet sur la population sauvage (Christophides *et al.*, 2006). L'élevage et la libération de milliers de mâles stériles sont coûteux et demandent une logistique importante et beaucoup de main-d'œuvre. La diminution de la densité des moustiques sauvages par la mise en œuvre des traitements UVB entraîne une diminution du nombre de mâles stériles à relâcher et favorise par la même occasion l'accouplement des femelles sauvages avec les mâles stériles aboutissant à un contrôle plus efficace.

Chapitre IV

Evaluation des pulvérisations spatiales d'adulticides

Introduction de l'article 2

L'étude de la bionomique d'*Aedes albopictus* nous montre l'importante adaptation à son environnement du sud français dont est capable cette espèce. En effet, les taux de parturité, la densité ainsi que les taux de piqûres/heure/homme de cette espèce couplée à une forte compétence à transmettre les virus du chikungunya (CHIKV) et de la dengue (DENV) (Vega-Rua *et al.*, 2013) démontrent l'importance du risque de réapparition d'épidémies arbovirales dans cette région, comme cela a été le cas en Italie (Rezza *et al.*, 2007), en Croatie (Gjenero-Margan *et al.*, 2010) et en France (Delisle *et al.*, 2014 ; Giron *et al.*, 2015).

La problématique est d'une importance cruciale en raison de la haute capacité du moustique tigre à se propager et à envahir l'habitat humain, que ce soit en milieu tropical ou tempéré. En l'absence d'un vaccin efficace contre le chikungunya et la dengue, les méthodes de contrôle sont basées sur la lutte contre les moustiques vecteurs.

La lutte par les insecticides reste à l'heure actuelle l'une des meilleures méthodes pour le contrôle des moustiques tels qu'*Ae. albopictus*. Les méthodes de lutte conventionnelles sont basées sur l'utilisation d'insecticides antilarvaires comme le Bti (toxine excrétée par la bactérie *Bacillus thuringiensis ser israelensis*) et les pulvérisations spatiales d'insecticides adulticides comme la deltaméthrine.

Dans des conditions épidémiques, l'application d'insecticides sous forme de pulvérisations spatiales est considérée comme la méthode de choix afin de limiter rapidement la propagation des femelles infectées dans la zone touchée (Bonds, 2012). Néanmoins, l'efficacité d'un traitement insecticide dépend en premier lieu de la sensibilité des arthropodes ciblés vis-à-vis de cet insecticide. Le niveau de résistance d'*Ae. albopictus* apparaît relativement faible à l'heure actuelle, par rapport à celui d'*Ae. aegypti* (Ranson *et al.*, 2010). La situation va certainement évoluer du fait de l'intensification de l'utilisation des insecticides non seulement par les particuliers mais aussi par les sociétés privées.

Dans de nombreux pays, les traitements spatiaux d'adulticides au moyen d'appareils de nébulisation UBV, montés sur véhicule, sont largement utilisés pour lutter contre les moustiques nuisibles et vecteurs.

Néanmoins, plusieurs essais sur le terrain n'ont pu aboutir à une réduction significative des densités d'*Ae. aegypti* et il n'y a aucune preuve que de tels traitements ont un impact marqué sur la transmission épidémique d'arbovirus (Newton *et al.*, 1992).

Aedes aegypti est une espèce endophile qui passe une grande partie de son temps séquestrée dans des sites abrités à l'intérieur des maisons, généralement cachées parmi les vêtements dans les placards. L'impact décevant des traitements UBV sur *Ae. aegypti* peut être attribuable à son comportement. En effet, les particules d'aérosol pulvérisées sont à la merci des mouvements d'air pour atteindre leur cible. Cette cible est cloîtrée dans les sites exempts de tout mouvement d'air. En revanche, en raison du fait qu'*Ae. albopictus* est nettement exophile, on peut émettre l'hypothèse qu'il serait plus vulnérable aux traitements insecticides. Dans l'article ci-après, sont présentés les résultats d'une série de quatre essais sur le terrain durant lesquels nous avons utilisé des pièges pondoires avec une infusion de foin et des pièges BGSentinel pour surveiller l'impact des traitements UBV par nébulisation à froid à base de deltaméthrine sur les populations sauvages d'*Ae. albopictus* dans des zones résidentielles à Nice, dans le sud-est de la France. Contrairement à la plupart des études entreprises pour l'évaluation de l'efficacité des traitements UBV, qui utilisent des moustiques emprisonnés dans des cagettes pour évaluer l'efficacité du traitement (Bengoa *et al.*, 2014), nous nous sommes basés sur l'impact direct des traitements insecticides sur la population sauvage d'*Ae. albopictus*.

Le traitement adulticide a pour but de diminuer la densité des moustiques femelles en-deçà d'un seuil où il ne peut plus y avoir de transmission d'agents pathogènes. Il s'agit, plus précisément, de diminuer l'âge des femelles survivantes en touchant le plus grand nombre de femelles âgées, les plus susceptibles de s'être infectées. Dans ce but, il a été vérifié non seulement s'il y a eu une baisse du nombre de femelles après le traitement mais aussi l'âge physiologique de celles-ci après dissection des follicules ovariens par la méthode de Detinova (1969). Nous avons également évalué une autre technique d'aspersion, la thermonébulisation, avec deux répliques au niveau d'une zone plus réduite. Cette technique est réputée pour son efficacité mais également par le fait qu'elle est très contraignante et demande du personnel qualifié et du temps.

RESEARCH

Open Access



Efficacy of ULV and thermal aerosols of deltamethrin for control of *Aedes albopictus* in nice, France

Saïd C Boubidi^{1,2*}, David Roiz³, Marie Rossignol³, Fabrice Chandre³, Romain Benoit¹, Marc Raselli¹, Charles Tizon¹, Bernard Cadiou¹, Reda Tounsi¹, Christophe Lagneau¹, Didier Fontenille^{3,4} and Paul Reiter⁵

Abstract

Background: Ultra-low volume (ULV) insecticidal aerosols dispensed from vehicle-mounted cold-foggers are widely considered the method of choice for control of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* during outbreaks of dengue and chikungunya and, more recently, Zika. Nevertheless, their effectiveness has been poorly studied, particularly in Europe. Nearly all published studies of ULV efficacy are bio-assays based on the mortality of caged mosquitoes. In our study we preferred to monitor the direct impact of treatments on the wild mosquito populations. This study was undertaken to evaluate the efficiency of the two widely used space spraying methods to control *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*.

Methods: We determined the susceptibility of local *Ae. albopictus* to deltamethrin by two methods: topical application and the "WHO Tube Test". We used ovitraps baited with hay infusion and adult traps (B-G Sentinel) baited with a patented attractant to monitor the mosquitoes in four residential areas in Nice, southern France. The impact of deltamethrin applied from vehicle-mounted ULV fogging-machines was assessed by comparing trap results in treated vs untreated areas for 5 days before and 5 days after treatment. Four trials were conducted at the maximum permitted application rate (1 g.ha⁻¹). We also made two small-scale tests of the impact of the same insecticide dispensed from a hand-held thermal fogger.

Results: Susceptibility to the insecticide was high but there was no discernable change in the oviposition rate or the catch of adult female mosquitoes, nor was there any change in the parous rate. In contrast, hand-held thermal foggers were highly effective, with more than 90% reduction of both laid eggs and females.

Conclusions: We believe that direct monitoring of the wild mosquito populations gives a realistic assessment of the impact of treatments and suggest that the lack of efficacy is due to lack of interaction between the target mosquitoes and the ULV aerosol. We discuss the factors that influence the effectiveness of both methods of spraying in the context of epidemic situations.

Keywords: *Aedes albopictus*, ULV, Cold fogging, Thermal fogging, Vector control, Dengue, Deltamethrin

Background

Dengue is transmitted by two species of mosquito, *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*, that thrive in the urban environment. For this reason it is a predominantly urban disease. In the past 50 years, the incidence and prevalence of dengue have risen dramatically; it is now by far the most important arboviral disease and a major public health problem throughout most tropical and some

sub-tropical regions worldwide. According to the most recent estimates, c.390 million people are infected each year and 96 million manifest with clinically apparent illness [1]. Two other arboviral diseases, chikungunya and Zika, are transmitted by the same vectors and have achieved high profile in the past decade after major urban outbreaks in the Americas, Africa and Polynesia [2].

The tiger mosquito *Ae. albopictus*, native to Asia, was first detected in Europe in the 1970s [3] and is now widespread, often common in at least 18 countries. An outbreak of chikungunya (292 clinical cases) in northeastern

* Correspondence: saidboubidi@yahoo.fr

¹EID Méditerranée, Montpellier, France

²Service Eco-épidémiologie parasitaire, Institut Pasteur, Algiers, Algeria

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



Italy [4] confirmed that epidemic transmission of this virus is possible. Sporadic autochthonous cases of dengue and chikungunya associated with infected travellers continue to occur at various sites in Mediterranean Europe, particularly in France [5–7], a forewarning of future outbreaks [8]. It is likely that the northward progression of the vector will expand the geographic range of such events. Moreover, Zika virus epidemics occurring currently in the Americas raise concerns, though this virus is adapted not only to *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* but to several species of mosquito [9, 10].

In the absence of a vaccine, vector control is the only option for suppression of transmission. In many countries, ultra-low volume (ULV) insecticidal aerosols dispensed from vehicle-mounted cold-foggers, widely used to combat nuisance species, are considered the method of choice during public health emergencies [11]. Nevertheless, field trials have failed to demonstrate any significant impact on urban *Ae. aegypti* populations and there is no evidence that such treatments have any marked impact on epidemic transmission [12]. Moreover, even if ULV were to achieve a major reduction of adult mosquitoes, the effect would probably be too transient for any marked reduction of transmission [13].

Aedes aegypti is an endophilic species that spends much of its time sequestered in sheltered sites indoors, typically among clothes in closets. The disappointing impact of ULV treatments on *Ae. aegypti* may be attributable to this behavior: once launched from the machine, aerosol particles are at the mercy of air movements to deliver them to the target, yet that target is cloistered in sites that are devoid of air movement. By contrast, because *Ae. albopictus* is markedly exophilic, we were optimistic that this species would be more vulnerable to outdoor treatments. In this article we report on a series of six field trials in which we used ovitraps and B-G Sentinel traps to monitor the impact of ULV deltamethrin on wild populations of *Ae. albopictus* in residential areas in Nice, France. We also present results of small-scale treatments by hand-held thermal fogger.

Methods

Mosquitoes

Adult *Ae. albopictus* were obtained by rearing eggs collected in ovitraps baited with seven day-old hay infusion [14]. Larvae (200 per liter) were fed 'Tetramin' fish food (Tetramin Tropical Flakes-Spectrum Brands, Inc). F₀ females were fed on cattle blood through a pig intestine membrane with the Hemotek membrane feeding system (Hemotek®). A 10% honey solution was available at all times except for 24 h before the blood meal. Three-five day-old F₁ females were used in all assays.

Insecticide susceptibility

Susceptibility of F₁ *Ae. albopictus* females was determined by the standard WHO Bioassay [15] and by topical application. For the WHO test, technical grade (TG) deltamethrin 99.8% (Sigma-Aldrich, France) was diluted in acetone with silicone oil as the carrier. Eight concentrations of deltamethrin ranging from 0.0005 to 0.05%, active ingredient were used. For each replicate, four batches of 25 non-blood-fed females (2–4 day-old) were held in the exposure tubes for 30 min. Knockdown (Kd) was recorded every 5 min. Recovery tubes were maintained at 27 ± 2 °C and 80 ± 10% relative humidity with a small pad saturated with 10% honey solution. Mortality was recorded 24 h after exposure. For each concentration, a batch of 25 mosquitoes of a susceptible strain originating in French Polynesia (Bora Bora) was used as a control.

For tests by topical application, eight doses of deltamethrin (0.0013753 ng/mg to 0.0880281 ng/mg) diluted in acetone were used to provide a range of mortality from 0 to 100%. Two-five day-old non blood-fed females were anaesthetized with carbon dioxide for 60 s and transferred to a refrigerating plate at 4 °C. Insecticide solution (0.1 µl at the required concentration) was deposited on the upper pronotum by microcapillary. Mosquitoes were then transferred to plastic cups and maintained at (27 ± 2 °C) and humidity (80 ± 10%). Mortality was recorded 60 min after dosing and again after 24 h.

Trial sites

The ULV trials were conducted in gated communities in Nice, southern France, each with a close network of roads linking approximately 200 houses. Vegetation, largely a wide range of evergreen shrubs and trees, was abundant and meticulously maintained. In the dry Mediterranean summer, mosquito breeding sites were very hard to find, yet *Ae. albopictus* was plentiful, attacking in large numbers in many shaded sites. The two most frequent breeding sites of *Ae. albopictus* were man-made containers, particularly flower pot saucers and catch basins.

The first three were in a residence in the commune of Villeneuve-Loubet in the department (= county) of Alpes-Maritimes, southeast France (Fig. 1). The fourth was in a residence with similar layout, about 350 m from the first one (Fig. 2). A third residence in the same residential area, about 500 m from the two other sites, was used as an untreated control (Fig. 3).

Spraying using hand-held thermal fogger was applied in an isolated cluster of four private houses surrounded by woodland and located in the same department at Saint-Julien district. The control site includes the same

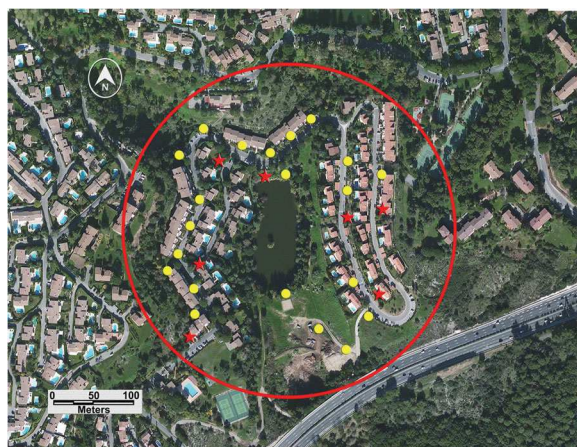


Fig. 1 Control site: Vaugrenier Residence, Villeneuve Loubet, Alpes Maritimes. Stars indicate BGs traps; dots indicate ovitraps

number of grouped and isolated houses located at approximately 300 m from the treated site (Fig. 4).

Insecticide formulation

Aqua K-Othrine® (Bayer SAS), containing 2% deltamethrin was used at maximum permitted dose (1 g active ingredient per hectare). The product is a patented formulation (*Film Forming Aqueous Spray Technology*) that forms a protective film around the spray droplets, thereby suppressing evaporation. Our trials were performed with Aqua K-Othrine®, aqueous emulsionnable FFAST formulation, this new formulation (at a dose of 1 g AI/ha) were reviewed by WHOPES which mentioned a mortality of 86% on *Ae. albopictus* in caged bioassays up to 50 m downwind from the point of spray discharge, which demonstrated the good adulticidal efficacy of Aqua K-Othrine [16].

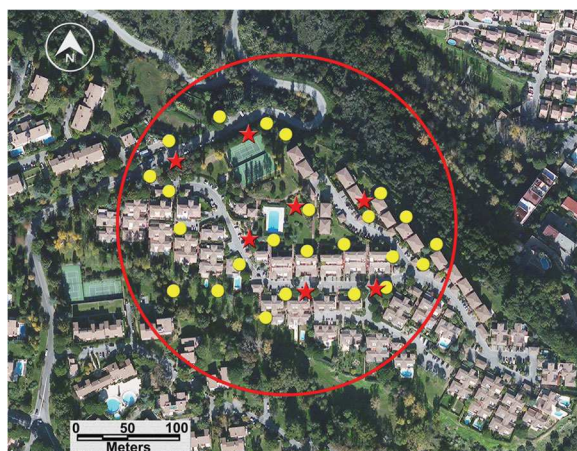


Fig. 2 ULV treatment evaluation site, Test n°1: les Ambassades residence. Dots indicate ovitraps; stars indicate BG sentinel traps

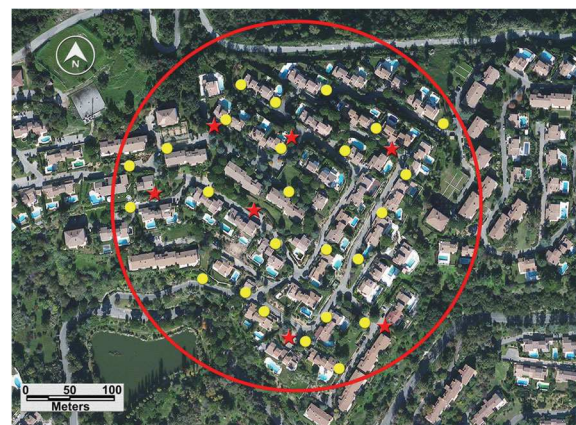


Fig. 3 ULV treatment evaluation site, Test n°2: "La Soubrane" residence. Dots indicate ovitraps; stars indicate BG sentinel traps

Pre-trial preparation

Local regulations require that all residents receive a letter outlining the objectives of the trial, the date and time of the treatment, as well as safety measures (e.g. closed windows) that should be respected. On the eve of the treatment, further information was distributed in flyers and stickers, and by the management of the residence.

Fogging equipment

Cold fogging was by a vehicle-mounted London Fogger Model 18-20 (London Foggers, Long Lake, MN, USA) ULV aerosol generator with nozzle horizontal, parallel to the road. Liquid flow-rate was 0.5 l/min, 80% of droplets below 20 µm and vehicle speed was held below 12 km/h. The solution was applied at 2 l per hectare, equivalent to 1 g active ingredient with the maximum permitted

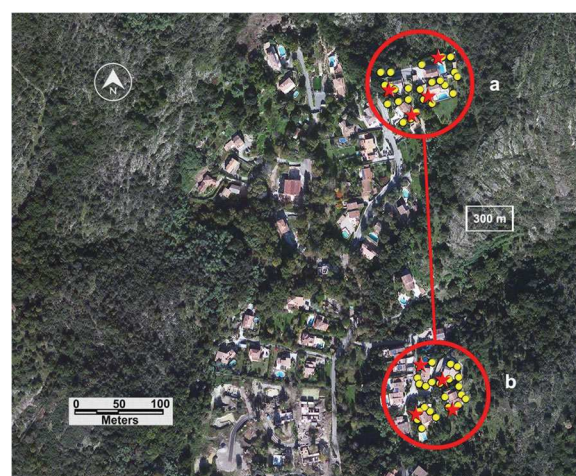


Fig. 4 Thermal fogging evaluation site, Les Terrasses de Saint Julien. **a** Treated area. **b** Control area. Dots indicate ovitraps; stars indicate BG sentinel traps

dosage. Additional file 1: Figure S1, Additional file 2: Figure S2 and Additional file 3: Figure S3 show the route of spraying in the two different residential areas. All treatments were made punctually in late dawn, one hour after astronomic sunrise.

Thermal fog was applied by a portable Pulsfog® K-10-SP (GRID) (Pulsfog Dr. Stahl & Sohn GmbH) with a liquid flow rate of 0.5 l/min and 100% of droplets below 25 µm diameter. Protective clothing and safety procedures followed WHO recommendations [17]. Treatments were made all around each house, with fog mainly directed less than 1 m above the ground, with particular attention to vegetation. Treatment dates and times are summarized in Table 1.

Monitoring the mosquito population

Mosquito populations were monitored with 25 ovitraps baited with hay infusion and seven adult traps baited with a patented attractant (BG-Sentinel® traps, BioGents, Regensburg, Germany). Traps were exchanged every 24-h. The thermal fog tests were on a much smaller scale, with 1 BG-Sentinel® trap and 6 ovitraps in each of the four private houses in the treatment and the control clusters.

Statistical analysis

The dose-mortality response was assessed by the R-script BioRssay [18]. This computes the doses of insecticides killing 50% and 95% of the tested colony or strain. After developing a protocol for data exploration [19], a Generalized Linear Mixed Model (GLMM) was applied with negative binomial distribution or zero-inflated negative binomial (as the data were over-dispersed) using the *glmm* ADMB package [20]. The response variables were *Ae. albopictus* female and egg abundance and parity rates. Explanatory variables are Control/Treatment and Pre/Post treatment and the interaction of both, while random variable was trap. Significant values were corrected by False Discovery Rate. Statistical analysis was performed in

R version 2.14.2 [18]. The interpretation of the variables used in our statistical analysis is summarized in Additional file 5: Table S1.

Results

The local strain of *Ae. albopictus* was fully susceptible to deltamethrin by both methods (Table 2); values for KdT_{50} and KdT_{95} were similar (overlapping 95% CIs) to those of the *Ae. aegypti* reference strain. We investigated the effect of the insecticidal treatment on the density and parity rates of natural populations of *Ae. albopictus*. Weather conditions appeared optimum; wind-speed was < 10 km/h and thermal conditions were stable. There was no marked impact of the fogging treatments on oviposition rate, adult capture rate or parous rate in any of the four field ULV applications (Additional file 6: Table S2; Additional file 7: Table S3; Additional file 8: Table S4; Fig. 5). Our efforts to improve the cold fogging spraying method in residential habitat was not successful despite the change to a site with a more extensive road network (Fig. 2) which assumed better coverage of the targeted zone by the swath of the insecticide cloud. Furthermore, even when two applications were made three days apart there was no impact on the wild mosquito population as shown by GLM analysis (Fig. 6) and the variable interaction “Treatment*Pre/Post” is positive and significant or not significant for all of the cases (Additional file 5: Table S1). Hence, in general Cold Fogging was not effective on diminishing the abundance of eggs and females and females’ parity rates (Additional file 6: Table S2; Additional file 7: Table S3; Additional file 8: Table S4).

By contrast, in treatment by thermal fog, oviposition rate and adult capture were reduced by about 95% (Fig. 5) in test 1 and 61% in Test 2; “Treatment*Pre/Post” was negative and highly significant ($P < 10^{-5}$; Additional file 6: Table S2; Additional file 7: Table S3). Therefore, the thermal fogging was effective to reduce the egg and the female abundance.

Intriguingly, even if the number of eggs and adults dropped drastically there was no effect of the spraying on the female’s parity rates as shown by the GLM analysis (Additional file 4: Figure S4; Additional file 8: Table S4). The statistical power of the analysis is illustrated by the explained variance in Additional file 9: Table S5.

Temperature and air velocity measurement inside and outside the vegetation in five points chosen randomly in the sprayed zone showed that atmospheric conditions were completely different from inside than outside bushes. Results emphasize the fact that the air velocity inside the vegetation is approximately 10-fold lower than in outside (outside vegetation: 1.13–2.01 m/s; inside vegetation: 0.15–0.5 m/s).

