

Identification des moustiques anophèles de Guyane française par profilage MALDI-TOF MS à l'aide de signatures protéiques de deux parties du corps

Sébastien Briolant, Monique Melo Costa, Christophe Nguyen, Isabelle Dusfour, Vincent Pommier de Santi, Romain Girod, Lionel Almeras

Publié: 20 août 2020 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098>

Abstrait

En Guyane, le paludisme, infection parasitaire transmise par les moustiques *anophèles*, reste une maladie d'importance de santé publique. Pour prévenir la transmission du paludisme, le principal moyen efficace reste le contrôle des *anophèles*. Pour un contrôle efficace, des *Anophèles* précis l'identification des espèces est indispensable pour distinguer les vecteurs du paludisme des non-vecteurs. Bien que les méthodes morphologiques et moléculaires soient largement utilisées, un outil innovant, basé sur des comparaisons de modèles de protéines, le profilage par spectrométrie de masse à temps de vol par désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS), est apparu cette dernière décennie pour l'identification des arthropodes. Cependant, la diversité limitée de la faune de moustiques des spectres MS de référence reste l'un des principaux inconvénients de sa large utilisation. L'objectif de la présente étude était alors de créer et de partager des spectres MS de référence pour l'identification des espèces d'*Anophéline de Guyane*. Au total, huit espèces distinctes d'*Anopheles*, parmi lesquelles quatre sont des vecteurs du paludisme, ont été collectées dans 6 zones. Pour améliorer les *anophèles* identification, deux parties du corps, les jambes et les thorax, ont été soumises indépendamment à MS pour la création de la base de données spectrale MS de référence (DB). Cette étude a souligné que la double vérification par MS a amélioré la confiance d'identification des *Anophèles* et le taux de classification fiable. Le partage de cette base de données de spectres MS de référence devrait faciliter le suivi des espèces d'*Anophèles* dans les zones de paludisme endémique pour aider les programmes de lutte antivectorielle ou d'élimination du paludisme.

Référence: Briolant S, Costa MM, Nguyen C, Dusfour I, Pommier de Santi V, Girod R, et al. (2020) Identification des moustiques anophèles de Guyane française par profilage MALDI-TOF MS à l'aide de signatures protéiques de deux parties du corps. PLoS ONE 15 (8): e0234098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098>

Rédacteur: Joseph Banoub, Pêches et Océans Canada, CANADA

Reçu: 25 mai 2020; **Accepté:** 23 juillet 2020; **Publié:** 20 août 2020

Copyright: © 2020 Briolant et al. Il s'agit d'un article en libre accès distribué sous les termes de la [licence d'attribution Creative Commons](#), qui permet une utilisation, une distribution et une reproduction sans restriction sur n'importe quel support, à condition que l'auteur original et la source soient crédités.

Disponibilité des données: toutes les données pertinentes se trouvent dans le papier et ses fichiers d'informations complémentaires.

Financement: Ce travail a été soutenu par la Délégation Générale pour l'Armement (DGA, projet MoSIS, Grant no PDH-2-NRBC-2-B-2113).

Intérêts concurrents: les auteurs déclarent ne pas avoir d'intérêts concurrents.

Liste des abréviations: sl, *sensu lato*; ss, *sensu stricto*; MALDI-TOF MS, spectrométrie de masse à temps de vol par désorption / ionisation laser assistée par matrice; PCR, réaction en chaîne par polymérase; CCI, indice de corrélation composite; LSV, valeur du score du journal

introduction

Depuis 2005, les cas de paludisme ont considérablement diminué en Guyane française, un territoire d'outre-mer de la France situé en Amérique du Sud. Le nombre de cas diagnostiqués est passé de 4 479 cas en 2005 à 597 cas en 2017 [1]. Cependant, la maladie est encore endémique dans les zones forestières intérieures, en particulier dans les zones d'exploitation illégale de l'or et reste donc d'une importance pour la santé publique [2 - 4]. La majorité des cas sont causés par *Plasmodium vivax* (89%, p = 531/597), suivi par *P. falciparum* (11%, p = 66/597).