Table 1 Trial dates and treatment times

Trial	Treatment	Date	Treatment time	Comment
1	ULV	26/08/2013	1 h pre-sunrise ^a	Site 1
2	ULV	24/09/2013	2 h post-sunrise ^b	Site 1
3	ULV	23/06/2014	2 h post-sunrise	Site 1
4	ULV	23/07/2014	2 h post-sunrise	Site 2 ^c
		28/07/2014	2 h post-sunrise	
5	Thermal fog	09/10/2013	2 h post-sunrise	Site 3
6	Thermal fog	20/08/2014	2 h post-sunrise	Site 3

^aTiming to minimize exposure of residents

^bTiming to coincide with maximum flight activity period of targeted mosquitoes

^cSite with denser network of roads enabling improved accessibility to machine

Table 2 Deltamethrin susceptibility status of *Aedes albopictus* populations from Nice, southeastern France

Strain	Topical application				WHO test kit assay				Knockdown times			
	LD50 (ng/mg) (95% CI)	LD95 (ng/mg) (95% CI)	RR50	RR95	LD50 (%) (95% CI)	LD95 (%) (95% CI)	RR50	RR95	T50 (min) (95% CI)	KT95 (min) (95% CI)	RR50	RR95
<i>Aedes albopictus</i>	0.01147 (0.00794–0.01531)	0.05701 (0.03611–0.14515)	0.974	1.123	0.00273 (0.00228–0.00325)	0.01978 (0.01388–0.03287)	0.62	0.75	16 (15.5–16.5)	24.7 (23.2–26.6)	0.979	0.939
<i>Aedes aegypti</i> (Bora)	0.01176 (0.00849–0.01525)	0.05074 (0.03366–0.11584)	1	1	0.00131 (0.00098–0.00183)	0.00896 (0.00538–0.02008)	1	1	16.3 (15.6–17.2)	26.3 (23.8–30.3)	1	1

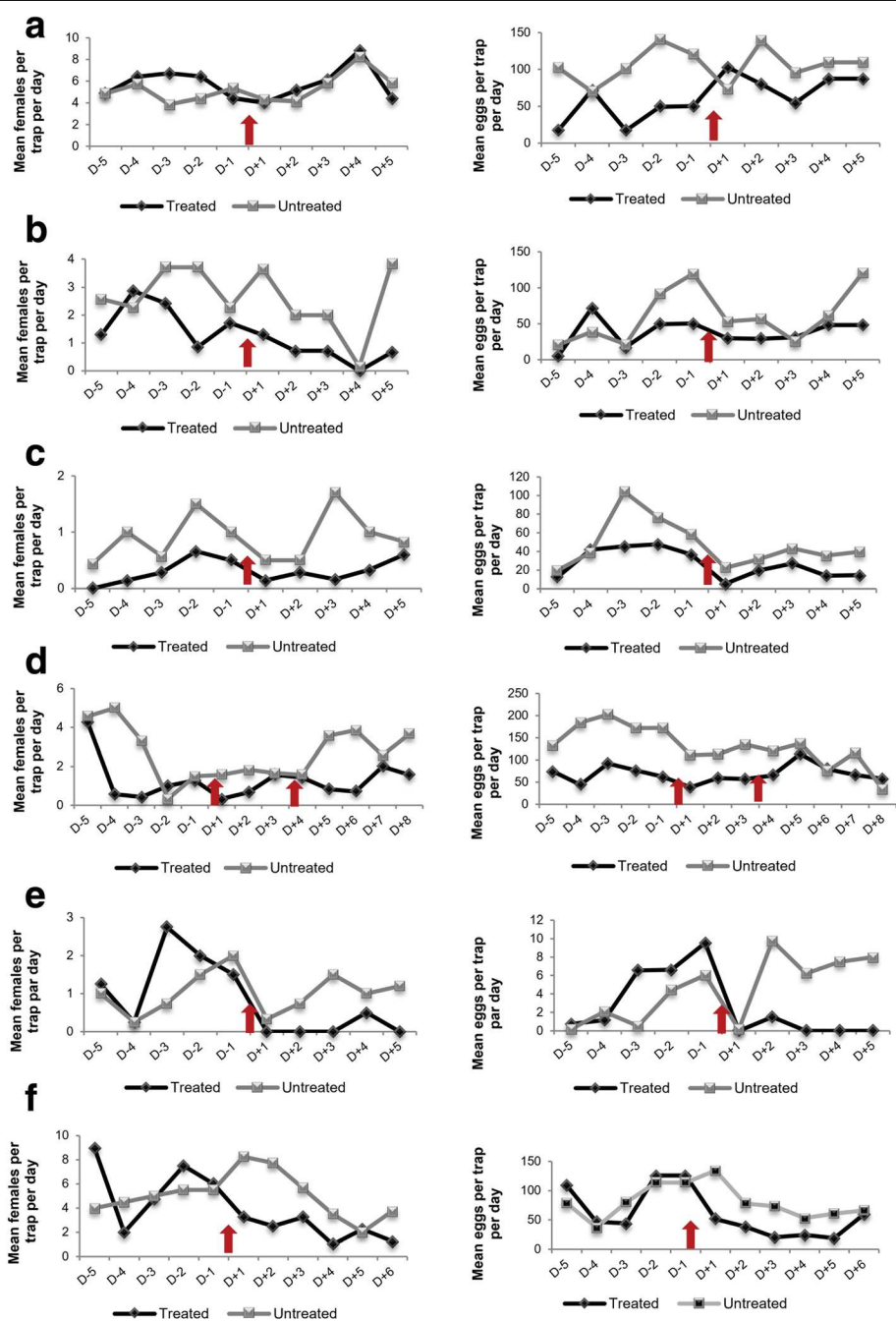


Fig. 5 Daily number of captures of females and eggs before and after the ULV treatment (a–d) and thermal fogging treatment (e, f)

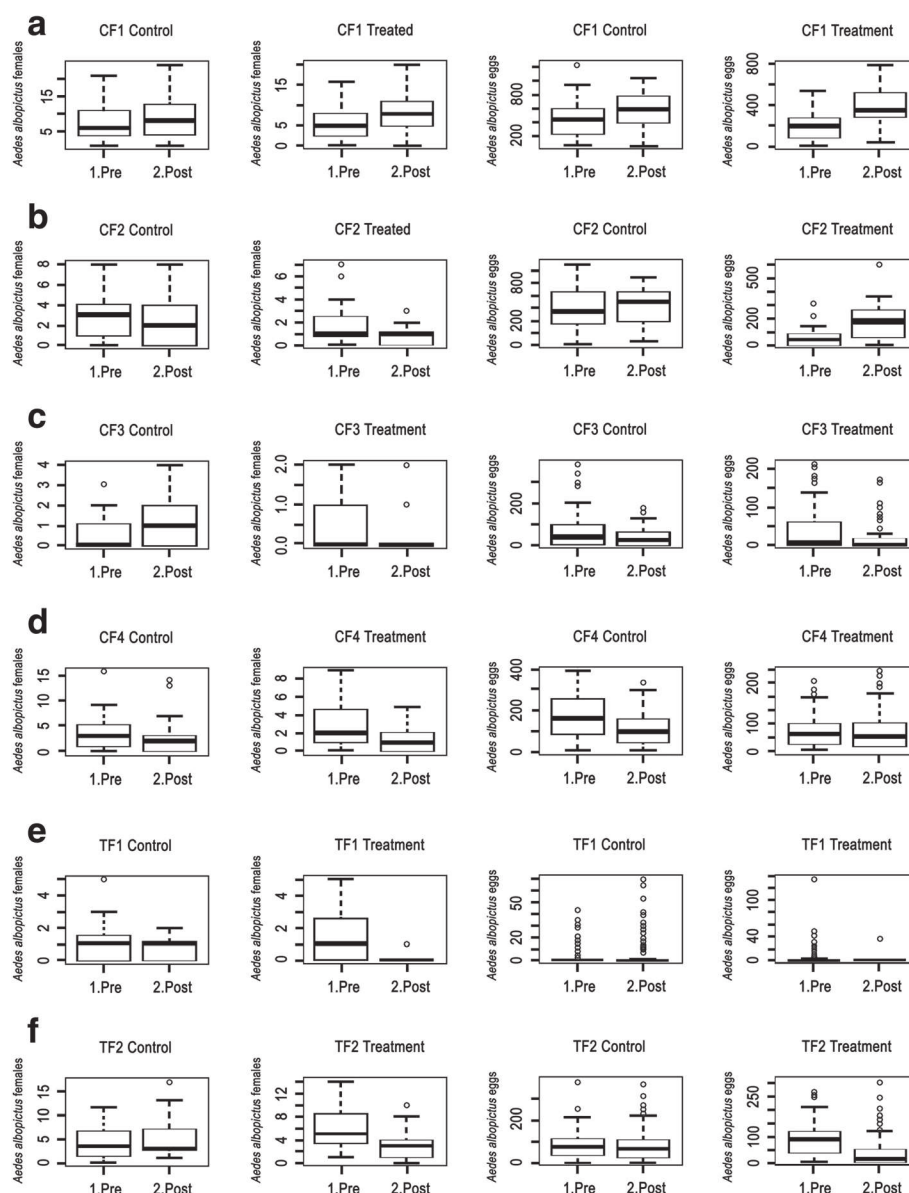


Fig. 6 Results of the GLM binomial analysis of the influence of ULV treatment (a–d) and thermal fogging treatment (e, f) on the daily number of captures of wild females and eggs

Discussion

In contrast to previous evaluations, nearly all of which have relied on the mortality of caged mosquitoes, we assessed the impact of treatments by monitoring the wild mosquito population on a daily (24-h) basis. As reported in other temperate regions [21–23], the local strain of *Ae. albopictus* was fully susceptible to deltamethrin. The lack of impact that we observed was in line with results obtained by a similar approach (ovitraps and back-pack aspirators) against *Ae. aegypti* in Puerto Rico, Jamaica and Venezuela [12] and in Panama [24].

Our results were disappointing because we had supposed that *Ae. albopictus* would be more vulnerable than

Ae. aegypti because of its markedly exophilic behaviour [25]. We suggest that the lack of efficacy was simply due to lack of interaction between aerosol particles and the mosquitoes: the mosquito favors resting sites, particularly vegetation, that are devoid of air movement but the insecticide particles depend on the nuances of air movement to deliver them to the mosquito. Indeed in nearly every country, *Ae. albopictus* is common in suburban and rural situations where important vegetation is available [25]. In densely crowded urban areas which lack vegetation and outdoor breeding sites, *Ae. albopictus* may be rare or absent [26]. Using a hot-wire anemometer, we observed at least a ten-fold reduction in air

movement in the interior of bushes that were abundant in the study area and it was clear that there are many sites (e.g. the leeward side of trunks, branches, leaves, crevices and other hollow structures) where mosquitoes can shelter with minimal exposure to air currents.

Apart from the lack of delivery to resting sites, there are clearly other limitations to the efficacy of ULV, particularly in urban areas, where walls, buildings and other structures obstruct the drift of particles [27]. In this context, the term “space spray” is appropriate because much of the aerosol drifts through open spaces, around or over obstacles. Moreover, mortality in a cage has little relation to mortality of resting or even free-flying mosquitoes, particularly at sites in vegetation where mosquitoes are likely to rest; in studies of the control of *Ae. aegypti* in Venezuela, mortality was more than 90% in caged mosquitoes set in the open but close to zero at typical indoor resting sites [12]. Similarly, Mount et al. [28] reported 90% mortality of caged mosquitoes in an open field but 34–67% in vegetation and Andis et al. [29] observed 95.5% mortality in caged *Ae. aegypti* suspended in the open vs. 49% in more sheltered locations. Moreover, Bengoa et al. [30] evaluated the efficacy of the ULV truck-mounted vehicle and obtained nearly 100% mortality in caged mosquitoes of *Ae. albopictus* in an open area but stated that this impact would be lower in wild uncaged mosquitoes resting within vegetation.

Logistically, ULV should be the control method of choice: a single vehicle with a driver and an operator can cover 50–80 ha in about three hours, dependent on the layout of roads and ease of access [26]. However, there is no documented evidence that ULV treatments have ever had a discernible impact on transmission of dengue or chikungunya anywhere in the world; this is not surprising, given our results.

By contrast, in our small test of thermal fog, the aerosol was applied at close quarters to the presumed resting sites, directed by the operator and boosted by the physical thrust from the exhaust energy of the machine. Therefore, hand-held thermal fogging was highly effective, eliminating between 61 and 95% of females and eggs after a single treatment directly applied in the vegetation surrounding the treated houses. These results are broadly in accordance with those of Britch et al. [31] who evaluated the efficiency of truck mounted ULV and thermal fogger and found that there is 100-fold greater chance that a droplet will come in contact with a mosquito in the sentinel cage in a thermal fog application versus a ULV application.

Conclusions

We conclude that in the event of outbreaks of disease, truck-mounted ULV is unlikely to have significant impact on transmission but that, despite being highly

labor-intensive, thermal or ULV aerosols dispensed from portable sprayers are the method of choice. Clearly this is not practicable on any large scale but may be useful in the event of potential “hot-spots” of local transmission.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Route of the fogging at les Ambassades residence. (TIF 2329 kb)

Additional file 2: Figure S2. Route of the fogging at La Soubrane residence. (TIF 3141 kb)

Additional file 3: Figure S3. Route of the fogging at zone A, Les Terrasses de Saint Julien. (TIF 400 kb)

Additional file 4: Figure S4. Results of the GLMM binomial analysis of the influence of the treatments on parity rates of the natural population of *Aedes albopictus* in Nice. (TIF 5172 kb)

Additional file 5: Table S1. Biological interpretation of the variables and results of the GLMM analysis. We used the model with interactions to explain the effect of the treatment. (DOCX 11 kb)

Additional file 6: Table S2. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on egg abundance. The dependent variable is the abundance of eggs and the independent variable is pre-post treatment. (DOCX 15 kb)

Additional file 7: Table S3. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on female abundance. The dependent variable is the abundance of females and the independent variable pre-post treatment. (DOCX 15 kb)

Additional file 8: Table S4. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on parity rate. The dependent variable is parity rate and the independent variable pre-post treatment. (DOCX 15 kb)

Additional file 9: Table S5. Explained variance (deviance) for the results of the GLM analysis on the influence of treatment on the abundance of *Ae. albopictus* females and eggs. (DOCX 11 kb)

Acknowledgments

We would like to thank Thierry Baldet of IDRC/CRDI–Ottawa, Canada and Annelies Wilder-Smith of University of Umea, Umea, Sweden for useful discussions and advices for the work. Our thanks also to Xavier Allen of CIRAD, UMR15 CMAEE; INRA, Montpellier, France for providing blood for the mosquito rearing and Arnaud Cannet and Pascal Delaunay of Inserm U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, C3 M, Université de Nice-Sophia Antipolis for their technical help and all the staff of EID Méditerranée, Montpellier, France for their help in field trials.

Funding

The research was funded by the European Commission under the 7th Framework, Grant Agreement Number: 282589 [32].

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

SCB, PR, CL and DF designed the experimental scheme, DR, MR and SCB performed the statistical analysis, SCB, MR and FC evaluated the insecticidal susceptibility in the laboratory, SCB, RB, MR, CT, BC and RT carried out the field collections and ULV/thermal fogger spraying, SCB, PR, DF, CL and DR drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval

In France, authorization for insecticidal space sprays must be obtained at the national and local (prefectural) levels. At the national level we were granted authorization by the French Ministry of Social Affairs and Health for each of the two summers of the trials. These were listed as DGS/R11/2013/182 of April 30th, 2013 and DGS/R11/2014/136 of April 29th, 2014. (These update the guidelines related to implementation modalities of the anti-disseminating plan of chikungunya and dengue in Metropolitan France). At the local level, we were granted authorization by the Prefecture for the Department (County) of Alpes-Maritimes: decrees number 2013-339 of April 24th, 2013, and 2014-414 of May 22th, 2014. Furthermore, condominium boards as well as the residents of all the treated areas were duly informed at least one week before the insecticide space spraying. These rules govern the operations of EID Méditerranée, the sole mosquito-control agency authorized to respond to suspect cases of dengue and chikungunya in the French Mediterranean region. Our study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol of blood sampling from cattle was approved by the Committee on the Ethics Animal Experiments of the French Ministry of Higher Education and Research (permit number 12ANI01). Certificates of all the authorizations are available from the authors upon request.

Author details

¹EID Méditerranée, Montpellier, France. ²Service Eco-épidémiologie parasitaire, Institut Pasteur, Algiers, Algeria. ³UMR Mivegec, IRD, CNRS et Université de Montpellier, Montpellier, France. ⁴Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia. ⁵Unité Insectes et Maladies Infectieuses, Institut Pasteur, Paris, France.

Received: 3 August 2016 Accepted: 9 November 2016

Published online: 23 November 2016

References

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
- Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet*. 2015;386(9990):243–4.
- Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc*. 1998;14(3):340–3.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007;370(9602):1840–6.
- Septfons A, Noël H, Leparc-Goffart I, Giron S, Delisle E, Chappert JL, et al. Monitoring of chikungunya and dengue in metropolitan France. *Bull Epidemiol Hebd*. 2015;13–14:204–11.
- Delisle E, Rousseau C, Broche B, Leparc-Goffart I, L'Ambert G, Cochet A, et al. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Eurosurveillance*. 2015;20(17):30.
- Roiz D, Boussès P, Simard F, Paupy C, Fontenille D. Autochthonous Chikungunya transmission and extreme climate events in southern France. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003854.
- Schaffner F, Fontenille D, Mathis A. Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirois in Europe. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(11):1044.
- Diallo D, Sall AA, Diagne CT, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*. 2014;9:e109442.
- Wong PS, Li MZ, Chong CS, Ng LC, Tan CH. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2348.
- Bonds JAS. Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Med Vet Entomol*. 2012;26(2):121–30.
- Reiter P. Surveillance and Control of Dengue vectors. Chapter 25. In: Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. 2nd ed. Wallingford: CAB International; 2014.
- Newton EA, Reiter PA. Model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47(6):709–20.
- Reiter P, Amador MA, Colon N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusion for daily monitoring of *Ae. aegypti* populations. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991;7:52–5.
- World Health Organization. Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications. Geneva: WHO Pesticide Evaluation Scheme WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.2; 2009. p. 51.
- World Health Organization. Review of Dimilin® GR and DT, Vectobac® DT, Aqua K-Othrine®, Aqua Reslin Super®. Report of the ninth WHOPES working group meeting, 5–9 December 2005. Geneva: WHO Pesticide Evaluation Scheme, WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2; 2006. p. 48–62.
- World Health Organization. Space Spray Application of Insecticides for Vector and Public Health Pest Control: a Practitioner's Guide. Geneva: WHO Pesticide Evaluation Scheme, WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5; 2003. p. 43.
- R Core team. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
- Zuur AF, Leno EN, Elphick CS, Zuur AF, Leno EN, Elphick CS. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Meth Ecol Evol*. 2010;1:3–14.
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MH, White JS. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol*. 2009;24(3):127–35.
- Romi R, Toma L, Severini F, Di Luca M. Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticides. *J Am Mosq Control Assoc*. 2003;19(4):419–23.
- Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS One*. 2014;9(7):e101992.
- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol*. 2012;104:126–31.
- Perich MJ, Davila G, Turner A, Garcia A, Nelson M. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *J Med Entomol*. 2000;37:541–6.
- Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc Suppl*. 1988;1:1–39. Review.
- Rudnick A, Hammon WMD. Newly recognized *Aedes aegypti* problems in Manila and Bangkok. *Mosq News*. 1960;20:247–9.
- Reiter P, Nathan M. Guidelines for Assessing the Efficacy of Insecticidal Space Sprays for Control of the Dengue Vector *Aedes aegypti*. Geneva: World Health Organization; 2001.
- Mount GA. A critical review of ultralow-volume aerosols of insecticide applied with vehicle-mounted generators for adult mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc*. 1998;14:305–34.
- Andis MD, Sackett SR, Carroll MK, Bordes ES. Strategies for the emergency control of arboviral epidemics in New Orleans. *J Am Mosq Control Assoc*. 1987;3(2):125–30.
- Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain. *J Am Mosq Control Assoc*. 2014;30(1):42–50.
- Britch SC, Linthicum KJ, Wynn WW, Walker TW, Farooq M, Smith VL, et al. Evaluation of ULV and thermal fog mosquito control applications in temperate and desert environments. *J Am Mosq Control Assoc*. 2010;26(2):183–97.
- Wilder-Smith A, Renhorn KE, Tissera H, Abu Bakar S, Alphey L, Kittayapong P, et al. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. *Glob Health Action*. 2012;22(5):17273.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Supporting information



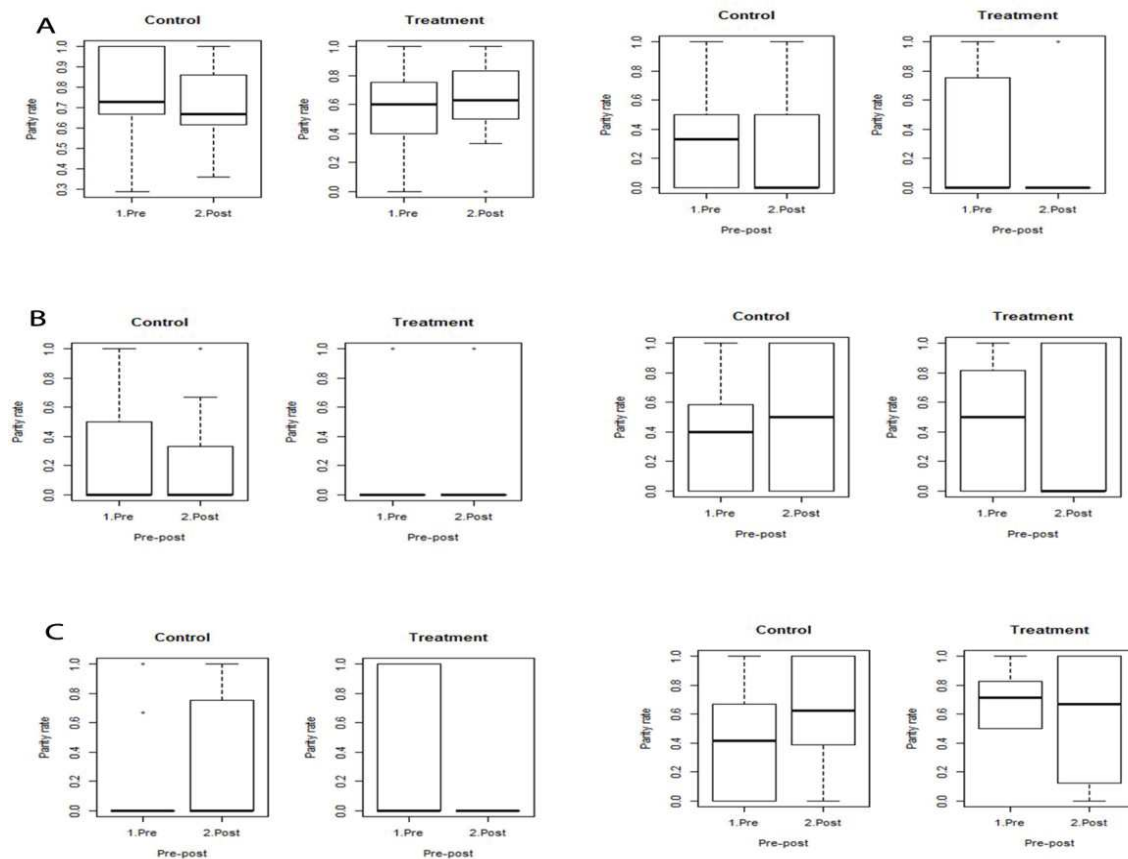
S1 Fig. Route of the fogging at les Ambassades residence.



S2 Fig. Route of the fogging at La Soubrane residence.



S3 Fig. Route of the fogging at zone A, Les Terrasses de Saint Julien.



S4 Figure : Results of the GLMM binomial analysis of the influence of the treatments on the parity rates of the natural population of *Aedes albopictus* in Nice.

S5 Table : Biological interpretation of the variables and results of the GLMM Analysis.

We used the model with interactions to explain the effect of the treatment.

"Treatment*Pre/Post"		"Treatment"		"Pre/Post"	
"Treatment*Pre/Post" > 0 and p < 0.05: there is more mosquitoes after the treatment than before in the treated area, and therefore, the treatment is not effective.	"Treatment*Pre/Post" < 0 and p < 0.05: there is less mosquitoes after the treatment than before in the treated area, and therefore, the treatment is effective.	"Treatment" > 0 and p < 0.05: the treated area has more mosquitoes than the control area.	"Treatment" < 0 and p < 0.05: the treated area has less abundance than the control area.	"Pre/Post" > 0 and p < 0.05: the "Post" area has more abundance than the "Pre" area.	"Pre/Post" < 0 and p < 0.05: the "Pre" area has more abundance than the "Post" area.

S6 Table. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on egg's abundance.

The dependent variable is the abundance of eggs and the independent variable is pre-post treatment.

Spraying method	Test	Variables	Estimate	Standard error	Z value	p
Cold fogging	CF1	Intercept	6.161	0.133	46.41	< 2e-16
		Treatment	-0.865	0.178	-4.86	1.1e-06
		Pre/post	0.190	0.177	1.07	0.282
		Treatment*Pre/Post	0.471	0.249	1.89	0.058
	CF2	Intercept	5.6776	0.2087	27.21	< 2e-16
		Treatment	-1.4922	0.2959	-5.04	4.6e-07
		Pre/post	0.0831	0.2951	0.28	0.778
		Treatment*Pre/Post	0.9600	0.4180	2.30	0.022
	CF3	Intercept	4.089	0.207	19.76	< 2e-16
		Treatment	-0.477	0.293	-1.63	0.10
		Pre/post	-0.555	0.295	-1.88	0.06
		Treatment*Pre/Post	-0.270	0.415	-0.65	0.52
	CF4	Intercept	5.151	0.095	54.24	< 2e-16
		Treatment	-0.912	0.135	-6.75	1.5e-11
		Pre/post	-0.493	0.121	-4.08	4.6e-05
		Treatment*Pre/Post	0.458	0.172	2.66	0.0077
Thermal Fogging	TF1	Intercept	0.468	0.566	0.83	0.41
		Treatment	0.858	0.580	1.48	0.14
		Pre/post	0.511	0.549	0.93	0.35
		Treatment*Pre/Post	-5.768	1.051	-5.49	4.1e-08
	TF2	Intercept	4.4093	0.1223	36.05	< 2e-16
		Treatment	0.0805	0.1552	0.52	0.60
		Pre/post	-0.0855	0.1478	-0.58	0.56
		Treatment*Pre/Post	-0.9015	0.2100	-4.29	1.8e-05

S7 Table: Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on female's abundance.

The dependent variable is the abundance of females and the independent variable pre-post treatment.

Spraying method	Test	Variables	Estimate	Standard error	Z value	p
Cold fogging	CF1	Intercept	2.068	0.115	18.02	<2e-16
		Treatment	-0.367	0.178	-2.07	0.039
		Pre/post	0.110	0.159	0.69	0.489
		Treatment*Pre/Post	0.306	0.236	1.30	0.195
	CF2	Intercept	1.038	0.153	6.79	1.1e-11
		Treatment	-0.440	0.203	-2.17	0.030
		Pre/post	-0.230	0.195	-1.18	0.240
		Treatment*Pre/Post	-0.764	0.336	-2.27	0.023
	CF3	Intercept	0.0724	0.3035	0.24	0.8113
		Treatment	-1.0666	0.3914	-2.73	0.0064
		Pre/post	0.0466	0.2949	0.16	0.8745
		Treatment*Pre/Post	-0.0464	0.5668	-0.08	0.9347
	CF4	Intercept	1.286	0.196	6.57	4.9e-11
		Treatment	-0.266	0.228	-1.17	0.243
		Pre/post	-0.336	0.213	-1.58	0.114
		Treatment*Pre/Post	-0.519	0.312	-1.66	0.096
Thermal Fogging	TF1	Intercept	0.178	0.375	0.47	0.6349
		Treatment	0.360	0.321	1.12	0.2621
		Pre/post	-0.221	0.379	-0.58	0.5602
		Treatment*Pre/Post	-2.484	0.830	-2.99	0.0028
	TF2	Intercept	1.399	0.211	6.62	3.7e-11
		Treatment	0.369	0.226	1.63	0.1022
		Pre/post	0.191	0.219	0.87	0.3831
		Treatment*Pre/Post	-0.917	0.317	-2.89	0.0038

S8 Table. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the treatment on parity rate's abundance.

The dependent variable is parity rate and the independent variable pre-post treatment.

Spraying method	Test	Variables	Estimate	Standard error	Z value	p
Cold fogging	CF1	Intercept	-0.2732	0.1998	-1.37	0.17
		Treatment	-0.3343	0.3120	-1.07	0.28
		Pre/post	-0.0576	0.2824	-0.20	0.84
		Treatment*Pre/Post	0.2398	0.4269	0.56	0.57
	CF2	Intercept	-1.10876	0.29438	-3.77	0.00017
		Treatment	-0.00431	0.41677	-0.01	0.99175
		Pre/post	-0.28237	0.45271	-0.62	0.53281
		Treatment*Pre/Post	-2.13091	1.13670	-1.87	0.06084
	CF3	Intercept	-1.4879	0.3814	-3.90	9.6e-05
		Treatment	-0.2215	0.5485	-0.40	0.69
		Pre/post	-0.0658	0.5440	-0.12	0.90
		Treatment*Pre/Post	-0.5671	0.8934	-0.63	0.53
	CF4	Intercept	-0.983	0.294	-3.35	0.00082
		Treatment	0.186	0.387	0.48	0.63127
		Pre/post	0.305	0.352	0.87	0.38700
		Treatment*Pre/Post	-0.503	0.489	-1.03	0.30329
Thermal Fogging	TF1	Intercept	-1.963	0.612	-3.21	0.0013
		Treatment	1.047	0.707	1.48	0.1387
		Pre/post	0.724	0.746	0.97	0.3322
		Treatment*Pre/Post	-18.475	2594.700	-0.01	0.9943
	TF2	Intercept	-0.870	0.346	-2.52	0.012
		Treatment	0.532	0.440	1.21	0.226
		Pre/post	0.380	0.436	0.87	0.383
		Treatment*Pre/Post	-0.589	0.583	-1.01	0.312

S9 Table. Explained variance (deviance) for the results of the GLM analysis on the influence of treatment on *Ae. albopictus* femaleS and egg abundance.

Test	Explained variance for females	Explained variance for eggs
CF1 ^a	6.13%	22.7%
CF2	19.35%	19.5%
CF3	12.2%	3.7%
CF4	11.8%	9.42%
TF1 ^b	25.9%	11.3%
TF2	10.3%	6.9%

^a CF: Cold Fogging; ^b TF: Thermal Fogging

Discussion Article 2

Les pulvérisations spatiales d'insecticides sont largement utilisées pour le contrôle des moustiques. Il est généralement admis que les moustiques doivent être en vol pour entrer en contact avec suffisamment de particules pour obtenir un effet létal. Il est donc nécessaire de faire en sorte d'amener le maximum de gouttelettes insecticides dans le milieu où évolue le moustique (Bonds *et al.*, 2012). Une autre condition de base pour le succès des méthodes de contrôle chimique est la sensibilité du moustique ciblé vis-à-vis de l'insecticide utilisé. Les résultats ont démontré que les populations locales d'*Ae. albopictus* étaient très sensibles à la deltaméthrine ce qui montre par conséquent que cet insecticide reste encore un outil efficace pour le contrôle d'*Ae. albopictus*.

A la différence d'*Ae. aegypti* qui a développé une résistance importantes aux pyréthrinoïdes, *Ae. albopictus* a subi peut-être une pression insecticide moins importante du fait que la souche invasive des zones tempérée n'est active que la moitié de l'année.

Le défi majeur des méthodes de traitement par pulvérisation spatiale est de faire en sorte que le maximum de gouttelettes d'insecticide entre en contact avec les insectes cibles. Dans notre cas, cette tâche était difficile à réaliser en raison de la configuration du terrain, très végétalisé, dans lequel évolue le moustique tigre.

Nos résultats montrent que les méthodes de nébulisation à froid n'ont eu aucun effet significatif sur les densités des œufs et des adultes d'*Ae. albopictus*, en dépit de l'optimisation des paramètres qui influencent l'efficacité de ce genre de méthode, tels que la dose appliquée, l'heure de la pulvérisation et la configuration du réseau routier depuis lequel l'insecticide est délivré. Comme déjà évoqué, la principale difficulté avec ce type d'application UBV depuis la voirie est de faire en sorte que les gouttelettes pulvérisées atteignent les moustiques qui se trouvent préférentiellement dans la végétation et à l'intérieur des jardins (Hawley, 1988 ; Delatte *et al.*, 2010). Etant un moustique diurne, *Ae. albopictus* a besoin d'être protégé contre la dessiccation par la lumière du soleil et donc de s'abriter dans un milieu ombragé et humide comme celui se trouvant à l'intérieur de la végétation. Ces obstacles sont le principal problème dans les méthodes de pulvérisation spatiale (Reiter & Nathan, 2001) en raison notamment de la distance entre le point d'émission des gouttelettes et la cible proprement dite. Plus la distance est importante et plus le nombre des gouttelettes sera dilué, exposé à l'évaporation et intercepté par des obstacles empêchant leur contact avec le moustique (Reiter *et al.*, 2014).

Le manque d'efficacité observé dans notre étude correspond aux résultats obtenus par une approche similaire concernant *Ae. aegypti* à Puerto Rico, à la Jamaïque et au Venezuela (Reiter *et al.*, 2014) et au Panama (Perich *et al.*, 2000). Ces résultats négatifs étaient inattendus, vu le comportement exophile d'*Ae. albopictus* et la vulnérabilité attendue d'un tel comportement.

Par contre, la thermonébulisation a donné d'excellents résultats, sur une plus petite échelle, en éliminant entre 61 et 95 % des femelles et des œufs après un seul traitement. Les thermonébulisateurs portables ont permis d'appliquer le nuage insecticide au plus près de la végétation (à quelques centimètres). Nos résultats sont conformes à ceux de Britch *et al.* (2010). Malgré le fait que cette méthode est laborieuse, dépendante de l'accès aux propriétés et que plusieurs opérateurs sont nécessaires pour le traitement, elle semble être en effet la meilleure méthode de contrôle d'*Ae. albopictus* dans des situations épidémiques.

Outre son efficacité, nous avons pu mieux caractériser le biotope du moustique tigre. Ce dernier a une nette préférence pour la végétation très proche des habitations, lui assurant à la fois une protection, un accès aux gîtes de ponte et une source de sang pour sa reproduction.

Un autre paramètre primordial à prendre en compte est la distance de dispersion du moustique tigre afin de définir le périmètre adéquat pour le traitement insecticide (Bonds, 2012).

Les maladies transmises par *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* sont de plus en plus fréquentes et causent des épidémies de forte ampleur. Le virus Zika ne fait que commencer à se répandre dans les Amériques et pourrait devenir endémique dans certaines régions d'une manière très rapide (Ayres, 2016). Ces événements sont des sonnettes d'alarme et font prendre conscience de l'urgente nécessité de trouver des méthodes de lutte plus efficaces et appropriées. En tout état de cause, la thermonébulisation semble pouvoir être rangée parmi celles-là.

Chapitre V

Evaluation de nouvelles méthodes de lutte : les pièges pondoirs létaux

Introduction Article 3

Depuis la résurgence mondiale de la dengue dans les années 1960, c'est plus d'un tiers de la population mondiale qui vit dorénavant dans les zones endémiques de cette maladie. Le chikungunya, un autre arbovirus transmis essentiellement par *Ae. albopictus*, qui était jusqu'à récemment confiné à l'Afrique sub-saharienne et à l'Asie du Sud-est, s'est récemment propagé à plusieurs pays européens et dans les Amériques, soulevant des inquiétudes sur le risque d'une possible dissémination à de nombreux autres pays dans le monde (Achee *et al.*, 2015). Le virus Zika est également en expansion et en situation de pandémie ces dernières années (Musso *et al.*, 2014).

En l'absence d'une vaccination efficace, seule la lutte insecticide, visant à réduire, à défaut de les supprimer, la densité des populations de moustiques vecteurs, permet d'agir sur la transmission de ces maladies. Toutefois, les outils actuellement disponibles pour contrôler les principaux vecteurs de la dengue et le chikungunya restent insuffisants. Le contrôle antilarvaire est très laborieux, sinon vain, à cause du nombre, de la localisation et de la petite taille des gîtes larvaires (Caputo *et al.*, 2012). La lutte contre les adultes par pulvérisation spatiale UBV d'insecticides a également montré des faiblesses face à des moustiques qui sont le plus souvent séquestrés dans leur micro-habitat.

La méthode des pièges pondoires létaux (PPL) pourrait palier à ces lacunes. Attirer et tuer les moustiques femelles en s'appuyant sur leur besoin biologique de pondre leurs œufs, par l'intermédiaire des PPL ou des pièges pondoires collants, est une stratégie prometteuse car sélective et non polluante pour l'environnement. Les femelles *Ae. albopictus* ainsi que celles d'*Ae. aegypti* ont la particularité de pondre leurs œufs, issus d'un même cycle gonotrophique, d'une façon séquentielle et dans plusieurs gîtes différents, en partie à cause de la petite taille des gîtes potentiels et par conséquent de la limitation de la quantité de nutriments disponibles et du risque d'assèchement de ces derniers. Ce comportement de ponte est appelé «*skip oviposition*». Cette méthode a été testée pour la première fois sur *Ae. aegypti* dans les années 1970's (Lok *et al.*, 1977). Les premières tentatives au Brésil (Perich *et al.*, 2003) et en Thaïlande (Sithiprasasna *et al.*, 2003) ont démontré une réduction du nombre d'adultes et des effectifs larvaires d'*Ae. aegypti*, sans pour autant avoir permis d'atteindre l'objectif de l'élimination de cette espèce.

D'autres variantes des PPL, comme la méthode d'autodissémination de pyriproxifène, ont été développées. Cette méthode exploite également ce comportement particulier du *skip oviposition* en utilisant des femelles qui s'imprègnent de pyriproxifène lors de leurs pontes dans les stations de contamination et qui vont le disséminer dans plusieurs gîtes naturels causant ainsi la mort des larves qui s'y développent (Itoh et al, 1994).

Ae. albopictus a toujours été considéré comme un vecteur secondaire (Lambrechts *et al.*, 2010). En conséquence, la plupart des recherches sur les différentes méthodes de lutte ont été réalisées sur *Ae. aegypti*. Ces deux moustiques sont cependant très proches de par leur biologie et leur comportement (Reiter, 2014). Nous nous sommes dès lors basés sur les études de PPL qui avaient pour modèle *Ae. aegypti*.

L'éradication d'*Ae. aegypti* dans les Amériques en 1962 par l'organisation panaméricaine de la santé (PAHO) reste le meilleur exemple à ce jour d'une opération réussie de contrôle de ce redoutable vecteur. En effet, cette organisation a déclaré qu'*Ae. aegypti* a été éradiqué de 22 pays dans les Amériques (PAHO, 1974). Cette remarquable réalisation est exceptionnelle. Elle a été obtenue par application "périfocale" du DDT. Cet insecticide a été épandu au niveau des gîtes infestés et 50-100 cm autour de ces derniers. Il est inconcevable que tous les gîtes aient été localisés et traités. L'explication la plus probable est que du fait du comportement de *skip oviposition*, les chances pour les femelles, en quête de lieux de ponte, de rencontrer des gîtes traités étaient importantes. Néanmoins, dès que la campagne d'éradication prit fin en 1964, la vitesse de réinfestation a été spectaculaire.

Nous nous sommes proposé d'exploiter ce trait biologique du comportement de ponte des femelles *Ae. albopictus* pour développer des pièges pondoires létaux. Le fait d'utiliser des gîtes artificiels attractifs, sous forme de pièges pondoires, auxquelles est ajouté un insecticide persistant pourrait aboutir à un effet similaire à celui obtenu lors de la campagne d'éradication d'*Ae. aegypti* dans les Amériques en 1962. Des pondoires de couleur noir ont été enduits sur leur face interne de peintures contenant une formulation insecticide issue de la technologie de microencapsulation développée par la société Inesfly Corporation SL (Valencia, Espagne). Cette technologie permet non seulement d'augmenter la rémanence de l'insecticide mais lui confère également une protection contre la dégradation due aux rayons ultraviolets du soleil.

Nous avons testé cinq produits Inesfly en respectant les trois phases habituellement utilisées pour l'évaluation des insecticides, à savoir la phase I au laboratoire, la phase II en conditions semi-réelles contrôlées et la phase III, en conditions réelles sur le terrain.

Le produit ayant engendré le plus de mortalité en phases I et II a été sélectionné pour la phase III sur le terrain. Cette dernière a été réalisée selon deux approches différentes.

Evaluation of insecticidal paints and coatings applied to ovitraps for control of *Aedes albopictus* in Nice, France

Boubidi SC et al.

Abstract

Introduction: *Aedes albopictus* is a major nuisance species in the south of France and the vector of sporadic autochthonous cases of dengue and chikungunya. Current methods of control appear ineffective so there is an urgent need for new and innovative approaches. We report exploratory studies on the efficacy of three residual formulations of Inesfly marketed as microencapsulated insecticidal paints and coatings, and two experimental formulations of microencapsulated insecticidal coatings.

Methods: We used standard WHO cone-tests to assess the effect of residual treatments on different surfaces (porous and non-porous) and their persistence after one year. We also compared the 24-hour mortality of mosquitoes in two 16 m² rooms: four oviposition jars containing a small amount of hay infusion were set out in each room. The inner surface of the jars in one room was coated with formulation while those in the other room served as an untreated control.

Results: 24h-mortality by the WHO tests was 100% for all five formulations after 30 minutes of tarsal exposure. In the room tests, there was 100% mortality with a paint and a (resin) coating with Chlorpyrifos (1.5%) + diazinon (1.5%) + pyriproxyfen (0.063%) as active ingredients but none with a paint containing Bendiocarb. Two other (resins) coatings, one containing Deltamethrin (0.5%) + pyriproxyfen (0.063%), the other alphacypermethrin (0.7%) + d-allethrin (1.0%) + pyriproxyfen (0.063%) were less effective, perhaps due to repellence by the pyrethroids.

Conclusions: The formulations tested are intended for of malaria control by Indoor Residual application. In many settings, this strategy may prove too intrusive for the control of the exophilic *Aedes albopictus* but treatment of selected sites, particularly in outdoor resting sites, deserves consideration.

Key words: *Aedes albopictus*, Lethal Ovitrap, microencapsulation, control, France.

Introduction

Over the last decades, tropical and temperate regions witnessed a dramatic increase in the geographical range of *Aedes albopictus* and associated disease transmitted. For example, in the last 50 years the worldwide incidence of dengue transmitted by both *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* has increased 30-fold (1).

Aedes albopictus is currently the most effective vector of arboviruses such as dengue, Chikungunya and Zika. Recent estimates mentioned that approximately 390 million people are infected by dengue each year and 96 million manifests with clinically apparent disease (2).

In the absence of a vaccine, vector control is the only option to suppress risk of transmission. Insecticidal aerosols dispensed from hand-held thermal-foggers or vehicle-mounted cold-foggers are widely used to counter populations of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*, and are frequently the method of choice during public health emergencies in order to rapidly limit adult mosquito production in the affected areas (3). However, these methods are highly polluting and non-selective causing high mortality to non-targeted insects like bees, beetle, and several pollinators. Long-term, sustainable, residual and selective methods are badly needed to monitor densities of this kind of highly efficient vectors.

Lethal Ovitrap technique (LOs) is a method of choice that exploits the natural behavior trait of this kind of mosquito that called: “skip oviposition”. There can be little doubt that this “skip oviposition” is a strategy to avoid overcrowding in sites where larval nutrition is limited (4, 5). In Samoa, an average of 20.5 (range, 8.3–37.3) eggs were deposited at a time (6). In Puerto Rico, of 1000 positive ovitraps baited with a hay infusion (7), more traps received one egg per 24-hour period than any other number (34/1000), and 140 contained 10 eggs or less (7). The phenomenon of modulation of the number of laid eggs is well documented for butterflies (8,9,10) and other insects. Several kinds of LOs were developed like Sticky gravid traps (11,12) or insecticide treated ovitraps (13,14) with moderately success in controlling *Ae. aegypti* development. The key of the success of such methods is the non-repellent long lasting lethal effect of attractive ovitraps. In the aim of developing efficient LOs, we evaluate five products (two paints and three coatings) issued from Inesfly insecticide’s microencapsulation technology, where active ingredients reside within Ca CO₃ + resin microcapsules. The formulation allows a gradual release of active ingredients, increasing its durability. Furthermore acute inhalation toxicity studies classified this paint as Category III (according to WHO) and category IV (according to EPA) - no warning label required in either case (15). The same paint has been evaluated under experimental conditions against *Triatoma infestans*, a main vector of Chagas disease in Argentina (16) and Bolivia (17). Furthermore, residual efficacy of over 12 months of organophosphate based Inesfly paint was observed on different kind of surfaces even against resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (18,19).

Our study was constructed following three phases: Phase I: to assess the efficacy of each product on *Ae. albopictus* females and larvae we used WHO cone test and larval bioassays respectively. The most efficient product was evaluated for residual effect at T0, T24 and T48 months. Phase II: the second step of our evaluation was the 24 hour-mortality assessment of coated black ovitraps against gravid females in “semi-field” tests conditions. Phase III: the product yielded to the best lethal effect was evaluated in the field with two approaches: 1) LOs were placed inside the vegetation of private garden of houses and 2) LOs were set up in the external side in a residential area and at the vicinity of human habitations. As a new potential tool for mosquito control implementation we report this first explanatory study on LOs treated with long lasting microencapsulated insecticides. Consequences on pathogen transmission are discussed.

Material and Methods

Mosquitoes

Adult *Ae. albopictus* were obtained by rearing eggs collected in ovitraps baited with 7 day-old hay infusion (20). Larva—200 per litre—were fed ‘Tetramin’ fish food (Tetramin Tropical Flakes-Spectrum Brands, Inc). F₀ females were fed on cattle blood through a pig intestine membrane with the Hemotek membrane feeding system (Hemotek®). A 10 % honey solution was available at all times except for 24 hours before the blood meal. 3-5 day-old F₁ females were used in all assays.

Phase I: laboratory evaluation

We used standard WHO cone-test to assess the mortality of residual treatments with Inesfly coatings and paints applied on plastic plates against females *Ae. albopictus*. Five products issued from the Inesfly microencapsulation technology were evaluated:

- OP-IGR paint: Chlorpyrifos 1.5%, diazinon 1.5% and pyriproxyfen 0.063%.
- OP-IGR coating: Chlorpyrifos 1.5%, diazinon 1.5% and pyriproxyfen 0.063%.
- Pyrethroids-IGR coating I: Alphacypermethrin 0.7%, d-allethrin 1.0% and pyriproxyfen 0.063%.
- Pyrethroids-IGR coating II: Deltamethrin 0.5% and pyriproxyfen 0.063%.
- Bendiocarb-IGR coating: Bendiocarb 1 % and pyriproxyfen 0.063%.

For the evaluation of the 5 products, 60 F₂ females 2-5 d-old blood unfed (15 in each cone) were exposed to 22 cm x 22 cm plastic plates painted with one of each formulation at 1kg/6m² and to plastic plates painted with corresponding coating without insecticide as a control as described by Mosqueira et al (2010) (18).

After a 30-minute exposure, mosquitoes were introduced in 150-ml plastic cups provided with honey-juice. Females were left at a temperature of 27 ± 1°C and a relative humidity of 80%, for 24-hour delayed mortality assessments.

Pyriproxyfen (IGR) was added to the all products for the lethal effect against larvae that are susceptible to hatch in the water especially by other mosquitoes like *Culex*. sp.

The lethal effect of each of the 5 products was also evaluated against larvae. For each product four 150 ml cups were painted at the whole inner surface with the dose of 1 kg/6 m² and two cups were painted with the corresponding coating without insecticide as a control. Cups were half-filled with dechlorinated water and 50-L4 *Ae. albopictus* larvae were added. Mortality was recorded 24 hours after exposure.

Phase II: evaluation in semi-realistic conditions

Lethal ovitraps design

The LOs used were modified regarding to those proposed by (21) and Perich et al. (2003). Three letters capacity polyethylene black buckets (top diameter: 17.1 cm, bottom diameter: 14 cm and height: 17.3 cm) were perforated at 11 cm from the bottom at two sides of the bucket to avoid as possible the contact with water in the case of an overflow caused by rainfall (**Figure: 1**). In order to increase the persistence of the lethal effect of the LOs, the inner surface of the buckets was painted with two layers of 167g /m² of the OP-IGR Inesfly black paint. This dosage, when applied to inner walls of dwellings, led to a good persistence and high mortality over 1 year against *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* as evaluated by Mosqueira et al (2010) (18,19,22).

Paint or coatings were applied undiluted with a regular brush and left to dry for 48 hours. After that, a second layer was applied to increase the persistence of the paint in field conditions. Buckets coating was performed two weeks before their placement in the field in order to get rid of the odor that may have a repellent effect on the gravid females.

Experimental evaluation of LOs

F1 mosquitos' larvae with a concentration of 200 larvae/l were reared in insectary at 26°C and 60% relative humidity, with a 12-hour light/dark cycle. 2-5 d-old females were allowed to feed on cattle blood for 30 min trough a pig intestine membrane used with a hemotek membrane feeding system. Approximately 500 engorged females were selected and isolated in 30 cm x 30 cm cage and were fed with 10 % of honey solution during 4 days for developing their eggs. Two hermetic 16 m² rooms were used for these trials; the ground was covered with 1mx1m white sheets of paper to facilitate the counting of dead mosquitoes. The same conditions of temperature and humidity as the insectary were provided. Four treated buckets were set up in the treated room and were half-filled with 10% of 7 d-old hay infusion. The inner surface of the buckets in the test room was coated with insecticidal formulation while those in the other room served as an untreated control. Each of the five products was tested. 24 h after releasing in the rooms, dead mosquitoes were counted each day during 3 days. If the mortality is upper than 90 % in 3 replicates, the product is therefore considered efficient.



Figure 1: description of the Lethal Ovitrap. (Photo Boubidi SC).

For the most efficient product we have evaluated the mortality caused by a decreasing number of LOs (4/4, 3/4, 2/4, 1/4) in presence of an increasing number of standard ovitraps with hay infusion; the competitiveness of the LOs must be high to maximize the impact of the mortality among natural breeding sites. The effect on males was also evaluated. Each experiment was performed in 3 replicates.

We also compared the 24-hour mortality of mosquitoes in a 16 m² room: four oviposition polyethylene buckets containing a small amount (10%) of hay infusion were set out in each room (**Figure: 2**).

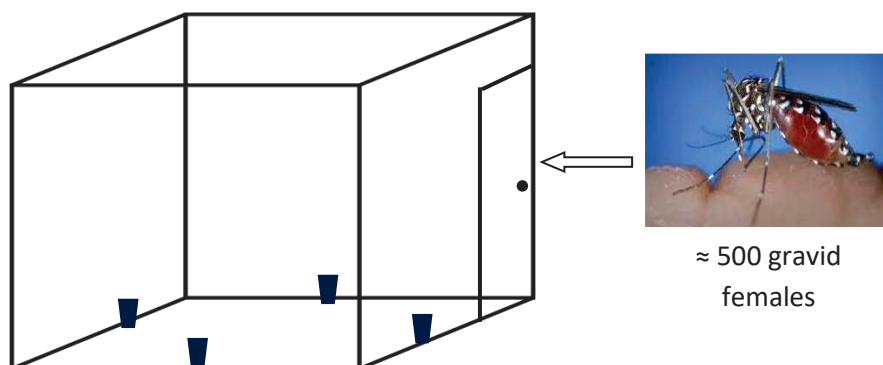


Figure 2: Schematic description of the Phase II room experiment.

The product that caused the higher mortality in a shorter lap of time was selected to the field evaluation against wild *Ae. albopictus*.

Persistence of lethality

Two kinds of surfaces, porous (cement) and non-porous (plastic), were coated with the most efficient paint to study its residual activity.

There were two treated and two controls for each kind of surface. The first treated surface was painted with one layer at the dose of 1 kg/6 m² (manufacturer's recommended dose to leave surfaces completely

black). However for the second one an under layer of the control paint was applied in the aim to avoid the lack of persistence due to porosity. For each kind of surface, one control was left untreated and the other one was painted at 1 kg/6 m² with the same paint but without the insecticides and the IGR. Paint was applied undiluted with a regular brush and left to dry for 48 hours. Tests were done at T0, T 12 month and T 24 month. When not tested, surfaces were stored in aluminum foil at a temperature of 27 ± 1°C and a relative humidity of 80%.

The persistence of lethal effect of the selected product was evaluated using the WHO cone tests with the same protocol described previously.

Phase III: field evaluations

The study was conducted from Jun to Octonbre 2015 and consisted of the following activities: 1) A pre-intervention or baseline study (4 wk from Jun to July 2015) to compare *Ae. albopictus* densities between areas and to a allow comparisons within areas before and after interventions; and 2) post-intervention follow-up assessment of *Ae. albopictus* density in both study areas (weekly from august to october 2015).

Lethal ovitraps were evaluated in the field according to two different approaches:

1) LOs were placed in the vegetation of common spaces between houses inside a private residence “Vaugrenier Residence” in the commune of Villeneuve-Loubet (43.633569, 7.117930) in the department (= county) of Alpes-Maritimes, southeast France. A second residence “Les Ambassades” (43.639315, 7.123745) in the same residential area, about 500m from the other site, was used as an untreated control (**Figure: 3**). Twenty standard ovitraps were placed in the treated and untreated residences for the monitoring of mosquitoes densities.