Les moustiques *anophèles* sont connus pour leur rôle dans la transmission du paludisme. Historiquement, trente-trois moustiques du genre *Anopheles* ont été signalés en Guyane [5]. Des membres du sous-genre *Anopheles* et *Nyssorhynchus* ont été impliqués dans la transmission du paludisme en Guyane française. *Anopheles darlingi* est le vecteur primaire reconnu sur le territoire [6 - 9]. Récemment, *An. nuneztovari* sl, *An. oswaldoi* sl, *An. intermedius*, *An. marajoara* et *An. ininii* ont été trouvés naturellement infectés par des sporozoïtes de *Plasmodium* et ont été soupçonnés d'être des vecteurs secondaires [2, 3, 10]. La transmission du paludisme est encore plus compliquée car certains de ces vecteurs secondaires appartiennent à des complexes d'espèces, caractérisés par des caractéristiques morphologiques similaires, comme *An. oswaldoi* [11], *An. marajoara* [12] et *An. nuneztovari* [13].

Une identification rapide et précise des espèces d'*Anopheles* est alors essentielle lors de la conception de stratégies de lutte antivectorielle du paludisme qui devraient être spécifiques à l'espèce pour être efficaces. La méthode la plus courante pour l'identification des espèces de moustiques reste l'utilisation de critères morphologiques [14]. Cependant, l'identification morphologique dépend des compétences nécessitant une expertise entomologique. L'attribution correcte des espèces pourrait également être compromise pour les spécimens endommagés avec la perte de caractères déterminants. De plus, la description

des variations des caractéristiques morphologiques entre les spécimens de la même espèce adultes intacts a souligné que la classification correcte des espèces de moustiques ne pouvait être détenue que par des taxonomistes de moustiques expérimentés [15]. De plus, la disponibilité des clés taxonomiques des moustiques est la pierre angulaire du succès de l'identification. Malheureusement, les clés morphologiques font encore défaut pour de nombreuses espèces d' *Anophèles* , notamment pour les espèces étroitement apparentées (espèces cryptiques et complexes).

L'émergence des approches de biologie moléculaire dans les années 2000 a résolu des questions taxonomiques de longue date [16]. Cependant, le choix de la séquence du gène cible pour une identification précise des moustiques pourrait être complexe. En Amérique du Sud, les espèces d' *Anophèles* ont été classées en utilisant différents gènes cibles: soit l'ARNr 18S [17], soit le deuxième espaceur interne transcrit (ITS2) [18], soit la cytochrome c oxydase I (COI) [19]. L'absence de consensus pour l'identification des espèces de moustiques complique la comparaison des études. Le développement du système Barcode of Life Data (BOLD) a contribué à normaliser le séquençage des gènes pour l'identification des organismes [20]. Néanmoins, pour certaines espèces de moustiques cryptiques (par exemple, le complexe *An . Gambiae*), le séquençage des COI pourrait être insuffisant pour les classer sans ambiguïté [21] et le séquençage d'un deuxième gène pourrait être nécessaire [22]. Par exemple, certaines espèces de frères *Anophèles* et *Culex* n'ont pas pu être distinguées en utilisant uniquement le code à barres mitochondrial COI [23 , 24]. De plus, malgré les grandes avancées de cette stratégie au cours de la dernière décennie, notamment en raccourcissant la durée des expériences et les coûts des réactifs, le séquençage des gènes reste long et coûteux [25]. Le développement d'une approche rapide et peu coûteuse pour la surveillance des moustiques avec un taux élevé d'identification fiable est toujours très demandé.