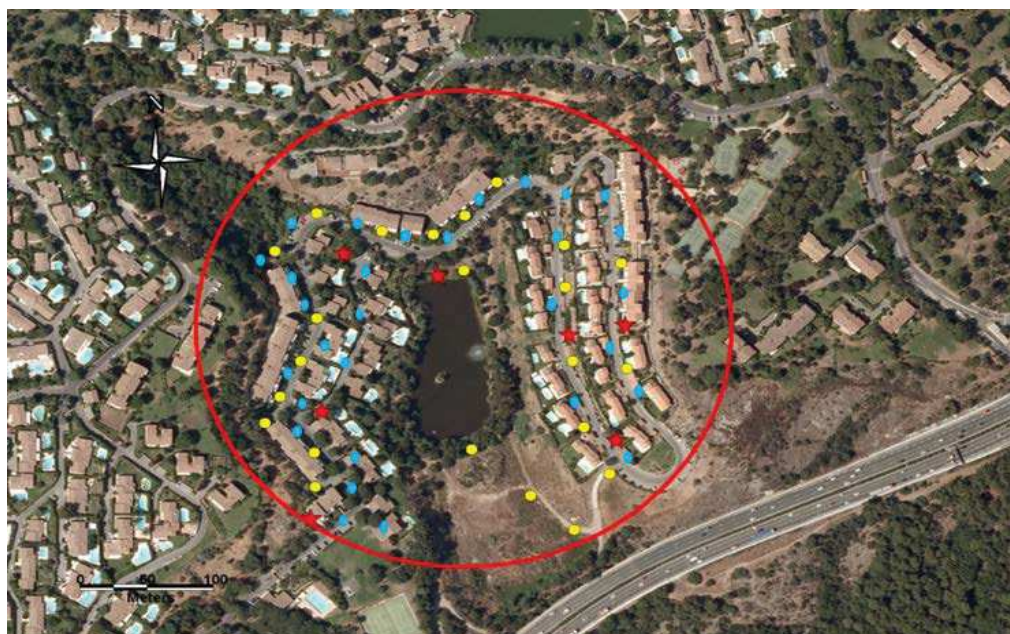


Figure 3: Approach I site, Vaugrenier Residence, Villeneuve Loubet, Nice; Blue dots: LOs; Yellow dots ovitraps; Red stars: BGs adults traps

2) With the second approach, LOs were set up inside the garden of four private houses isolated by vegetation and located in the same department at Saint-Julien neighborhood (43.645598, 7.092182). The

control site includes the same number of grouped and isolated houses located at approx. 300 m from the treated site (43.644260, 7.091146) (**Figure:4**).

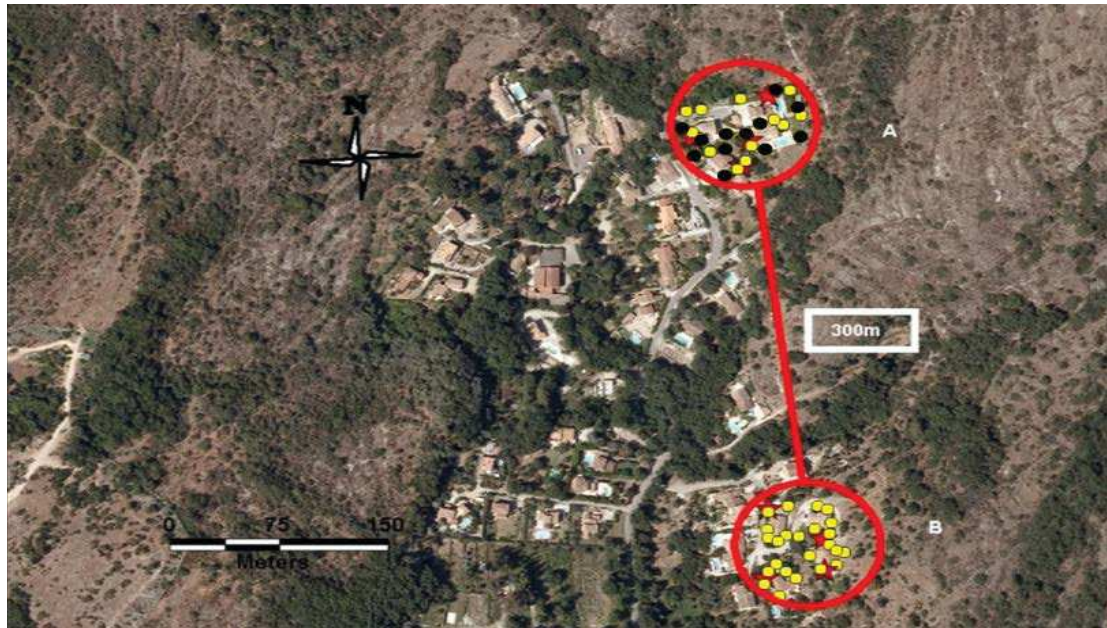


Figure 4: Approach II site, Chemin de Saint Jumien, Biot, Nice; Black dots: LOs; Yellow dots ovitraps; Red stars: BGs adults traps;

Surveillance before placement of Lethal Ovitrap

The survey of densities of adults and eggs were performed 4 weeks before the placement of the lethal ovitraps. The impact of each treatment was assessed by weekly collections with two devices: adult traps baited with an attractant marketed by the manufacturer (BG-Sentinel® traps, BioGents, Regensburg, Germany) and infusion-baited ovitraps (20) lined with germination paper (Anchor Paper Co., Minneapolis, Minnesota). Collections were made every day twice a week for BG-Sentinel and once a week for the ovitraps.

For the approach, I. 5 BG-Sentinel® traps and 20 standard ovitraps were deployed in the (pre)treatment and in the control (untreated) areas.

Trials were on a much smaller scale for the approach II, with 1 BG-Sentinel® trap and 4 ovitraps in each of the four private houses in the (pre)treatment and the control clusters.

Surveillance postplacement of Lethal Ovitrap

After one month of surveillance, 32 LOs were placed close to the vegetation 20 meters apart from each other as described above and checked ones a week in the first approach.

Concerning the second approach, three LOs were set up with the same manner inside the gardens of each of the four houses in the treated area.

Hay infusion water was changed every week in both LOs and standard ovitraps to keep a good attractiveness of those breeding sites and to avoid an accumulative deposition of residuals, which possibly can be released from the painted LOs into the hay infusion and alter the water attractiveness.

The same trapping methods of adults and larvae were carried out as done during the before placement phase. Adult mosquitoes were sorted by species and sex, and enumerated. Collected eggs were counted.

Statistical analysis

Mortality caused by all paints and coating were analysed using ANOVA test. Comparisons of mortalities caused by treated and non-treated surfaces were performed using student T test. Kruskal-Wallis test were also used. p -values > 0.05 were considered non-significant. Statistical analyses were conducted in IBM SPSS Statistics Software v.21 (IBM Corporation, Armonk, NY).

Field results were analyzed after developing a protocol for data exploration (23), a Generalized Linear Mixed Model (GLMM) was applied with negative binomial distribution or zero-inflated negative binomial (as the data were over-dispersed) using the glmm ADMB package (24). The response variables were *Ae. albopictus* female and egg abundance. Explanatory variables are Control/Treatment and Pre/Post treatment and the interaction of both, while random variable was trap. Significant values were corrected by False Discovery Rate. Statistical analysis was performed in R version 2.14.2 (25). The interpretation of the used variables in our statistical analysis is summarized in S1 Table.

Results

Phase I

Only two among the five tested products (OP-IGR paint, OP-IGR coating) led to 100 % Delayed 24-hour mortality when exposed to plastic coated surface (compared to control $p < 10^{-5}$) for F2 *Ae. albopictus* females. Both coatings with pyrethroids performed less optimally against females *Ae. albopictus* 40% ($p:0,012$) and 41,6% ($p:0,002$) for Pyrethroids-IGR coating I and II respectively despite the highest coating dosage (1 kg/6m²) used by (18).

Control paint of bendiocarb based paint led to 100 % of mortality after 30 min of forced contact using the WHO cones and then, the test was considered unusable.

Delayed 24-hour mortality of exposed larvae to the 5 product was 100 %. Unfortunately, control paint of the bendiocarb-based paint led to 100% of mortality after 24 hour of contact with the water filled in the plastic cups painted with bendiocarb control paint (without insecticide). Results of forced contact with this product were also unusable. The matrix of this product, which is confidential by the manufacturer (Inesfly), seems to be composed with material that has caused the mortality of adults and larvae of *Ae. albopictus* despite the total absence of insecticide.

Phase II

Lethal ovitraps (LOs) were designed in the aim of the control of gravid females and then the most probably infected old females. Before the evaluation in the field of the painted ovitraps, we performed the assessment of the mortality of these devices in semi-realistic conditions (16 m² room).

The OP-IGR painted LOs gave the best results after 3 replicates (94-99%/24h) ($p < 10^{-5}$).

OP-IGR coated LOs and Pyrethroids-IGR coating II LOs also led to a high mortality (71-98%/24h) ($p < 10^{-5}$). While Pyrethroids-IGR coating I LOs (4-35%/24h) ($p: 0,11$) and Bendiocarb-IGR coating LOs (3.5-36%/24h) ($p: 0,710$) were inefficient (Figure: 5).

To evaluate the competitiveness of the most efficient LOs towards standard ovitraps we have estimated the lethality of a decreased number of the OP-IGR paint LOs in the presence of an increased number of standard ovitraps. All ovitraps were filled at $\frac{3}{4}$ with 7 days-old hay infusion (Figure: 6).

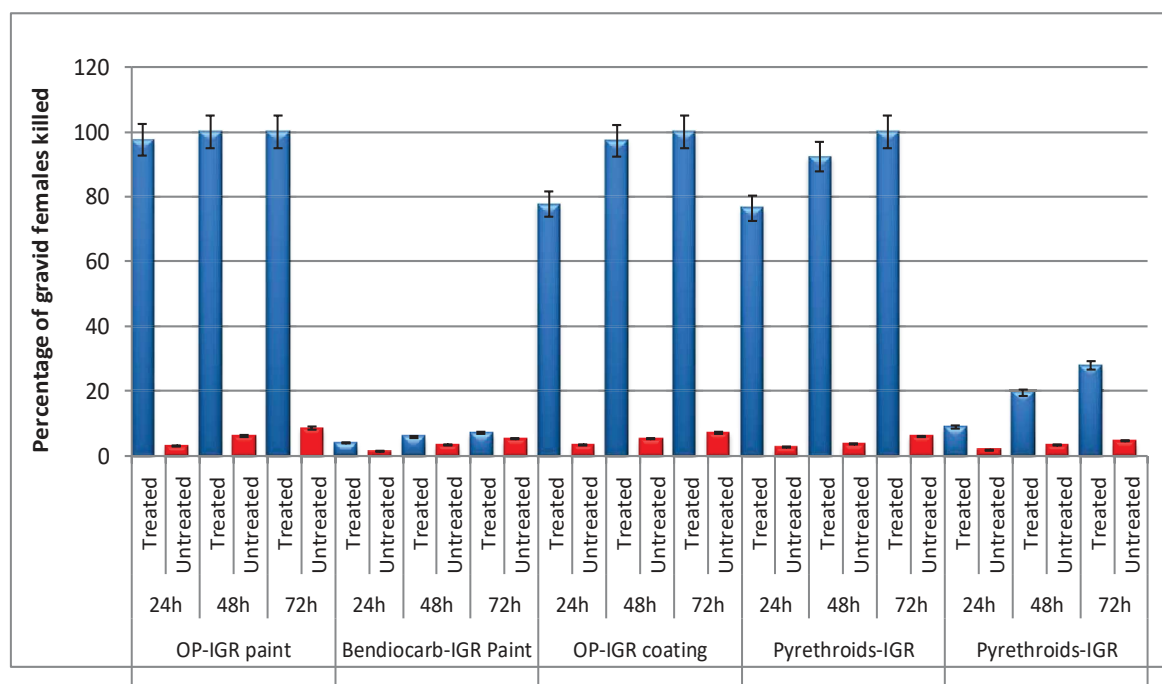


Figure 5 : Mortality (%) with treated (blue bars) and untreated (red bars) ovitraps.

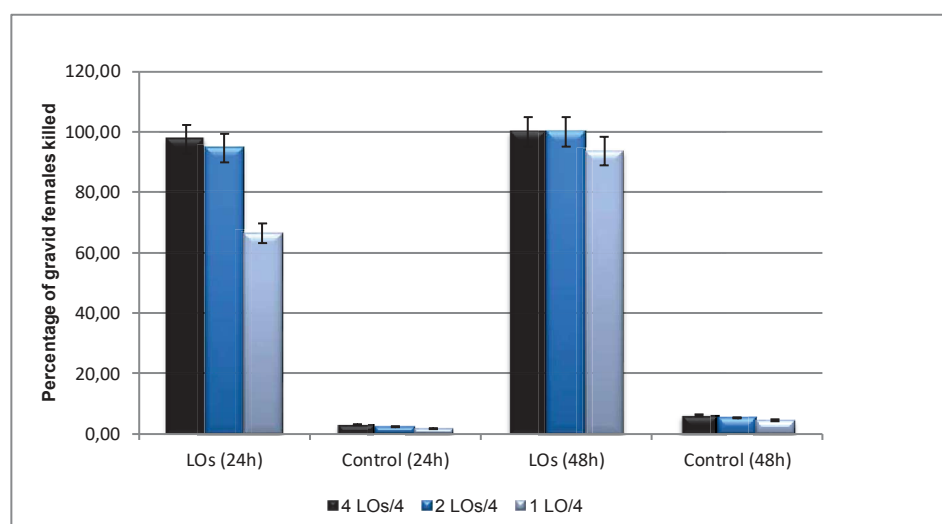


Figure 6: Mortality of gravid females of *Aedes albopictus* according to decreasing number of OP based LOs.

The combination 4 LOs /1 ovitrap (OT) and 2 LOs/2 OT killed 97,52 % and 94,48 % of gravid females respectively and had virtually the same efficiency ($p < 10^{-5}$). However the combination: 1 LOs/3 OT was less efficient and led to the mortality of 66,3 % ($p: 0,007$).

Knowing that the males *Ae. albopictus* are attracted by hosts and breeding sites _to encounter females to mate with_ we estimated the lethality of the OP-IGR paint LOs against them.

The presence of 4 LOs in the room killed 76.41 % of males in 24 h (3 replicates) ($p < 10^{-3}$).

(18) shows that the OP-IGR paint used on walls inside houses led to a good lethality against *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* even at a distance of 1 m. Therefore we designed an experiment to estimate this effect against *Ae. albopictus* gravid females.

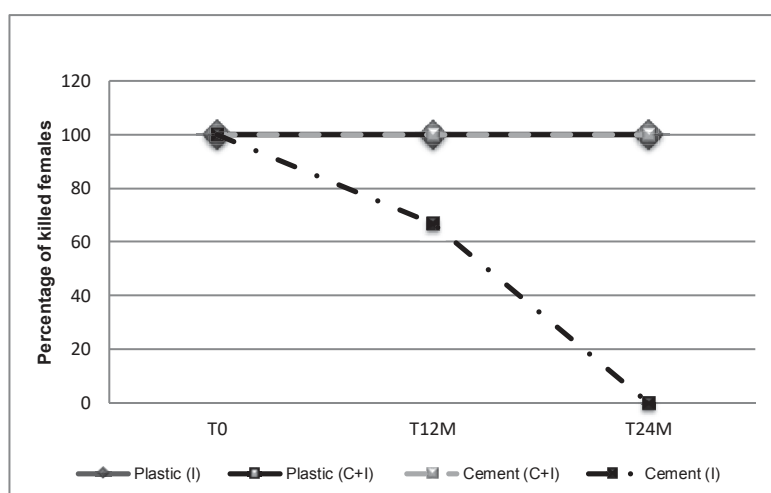


Figure 7 : Residual effects. Paint applied directly to cement had poor persistence (black line) but when a primer was applied (black paint without insecticide) there was still 100% kill after 2 years. No primer was required on plastic.

Four OP-based paint LOs were placed inside cages covered with mosquito net mesh to avoid the contact with gravid females. After 24 hour of exposition (3 replicates), 19,4 % of gravid females were killed (p: 0,390) (**Figure: 7**).

Persistence of the product that gives the higher mortality was estimated at T0, T12 months and T24 months. Delayed 24-hour mortality at T0 was 100% ($p < 10^{-5}$) for both surfaces porous and non-porous and for the two ways of application. Twelve months later (T12) OP-IGR paint applied on cement with one layer showed a decrease in the lethal effect on females *Ae. albopictus* (compared to T0, $p < 10^{-3}$). Delayed 24-hour mortality at T24 was 100% plastic surfaces and cement with an under-layer of control paint application, however cement plates treated without the under-layer control paint became completely unlethal (0%/ 24h) ($p < 10^{-3}$).

Phase III

OP-based paint was estimated as the best product with good and rapid lethality effect expressed in phase I and II.

Lethal ovitraps evaluated during phase II were used in the field as a control method against wild *Ae. albopictus* populations.

The GLMM analysis showed (S2 Tables) that the densities of adults and eggs were not significantly different between study areas at both approaches I and II before the placement of LOs. The variable “Treatment” is positive or negative but it is not significant in both study sites (tableau interpretation des GLMM).

Thirty-two LOs placed in the vegetation outside houses at residence Vaugrenier Présidence were not efficient for reducing the number of collected eggs or adults *Ae. albopictus* (**Figure: 8**). In the same line the three LOs set up inside gardens of each of the four houses have not led to the decrease of wild *Ae. albopictus* (**Figure: 9**).

Therefore, in both approaches the variable interaction “Treatment*Pre/Post” is negative and not significant for all of the cases (GLMM analysis, S2 Tables).

The lack of efficacy of the LOs may be attributable to the degradation of the embedded insecticides in the used OP-based paint when exposed to the environmental factors like sunlight and rainfall. Therefore we evaluate in laboratory the lethality of 5 randomly chosen LOs one month after placement in the field. Sixty 3-5 days-old F2 females were introduced inside each of the 5 LOs issued from the field after covering them with mosquito net mesh. One black bucket with the same size but without insecticidal paint received 60 females and served as control.

After 5 minutes of exposition 100 % of mosquitoes were killed. Delayed mortality were assessed after the transfer of mosquitoes in 50 ml plastic cups covered with mosquito mesh net and supplemented with honey (10%) solution. After 24 hours of the 5 min of exposition 100 % of the females still died confirming that there was no degradation of the OP- based paint in the field and the LOs remains efficient.

Approach I

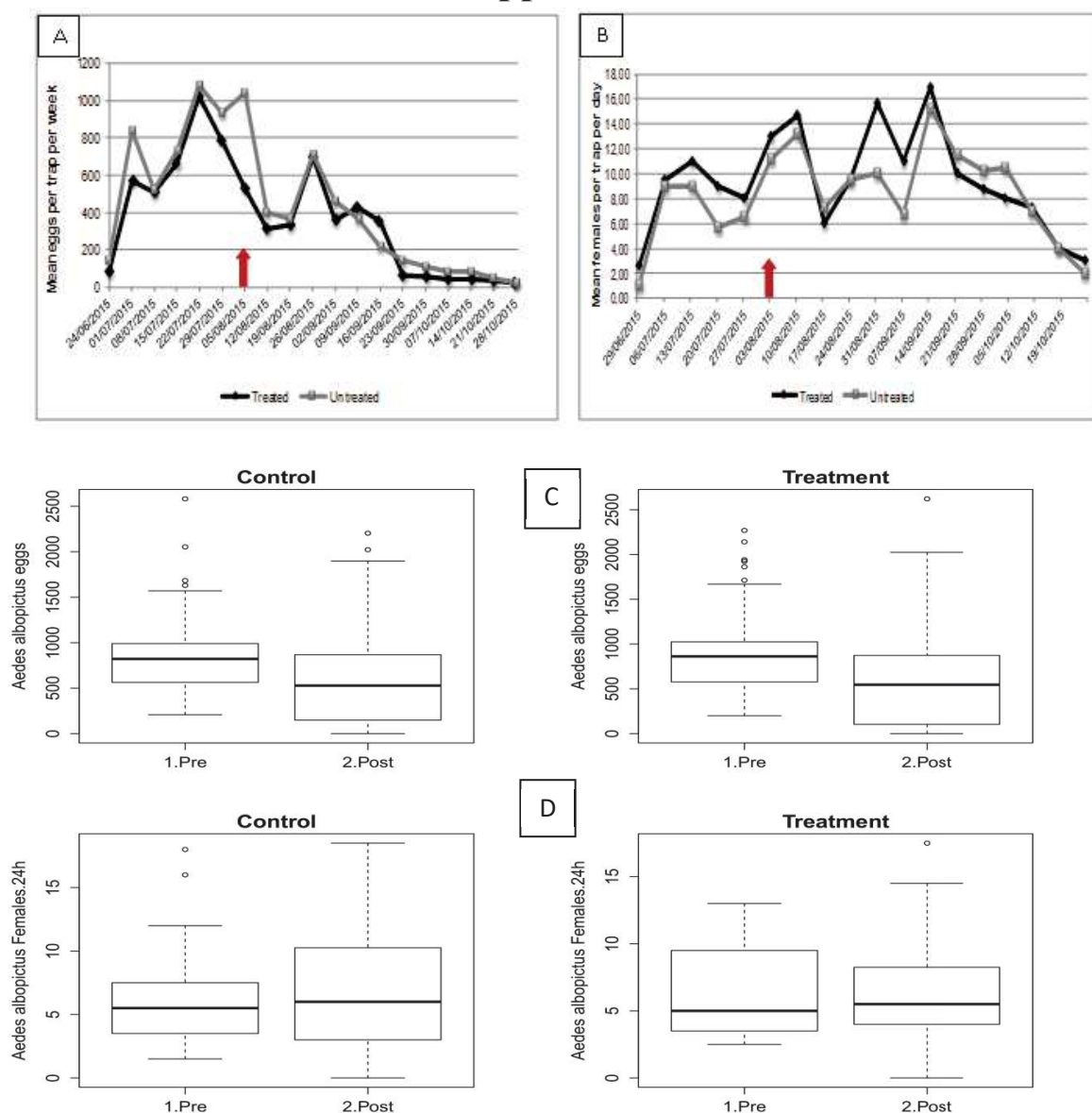


Figure 8. Results of monitoring of eggs (A) and females (B) before and after the placement of the LOs in approach I sites and GLMM binomial analysis of the abundance of eggs (C) and females (D).

Approach II

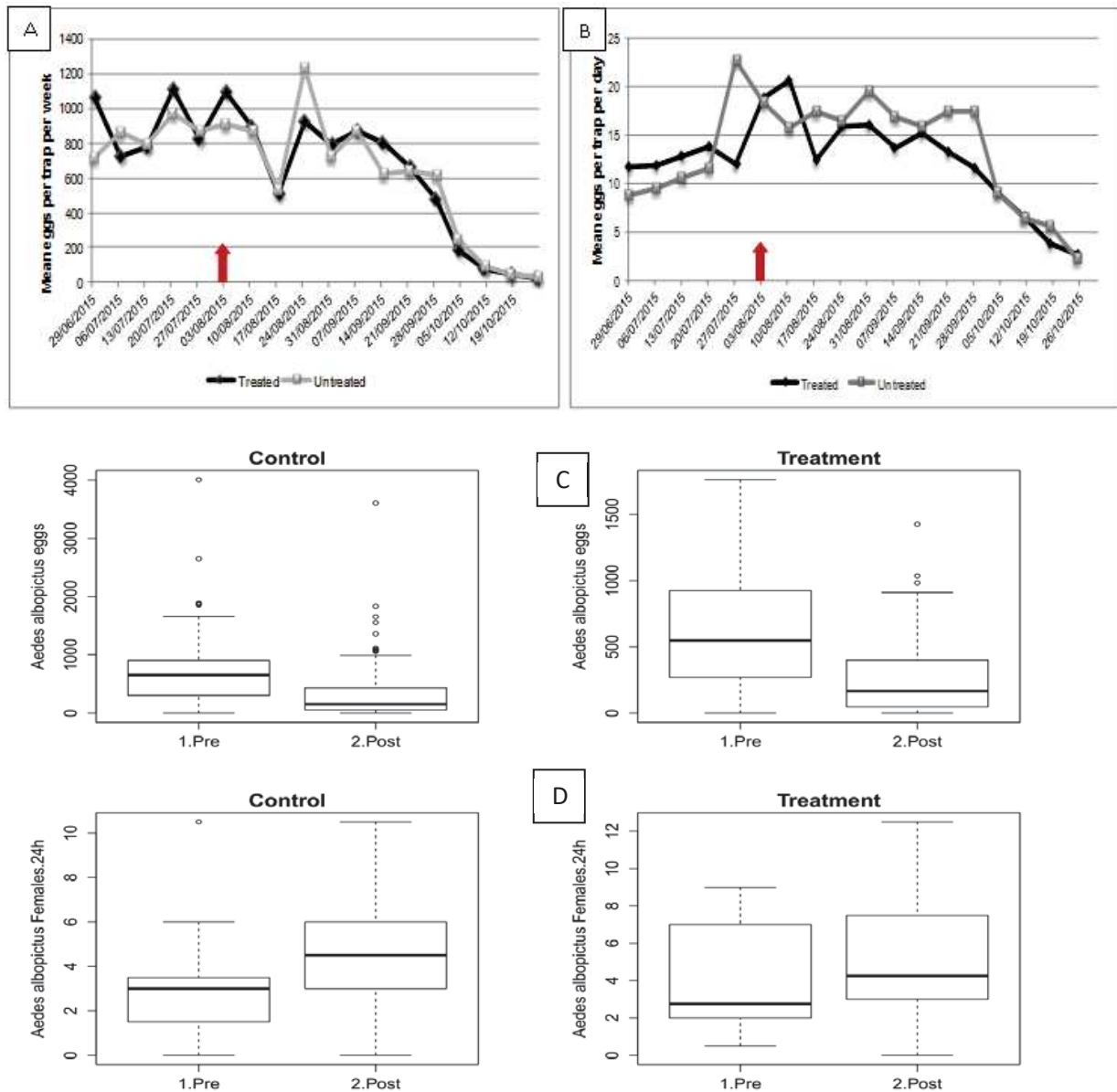


Figure 9. Results of monitoring of eggs (A) and females (B) before and after the placement of the LOs in approach II sites and GLMM binomial analysis of the abundance of eggs (C) and females (D).

Discussion

The development of the lethal ovitraps tool for controlling mosquitoes may be enhanced by the design of microencapsulated technologies that leads to an efficient, long-term lethal and environmental-resistant product. Indore application of one of our evaluated Inesfly products was studied to control Chagas disease vectors in Latin America (26,27) and pyrethroids resistant *An. gambiae* and *Cx. quinquefasciatus* in Burkina Faso (19). This product has shown promising efficacy with lethal effect beyond 12 months.

As an alternative to ULV treatments we made an exploratory study of the efficacy of 5 residual formulations of Inesfly®.

Phase I

All the five evaluated products led to 100% of mortality after 30 min of forced tarsal exposure of *Ae. albopictus* females using WHO cones bioassay. However, the control coating of Bendiocarb-IGR coating, which the composition is secret from the manufacturer Inesfly, was lethal against exposed females and repellent for gravid ones and therefore eliminated from further evaluations. Moreover, both Pyrethroids-IGR coatings expressed insufficient delayed mortality, after 24 hours from exposition, only 41.66% and 40 % of females respectively were killed. The low concentration of both products may explain the lack of their lethality. On the other hand, both OP-IGR products lead to the best efficiency with 100 % of mortality after 24 h from the exposition. Our results confirm findings of (18). Residual effect of OP-IGR paint, the more efficient product, was evaluated on two kind of surfaces, porous (plastic) and non-porous (cement) plates. At T0, after 30 minutes of tarsal exposition on both surfaces at a dosage of 1 kg/6m² killed all the females (100%). After one year, the plastic surface painted with one layer of OP-IGR paint and the second one with one layer of control paint leads to 100 % of mortality. However, cement plates with both applications produced 55% and 75% of mortality respectively. At T24 months the plastic surfaces still caused 100 % of mortality; contrariwise cement plates leads to 71.66% of females mortality when 2 layers were applied and 0% of mortality when only one layer was applied. Nearly the same results was found by (18), the porous surfaces have greater absorbance of painted substances in contrary the first layer of paint without insecticide reduces drastically such absorbance leading to a greater persistence of the insecticide, this effect of porosity was observed with DDT application that may last for six months on cement surfaces, though it usually leaves walls stained (28). The choice of these two kinds of surfaces was performed to evaluate the possible use of the insecticidal paints in some potential breeding sites like catch basins, flour soccer...etc. and for the development of long-term lethal ovitraps.

Phase II

As a bridge strategy we undertook the assessment of the lethality of painted ovitraps in semi realistic wide room before moving laboratory-based research into full field applications. Designed LOs were composed with black 3 l plastic buckets. Black colour was chosen because that for diurnally active artificial-container breeders such as *Aedes aegypti* (L.) and *Ae. albopictus* (Skuse), vision undoubtedly influences oviposition site selection; diurnally active mosquitoes are believed to have a better developed color sensitivity than crepuscular or nocturnally active species (29).

While *Ae. albopictus* is believed to have originated as a tree hole breeder from the tropical forests of Southeast Asia (30) and the selection of black ovitraps used to monitor populations was based on their preference to oviposit in small black or dark water-holding containers resembling tree holes or rock cavities (31).

The second important parameter is the attractiveness of the water inside the LOs. Females prefer water with abundant microfauna (Reiter et al. 1991), use of plant based infusions in ovitraps increases the number of eggs deposited (32–33).

Ponnusamy et al, (2015) (32) showed that volatile products of bacterial metabolism in canebrake bamboo leaf infusions were attractive to gravid females of both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Polson et al, (2002) (34) collected nearly 3-fold of eggs with ovitraps filled with hay infusion versus tap water.

Released gravid females into a 16 m² room was daily monitored to estimate the rate of their mortality without forced exposition to the insecticidal paints of the five laboratory evaluated products. The main condition of the success of this kind of LOs is to make sure those gravid females flights easily towards the lethal breeding sites, lands on it trying to lay their eggs and receive in the same time a lethal dose of insecticide.

Our results show that there is a different lethal effect of LOs coated with the five components which is mainly depending on the chemical class of the insecticides incorporated in the coatings and paints. Both

OP-IGR paint and coating leads to the best “score” of the 24-h mortality (~ 100%), however, we obtained different results among pyrethroids chemical class. Pyrethroids-IGR coating I coating gave a significantly higher lethality than the Pyrethroids-IGR coating I, these results was not expected because of known mosquito repellency of pyrethroids, Pyrethroid insecticides are currently recommended for mosquito net impregnation for malaria control because of their low toxicity for humans, rapidity of action (knock-down effect), and repellent and irritating properties against adult mosquitoes (35). Contrariwise, the repellent characteristic of organophosphates towards mosquitoes is not well documented. Darriet et al, (2005) (36) founds that chlorpyrifos-methyl treated net led to a moderate repellent effect against Kdr + *Anopheles gambiae*. Surprisingly the last tested component, Bendiocarb-IGR coating, showed virtually no mortality effect against gravid females. In addition of the high mortality caused by the control coating of this product while assessed by WHO cone bioassays, it seems to be repellent against gravid females. Knowing that bendiocarb have no repellent effect (37), the evaluation in laboratory of the repellency of all of control coatings proved that no eggs were laid by gravid females on seed paper coated with the control component intended to be mixed with the bendiocarb solution. Contrariwise more than a thousand eggs were laid on the other control coatings. Results gave us supplementary information about the non-suitability of this component for further evaluations.

Furthermore, Achee et al (2009) (37) performed an interesting characterization of the spatial repellent, contact irritant, and toxicant chemical actions of 14 compounds historically used for vector control. Among tested insecticides: DDT, alphacypermethrin, chlorpyrifos-methyl and bendiocarb were evaluated against *Ae. Aegypti* and the authors concluded to a repellent effect caused by only the DDT. In our Knowledge there is no study on the effect of insecticides treated surfaces on free gravid females. Scientists focused their attention only on the behavior of biting females when exposed to treated bed nets. Gravid females seeking suitable breeding sites for laying their eggs are stimulated by cues that differs completely then those used for seeking a host for a blood meal. Our results showed that the OP-based paint gave the most high and fast mortality (~ 100%) in the 24-h cycle evaluation. Knowing the nearly same attractiveness of males to hosts and breeding sites as females *Ae. albopictus* (31) we was curious to evaluate the effect of our best LO against males. The results were spectacular, 76,41% of males were killed in 24 hours confirming the attractiveness of males to a suitable breeding sites looking for females to mate with. The mortality was less than that for the females because of the particular behavior of males that flew for a long time close to the host or the breeding site seeking females by the detection of sound waves produced by their wings beating (38). In contrary, females looking for hosts or breeding sites land on them rapidly (39).

Phase III

The most efficient LOs treated with the OP-IGR paint black paint was evaluated in the field during the seasonal mosquito activity from June to October 2015.

Evaluations were carried out by two approaches; intrusive and non-intrusive, the main difference between both methods was the location of LOs.

Concerning the first approach, LOs (3/house) were setup in the vegetation of private gardens of the owners close to most important *Ae. albopictus* resting sites (31). This method has the advantage to minimize the distance between targeted mosquitoes and LOs, increasing the probability of exposition. The disadvantage of this method was the intrusion inside private properties which is highly difficult to setup in large scale conditions.

Second method was easier to achieve; all LOs (32/residence) were setup at the bottom of the vegetation located between houses at the external side. The maintenance of LOs was easier because of their accessibility without needing for the agreement of the inhabitants. The possible weak point of this method is that the LOs are not setup in the best resting site of mosquitoes and if suitable natural breeding sites are present inside private gardens they will be highly competitive with our LOs for targeted gravid females.

Prior the placement of the LOs in the field, Pre-treatment sampling was initiated 4 weeks at all treatment and control sites in the two study areas. One month after setting up of the LOs, neither eggs nor adult's densities, as determined by standard ovitraps and adult BGs traps respectively, were found to be significantly different between treatment and control sites at both studied areas. Intriguingly field results were completely different in comparison with Phase I and Phase II. The first explanation is may be that the number of LOs was not appropriate to lead to a good competitiveness with natural breeding sites. Perich et al, (2003) **(13)** placed 10 deltamethrin treated ovitraps (5 LOs inside houses and 5 LOs outside) for each of 30 houses in each of two Brazilian municipalities. They found that *Ae. aegypti* were significantly reduced in terms of the number of positive containers (4-5 vs. 10-18) and pupae/house (0.3-0.7 vs. 8-10) in treated vs. untreated houses, 3 months post treatment. Sithiprasasna et al. (2003) **(40)** evaluated a LO for the control of *Ae. Aegypti* in three villages in Ratchaburi Province, Thailand in 1999 and 2000. Using 10 LOs per house had no significant results in 1999; however the same authors found a significant decrease on *Ae. aegypti* population in 2000. For our opinion efficient LOs must reduce mosquitos' densities with little number (2 or 3 per house) using more than 5 LOs/house is hard to implement during operational applications.

The second explanation of the failure of our method is the possible repellency of the used OP-IGR paint. Even if organophosphates were evaluated as a non-repellent insecticide by Achee et al, (2009) **(37)** on non-gravid females of *Ae. aegypti*, the repellency of such chemical may occur on some physiological stages like gravid females seeking suitable breeding sites for their offspring. Moreover, Mosqueira et al, (2010) **(18)** using the same OP-based paint component (but colored white) found that the inside treatment of walls in Burkina Faso yielded to a high efficiency on *An. gambiae* and *Cx. quinquefasciatus* even at 1 m of distance from treated walls. During our investigations in semi-realistic conditions we evaluated the distance effect of the OP-based product and found that only 19,4 % of released gravid females were killed even if the 4 LOs were placed inside netting cages. This lethality is significantly lower than that obtained with free LOs (97,52%).

Further investigations should be followed for the improvement of such LOs to identify/develop the best microencapsulated component that confer durability of lethal action and resistance to the environment deterrent effects as sunlight and rainfall. In 1962, the Pan American Health Organization declared that *Ae. aegypti* had been eradicated from 22 countries in the Americas **(41)**. This remarkable achievement was obtained by "perifocal" application of DDT: insecticide was applied to infested containers and to surfaces 50–100 cm around those containers. It is inconceivable that every container in all these countries was located and treated. Instead, it is likely that skip oviposition insured a high probability that females would encounter a treated site **(20)**. We believe in such residual controlling method using authorized and suitable residual adulticides like microencapsulated ones because controlling the tiger mosquito by sources reduction and larvicid treatment is labor to achieve due to the great number of small potential breeding sites. Amaku et al, (2014) **(42)** performed a comparative analysis of the relative efficacy of vector-control strategies against dengue fever and conclude that of the available vector control strategies, adulticide application is the most effective, followed by the reduction of the exposure to mosquito bites, locating and destroying breeding places and, finally, larvicides.

Despite the negative results obtained, further trials must be continued with other insecticides. We must keep in mind the unique and spectacular success of the elimination of *Ae. aegypti* in the Americas the 1960's was mainly due to the "skip oviposition", this biological characteristic obliged the females to visit several breeding sites and then maximize the "chance" to encounter a treated one.

Supplementary information

S1 Table: Biological interpretation of the variables and results of the GLMM Analysis. We used the model with interactions to explain the effect of the treatment.

“Treatment*Pre/Post”		“Treatment”		“Pre/Post”	
“Treatment*Pre/Post” > 0 and $p < 0.05$: there is more mosquitoes after the treatment than before in the treated area, and therefore, the treatment is not effective.	“Treatment*Pre/Post” < 0 and $p < 0.05$: there is less mosquitoes after the treatment than before in the treated area, and therefore, the treatment is effective.	“Treatment” > 0 and $p < 0.05$: the treated area has more mosquitoes than the control area.	“Treatment” < 0 and $p < 0.05$: the treated area has less abundance than the control area.	“Pre/Post” > 0 and $p < 0.05$: the “Post” area has more abundance than the “Pre” area.	“Pre/Post” < 0 and $p < 0.05$: the “Pre” area has more abundance than the “Post” area.

APPROACH 1

Spraying method	Variables	Estimate	Standard error	Z value	Pr(> z)
Eggs	Intercept	6.7341	0.0866	77.75	< 2e-16 ***
	Treatment	0.0639	0.1225	0.52	0.60180
	Pre/post	-0.3675	0.1026	-3.58	0.00034 ***
	Treatment*Pre/Post	-0.0771	0.1449	-0.53	0.59459
Femals	Intercept	1.8524	0.1267	14.62	<2e-16 ***
	Treatment	-0.0162	0.1835	-0.09	0.93
	Pre/post	0.0454	0.1486	0.31	0.76
	Treatment*Pre/Post	-0.0610	0.2146	-0.28	0.78

APPROACH II

S2 Table. Results of the GLMM with negative binomial distribution analysis of the influence of the LOs on egg's and female's abundance in both approaches I and II. The dependent variables are the abundance of eggs and females, the independent variable is pre-post treatment.

Spraying method	Variables	Estimate	Standard error	Z value	Pr(> z)
Eggs	Intercept	6.5865	0.1075	61.26	< 2e-16 ***
	Treatment	-0.1418	0.1512	-0.94	0.35
	Pre/post	-0.7763	0.1320	-5.88	4.1e-09 ***
	Treatment*Pre/Post	-0.0667	0.1851	-0.36	0.72
Femals	Intercept	1.160	0.170	6.81	9.7e-12 ***
	Treatment	0.260	0.212	1.23	0.218
	Pre/post	0.348	0.175	1.98	0.047 *
	Treatment*Pre/Post	-0.155	0.241	-0.64	0.520

References

1. WHO TDR Global Alert and Repsonse Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever [webpage on the Internet] Geneva: World Health Organization (WHO); 2013. [cited March 3, 2013]. Available from:<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html>.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):504-7.
3. Bonds JAS. Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Medical and Veterinary Entomology*. 2012; 26(2):121-30.
4. Dye, C. Competition amongst larval *Aedes aegypti*: the role of interference. *Ecol Entomol* 1984; 9:355–357.
5. Reiter P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007 Summer;7(2):261-73
6. Buxton, P, Hopkins, G. *Researches in Polynesia and Melanesia*. Parts I-V. London: London School of Hygiene and Tropical Medicine; 1927:1–127
7. Reiter, P, Amador, MA, Anderson, RA, et al. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52:177–179.
8. Doak, P, Kareiva, P, Kingsolver, J. Fitness consequences of choosy oviposition for a time-limited butterfly. *Ecology* 2006; 87:395–408.
9. Jones, R, Gilbert, N, Guppy, M, et al. Long-distance movement of *Pieris rapae*. *J Anim Ecol* 1980; 49:629–642.
10. Schoonhoven, L, Sparnaay, T, van Wissen, W, et al. Sevenweek persistence of an oviposition-deterrent pheromone.

J Chem Ecol 1981; 7:583–588.

11. Ordóñez-Gonzalez JG¹, Mercado-Hernandez R, Flores-Suarez AE, Fernández-Salas I. The use of sticky ovitraps to estimate dispersal of *Aedes aegypti* in northeastern Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 2001 Jun;17(2):93-7.
12. Barrera R, Amador M, Acevedo V, Caban B, Felix G, Mackay AJ. Use of the CDC autocidal gravid ovitrap to control and prevent outbreaks of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2014 Jan;51(1):145-54.
13. Perich MJ¹, Kardec A, Braga IA, Portal IF, Burge R, Zeichner BC, Brogdon WA, Wirtz RA. Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vectors in Brazil, Med Vet Entomol. 2003 Jun;17(2):205-10.
14. Barrera R, Mackay AJ, Amador M. A novel autocidal ovitrap for the surveillance and control of *Aedes aegypti*. J Am Mosq Control Assoc. 2013 Sep;29(3):293-6.
15. International center of training and medical investigations (CIDEIM): Toxicity studies on Inesfly 5A IGR. CIDEIM, Cali (Colombia); 2003 [<http://www.cideim.org.co>].
16. Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE: Experimental evaluation of insecticidal paints against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), under natural climatic conditions. Parasit Vectors 2009, 2:30-6.
17. Dias JC, Jemmio A: About an insecticidal paint for controlling *Triatoma infestans*, in Bolivia. Rev Soc Bras Med Trop 2008, 41:79-81.
18. Mosqueira B, Chabi J, Chandre F, Akogbeto M, Hougard JM, Carnevale P, Mas-Coma S. Efficacy of an insecticide paint against malaria vectors and nuisance in West Africa--part 2: field evaluation. Malar J. 2010 Nov 25;9:341. doi: 10.1186/1475-2875-9-341.
19. Mosqueira B, Duchon S, Chandre F, Hougard JM, Carnevale P, Mas-Coma S. Efficacy of an insecticide paint against insecticide-susceptible and resistant mosquitoes - part 1: laboratory evaluation. Malar J. 2010 Nov 25;9:340. doi: 10.1186/1475-2875-9-340.
20. Reiter P, Amador MA, Colon N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusion for daily monitoring of *Ae. aegypti* populations. Journal of American Mosquito Control Association. 1991; 7: 52-55.
21. Zeichner BC, Perich MJ 1999. Laboratory testing of a lethal ovitrap for *Aedes aegypti*. Med Vet Entomol 13: 234-238.
22. Mosqueira B, Soma DD, Namountougou M, Poda S, Diabaté A, Ali O, Fournet F, Baldet T, Carnevale P, Dabiré RK, Mas-Coma S. Pilot study on the combination of an organophosphate-based insecticide paint and pyrethroid-treated long lasting nets against pyrethroid resistant malaria vectors in Burkina Faso. Acta Trop. 2015 Aug;148:162-9.
23. Zuur AF, Leno EN, Elphick CS Zuur AF, Leno EN, Elphick CS. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. Method. Ecol. Evol. 2010; 1: 3–14. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. 2010.
24. Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MH, White JS. Trends Ecol Evol. 2009 Mar;24(3):127-35. doi: 10.1016/j.tree.2008.10.008. Review.
25. R Core team. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
26. Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE: Experimental evaluation of insecticidal paints against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), under natural climatic conditions. Parasit Vectors 2009, 2:30-6. 8.
27. Dias JC, Jemmio A: About an insecticidal paint for controlling *Triatoma infestans*, in Bolivia. Rev Soc Bras Med Trop 2008, 41:79-81.
28. Najera JA, Zaim M: Malaria Vector Control. Insecticides for Indoor Residual Spraying. (WHO/CDS/WHOPES/2001.3). World Health Organization Geneva; 2001.
29. Allan SA, Kline DL. Evaluation of organic infusions and synthetic compounds mediating oviposition in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Chem Ecol. 1995;21(11):1847–60.
30. Watson MS. 1967. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): a literature review. Frederick, MD: Department of the Army. Misc Publ 22:1–38.

31. Hawley WA. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. J Am Mosq Control Assoc 4(Suppl 1):1–40.
32. Ponnusamyl L, Coby Schal, Dawn M. Wesson, Consuelo Arellano and Charles S. Apperson. Oviposition responses of *Aedes* mosquitoes to bacterial isolates from attractive bamboo infusions. Parasites & Vectors (2015) 8:486.
33. Sant’Ana AL, Roque RA, Eiras AE. Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes* (Stegomyia) (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2006;43:214–20.
34. Polson Karen A, Chris Curtis, Chang Moh Seng, James G Olson, Ngan Chantha+ and Sam C Rawlins. The Use of Ovitrap Baited with Hay Infusion as a Surveillance Tool for *Aedes aegypti* Mosquitoes in Cambodia Dengue Bulletin – Vol 26, 2002
35. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. 2000. Safety of pyrethroid treated mosquito nets. Med Vet Entomol 74:1-5.
36. Darriet F, Hougard JM, Corbel V [Effect of pyrethoid and organophosphate bi-treated nets on the behaviour of Kdr+ *Anopheles gambiae* mosquitoes]. Bull Soc Pathol Exot. 2005 Sep;98(3):201-4.
37. Achee NL¹, Sardelis MR, Dusfour I, Chauhan KR, Grieco JP. Characterization of spatial repellent, contact irritant, and toxicant chemical actions of standard vector control compounds. J Am Mosq Control Assoc. 2009 Jun;25(2):156-67.
38. Arthur B J, Kevin Emr S, Robert A. Wytenbach, and Ronald R. Hoy Mosquito (*Aedes aegypti*) flight tones: Frequency, harmonicity, spherical spreading, and phase relationships. J Acoust Soc Am. 2014 Feb; 135(2): 933–941.
39. Roth LM. A study of mosquito behaviour - an experimental laboratory study of the sexual behaviour of *Aedes aegypti* (Linnaeus). *The American Midland Naturalist*, 1948.
40. Sithiprasasna R, Mahapibul P, Noigamol C, Perich MJ, Zeichner BC, Burge B, Norris SL, Jones JW, Schleich SS, Coleman RE. Field evaluation of a lethal ovitrap for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. J Med Entomol. 2003 Jul;40(4):455-62.
41. Pan American Health Organization. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control*. Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 1974.
42. M Amaku, FAB Coutinho, SM Raimundo, LF Lopez, MN Burattini. A comparative analysis of the relative efficacy of vector-control strategies against dengue fever. Bulletin of mathematical biology 76 (3), 697-717.

Discussion Article 3

La lutte antivectorielle « moderne » doit prendre en compte les impératifs suivants : être efficace, sélective, et à un coût acceptable. Elle doit être durable et acceptée par les populations et les opérateurs. Elle ne doit pas avoir trop d'impacts non désirés (Entwistle, 2011). Notre tentative de développer une méthode innovante pour un contrôle sélectif et non polluant pour l'environnement s'inscrit dans cette vision.

La première étape de cette étude a permis de sélectionner l'application insecticide adéquate pour les PPL. L'évaluation, au moyen de tests en cônes de l'OMS, de cinq peintures à base d'insecticides microencapsulés développées par la société Inesfly Corporation SL., a permis de montrer l'efficacité plus importante des produits à base d'organophosphorés.

Les produits à base de pyréthrinoïdes ont été moins efficaces avec une mortalité inférieure à 50 % après 24 h. La principale explication est que la dose insecticide, produite par le fabricant, contenue dans ces produits était trop faible pour entraîner une mortalité de 100 %. L'évaluation des PPL en conditions contrôlées et à petite échelle a été l'étape suivante. L'effet létal des PPL a été estimé dans une salle de 16 m² sur des femelles gravides mais également sur des mâles. Ceux-ci sont en effet également attirés par les gîtes de pontes favorables aux femelles *Ae. albopictus*.

Les PPL à base d'organophosphorés et de pyréthrinoïdes-IGR I (à base d'alphacyperméthrine et de d-alléthrine) ont donné l'effet létal le plus important (~ 100% après 24h). Cependant, la résine à base de pyréthrinoïdes-IGR II (à base de deltaméthrine) n'a produit qu'une faible mortalité, probablement à cause de l'effet répulsif de la deltaméthrine qui est incorporée dans cette résine. Les résultats obtenus correspondent aux constations faites par Achee *et al.* (2009) qui avaient analysé l'effet répulsif de quatorze insecticides sur des femelles d'*Ae. Aegypti* et démontré que l'alphacyperméthrine n'était pas un produit répulsif. A l'inverse, la deltaméthrine est très utilisée pour l'imprégnation des moustiquaires à cause de l'effet excito-répulsif qu'elle engendre (Zaim *et al.*, 2000).

En sachant que les mâles d'*Ae. albopictus* sont attirés par les gîtes larvaires aussi bien que les femelles (Hawley, 1988), nous avons donc évalué l'effet de nos PPL à base de peinture OP-IGR sur ces derniers. Les trois répliques réalisés ont abouti à une mortalité avoisinant les 80 %.

Nos PPL montrent clairement un effet important sur les mâles ce qui pourrait amplifier l'action létale de cette méthode qui visait principalement les femelles gravides.

En conditions naturelles, il peut exister plusieurs types de gîtes propices pour *Ae. albopictus*. Les gîtes artificiels de type PPL doivent donc être compétitifs et au moins aussi attractifs que les gîtes présents dans la zone traitée. Nous avons donc entrepris l'évaluation de cette compétitivité face à un nombre croissant de pièges pondoires (PP) standard dont l'attractivité a été renforcée par l'utilisation d'une infusion de foin de 10 jours. La combinaison 4 PPL / 1PP ainsi que 2 PPL / 2 PP a entraîné une mortalité des femelles gravides de 97,52 et 94,48 %, respectivement. Cependant, la combinaison 1 PPL / 3 PP a été moins efficace et a conduit à une mortalité de 66,3 % après 24 h d'exposition. Ces résultats montrent clairement que cette méthode ne nécessite pas un grand nombre de PPL sur les sites traités grâce au comportement de *skip oviposition* des femelles *Ae. albopictus* qui, en déposant leurs œufs dans plusieurs gîtes, augmentent la probabilité de rencontrer les PPL et d'être exposées à une dose mortelle d'insecticide.

Mosqueira *et al.* (2010) ont analysé la mortalité occasionnée par une peinture insecticide à base d'OP-IGR sur *Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus* au Burkina Faso. Les résultats obtenus ont démontré une efficacité importante allant jusqu'à 100 % en 24h à une distance d'un mètre du mur traité. Dans le même ordre d'idée, nous avons voulu étudier l'effet à distance de nos PPL vis-à-vis des femelles gravides et nous avons obtenu un effet létal de seulement 19,4 % en 24 h lorsque les PPL ont été placés dans des cages protégées par un tulle moustiquaire pour éviter le contact direct avec les femelles *Ae. albopictus*. Nous avons donc conclu que la mortalité était provoquée essentiellement par contact des moustiques avec les surfaces traitées des PPL. Ce paramètre revêt une importance capitale car si la mortalité était provoquée à distance et dépendante de la volatilité de l'insecticide, un tel effet obtenu en milieu clos pourrait ne pas suffire dans un espace ouvert *in natura*.