Le profilage MALDI-TOF MS a récemment démontré ses performances pour l'identification fiable des arthropodes [25], y compris les moustiques aux stades adulte [26] et immature [27 , 28]. Au stade adulte, pour l'identification des échantillons par la SEP, différentes parties du corps du moustique ont été sélectionnées comme le céphalothorax [29 , 30] ou les pattes, mais ce dernier compartiment reste le plus fréquemment utilisé [26 , 31 - 33]. La récente identification réussie des moustiques à des stades immatures par le profilage MALDI-TOF MS a validé l'efficacité de cette stratégie MS pour la surveillance sur le terrain des *Culicidae* [19]. Les faibles coûts récents, la rapidité et la simplicité technique des protocoles ont participé au succès de cette approche. Cependant, contrairement aux analyses moléculaires, les profils de protéines MS provenant d'échantillons conspécifiques pourraient varier en fonction de plusieurs facteurs tels que le mode de stockage des échantillons, le stade de développement, le mode d'homogénéisation ou la partie du corps utilisée [25 , 34]. Pour surmonter ces limitations, des protocoles standardisés ont été établis pour certaines familles d'arthropodes [35], y compris les moustiques [36]. La standardisation des protocoles a facilité les comparaisons de résultats et le partage de spectres MS de référence.

Le principal problème avec les jambes est qu'elles sont cassables. La perte d'une à toutes les pattes de moustique pendant le piégeage et / ou le stockage n'est pas rare, ce qui pourrait compromettre l'identification des échantillons par la SEP. La sélection d'une seconde partie du corps, le thorax du moustique, a révélé qu'elle pouvait également générer une SEP spécifique à l'espèce de moustique mais distincte des pattes de spécimens conspécifiques [37]. Cette dernière étude a souligné que l'interrogation de ces deux parties du corps par rapport à la base de données spectrale MS de référence (DB) améliorerait l'identification des espèces de moustiques avec précision et confiance. Cette étude pionnière a été évaluée sur 7 espèces de moustiques distinctes de 4 genres vivant en sympatrie en Guadeloupe [37].

Le but de la présente étude était d'évaluer si la soumission de deux parties du corps pouvait améliorer l' identification des *anophèles* de Guyane française. La création d'une base de données de spectres MS de référence devrait faciliter le suivi des espèces d' *Anophèles* dans les zones de paludisme endémique pour aider les programmes de lutte antivectorielle ou d'élimination du paludisme.

Méthodes

Collecte et dissection de moustiques

Les moustiques femelles adultes *anophèles* ont été sélectionnés à partir de collectes de moustiques sur le terrain réalisées dans 6 sites distincts de Guyane, lors d'enquêtes entomologiques, en utilisant différentes méthodes de collecte, sur différentes périodes d'échantillonnage (Fig 1 et Tableau 1) [3 , 38 - 40]. Aucun permis n'était requis pour l'étude décrite, qui était conforme à toutes les réglementations pertinentes; les terres accessibles étaient publiques (ni privées ni protégées) et aucun animal ou plante protégé ou sensible n'a été échantillonné. Après les collectes, les moustiques ont été triés par genres et *anophèles* les moustiques ont été identifiés morphologiquement sous une loupe binoculaire à un grossissement de × 56 (Leica M80, Leica, Nanterre, France) en utilisant des clés taxonomiques standard pour la région (Floch et Abonnenc 1951, Forattini 1962, Faran et Linthicum 1981). Les échantillons d' *anophèles* ont ensuite été stockés individuellement à -20 ° C. Selon leur disponibilité, un à 22 spécimens par espèce d' *Anopheles* ont été sélectionnés pour des analyses moléculaires et MS (Tableau 1). Les pattes et les thorax des moustiques ont été disséqués pour l'analyse MALDI-TOF MS [37]. Les abdomens, les ailes et les têtes ont été conservés pour des analyses moléculaires.



Fig 1. Carte des sites de collecte de moustiques en Guyane française.