L'évaluation des PPL à base d'OP-IGR sur le terrain a été réalisée à travers deux approches différentes. La première a consisté à mettre en place des PPL à l'extérieur des jardins des maisons, dans les espaces communs d'une résidence d'environ 100 maisons. La seconde approche a consisté à placer le même type de PPL à l'intérieur des jardins d'un groupe isolé de quatre maisons. Le monitoring des moustiques par pièges BGs et par PP n'a malheureusement pas permis de démontrer une baisse significative de la densité des moustiques et cela quelle que soit l'approche, comme le montre notre analyse GLMM. Deux explications peuvent être émises,

1) Le nombre de PPL déposés dans les sites d'étude n'est peut-être pas suffisant pour qu'une proportion importante de femelles gravides puisse entrer en contact avec au moins l'un d'entre eux. Perich *et al.* (2003) ont placé 10 PPL traités à la deltaméthrine (5 PPL à l'intérieur des maisons et 5 à l'extérieur) pour chacune des 30 maisons dans deux municipalités brésiliennes. Ils ont constaté que la densité d'*Ae. aegypti* a été considérablement réduite en termes de nombre de gîtes positifs (4-5 vs. 10-18) et de nombre de nymphes/maison (0,3- 0,7 vs. 8-10) 3 mois après le traitement ; 2) La peinture OP-IGR utilisée pourrait présenter une certaine répulsivité. Même si les organophosphorés ont été évalués comme des insecticides non-répulsifs par Achee *et al.* (2009) sur les femelles non gravides d'*Ae. aegypti*, un effet répulsif pourrait néanmoins se produire sur certains stades physiologiques comme celui des femelles gravides qui sont à la recherche de gîtes appropriés pour le développement de leurs progénitures.

D'autres méthodes, comme celle de l'autodissémination de pyriproxifène, sont prônées par plusieurs chercheurs (Itoh *et al.*, 1994 ; Furlong *et al.* 1995 ; Dell Chism & Apperson, 2003, Baxter *et al.*, 2008 ; Caputo *et al.* 2012) mais bien que cette méthode produise un effet sur les larves, le résultat escompté est très tardif dans des zones vastes où la densité d'*Ae. albopictus* est importante.

Malgré les résultats négatifs obtenus, d'autres essais doivent être poursuivis avec d'autres insecticides. Nous devons garder à l'esprit le succès unique et spectaculaire de l'élimination d'*Ae. aegypti* dans les Amériques dans les années 1960 et qui était principalement dû au comportement de *skip oviposition*, cette caractéristique biologique qui oblige les femelles à visiter plusieurs gîtes et par la même occasion à maximiser les «chances» de rencontrer un gîte traité.

DISCUSSION GENERALE

Une biologie en faveur de la transmission vectorielle ?

L'importance médicale d'*Aedes albopictus* découle de quatre facteurs essentiels : (i) son comportement invasif et son adaptabilité écologique ; (ii) sa compétence pour transmettre plusieurs agents pathogènes ; (iii) son potentiel en tant que vecteur intermédiaire en raison de son comportement trophique opportuniste et (iv) sa longévité compatible avec les durées de développement des virus.

L'étude de la dynamique saisonnière a mis en évidence une forte densité de ce moustique au niveau du site d'étude, fluctuant d'une année à l'autre mais dont les pics d'activité se situent entre juillet et septembre que ce soit pour les œufs ou pour les adultes, ce qui correspond aux observations effectuées en Italie par Romi *et al.* (2006).

Les trois méthodes de capture utilisées : pièges pondoires, capture aux pièges BGs et capture sur Homme ont permis d'apprécier la biologie et le comportement des populations locales. Les captures d'adultes et les taux de parturité obtenus montrent que la longévité d'*Ae. albopictus* est compatible avec la transmission de virus à l'homme. Les résultats sur la parturité d'*Ae. albopictus* correspondent à ceux obtenus par Almeida *et al.* (2005) en Chine, par Gottfried *et al.*, (2002) au Tennessee (USA) ainsi que par Lima-Camara *et al.* (2007) au Brésil. Néanmoins, les taux de parturité restent élevés, ce qui suggère une grande longévité de la population étudiée (Almeida *et al.*, 2005). De plus la population d'*Ae. albopictus* montre un niveau de reproduction élevé avec des taux de ponte quotidiens très élevés. Les résultats de captures sur Homme montrent également que les taux de piqûres par homme peuvent atteindre 60 par heure au mois de septembre 2014, ce qui est comparable aux taux de capture obtenus en Italie la même année (Caputo, données non publiées).

Un comportement de piqûre particulier

Les diptères piqueurs diurnes (moustiques, simules, etc.) ont généralement un comportement agressif plus accentué que les espèces nocturnes, les prises de sang se faisant sur des hôtes non endormis étant difficiles et obligeant l'insecte hématophage à multiplier les tentatives car il est souvent chassé par l'hôte (Clements, 1999). Il en est de même pour *Ae. albopictus* qui, à l'instar de la plupart des *Aedes* spp., est très agressif et cherche avec insistance à prendre un repas sanguin, multipliant les tentatives jusqu'à atteindre la réplétion ou bien se faire écraser (Delatte *et al.*, 2010). De plus, *Ae. albopictus* est connu pour effectuer des repas multiples durant un même cycle gonotrophique (Hawley, 1988 ; Ponlanwat and Harrington,

2005) ce qui augmente, de ce fait, le risque de transmission de pathogènes de l'hôte vers le vecteur et *vice versa*.

Nous avons confirmé ce comportement particulier en capturant un pourcentage non négligeable (jusqu'à 50 %) de femelles gravides par des méthodes de piégeage pour adultes, y compris la méthode HLC, censées capturer des femelles venant pour piquer et non pas pour pondre. Ce comportement augmente probablement la capacité vectorielle de ce moustique car les femelles semblent avoir une activité de recherche d'hôtes et de gîtes de ponte de manière simultanée. Les repas multiples ont été étudiés chez *Ae. aegypti* (Macdonald, 1956; Yasuno & Tonn, 1970; McClelland & Conway, 1971; Pant & Yasuno, 1973; Scott *et al.*, 1993a, 2000; Xue *et al.*, 1995) et ont été expliqués par ces auteurs comme étant la conséquence des repas interrompus ainsi que du manque de nutriments durant la vie préimaginale des femelles. Ce comportement augmente la durée du cycle gonotrophique, qui est de 2 à 3 jours pour la plupart des autres espèces de moustiques, ce qui aura pour conséquence directe un taux quotidien de survie et donc une capacité vectorielle plus élevés. Le taux quotidien de survie « *p* » étant estimé par la formule de Davidson (1954) :

$$p = n \sqrt{\text{taux de parturité}}$$

où *n* est la durée du cycle gonotrophique.

Les captures sur homme ont également montré des taux allant jusqu'à 60 piqures/homme/heure au mois de septembre 2014. Des résultats similaires ont été rapportés en Italie (Manica *et al.*, 2016). Cette forte agressivité, couplée à une forte anthropophilie en milieu urbain, comme l'ont démontré différentes études en Caroline du Nord (USA) (Richards *et al.*, 2006), en Italie (Valerio *et al.*, 2010) et au Cameroun (Kamgang *et al.*, 2012), fait de ce moustique un vecteur potentiellement redoutable.

La plupart des études font référence à un comportement exophage et exophile du moustique tigre (il pique et se repose à l'extérieur des maisons). Cependant, des études récentes en Italie (Valerio *et al.*, 2010) ont rapporté un comportement endophile et endophage. Nos observations nous ont montré le même comportement essentiellement en automne (septembre-octobre) où les femelles piquent davantage à l'intérieur des maisons. Ce comportement agressif pourrait être induit par un déclenchement progressif du mécanisme de diapause qui oblige les femelles à pondre le maximum d'œufs avant la mauvaise saison. De ce fait, il est possible que ce comportement augmente d'avantage le risque de transmission vectorielle comme cela a été le

cas pour la plupart des cas autochtones de dengue et de chikungunya qui ont surgi en Europe ces dernières années (La Ruche *et al.*, 2010 ; Grandadam *et al.*, 2011 ; Marchand *et al.*, 2013 ; Delisle *et al.*, 2014 ; Giron *et al.*, 2015).

Un contrôle d'*Ae. albopictus* difficile

Les méthodes de contrôle actuellement utilisées contre *Ae. albopictus* s'avèrent inefficaces. Bien qu'il y ait eu dans le passé quelques rares cas où le contrôle d'*Ae. aegypti* a été une réussite (Pan American Health Organization, 1974), il n'existe jusqu'à présent aucune campagne de lutte, au niveau mondial, qui a pu aboutir à un contrôle efficace (Reiter *et al.*, 2014).

Les mâles d'*Ae. albopictus* : talon d'Achille de l'espèce ?

Ayant peu d'information sur le statut de sensibilité des populations françaises de moustiques tigres vis-à-vis des insecticides, nous avons entrepris l'évaluation de la sensibilité des populations issues de la zone d'étude (Villeneuve-Loubet, Alpes-Maritimes) vis-à-vis du principal adulticide autorisé en France, la deltaméthrine.

Les deux méthodes utilisées, les applications topiques et les papiers imprégnés d'insecticide (test en tube de l'OMS) ont montré une sensibilité à la deltaméthrine comparable à celle de la souche sensible de référence *Ae. aegypti* Bora Bora, ce qui correspond aux résultats des rares études similaires dans les régions tempérées (Romi *et al.*, 2003 ; Marcombe *et al.*, 2014).

Lors des évaluations des méthodes de pulvérisation UBV, nous avons remarqué qu'en dépit du fait que les premiers tests sur terrain n'avaient montré aucun effet sur les femelles *Ae. albopictus*, les mâles au contraire avaient subi un effet létal significatif. Des travaux similaires au Venezuela (Reiter, 2014) et aux USA (Unlu *et al.*, 2014) ont rapporté des résultats similaires aux nôtres. Nous avons voulu connaître la cause d'un tel biais concernant les deux sexes d'une même espèce.

L'analyse de la sensibilité des mâles en comparaison avec celle des femelles a montré une différence significative en utilisant la méthode des papiers imprégnés. Cette différence est due à la taille des mâles qui est de 1,5 à 3 fois plus petite que celle des femelles. Certains auteurs (Davidson, 1958 ; Doyle *et al.*, 2009) ont pu démontrer qu'il y avait une différence de sensibilité entre les deux sexes des moustiques mais aucune étude n'a démontré cette différence chez *Ae. albopictus* vis-à-vis de la deltaméthrine. Ces résultats suggèrent que les mâles sont une cible de choix à prendre en compte en particulier lors de l'utilisation des méthodes de contrôle

innovantes telles que celles des Insectes Stériles (SIT) (Unlu *et al.*, 2014). Il est estimé qu'un ratio de 10:1 de mâles stériles par rapport aux mâles sauvages est nécessaire pour obtenir un effet sur la population sauvage (Christophides *et al.*, 2006). La diminution de la densité des mâles sauvages par la mise en œuvre préalable de pulvérisation spatiale UBV peut réduire drastiquement la densité de ces derniers favorisant par la même occasion le taux d'accouplement entre les mâles stériles, qui seront relâchés, et les femelles sauvages.

Contrôle post-épidémique

Un moustique difficile à atteindre

La lutte adulticide contre *Ae. albopictus* est préconisée uniquement lors de l'apparition ou de la suspicion de maladies dont les agents pathogènes peuvent être transmis par ce moustique. Cette méthode a pour but la réduction rapide de la densité vectorielle et surtout celle des femelles âgées jusqu'à un seuil où la transmission n'est plus possible. Malgré toutes les précautions qu'on doit prendre lors des pulvérisations spatiales UBV, il y a des paramètres qu'on ne peut pas contrôler comme les différentes barrières que les gouttelettes insecticides peuvent rencontrer sur leur chemin entre la buse du nébulisateur et le moustique cible. Ces barrières sont constituées essentiellement par la végétation qui est parfois très dense. En effet, dans presque tous les pays *Ae. albopictus* est commun dans les zones périurbaines et rurales où il y a une végétation importante (Hawley, 1988).

Taylor & Schoof (1971) ont rapporté que la végétation était un filtre susceptible d'arrêter les gouttelettes insecticides, ce qui conduirait à une réduction importante de la quantité de celle-ci et donc les chances de contact avec le moustique.

Selon Mount (1998), une pulvérisation UBV de malathion a permis de réduire la population de moustique de l'ordre de 90 % lorsque l'épandage a été réalisé dans un champ ouvert et sans végétation, mais seulement de 34 % lorsqu'il a été fait en milieu végétalisé.

Nos résultats montrent clairement que les traitements UBV réalisés seuls dans des zones végétalisées n'ont pas eu un impact significatif. Les 25 pièges pondoires ainsi que les 7 pièges BGs déposées dans les sites traités n'ont montré aucune baisse significative du nombre de femelles ni celui du nombre d'œufs récoltés en comparaison avec ceux des sites témoins. De plus, Curtis et Mason (1988) avaient noté qu'il y avait une réduction de la vitesse du vent à

l'intérieur de la végétation ce qui réduirait le contact entre les gouttelettes insecticides et les moustiques diminuant par la même occasion la mortalité de ces derniers.

Effectivement, lors de nos évaluations des traitements UBV, nous avons pu effectuer des mesures de température et de vitesse de vent à l'extérieur et à l'intérieur de la végétation dans les sites traités. Nous avons pu constater que les conditions à l'intérieur et à l'extérieur de celle-ci étaient complètement différentes. La température était plus élevée et le vent avait une vitesse plus faible à l'intérieur de la végétation. Ces conditions montrent clairement que la végétation est un biotope particulier et un abri adéquat conférant des conditions optimales et une protection pour les moustiques exophiles comme *Ae. albopictus*.

D'un autre côté, nos évaluations des traitements par thermonébulisation, sur une plus petite échelle, avec des appareils portables, ont montré une grande efficacité et nous avons pu atteindre une réduction du nombre de moustiques femelles de l'ordre de 61 à 95 %. Les traitements se sont effectués directement dans la végétation entourant les maisons. La distance entre l'appareil nébulisateur dans le cas des traitements UBV qui était de l'ordre de plusieurs mètres voire de plus de 10 mètres s'est trouvée réduite à quelques centimètres avec la méthode de thermonébulisation.

La quantité de gouttelettes envoyées directement dans le biotope du moustique tigre a été beaucoup plus importante car il n'y avait aucun effet de dilution due à la distance. Les autres effets comme l'évaporation ou le détournement de la trajectoire des gouttelettes par le vent sont pratiquement nuls. Il est également possible qu'une forte quantité de gouttelettes insecticides se soit déposée sur la végétation et continue à agir contre les moustiques qui entrent en contact avec celle-ci.

Dans le cas d'une urgence épidémique, notre étude montre que le meilleur moyen disponible est la pulvérisation d'insecticide sous forme d'aérosols au plus près de la végétation entourant les maisons. Que ce soit par la technique de thermonébulisation ou bien UBV autoporté, le plus important est que le nébulisateur émette le nuage insecticide directement dans la végétation entourant les maisons où il y a un risque de transmission d'arbovirus.

Contrôle pré-épidémique par une méthode innovante

L'exceptionnelle éradication d'*Aedes aegypti* dans les Amériques : une leçon à exploiter

Le succès de l'éradication d'*Ae. aegypti* en 1962, par l'organisation panaméricaine de la santé (PHAO) au niveau de 22 pays dans les Amériques, reste exceptionnelle et l'un des rares succès contre ce genre de moustiques (PAHO, 1974). Les PPL que nous avons développés dans ce sens ont montré une grande efficacité au laboratoire (Phase I) et dans des conditions semi-réelles (Phase II) vis-à-vis des femelles gravides et même des mâles *Ae. albopictus*. La peinture insecticide la plus efficace (OP-IGR) a montré également une persistance d'action sur des surfaces en plastique, similaires à celle des PPL, allant jusqu'à 2 années. En outre, une efficacité résiduelle de plus de 12 mois a été observée pour cette même peinture sur différents types de surfaces contre *Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus* résistants (Mosqueira *et al.*, 2010a ; 2010b).

Une méthode, deux approches

L'évaluation des pièges pondoirs létaux a été abordée avec deux approches différentes : 1) les PPL ont été déposés à l'extérieur des jardins des maisons et 2) les PPL ont été déposés à l'intérieur des jardins des maisons. Le but de ces deux approches était de voir s'il était possible, dans le cas où ces pièges étaient efficaces pour contrôler les moustiques, que des opérateurs de la lutte antivectorielle puissent eux-mêmes appliquer ces méthodes sans être intrusifs et dépendre de l'accès aux maisons des résidents. La seconde démarche pourrait ouvrir le chemin vers le développement de pièges létaux à utilisation domestique et accentuer la participation communautaire comme un élément essentiel pour le contrôle d'*Ae. albopictus* (Gubler, 1989 ; Lloyd *et al.*, 1992 ; Gubler & Clark, 1996 ; Fernandez *et al.*, 1998 ; Reiter, 2014). Gubler (1989) a suggéré que la participation communautaire pour la lutte contre *Ae. aegypti* serait plus efficace que les procédures gouvernementales pour la lutte antivectorielle. Cette approche a un meilleur rapport coût/efficacité. Ce genre de moustique est un commensal de l'homme, il prolifère grâce à ce dernier, il est donc indispensable de mobiliser toute la communauté pour un contrôle efficace et durable.

Malheureusement, l'utilisation des PPL sous cette forme n'a donné aucun résultat positif quelle que soit l'approche. Le manque d'efficacité de nos pièges peut être dû à un manque d'attractivité de ceux-ci, malgré l'utilisation de l'infusion de foin qui est très attractive envers les femelles gravides *Ae. albopictus* (Reiter *et al.*, 1991 ; Ponnusamy *et al.*, 2015). La peinture elle-même n'est pas répulsive car les organophosphorés qu'elle contient ne le sont pas comme l'ont démontré Achee *et al.* (2009) sur des femelles *Ae. aegypti* non gravides. Mais il est possible que ces insecticides soient répulsifs uniquement pour les femelles gravides, en

recherche de gîtes de pontes mais pas pour les femelles en recherche d'un hôte à piquer. Il est possible également que le nombre de PPL déposés dans les sites d'études n'ait pas été suffisant afin qu'une proportion importante de femelles gravides puisse entrer en contact avec au moins l'un d'entre eux et recevoir une dose létale d'insecticide.

Malgré les résultats négatifs obtenus, d'autres essais doivent être poursuivis avec d'autres insecticides microencapsulés. Ces produits sont innovants et ont déjà fait leurs preuves sur d'autres moustiques (Mosqueira *et al.*, 2010b). Le fait que ces produits contiennent plusieurs insecticides devrait augmenter leur efficacité et prévenir l'apparition de résistances.

La lutte adulticide doit être favorisée par des moyens non polluants et sélectifs comme les PPL car éliminer les moustiques géniteurs est beaucoup plus efficace qu'éliminer leurs progénitures (Amaku *et al.*, 2014).

Nous devons garder à l'esprit le succès unique et spectaculaire de l'élimination d'*Ae. aegypti* dans les Amériques en 1962 et poursuivre nos investigations pour améliorer l'efficacité de ces méthodes qui auront certainement un avenir fructueux dans le domaine de la lutte contre les vecteurs de la dengue, du zika et du chikungunya.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En raison de son expansion sur les cinq continents et de son implication dans la transmission de nombreuses arboviroses dont le chikungunya, la dengue, plus modestement le zika et, potentiellement, la fièvre jaune, *Aedes albopictus* représente et continuera de représenter un lourd fardeau en termes de santé publique et de nuisance.

Nos travaux ont prouvé que la population d'*Ae. albopictus* des Alpes-Maritimes, qui a montré sa capacité à transmettre localement la dengue et le chikungunya, est très bien adaptée à son environnement et justifie les actions de lutte antivectorielle conduites par les municipalités, les opérateurs et le Ministère de la Santé.

Bien que nous ayons démontré la sensibilité de cette population à la deltaméthrine, les moyens de contrôle disponibles n'arrivent pas à freiner la dispersion et la multiplication de cette espèce. L'application de cet insecticide antiadulte par traitement spatial UBV au moyen d'un nébulisateur à froid autoporté ou d'un thermo-nébulisateur portable est préconisée autour des lieux de résidence de cas d'arboviroses introduits ou autochtones suspects ou avérés de ces maladies et en cas d'épidémies transmises par ce moustique.

Nos résultats montrent que les pulvérisations spatiales d'adulticides, pour être efficaces, doivent se faire directement dans la végétation entourant les habitations. Le moustique tigre, bien qu'il soit exophile, est bel et bien protégé par celle-ci, ce qui rend peu efficaces les méthodes d'épandage UBV par nébulisation à froid depuis la voirie, dont la distance à la cible est souvent trop importante. C'est une incitation forte à adapter les stratégies de lutte actuelles.

En outre, un problème non négligeable se profile à travers l'utilisation insuffisamment contrôlée par les particuliers et le secteur privé de 3-D, des adulticides dont les seuls encore autorisés en Europe, telle que la deltaméthrine utilisée en LAV, appartiennent tous à la famille des pyréthrinoïdes. Ces pratiques peuvent entraîner, à long terme, l'apparition de phénomènes de résistance sans qu'il existe pour l'heure de solution de rechange, ce qui rendrait dès lors totalement inefficace toute opération de lutte antivectorielle en cas d'épidémie. Il est donc urgent d'évaluer d'autres substances actives insecticides au mode d'action différent de celui des pyréthrinoïdes, d'obtenir ensuite leur autorisation de mise sur le marché et de permettre ainsi de les utiliser en alternance avec la deltaméthrine en santé publique.

Bien que la meilleure méthode à utiliser en cas d'épidémie ait été identifiée, aucune méthode de contrôle à long terme n'a démontré jusqu'à présent une réelle efficacité. *Ae. albopictus* continue inexorablement son expansion à travers le monde.

Suite à 3 années de suivi d'*Ae. albopictus* à Nice, il me semble que la lutte contre les adultes est celle qui pourrait apporter le meilleur résultat concernant le contrôle d'*Ae. albopictus*. Une perspective intéressante à nos travaux serait le développement d'approches similaires à celle des PPL. Néanmoins, des études plus poussées devront être poursuivies sur le comportement des femelles d'*Ae. albopictus*, au stade grvide, face aux insecticides à effet persistant comme ceux issus de la technologie de microencapsulation. La recherche seule ne pourra pas aboutir à la limitation de la multiplication et de la propagation d'*Ae. albopictus*, la participation communautaire, dont l'impact est loin d'être négligeable, est indispensable pour un contrôle efficace contre ce vecteur commensal de l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265-267.
- Abramides, G. C., Roiz, D., Guitart, R., Quintana, S., Guerrero, I., & Giménez, N. (2011). Effectiveness of a multiple intervention strategy for the control of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(5), 281-288.
- Achee, N. L., Gould, F., Perkins, T. A., Reiner Jr, R. C., Morrison, A. C., Ritchie, S. A., ... & Scott, T. W. (2015). A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(5), e0003655.
- Achee, N. L., Sardelis, M. R., Dusfour, I., Chauhan, K. R., & Grieco, J. P. (2009). Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical Actions of Standard Vector Control Compounds 1. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(2), 156-167.
- Adhami, J., & Reiter, P. (1998). Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(3), 340-343.
- Akoua-Koffi, C., Diarrassouba, S., Benie, V. B., Ngbichi, J. M., Bozoua, T., Bosson, A., et al. (2001). [Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Cote d'Ivoire in 1999]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)*, 94(3), 227-230.
- Allan, S. A., & Kline, D. L. (1995). Evaluation of organic infusions and synthetic compounds mediating oviposition in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of chemical ecology*, 21(11), 1847-1860.
- Almeida, A. P. G., Baptista, S. S., Sousa, C. A., Novo, M. T. L., Ramos, H. C., Panella, N. A., ... & Mitchell, C. J. (2005). Bioecology and vectorial capacity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Macao, China, in relation to dengue virus transmission. *Journal of medical entomology*, 42(3), 419-428.
- Alphey, L., McKemey, A., Nimmo, D., Neira Oviedo, M., Lacroix, R., Matzen, K., & Beech, C. (2013). Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and global health*, 107(4), 170-179.
- Alphey, L. (2014). Genetic control of mosquitoes. *Annual review of entomology*, 59, 205-224.

Amaku, M., Coutinho, F. A. B., Raimundo, S. M., Lopez, L. F., Burattini, M. N., & Massad, E. (2014). A comparative analysis of the relative efficacy of vector-control strategies against dengue fever. *Bulletin of mathematical biology*, 76(3), 697-717.

Amelotti, I., Catalá, S. S., & Gorla, D. E. (2009). Experimental evaluation of insecticidal paints against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), under natural climatic conditions. *Parasites & vectors*, 2(1), 1.

Andis, M. D., Sackett, S. R., Carroll, M. K., & Bordes, E. S. (1987). Strategies for the emergency control of arboviral epidemics in New Orleans. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(2), 125-130.

Andreadis, T. G. (2007). Microsporidian parasites of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 3-29.

Andrews, E. S., Fu, Y., Calvitti, M., & Dobson, S. L. (2014). Interspecific Transfer of a Wolbachia Infection Into *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Yields a Novel Phenotype Capable of Rescuing a Superinfection. *Journal of medical entomology*, 51(6), 1192-1198.

Arankalle, V. A., Shrivastava, S., Cherian, S., Gunjekar, R. S., Walimbe, A. M., Jadhav, S. M., ... & Mishra, A. C. (2007). Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963–2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic. *Journal of General Virology*, 88(7), 1967-1976.

Arias-Goeta, C., Mousson, L., Rougeon, F., & Failloux, A. B. (2013). Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in *Aedes albopictus* are controlled at the midgut barrier level. *PLoS One*, 8(2), e57548.

Arthur, B. J., Emr, K. S., Wyttenbach, R. A., & Hoy, R. R. (2014). Mosquito (*Aedes aegypti*) flight tones: Frequency, harmonicity, spherical spreading, and phase relationships. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 135(2), 933-941.

Ayres, C. F. (2016). Identification of Zika virus vectors and implications for control. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 278-279.

Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F., & Rizzoli, A. (2015). Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest management science*, 71(11), 1471-1485.

Barniol, J., Gaczowski, R., Barbato, E. V., da Cunha, R. V., Salgado, D., Martínez, E., ... & Lum, L. C. (2011). Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC infectious diseases*, 11(1), 1.

Bagny, L., Delatte, H., Quilici, S., & Fontenille, D. (2009). Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. *Journal of medical entomology*, 46(6), 1541-1545.

Barber, J. A., Greer, M., & Coughlin, J. (2007). Field tests of malathion and permethrin applied via a truck-mounted cold fogger to both open and vegetated habitats. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(1), 55-59.

Barrera, R., Mackay, A. J., & Amador, M. (2013). A novel autocidal ovitrap for the surveillance and control of *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(3), 293-296.

Barrera, R., Amador, M., Acevedo, V., Caban, B., Felix, G., & Mackay, A. J. (2014). Use of the CDC autocidal gravid ovitrap to control and prevent outbreaks of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 51(1), 145-154.

Becnel, J. J., & White, S. E. (2007). Mosquito pathogenic viruses-the last 20 years. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 36-49.

Bellini, R., Carrieri, M., Burgio, G., & Bacchi, M. (1996). Efficacy of different ovitraps and binomial sampling in *Aedes albopictus* surveillance activity. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(4), 632-636.

Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., & Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *Journal of medical entomology*, 50(2), 317-325.

Bengoa, M., Eritja, R., & Lucientes, J. (2014). Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 30(1), 42-50.

Bennouna A, Balenghien T, El Rhaffouli H, Schaffner F, Garros C, Gardès L, Lhor Y, Hammoumi S, Chlyeh G & Fassi Fihri O (2016). First record of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) in Morocco: a major threat to public health in Northern Africa? *Med Vet Entomol*, in press.

Bentley, M. D., & Day, J. F. (1989). Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Annual review of entomology*, 34(1), 401-421.

Berry RA. 1971. Further studies on ULV ground applications for adult mosquito control. *Proc NJ Mosq Exterm Assoc* 58:154–156.

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., et al, Myers, M. F. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507.

Blagrove, M. S., Arias-Goeta, C., Failloux, A. B., & Sinkins, S. P. (2012). Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 255-260.

Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., & White, J. S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 24(3), 127-135.

Bonds, J. A. S. (2012). Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Medical and veterinary entomology*, 26(2), 121-130.

Bouyer, J., Chandre, F., Gilles, J., & Baldet, T. (2016). Alternative vector control methods to manage the Zika virus outbreak: more haste, less speed. *The Lancet. Global health*, 4(6), e364.

Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A., Velayudhan, R., Roberts, B., & Horstick, O. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Tropical Medicine & International Health*, 18(5), 564-577.

Bradshaw, C. J., Leroy, B., Bellard, C., Roiz, D., Albert, C., Fournier, A., et al. (2016). Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications*, 7, 12986.

Britch, S. C., Linthicum, K. J., Wynn, W. W., Walker, T. W., Farooq, M., Smith, V. L., et al. (2010). Evaluation of ULV and thermal fog mosquito control applications in temperate and desert environments. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26(2), 183-197.

Brown, A. W. A. (1968). Principles of dispersal in ground equipment and insecticides for mosquito control. *Am. Mosq Control Assoc Bull*, 2, 11-19.

Buxton, P. A., Hopkins, G. H. E., Haslam, J. F. C., & Greenwood, M. (1927). *Research in Polynesia and Melanesia: An account of investigations in Samoa, Tonga, the Ellice group, and the New Hebrides, in 1924, 1925* (Vol. 1). The London school of hygiene and tropical medicine.

Buzicky AW. (1968). Equipment for applying insecticides in ground equipment and insecticides for mosquito control. *Am MosqContrAssoc Bull* 2:23–43.

Calvitti, M., Moretti, R., Skidmore, A. R., & Dobson, S. L. (2012). Wolbachia strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a Wolbachia-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors*, 5(1), 1.

Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1885.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. (2014). Zika virus, is a French, F. PZika virus, French polynesia, South pacific, 2013.

Caputo, B., Ienco, A., Cianci, D., Pombi, M., Petrarca, V., Baseggio, A., ... & Della Torre, A. (2012). The “auto-dissemination” approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(8), e1793.

CDC. Chikungunya virus in the United States. Available online: <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states.html> (accessed on 8 November 2014).

Carrieri, M., Angelini, P., Venturelli, C., Maccagnani, B., & Bellini, R. (2011). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population size survey in the 2007 Chikungunya outbreak area in Italy. I. Characterization of breeding sites and evaluation of sampling methodologies. *Journal of medical entomology*, 48(6), 1214-1225.

Carvalho, D. O., McKemey, A. R., Garziera, L., Lacroix, R., Donnelly, C. A., Alphey, L., et al. (2015). Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(7), e0003864.

Chadee, D. D., & Corbet, P. S. (1987). Seasonal incidence and diel patterns of oviposition in the field of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies: a preliminary study. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 81(2), 151-161.

Chambers, E. W., Peel, B. A., Bossin, H., & Dobson, S. L. (2011). Male mating competitiveness of a Wolbachia-introgressed *Aedes polynesiensis* strain under semi-field conditions. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(8), e1271.

Chen, X. G., Jiang, X., Gu, J., Xu, M., Wu, Y., Deng, Y., ... & Armbruster, P. (2015). Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), E5907-E5915.

Christophides, G. K., Gouagna, L. C., Jacobs-Lorena, M., James, A. A., & Olson, K. (2006). What are relevant assays for refractoriness. *Bridging laboratory and field research for genetic control of disease vectors. Wageningen UR Frontis Series. Springer. Dordrecht, Netherlands*, 165-170.

Christophers, S. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. *Rickard*.

Guyane, C. A. (2008). Surveillance épidémiologique des cas hospitalisés clinique et diagnostic de la dengue. *Bull d'Alerte Surveill Antilles Guyane*, 4, 10.

Clements, A. N. (1999). The biology of mosquitoes: v. 2-sensory reception and behaviour. In *The biology of mosquitoes: v. 2-sensory reception and behaviour*.

Cros M, Tran A, Demarchi M, Lacour G, L'Ambert G, Alfonsi J, Gibergues PM. 2014. A mapping tool to assess entomological risk related to *Aedes albopictus*. Conference E-SOVE, 13-17 Octobre, Thessalonique (Grèce).

Curtis, G. A., & Mason, J. A. M. E. S. (1988). Evaluation of equipment modifications and dosage rates of ground ULV applications of naled against *Aedes taeniorhynchus* in a Florida citrus grove. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 4(3), 345-350.

Dame, D. A., Curtis, C. F., Benedict, M. Q., Robinson, A. S., & Knols, B. G. (2009). Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malaria journal*, 8(2), 1.

Darriet, F., Hougard, J. M., & Corbel, V. (2005). [Effect of pyrethroid and organophosphate bi-treated nets on the behaviour of Kdr+ *Anopheles gambiae* mosquitoes]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 98(3), 201-204.

Darbro, J. M., Johnson, P. H., Thomas, M. B., Ritchie, S. A., Kay, B. H., & Ryan, P. A. (2012). Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(4), 656-664.

Davidson, G. (1954). Estimation of the survival-rate of anopheline mosquitoes in nature., 1954, 174, 792-793.

Davidson, G. (1958). Studies on insecticide resistance in anopheline mosquitos. *Bulletin of the World Health Organization*, 18(4), 579.

Delatte, H., Paupy, C., Dehecq, J. S., Thiria, J., Failloux, A. B., & Fontenille, D. (2008). [*Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control]. *Parasite (Paris, France)*, 15(1), 3-13.

Delatte, H., Desvars, A., Bouétard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G., & Fontenille, D. (2010). Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 249-258.

Delaunay, P., Mathieu, B., Marty, P., Fauran, P., & Schaffner, F. (2007). Historique de l'installation d'*Aedes albopictus* dans les Alpes-Maritimes (France) de 2002 à 2005. *Médecine tropicale*, 67(3), 310-311.

Delaunay, P., Jeannin, C., Schaffner, F., & Marty, P. (2009). [News on the presence of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in metropolitan France]. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*, 16, S66-71.

Delisle, E., Rousseau, C., Broche, B., Leparc-Goffart, I., L'Ambert, G., Cochet, A., ... & Flusin, O. (2015). Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill*, 20(17), 21108.

Dell Chism, B., & Apperson, C. S. (2003). Horizontal transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval microcosms by gravid *Aedes albopictus* and *Ochlerotatus triseriatus* mosquitoes in the laboratory. *Medical and veterinary entomology*, 17(2), 211-220.

Detinova, T. S. (1962). Age grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Age Grouping Methods in Diptera of Medical Importance with special reference to some Vectors of Malaria*.

De Valdez, M. R. W., Nimmo, D., Betz, J., Gong, H. F., James, A. A., Alphey, L., & Black, W. C. (2011). Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4772-4775.

Devine, G. J., Perea, E. Z., Killeen, G. F., Stancil, J. D., Clark, S. J., & Morrison, A. C. (2009). Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11530-11534.

Diagne, C. T., Diallo, D., Faye, O., Ba, Y., Faye, O., Gaye, A., ... & Diallo, M. (2015). Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC infectious diseases*, 15(1), 1.

Diallo, D., Sall, A. A., Diagne, C. T., Faye, O., Faye, O., Ba, Y., ... & Diallo, M. (2014). Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PloS one*, 9(10), 109442.

Dias, J. C. P., & Jemmio, A. (2008). About an insecticidal paint for controlling *Triatoma infestans*, in Bolivia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(1), 79-81.

Dick, G. W. A. (1952). Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5), 521-534.

Di Luca, M., Toma, L., Severini, F., D'Ancona, F., & Romi, R. (2000). [*Aedes albopictus* in Rome: monitoring in the 3-year period of 1998-2000]. *Annali dell'Istituto superiore di sanit *, 37(2), 249-254.

Doak, P., Kareiva, P., & Kingsolver, J. (2006). Fitness consequences of choosy oviposition for a time-limited butterfly. *Ecology*, 87(2), 395-408.

Dobson, S. L., Marsland, E. J., & Rattanadechakul, W. (2001). Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility in single-and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 38(3), 382-387.

Doyle, M. A., Kline, D. L., Allan, S. A., & Kaufman, P. E. (2009). Efficacy of residual bifenthrin applied to landscape vegetation against *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(2), 179-183.

Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... & Guillaumot, L. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536-2543.

Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daures, M., John, M., Grangeon, J. P., & Gourinat, A. C. (2015). Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*, 21(2), 381-2.

Dyck, V. A., Hendrichs, J., & Robinson, A. S. (2005). *Sterile insect technique*. IAEA.Vienna: Springer.

DYE, C. (1984). Competition amongst larval *Aedes aegypti*: the role of interference. *Ecological Entomology*, 9(3), 355-357.

Dye, C. (1986). Vectorial capacity: must we measure all its components?. *Parasitology Today*, 2(8), 203-209.

Bonds, J. A. S. (2012). Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Medical and veterinary entomology*, 26(2), 121-130.

Entwistle J. Emerging technologies for control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae). *International Pest Control* Nov 2011; 53(6):318-322.

Estrada-Franco, J. G., & Craig, G. B. (1995). *Biology, disease relationships, and control of Aedes albopictus* (No. 42). Pan American Health Organization.

Fagbami, A. H. (1979). Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *Journal of Hygiene*, 83(02), 213-219.

Failloux, A. B., Vazeille, M., & Rodhain, F. (2002). Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, 55(6), 653-663.

Fay, R. W., & Perry, A. S. (1965). Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 25(276-281), 281.

Farajollahi, A., Williams, G. M., Condon, G. C., Kesavaraju, B., Unlu, I., & Gaugler, R. (2013). Assessment of a direct application of two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations for immediate and residual control of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(4), 385-388.

Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., & Kilpatrick, A. M. (2011). "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, genetics and evolution*, 11(7), 1577-1585.

Farajollahi, A., Healy, S. P., Unlu, I., Gaugler, R., & Fonseca, D. M. (2012). Effectiveness of ultra-low volume nighttime applications of an adulticide against diurnal *Aedes albopictus*, a critical vector of dengue and chikungunya viruses. *PLoS One*, 7(11), e49181.

Farjana, T., & Tuno, N. (2013). Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 50(4), 838-846.

Fay, R. W., & Eliason, D. A. (1966). A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq news*, 26(4), 531-534.

Faye, O., Freire, C. C., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., & Zanutto, P. M. (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20 th century. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(1), e2636.

Fernandez, E. A., Leontsini, E., Sherman, C., Chan, A. S. T., Reyes, C. E., Lozano, R. C., et al. (1998). Trial of a community-based intervention to decrease infestation of *Aedes aegypti* mosquitoes in cement washbasins in El Progreso, Honduras. *Acta tropica*, 70(2), 171-183.

Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis: 3d Ed.* Cambridge University Press.

Focks, D. A., & Chadee, D. D. (1997). Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 56(2), 159-167.

Focks, D. A. (2007). Toxorhynchites as biocontrol agents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 118-127.

Fonseca, D. M., Unlu, I., Crepeau, T., Farajollahi, A., Healy, S. P., Bartlett-Healy, K., ... & Clark, G. G. (2013). Area-wide management of *Aedes albopictus*. Part 2: Gauging the efficacy of traditional integrated pest control measures against urban container mosquitoes. *Pest Management Science*, 69(12), 1351-1361.

Furlong, M. J., Pell, J. K., Choo, O. P., & Rahman, S. A. (1995). Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen

Zoophthora radicans (Entomophthorales) by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Bulletin of Entomological research*, 85(03), 331-337.

Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E., & James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49), E6736-E6743.

Garrett-Jones, C., Ferreira Neto, J. A., & World Health Organization. (1964). The prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity.

Garrett-Jones, C., & Shidrawi, G. R. (1969). Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. *Bulletin of the World Health Organization*, 40(4), 531.

Gaugler, R., Suman, D., & Wang, Y. (2012). An autodissemination station for the transfer of an insect growth regulator to mosquito oviposition sites. *Medical and veterinary entomology*, 26(1), 37-45.

Geden, C. J., & Devine, G. J. (2012). Pyriproxyfen and house flies (Diptera: Muscidae): effects of direct exposure and autodissemination to larval habitats. *Journal of medical entomology*, 49(3), 606-613.

Giron, S., Rizzi, J., Leparc-Goffart, I., Septfonds, A., Tine, R., & Cadiou, B. (2015). Nouvelles apparitions de cas autochtones de dengue en région Provence-Alpes-Côte d'Azur, France, août-septembre 2014. *Bull Epidémiol Hebd*, 13-14.

Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajcar, D., Lesnikar, V., Klobucar, A., Pem-Novosel, I., ... & Betica-Radic, L. (2011). Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill*, 16(9), 19805.

Gottfried, K. L., Gerhardt, R. R., Nasci, R. S., Crabtree, M. B., Karabatsos, N., Burkhalter, K. L., ... & Paulson, D. J. (2002). Temporal abundance, parity, survival rates, and arbovirus isolation of field-collected container-inhabiting mosquitoes in eastern Tennessee. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18(3), 164-172.

Gould, E. A., Gallian, P., De Lamballerie, X., & Charrel, R. N. (2010). First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality!. *Clinical microbiology and infection*, 16(12), 1702-1704.

Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J. M., Souarès, Y., Failloux, A. B., ... & Desprès, P. (2011). Chikungunya virus, southeastern France. *Emerging infectious diseases*, 17(5), 910-914.

Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Ondo, S. M., Jiolle, D., et al. (2014). Zika virus in Gabon (Central Africa)–2007: a new threat from *Aedes albopictus*?. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(2), e2681.

Gratz, N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology*, 18(3), 215-227.

Gubler, D. J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 40(6), 571-578.

Gubler, D. J., & Clark, G. G. (1996). Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. *Acta tropica*, 61(2), 169-179.

Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 480-496.

Gubler, D. J. (2002). How effectively is epidemiological surveillance used for dengue programme planning and epidemic response?. *Dengue Bulletin*, 26, 96-106.

Guy, B., Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M., Teyssou, R., & Lang, J. (2011). From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*, 29(42), 7229-7241.

Guy, B., Lang, J., Saville, M., & Jackson, N. (2016). Vaccination Against Dengue: Challenges and Current Developments. *Annual review of medicine*, 67, 387-404.

Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., ... & Weaver, S. C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(2), e1477.

Halstead, S. B. (2007). Dengue. *The Lancet*, 370(9599), 1644-1652.

Harrington, L. C., & Edman, J. D. (2001). Indirect evidence against delayed "skip-oviposition" behavior by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of medical entomology*, 38(5), 641-645.

Harris, A. F., McKemey, A. R., Nimmo, D., Curtis, Z., Black, I., Morgan, S. A., et al. (2012). Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature biotechnology*, 30(9), 828-830.

Harris, E., Videz, E., Pérez, L., Sandoval, E., Téllez, Y., Perez, M. L., et al. (2000). Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 63(1), 5-11.

Harris, A. F., Nimmo, D., McKemey, A. R., Kelly, N., Scaife, S., Donnelly, C. A., et al. (2011). Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature biotechnology*, 29(11), 1034-1037.

Hawley, W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, 1, 1.

Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., ... & Cook, H. (2011). Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476(7361), 454-457.

Hoffmann, W. C., Walker, T. W., Martin, D. E., Barber, J. A. B., Gwinn, T., Smith, V. L., et al. (2007). Characterization of truck-mounted atomization equipment typically used in vector control 1. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(3), 321-329.

Hoffmann, W. C., Walker, T. W., Fritz, B. K., Gwinn, T., Smith, V. L., Szumlas, D., et al. (2008). Spray Characterization of Thermal Fogging Equipment Typically Used in Vector Control 1. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(4), 550-559.

International center of training and medical investigations (CIDEIM): Toxicity studies on Inesfly 5A IGR. CIDEIM, Cali (Colombia); 2003 [<http://www.cideim.org.co>].

Ishak, I. H., Jaal, Z., Ranson, H., & Wondji, C. S. (2015). Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & vectors*, 8(1), 1.

Itoh, T., Kawada, H., Abe, A., Eshita, Y., Rongsriyam, Y., & Igarashi, A. (1994). Utilization of bloodfed females of *Aedes aegypti* as a vehicle for the transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval habitats. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, 10(3), 344-347.

Izri, A., Bitam, I., & Charrel, R. N. (2011). First entomological documentation of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 1116-1118.

Jatanasen, S. (1967). Environmental manipulation and health education in *Aedes aegypti* control in Thailand. *Bulletin of the World Health Organization*, 36(4), 636.

Jones, R. E., Gilbert, N., Guppy, M., & Nealis, V. (1980). Long-distance movement of *Pieris rapae*. *The Journal of Animal Ecology*, 629-642.

Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., & Ellis, M. D. (2013). Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8(1), e54092.

Juliano, S. A. (2009). Species interactions among larval mosquitoes: context dependence across habitat gradients. *Annual review of entomology*, 54, 37.

Jupille, H., Seixas, G., Mousson, L., SOUSA, C., & Failloux, A. B. (2016). Zika virus, a new threat for Europe?. *bioRxiv*, 048454.

Jupp, P. G., & McIntosh, B. M. (1990). *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc*, 6(3), 415-420.

Kamgang, B., Nchoutpouen, E., Simard, F., & Paupy, C. (2012). Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites & vectors*, 5(1), 1.

Kraemer, M. U. G., Golding, N., Brady, O. J., Messina, J. P., Smith, D. L., Wint, G. R. W., & Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Tropical Medicine & International Health*, 20, 38.

Kariuki Njenga, M., Nderitu, L., Ledermann, J. P., Ndirangu, A., Logue, C. H., Kelly, C. H. L., et al. (2008). Tracking epidemic chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *Journal of General Virology*, 89(11), 2754-2760.

Kay, B. H., Nam, V. S., Van Tien, T., Yen, N. T., Phong, T. V., Diep, V. T. B., et al. (2002). Control of *Aedes* vectors of dengue in three provinces of Vietnam by use of *Mesocyclops* (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66(1), 40-48.

Klassen, W., & Curtis, C. F. (2005). History of the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 3-36). Springer Netherlands.

Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459-462.

Kobayashi, M., Nihei, N., & Kurihara, T. (2002). Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *Journal of Medical Entomology*, 39(1), 4-11.

Kuehn, B. M. (2014). Chikungunya virus transmission found in the United States: US health authorities brace for wider spread. *Jama*, 312(8), 776-777.

Kularatne, S. A. M., Gihan, M. C., Weerasinghe, S. C., & Gunasena, S. (2009). Concurrent outbreaks of Chikungunya and Dengue fever in Kandy, Sri Lanka, 2006–07: a comparative analysis of clinical and laboratory features. *Postgraduate medical journal*, 85(1005), 342-346.

Kushwah, R. B. S., Mallick, P. K., Ravikumar, H., Dev, V., Kapoor, N., Adak, T., & Singh, O. P. (2015). Status of DDT and pyrethroid resistance in Indian *Aedes albopictus* and absence of knockdown resistance (kdr) mutation. *Journal of vector borne diseases*, 52(1), 95.

Lacour, G., Chanaud, L., L'Ambert, G., & Hance, T. (2015). Seasonal Synchronization of Diapause Phases in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *PloS one*, 10(12), e0145311.

Lacroix, R., Delatte, H., Hue, T., Dehecq, J. S., & Reiter, P. (2009). Adaptation of the BG-Sentinel trap to capture male and female *Aedes albopictus* mosquitoes. *Medical and veterinary entomology*, 23(2), 160-162.

Lambrechts, L., Scott, T. W., & Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(5), e646.

Lambrechts, L., Ferguson, N. M., Harris, E., Holmes, E. C., McGraw, E. A., O'Neill, S. L., et al. (2015). Assessing the epidemiological effect of Wolbachia for dengue control. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(7), 862-866.

La Ruche, G., Souarès, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., ... & Ollier, L. (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill*, 15(39), 19676.

Coffey, L. L., Failloux, A. B., & Weaver, S. C. (2014). Chikungunya virus–vector interactions. *Viruses*, 6(11), 4628-4663.

Li, M. I., Wong, P. S. J., Ng, L. C., & Tan, C. H. (2012). Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(8), e1792.

Liew, C., & Curtis, C. F. (2004). Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, in Singapore. *Medical and veterinary entomology*, 18(4), 351-360.

Norzahira, R., Hidayatulfathi, O., Wong, H. M., Cheryl, A., Firdaus, R., Chew, H. S., ... & Lee, H. L. (2011). Ovitraps surveillance of the dengue vectors, *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse in selected areas in Bentong, Pahang, Malaysia. *Trop Biomed*, 28(1), 48-54.

Linley, J. R., & Jordan, S. (1992). Effects of ultra-low volume and thermal fog malathion, Scourge and naled applied against caged adult *Culicoides furens* and *Culex quinquefasciatus* in open and vegetated terrain. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8(1), 69-76.

Lloyd, L. S., Winch, P., Ortega-Canto, J., & Kendall, C. (1992). Results of a community-based *Aedes aegypti* control program in Merida, Yucatan, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 46(6), 635-642.

Lofgren, C. S., Anthony, D. W., & Mount, G. A. (1973). Size of aerosol droplets impinging on mosquitoes as determined with a scanning electron microscope. *Journal of economic entomology*, 66(5), 1085-1088.

Lofgren, C. S., Ford, H. R., Tonn, R. J., & Jatanasen, S. (1970). The effectiveness of ultra-low-volume applications of malathion at a rate of 6 US fluid ounces per acre in controlling *Aedes aegypti* in a large-scale test at Nakhon Sawan, Thailand. *Bulletin of the World Health Organization*, 42(1), 15.

Lok, C. K., Kiat, N. S., & Koh, T. K. (1977). An autocidal ovitrap for the control and possible eradication of *Aedes aegypti*. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 8(1), 56-62.

Lowe, R. E., Bailey, D. L., Dame, D. A., Savage, K. E., & Kaiser, P. E. (1980). Efficiency of techniques for the mass release of sterile male *Anopheles albimanus* Wiedemann in El Salvador. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 29(4), 695-703.

Mabbett, T. (2003). Fogging for public health protection. *International Pest Control*, 45(6), 308-311.

MABBETT, T. (2004). Fogged protection for food on the move. *International pest control*, 46(6), 323-324.

Mabbett, T. (2006). Technologies-Blanket Protection From Carrier Pests-Foggers remain key tools to preventing diseases carried by mosquitoes and other insect vectors. *Pest Control*, 74(1), 45-49.

Macdonald, W. W. (1956). *Aedes Aegypti* in Malaya: II.—Larval and Adult Biology. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 50(4), 399-414.

MAKIYA, K. (1976). Some considerations on the distribution pattern of the mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) and the practical usefulness of the log (x+ 1) transformation for the field collection data. *Medical Entomology and Zoology*, 27(4), 399-404.

Manica, M., Filipponi, F., D'Alessandro, A., Screti, A., Neteler, M., Rosà, R., et al. (2016). Spatial and temporal hot spots of *Aedes albopictus* abundance inside and outside a South European metropolitan area. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(6), e0004758.

Marchand, E., Prat, C., Jeannin, C., Lafont, E., Bergmann, T., Flusin, O., ... & Noel, H. (2013). Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill*, 201, 18-50.

Marchette, N. J., Garcia, R., & Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(3), 411-415.

Marcombe, S., Farajollahi, A., Healy, S. P., Clark, G. G., & Fonseca, D. M. (2014). Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PloS one*, 9(7), e101992.