Les différents sites d'échantillonnage sont indiqués par des cercles.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.g001>

Morphological identification	Catching site (Latitude/Longitude)	Catching period	Number of specimens (MSI MS1 MS2)	Species identified by NCBI (Accession Number)	COI gene sequence identity (%)	Species identified by BOLD	COI gene sequence identity (%)
<i>An. parvipes</i>	Case of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	3 (2)	NC_027796.1	99/99	K2198875	97.84
<i>An. intermedius</i>	Case of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	18 (2)	MF391786.1 / NC_027796.1	99/99	Early release	98.62-99.39
<i>An. annalis</i>	Case of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	1 (1)	MJ243966.1	95/99	S1917788	97.83
<i>An. stephensi</i>	Case of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	17 (2)	KC204822.1	99/99	KC218823	98.55-98.59
<i>An. crucians</i>	Case of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	18 (2)	NC_027796.1 / MF391786.1	99/99	Private (F29291619) (F29291620)	98.91-99.73
<i>An. deiringeri</i>	Mound of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	22 (2)	MF391786.1 / MF391786.1	99/99	SP120911 (private)	99.83-100
<i>An. maceratus</i>	Mound of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	26 (2)	NC_027796.1 / MF391786.1	99/99	KJ360352 / KC387757	99.83-100
<i>An. maceratus</i>	Case of 14°12'29" N 10°10'15" E	June 2015	26 (2)	MF391786.1 / KJ360352.1	99/99	Early release / KC387757	99.58-99.83
Total			113 (26)				

MS1, MS2: Number of specimens used to create the reference MS database.
 *Multiple species for which COI gene sequences are not available (N.A.) in the database (17th November 2020). *%in reliable ID: Identity with top match < 97%.
 BOLD: Barcode of Life Data Systems, COI: cytochrome oxidase subunit I.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.t001>

Tableau 1. Vue d'ensemble des origines des moustiques *anophèles* et identification des sous-groupes par typage moléculaire COI.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.t001>

Identification moléculaire des moustiques

L'ADN a été extrait individuellement de la tête et de l'abdomen de tous les échantillons de moustiques (n = 111) en utilisant le kit d'extraction de tissu d'ADN QIAamp (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. L'identification moléculaire du moustique au niveau de l'espèce a été réalisée par séquençage du produit PCR d'un fragment du gène du cytochrome c oxydase I (COI) (LCO1490 (avant): 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' ; HC02198 (inverse): 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') comme décrit précédemment [19 , 41]. Les séquences ont été assemblées et analysées à l'aide du logiciel d'analyse génétique évolutive moléculaire (MEGA) version 7.0 et du logiciel éditeur d'alignement de séquence BioEdit version 7.2.6.0. Toutes les séquences ont été explorées contre GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et contre le Barcode of Life Data Systems (BOLD; <http://www.barcodinglife.org> ; [20]) d'attribuer des séquences COI inconnues aux espèces de moustiques.

Homogénéisation des échantillons et analyse MALDI-TOF MS

Chaque compartiment disséqué (jambes et thorax) a été homogénéisé individuellement 3 x 1 minute à 30 Hertz en utilisant TissueLyser (Qiagen) et des billes de verre (# 11079110, BioSpec Products, Bartlesville, OK, US) dans un tampon d'homogénéisation composé d'un mélange (50 / 50) d'acide formique à 70% (v / v) (Sigma) et 50% (v / v) d'acétonitrile (Fluka, Buchs, Suisse), préparés avec de l'eau de qualité HPLC, selon le réglage automatisé normalisé [42]. Après homogénéisation de l'échantillon, une centrifugation à rotation rapide à 200 g pendant 1 min a ensuite été réalisée et 1 µL du surnageant de chaque échantillon a été repéré sur la plaque cible en acier MALDI-TOF en quadruple (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Après séchage à l'air, 1 µL de solution matricielle composée d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique saturé (Sigma, Lyon, France), 50% (v / v) d'acétonitrile, 2,5% (v / v) d'acide trifluoroacétique (Aldrich, Dorset, UK) préparé avec de l'eau de qualité HPLC, a été ajouté. Pour contrôler la qualité de la matrice (c'est-à-dire l'absence de pics MS dus aux impuretés du tampon de matrice) et les performances de l'appareil MALDI-TOF, la solution de matrice a été chargée en double sur chaque plaque MALDI-TOF seule et avec un standard de test bactérien (Bruker Bacterial Test Standard, réf: # 8255343).