Marten, G. G., & Reid, J. W. (2007). Cyclopoid copepods. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 65-92.

Matthews GA. (1979). Pesticide application methods. Essex, United Kingdom: Longman Group, UK, Ltd.

McCrae, A. W. R., & Kirya, B. G. (1982). Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4), 552-562.

McClelland, G. A. H., & Conway, G. R. (1971). Frequency of blood feeding in the mosquito *Aedes aegypti*. *Nature*, 23, 485-6.

McGraw, E. A., & O'Neill, S. L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 181-193.

McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323(5910), 141-144.

Meeraus, W. H., Armistead, J. S., & Arias, J. R. (2008). Field comparison of novel and gold standard traps for collecting *Aedes albopictus* in northern Virginia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(2), 244-248.

Mombouli, J.V., Bitsindou, P., Elion, D.O., Grolla, A., Feldmann, H., Niama, F.R., Parra, H.J., Munster, V.J. 2013. Chikungunya virus infection, Brazzaville, Republic of Congo, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 19, 1542–1543.

Monlun, E., Zeller, H., Le Guenno, B., Traore-Lamizana, M., Hervy, J. P., Adam, F., ... & Mondo, M. (1992). [Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 86(1), 21-28.

Mogi, M., & Mokry, J. (1980). Distribution of *Wyeomyia smithii* (Diptera, Culicidae) eggs in pitcher plants in Newfoundland, Canada. *Tropical Medicine*, 22(1), 1-12.

Mogi, M. (2007). Insects and other invertebrate predators. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 93-109.

Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., ... & Hugo, L. E. (2009). A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268-1278.

Mori, A. (1979). Effects of larval density and nutrition on some attributes of immature and adult *Aedes albopictus*. *Tropical Medicine*, 21(2), 85-103.

Mosqueira, B., Chabi, J., Chandre, F., Akogbeto, M., Hougard, J. M., Carnevale, P., & Mas-Coma, S. (2010). Efficacy of an insecticide paint against malaria vectors and nuisance in West Africa-Part 2: Field evaluation. *Malaria journal*, 9(1), 1.

Mosqueira, B., Duchon, S., Chandre, F., Hougard, J. M., Carnevale, P., & Mas-Coma, S. (2010). Efficacy of an insecticide paint against insecticide-susceptible and resistant mosquitoes-Part 1: Laboratory evaluation. *Malaria journal*, 9(1), 1.

Mosqueira, B., Soma, D. D., Namountougou, M., Poda, S., Diabaté, A., Ali, O., ... & Mas-Coma, S. (2015). Pilot study on the combination of an organophosphate-based insecticide paint and pyrethroid-treated long lasting nets against pyrethroid resistant malaria vectors in Burkina Faso. *Acta tropica*, 148, 162-169.

Mount, G. A., & Lofgren, C. S. (1967). Ultra-low volume and conventional aerial sprays for control of adult salt-marsh mosquitoes, *Aedes sollicitans* (Walker) and *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann), in Florida. *Mosquito News*, 27(4), 473-477.

Mount, G. A., & Lofgren, C. S. (1967). New insecticides as nonthermal aerosols for control of adult mosquitoes. *Mosquito News*, 27(4), 470-3.

Mount, G. A., Pierce, N. W., & Baldwin, K. F. (1975). Ultralow volume ground aerosols of propoxur (Baygon MOS) for control of adult mosquitoes [*Aedes taeniorhynchus*, *Anopheles quadrimaculatus*, insects]. *Mosquito News (USA)*.

Mount, G. A. (1998). A critical review of ultralow-volume aerosols of insecticide applied with vehicle-mounted generators for adult mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(3), 305-334.

Musso, D., Nilles, E. J., & Cao-Lormeau, V. M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), O595-O596.

Musso, D., & Gubler, D. J. (2015). Zika virus: following the path of dengue and chikungunya?. *The Lancet*, 386(9990), 243-244.

Najera, J. A., & Zaim, M. (2001). Malaria vector control–insecticides for indoor residual spraying. *WHO Dengue Bulletin*, 25, 126-127.

Nelder, M., Kesavaraju, B., Farajollahi, A., Healy, S., Unlu, I., Crepeau, T., et al. (2010). Suppressing *Aedes albopictus*, an emerging vector of dengue and chikungunya viruses, by a

novel combination of a monomolecular film and an insect-growth regulator. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(5), 831-837.

Newton, E. A., & Reiter, P. (1992). A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(6), 709-720.

O'Connor, L., Plichart, C., Sang, A. C., Brelsfoard, C. L., Bossin, H. C., & Dobson, S. L. (2012). Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: field performance and infection containment. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(11), e1797.

Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., et al. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*, 19 (9), 20720.

Ordóñez González, J. G., Mercado Hernández, R., Flores Suárez, A. E., & Fernández Salas, I. (2001). The use of sticky ovitraps to estimate dispersal of *Aedes aegypti* in northeastern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 17(2), 93-97.

Organisation mondiale de la santé. 2016. Dengue et dengue hémorragique. Aide-mémoire n° 117. Disponible à : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. July.

Pan American Health Organization. 1974. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington, D.C.: Pan American Health Organization.

Pant, C. P., & Yasuno, M. (1973). Field studies on the gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *Journal of medical entomology*, 10(2), 219-223.

Papaevangelou, G., & Halstead, S. B. (1977). Infections with two dengue viruses in Greece in the 20th century. Did dengue hemorrhagic fever occur in the 1928 epidemic?. *The Journal of tropical medicine and hygiene*, 80(3), 46-51.

Patterson, R. S., Weidhaas, D. E., Ford, H. R., & Lofgren, C. S. (1970). Suppression and elimination of an island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. *Science*, 168(3937), 1368-1369.

Paupy, C., Kassa Kassa, F., Caron, M., Nkoghe, D., & Leroy, E. M. (2012). A chikungunya outbreak associated with the vector *Aedes albopictus* in remote villages of Gabon. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 12(2), 167-169.

Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infection*, 11(14), 1177-1185.

Penilla, R. P., Rodríguez, A. D., Hemingway, J., Trejo, A., Lopez, A. D., & Rodríguez, M. H. (2007). Cytochrome P 450-based resistance mechanism and pyrethroid resistance in the

field *Anopheles albimanus* resistance management trial. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(2), 111-117.

Perich, M. J., Kardec, A., Braga, I. A., Portal, I. F., Burge, R., Zeichner, B. C., et al. (2003). Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vectors in Brazil. *Medical and veterinary entomology*, 17(2), 205-210.

Perich, M. J., Davila, G., Turner, A., Garcia, A., & Nelson, M. (2000). Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *Journal of Medical Entomology*, 37(4), 541-546.

Peyrefitte, C. N., Rousset, D., Pastorino, B. A., Pouillot, R., Bessaud, M., Tock, F., ... & Vessiere, A. (2007). Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerging infectious diseases*, 13(5), 768.

Phanthumachinda, B., Samuthrapngse, W., & Chanthon, K. (1976). The control of field populations of *Aedes aegypti* by malathion, fenitrothion, bioresmethrin and pyrethrum ULV ground aerosols, and by malathion, DDVP and bioresmethrin thermal foggings. *Bangkok, Thailand: Unpublished document WHO/VBC/76.651*.

Phanthumachinda, B., Phanurai, P., Samutrapongse, W., & Charoensook, O. (1985). Studies on community participation in *Aedes aegypti* control at Phanus Nikhom district, Chonburi province, Thailand. *Mosquito-Borne Diseases Bulletin*, 2, 1-8.

Platzer, E. G. (2007). Mermithid nematodes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 58-64.

Polson, K. A., Curtis, C., Seng, C. M., Olson, J. G., Chantha, N., & Rawlins, S. C. (2002). The use of ovitraps baited with hay infusion as a surveillance tool for *Aedes aegypti* mosquitoes in Cambodia. *Dengue Bull*, 26, 178-184.

Ponnusamy, L., Xu, N., Nojima, S., Wesson, D. M., Schal, C., & Apperson, C. S. (2008). Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27), 9262-9267.

Ponnusamy, L., Schal, C., Wesson, D. M., Arellano, C., & Apperson, C. S. (2015). Oviposition responses of *Aedes* mosquitoes to bacterial isolates from attractive bamboo infusions. *Parasites & vectors*, 8(1), 1.

Ponlawat, A., & Harrington, L. C. (2005). Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of medical entomology*, 42(5), 844-849.

Powers, A. M., & Logue, C. H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*, 88(9), 2363-2377.

- R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing.
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., & Black IV, W. C. (2010). Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA. net*, 1(1), 0-0.
- Rao, B. B. (2010). Larval habitats of *Aedes albopictus* (Skuse) in rural areas of Calicut, Kerala, India. *Journal of vector borne diseases*, 47(3), 175.
- Rapley, L. P., Johnson, P. H., Williams, C. R., Silcock, R. M., Larkman, M., Long, S. A., et al. (2009). A lethal ovitrap-based mass trapping scheme for dengue control in Australia: II. Impact on populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and veterinary entomology*, 23(4), 303-316.
- Rathburn Jr, C. B., & Boike Jr, A. H. (1972). Ultra low volume tests of malathion applied by ground equipment for the control of adult mosquitoes. *Mosquito News*, 32(2), 183-187.
- Ratsitorahina, M., Harisoa, J., Ratovonjato, J., Biacabe, S., Reynes, J. M., Zeller, H., ... & Soares, J. L. (2008). Outbreak of dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis*, 14(7), 1135-7.
- Ravi, V. (2006). Re-emergence of chikungunya virus in India. *Indian journal of medical microbiology*, 24(2), 83.
- Read, A. F., Lynch, P. A., & Thomas, M. B. (2009). How to make evolution-proof insecticides for malaria control. *PLoS Biol*, 7(4), e1000058.
- Reddy, M. R., Spielman, A., Lepore, T. J., Henley, D., Kiszewski, A. E., & Reiter, P. (2006). Efficacy of resmethrin aerosols applied from the road for suppressing *Culex* vectors of West Nile virus. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, 6(2), 117-127.
- Reiter, P., & Sprenger, D. (1987). The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(3), 494-501.
- Reiter, P. (2014). 25 Surveillance and Control of Urban Dengue Vectors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, 481.
- Reiter, P. (2007). Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), 261-273.
- REITER, P., & DARSIE JR, R. F. (1984). *Aedes albopictus* in Memphis, Tennessee (USA): an achievement of modern transportation?. *Mosquito News*, 44(3), 396-399.
- Reiter, P. (2010). Yellow fever and dengue: a threat to Europe. *Euro Surveill*, 15(10), 19509.

Reiter, P., Fontenille, D., & Paupy, C. (2006). *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem?. *The Lancet infectious diseases*, 6(8), 463-464.

Reiter, P., Amador, MA, Anderson, RA, et al. (1995) Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am J Trop Med Hyg.* 52:177–179.

Reiter P, Amador MA, Colon N. (1991). Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusion for daily monitoring of *Ae. aegypti* populations. *Journal of American Mosquito Control Association.* 7: 52-55.

Reiter, P., & Nathan, M. B. (2001). Guidelines for assessing the efficacy of insecticidal space sprays for control of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Guidelines for assessing the efficacy of insecticidal space sprays for control of the dengue vector Aedes aegypti*.

Renault, P., Solet, J. L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., Filleul, L., et al. (2007). A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(4), 727-731.

Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., et al. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, 370(9602), 1840-1846.

Rianthavorn, P., Prianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N., Theamboonlers, A., & Poovorawan, Y. (2010). An outbreak of chikungunya in southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, e161-e165.

Richards, S. L., Ponnusamy, L., Unnasch, T. R., Hassan, H. K., & Apperson, C. S. (2006). Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *Journal of medical entomology*, 43(3), 543-551.

Ritchie, S. A., Rapley, L. P., & Benjamin, S. (2010). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(6), 1053-1059.

Robinson, M. C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), 28-32.

Roiz, D., Rosa, R., Arnoldi, D., & Rizzoli, A. (2010). Effects of temperature and rainfall on the activity and dynamics of host-seeking *Aedes albopictus* females in northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(8), 811-816.

Roiz, D., Boussès, P., Simard, F., Paupy, C., & Fontenille, D. (2015). Autochthonous chikungunya transmission and extreme climate events in southern france. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(6), e0003854.

Roiz, D., Duperier, S., Roussel, M., Boussès, P., Fontenille, D., Simard, F., & Paupy, C. (2016). Trapping the Tiger: Efficacy of the Novel BG-Sentinel 2 With Several Attractants and Carbon Dioxide for Collecting *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southern France. *Journal of Medical Entomology*, 53(2), 460-465.

Romi, R., Toma, L., Severini, F., & Di Luca, M. (2003). Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticides. *Journal of the American mosquito control association*, 19(4), 419-423.

Romi, R., Severini, F., & Toma, L. (2006). Cold acclimation and overwintering of female *Aedes albopictus* in Roma. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(1), 149-151.

Rose, R. I. (2001). Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging infectious diseases*, 7(1), 17.

Roth, L. M. (1948). A study of mosquito behavior. An experimental laboratory study of the sexual behavior of *Aedes aegypti* (Linnaeus). *The American Midland Naturalist*, 40(2), 265-352.

Rozeboom, L. E., Rosen, L., & Ikeda, J. (1973). Observations on oviposition by *Aedes* (S.) *albopictus* Skuse and A.(S.) *polynesiensis* Marks in nature. *Journal of medical entomology*, 10(4), 397-399.

Rozilawati, H., Zairi, J., & Adanan, C. R. (2007). Seasonal abundance of *Aedes albopictus* in selected urban and suburban areas in Penang, Malaysia. *Trop Biomed*, 24(1), 83-94.

Rudnick, A., & Hammon, W. M. (1960). Newly recognized *Aedes aegypti* problems in Manila and Bangkok. *Mosquito News*, 20(3), 247-249.

Sant'ana, A. L., Roque, R. A., & Eiras, A. E. (2006). Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes* (Stegomyia)(Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 43(2), 214-220.

Schaffner, F., & Karch, S. (2000). First report of *Aedes albopictus* (Skuse, 1984) in metropolitan France. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série III, Sciences de la vie*, 323(4), 373.

Schaffner, F., Fontenille, D., & Mathis, A. (2014). Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirosis in Europe. *Lancet Infect Dis*, 14(11), 1044.

Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., et al. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*, 3(7), e263.

Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 May 25;4(5):e646.

Scott, T. W., Clark, G. G., Lorenz, L. H., Amerasinghe, P. H., Reiter, P., & Edman, J. D. (1993). Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *Journal of Medical Entomology*, 30(1), 94-99.

Septfons, A., Noël, H., Leparç-Goffart, I., Giron, S., Delisle, E., & Chappert, J. L. (2015). Monitoring of chikungunya and dengue in metropolitan France, 2014. *Bull Epidemiol Hebdo*, 13, 204-211.

Service, M. W. (1985). Population dynamics and mortalities of mosquito preadults. In L. P. Lounibos, J. R. Rey, & J. H. Frank (Eds.), *Ecology of mosquitoes: Proceedings of a workshop* (pp. 185-201). Vero Beach: Florida Medical Entomology Laboratory.

Schoonhoven, L. M., Sparnaay, T., Van Wissen, W., & Meerman, J. (1981). Seven-week persistence of an oviposition-deterrent pheromone. *Journal of chemical ecology*, 7(3), 583-588.

Sithiprasasna, R., Mahapibul, P., Noigamol, C., Perich, M. J., Zeichner, B. C., Burge, B., et al. (2003). Field evaluation of a lethal ovitrap for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of medical entomology*, 40(4), 455-462.

Soedarmo, S. P. (1994). Community participation in the control and prevention of DHF in Indonesia. *Tropical medicine*, 35(4), 315-324.

Strickman, D. (1980). Stimuli affecting selection of oviposition sites by *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae): moisture. *Mosq News*, 40, 236-245.

Sun, D., Williges, E., Unlu, I., Healy, S., Williams, G. M., Obenauer, P., et al. (2014). Taming a tiger in the city: Comparison of motorized backpack applications and source reduction against the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 30(2), 99-105.

Suter, T. T., Flacio, E., Fariña, B. F., Engeler, L., Tonolla, M., Regis, L. N., et al. (2016). Surveillance and control of *Aedes albopictus* in the swiss-italian border region: differences in egg densities between intervention and non-intervention areas. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(1), e0004315.

Takagi, M., & Tsuda, Y. (1995). Temporal and spatial distribution of released *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Nagasaki, Japan. *Medical Entomology and Zoology*, 46(3), 223-228.

Tan, A. W. A., Loke, S. R., Benjamin, S., Lee, H. L., Chooi, K. H., & Sofian-Azirun, M. (2012). Spray application of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti strain AM65-52) against *Aedes aegypti* (L.) and *Ae. albopictus* Skuse populations and impact on dengue transmission in a dengue endemic residential site in Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 43(2), 296.

Taylor, R. T., & Schoof, H. F. (1971). The relative effectiveness of malathion thermal aerosols and ground-applied ULV against three species of mosquitoes. *Mosq News*, 31, 346-349.

Tesh RB, Gubler DJ, Rosen L. (1976). Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with chikungunya virus. *Am J Trop Med Hyg.*; 25(2):326–35.

Thomas, D. D., Donnelly, C. A., Wood, R. J., & Alphey, L. S. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287(5462), 2474-2476.

Thorsteinson, A. J. (1960). Host selection in phytophagous insects. *Annual review of entomology*, 5(1), 193-218.

Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., ... & Vera, L. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of virology*, 161(3), 665-668.

Toma, L., Severini, F., Di Luca, M., Bella, A., et al. (2003). Seasonal patterns of oviposition and egg hatching rate of *Aedes albopictus* in Rome. *J Am Mosq Control Assoc.* 19:19–22.

Tran, A., L'Ambert, G., Lacour, G., Benoît, R., Demarchi, M., Cros, M., et al. (2013). A rainfall-and temperature-driven abundance model for *Aedes albopictus* populations. *International journal of environmental research and public health*, 10(5), 1698-1719.

Trexler, J. D., Apperson, C. S., & Schal, C. (1998). Laboratory and field evaluations of oviposition responses of *Aedes albopictus* and *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) to oak leaf infusions. *Journal of Medical Entomology*, 35(6), 967-976.

Tseng, M. (2007). Ascogregarine parasites as possible biocontrol agents of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 30-34.

Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLOS pathog*, 3(12), e201.

Tsetsarkin, K. A., McGee, C. E., Volk, S. M., Vanlandingham, D. L., Weaver, S. C., & Higgs, S. (2009). Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PLoS One*, 4(8), e6835.

Tsetsarkin, K. A., Chen, R., Sherman, M. B., & Weaver, S. C. (2011). Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Current opinion in virology*, 1(4), 310-317.

Tsetsarkin, K. A., Chen, R., Yun, R., Rossi, S. L., Plante, K. S., Guerbois, M., et al. (2014). Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nature communications*, 5.

Unlu, I., Farajollahi, A., Rochlin, I., Crepeau, T. N., Strickman, D., & Gaugler, R. (2014). Differences in male–female ratios of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) following ultra-low volume adulticide applications. *Acta tropica*, 137, 201-205.

Unlu, I., Farajollahi, A., Strickman, D., & Fonseca, D. M. (2013). Crouching tiger, hidden trouble: Urban sources of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) refractory to source-reduction. *PLoS One*, 8(10), e77999.

Unlu, I., Faraji, A., Indelicato, N., & Fonseca, D. M. (2014). The hidden world of Asian tiger mosquitoes: immature *Aedes albopictus* (Skuse) dominate in rainwater corrugated extension spouts. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, tru139.

Valerio, L., Marini, F., Bongiorno, G., Facchinelli, L., Pombi, M., Caputo, B., et al. (2010). Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome province, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 291-294.

Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., et al. (2007). Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PloS one*, 2(11), e1168.

Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M., & Failloux, A. B. (2013). High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PloS one*, 8(3), e59716.

Velo, E., Kadriaj, P., Mersini, K., Shukullari, A., Manxhari, B., Simaku, A., et al. (2016). Enhancement of *Aedes albopictus* collections by ovitrap and sticky adult trap. *Parasites & vectors*, 9(1), 1.

Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., & Ranson, H. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 126-131.

Walker, E. D., Lawson, D. L., Merritt, R. W., Morgan, W. T., & Klug, M. J. (1991). Nutrient dynamics, bacterial populations, and mosquito productivity in tree hole ecosystems and microcosms. *Ecology*, 72(5), 1529-1546.

Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., et al. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361), 450-453.

Wallis, R.C. (1954). A study of oviposition activity of mosquitoes. *Am. J. Hyg.* 60: 135–168.

Walton, W. E. (2007). Larvivorous fish including Gambusia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 184-220.

Wang, Y., Suman, D. S., Bertrand, J., Dong, L., & Gaugler, R. (2014). Dual-treatment autodissemination station with enhanced transfer of an insect growth regulator to mosquito oviposition sites. *Pest management science*, 70(8), 1299-1304.

Warner, D. G., Olney, C. A., Wood, F. B., Hansen, L., & Bowden, V. M. (2005). High school peer tutors teach MedlinePlus: a model for Hispanic outreach. *Journal of the Medical Library Association*, 93(2), 243.

Watson, M. S. (1967). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a literature review. *Miscellaneous Publication*, 22, 1-38.

Wheeler, A. S., Petrie, W. D., Malone, D., & Allen, F. (2009). Introduction, control, and spread of *Aedes albopictus* on Grand Cayman Island, 1997-2001. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(3), 251-259.

Wilder-Smith, A. (2014). Dengue vaccines: dawning at last?. *The Lancet*, 384(9951), 1327-1329.

Wilder-Smith, A., Renhorn, K. E., Tissera, H., Bakar, S. A., Alphey, L., Kittayapong, P., ... & Rocklöv, J. (2012). DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. *Global health action*, (22)5.

Wirat, S., Somkiat, B., Banyong, M., Mongkol, G., Poonyos, R., & Boonluan, P. (1982). Tests of insecticides applied by ULV ground and thermal fogging equipment for the control of *Aedes aegypti* in Thailand. *Bangkok, Thailand: Unpublished document WHO/VBC/82.869*.

Wong, J., Morrison, A. C., Stoddard, S. T., Astete, H., Chu, Y. Y., Baseer, I., & Scott, T. W. (2012). Linking oviposition site choice to offspring fitness in *Aedes aegypti*: consequences for targeted larval control of dengue vectors. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1632.

Wong, P. S. J., Li, M. Z. I., Chong, C. S., Ng, L. C., & Tan, C. H. (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8), e2348.

WHO/CDS/NTD/WHOPES/.2. (2006). Geneva, Switzerland: World Health Organization.

World Health Organization, Special Programme for Research, Training in Tropical Diseases, World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. Epidemic, & Pandemic Alert. (2009). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization.

World Health Organization. (2003). Space spray application of insecticides for vector and public health pest control: a practitioner's guide. In *Space spray application of insecticides for vector and public health pest control: a practitioner's guide* (pp. 49-49).

World Health Organization. (2005). Dengue, dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in the context of the integrated management of childhood illness.

World Health Organization. (2006). Report of the ninth WHOPES Working Group meeting. Review of Dimilin GR and DT, Vectobac DT, Aqua K-othrine, Aqua Reslin Super.

World Health Organization. 2006b. Review of Dimilin® GR and DT, Vectobac® DT, Aqua K-Othrine®, Aqua Reslin Super®. Report of the ninth WHOPES working group meeting, 5-9 December 2005. WHO Pesticide Evaluation Scheme, WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2. Geneva, Switzerland.; pp. 48-62.

World Health Organization. (2009). Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications.

WHO TDR. 2013. Global Alert and Repsonse Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever [webpage on the Internet] Geneva: World Health Organization (WHO). [cited March 3, 2013]. Available from:<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html>.

Wu, F., Liu, Q., Lu, L., Wang, J., Song, X., & Ren, D. (2011). Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in northwestern China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), 1181-1186.

Xi, Z., Khoo, C. C., & Dobson, S. L. (2006). Interspecific transfer of Wolbachia into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273(1592), 1317-1322.

De Xue, R., Edman, J. D., & Scott, T. W. (1995). Age and body size effects on blood meal size and multiple blood feeding by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 32(4), 471-474.

Yasuno, M., & Tonn, R. J. (1970). A study of biting habits of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *Bulletin of the World Health Organization*, 43(2), 319.

Yergolkar, P. N., Tandale, B. V., Arankalle, V. A., Sathe, P. S., Sudeep, A. B., Gandhe, S. S., ... & Mishra, A. C. (2006). Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerging infectious diseases*, 12(10), 1580.

YiBin, Z., TongYan, Z., & PeiEn, L. (2009). Evaluation on the control efficacy of source reduction to *Aedes albopictus* in Shanghai, China. *Zhongguo Meijie Shengwuxue ji Kongzhi Zazhi= Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 20(1), 3-6.

Yoshioka, M., Couret, J., Kim, F., McMillan, J., Burkot, T. R., Dotson, E. M., et al. (2012). Diet and density dependent competition affect larval performance and oviposition site selection in the mosquito species *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 5(1), 1.

Zaim, M., Aitio, A., & Nakashima, N. (2000). Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and veterinary entomology*, 14(1), 1-5.

Zanluca, C., Melo, V. C. A. D., Mosimann, A. L. P., Santos, G. I. V. D., Santos, C. N. D. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569-572.

Zeichner, B. C., & Debboun, M. (2011). The lethal ovitrap: a response to the resurgence of dengue and chikungunya. *US Army Med Dep J*, 4-11.

Zeichner, B. C., & Perich, M. J. (1999). Laboratory testing of a lethal ovitrap for *Aedes aegypti*. *Medical and veterinary entomology*, 13(3), 234-238.

Zug, R., & Hammerstein, P. (2012). Still a host of hosts for Wolbachia: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS one*, 7(6), e38544.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), 3-14.