Paramètres MS MALDI-TOF

Les profils de masse des protéines ont été obtenus en utilisant un spectromètre de masse Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Allemagne), avec détection en mode linéaire à ions positifs à une fréquence laser de 50 Hz dans une plage de masse de 2 à 20 kDa. Les paramètres de réglage de l'appareil MALDI-TOF MS étaient identiques à ceux précédemment utilisés [43]. En bref, la tension d'accélération était de 20 kV et le temps de retard d'extraction était de 200 ns. Chaque spectre correspond à des ions obtenus à partir de 240 tirs laser réalisés dans six régions du même spot et acquis automatiquement à l'aide de l'AutoXecute du logiciel Flex Control v.2.4 (Bruker Daltonics).

Analyse spectrale MS

Les profils de spectres MS ont d'abord été contrôlés visuellement avec le logiciel flexAnalysis v3.3 (Bruker Daltonics). Les spectres MS ont ensuite été exportés vers ClinProTools v2.2 et MALDI-Biotyper v3.0. (Bruker Daltonics) pour le traitement des données (lissage, soustraction de base, picking de pics). La reproductibilité des spectres MS a été évaluée par la comparaison des profils spectraux moyens (MSP, Main Spectrum Profile) obtenus à partir des quatre spots pour chaque échantillon selon la partie du corps avec le logiciel MALDI-Biotyper v3.0 (Bruker Daltonics). La reproductibilité et la spécificité des spectres MS prenant en compte une partie du corps du moustique ont été objectivées à l'aide d'analyses en grappes. Des analyses de cluster (dendrogramme MSP) ont été effectuées sur la base de la comparaison de la MSP donnée par MALDI-Biotyper v3.0. logiciels et regroupés selon le profil de masse des protéines (c'est-à-dire leurs signaux de masse et leurs intensités). En plus,

Le top 10 et le top 5 des pics de SEP les plus intenses par espèce de moustique et par partie du corps ont été analysés avec le logiciel ClinProTools pour estimer leurs performances pour discriminer les *anophèles*. espèces pour chaque partie du corps. Les réglages des paramètres dans le logiciel ClinProTools pour la préparation du spectre étaient les suivants: une résolution de 300; un seuil de bruit de 2,00; un décalage de pic maximal de 800 ppm et une correspondance avec les pics d'agent d'étalonnage de 10%. Le calcul et la sélection des pics ont été effectués sur des spectres individuels avec un seuil signal sur bruit de 2,00 et une agrégation de 800 ppm. Sur la base de la liste des pics obtenue pour chaque partie du corps par espèce, les 10 premiers et 5 premiers pics m / z les plus intenses ont été sélectionnés pour les inclure dans le modèle d'algorithme génétique (GA). Les pics sélectionnés par l'opérateur ont donné une valeur de capacité de reconnaissance (RC) avec la valeur de validation croisée (CV) la plus élevée.

Création de bases de données et tests aveugles

Les spectres MS de référence ont été créés en utilisant les spectres des jambes et du thorax de deux spécimens par espèce lorsqu'ils sont disponibles à l'aide du logiciel MALDI-Biotyper v3.0. (Bruker Daltonics) [26]. Les spectres MS des jambes et des thorax d'un total de 15 spécimens, identifiés morphologiquement et moléculairement, ont été ajoutés à notre base de données de spectres MS (DB), y compris déjà les spectres MS de référence des jambes et des thorax de huit espèces de moustiques distinctes, mais aucun du genre *Anopheles* [37]. Les spectres MS ont été créés avec un algorithme non biaisé utilisant des informations sur la position du pic, l'intensité et la fréquence. Les spectres MS des jambes et des thorax de 96 moustiques ont été testés contre les spectres de référence MS internes DB. La liste des pics des échantillons de requête a été comparée aux listes de pics de référence des organismes dans la base de données spectres de référence MS. La fiabilité de l'identification des espèces a été estimée à l'aide des valeurs de score log (LSV). Le calcul de ce score, qui variait de 0 à 3, a été réalisé à l'aide d'un algorithme biostatistique du logiciel MALDI Biotyper v.3.0. Selon des études antérieures [26 , 43], les VBV supérieurs à 1,8 étaient considérés comme fiables pour l'identification des espèces. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Analyses phylogénétiques

Après alignement des séquences de gènes avec l'algorithme Clustal ω2 du logiciel MEGA 7.0, un arbre de vraisemblance maximum basé sur le gène COI a été construit à l'aide du logiciel MEGA 7.0 [44]. L'arbre avec la probabilité logarithmique la plus élevée a été conservé. L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branches mesurées en nombre de substitutions par site. La prise en charge des nœuds internes a été estimée à l'aide de la méthode de bootstrap non paramétrique avec 1000 répliquions.

Résultats

Identification morphologique et validation moléculaire

Parmi les moustiques capturés dans les 6 sites distincts de la Guyane française (Fig_1), des spécimens uniquement d'anophèles ont été sélectionnés. Ces moustiques ont été classés morphologiquement en huit espèces distinctes, six de la *Nyssorhynchus* sous-genre (*An . Aquasilis* , *Un . Braziliensis* , *An . Darlingi* , *An . Nuneztovari* sl , *Un . Triannulatus* sl , un *. Oswaldoi* sl) et deux de l'*Anopheles* sous-genre (*Un . Intermedius* , *Un . peryassui*) (Tableau 1). Selon leur disponibilité, un à 22 spécimens par espèce ont été inclus dans la présente étude. Un total de 111 spécimens d'*anophèles* ont été sélectionnés. Le séquençage du gène COI de tous les échantillons a été effectué pour une identification morphologique valide. Les séquences de gène COI ont été interrogées contre GenBank (NCBI) et les systèmes Barcode of Life Data (BOLD). L'interrogation des séquences de gènes COI a permis d'obtenir une identification fiable des espèces de moustiques pour tous les échantillons avec des plages d'identité de 98 à 99% contre GenBank et de 98,15 à 100% contre les bases de données BOLD (Tableau 1). Une identification des espèces de moustiques concordantes a été obtenue entre les deux DB moléculaires. Le séquençage du gène COI a corroboré les classifications morphologiques, à l'exception d'un moustique. Il a été morphologiquement classé comme *An . peryassui* mais l'analyse moléculaire a révélé qu'il était identifié comme *An . intermedius* . L'analyse phylogénétique a été réalisée avec les séquences de gènes COI des 15 spécimens de moustiques sélectionnés pour la création de référence MS (Fig_S1). Les moustiques appartenant au même sous-genre se sont regroupés.

Spectres MS reproductibles et spécifiques des deux parties du corps du moustique

Des profils de SP de haute intensité (> 2000 ua) ont été obtenus pour les pattes (Fig_2A) et les thorax (Fig_2B) de chacun des 111 moustiques soumis à MALDI-TOF MS. Des spectres MS visuels reproductibles ont été obtenus pour des échantillons de la même espèce en fonction de la partie du corps (Fig_2). Pour évaluer la reproductibilité et la spécificité des spectres MS des jambes et des thorax en fonction des espèces, des analyses en grappes ont été effectuées. Deux spécimens par espèce ont été utilisés pour la création de dendrogrammes MSP, à l'exception d' *An . oswaldoi* pour lequel un seul spécimen était disponible. Le regroupement des spécimens de la même espèce sur la même branche et l'absence d'entrelacement d'espèces ont souligné la reproductibilité et la spécificité des profils protéiques pour chaque espèce d' *Anopheles* pour les pattes (Fig_3A) et les thorax (Fig_3B). Fait intéressant, l'ordination des espèces d' *Anopheles* à partir des dendrogrammes MSP n'était pas similaire entre les jambes et les thorax des espèces appariées (Fig_3). Néanmoins, les espèces d' *Anopheles* du même sous-genre se sont regroupées sur la même branche sur les deux dendrogrammes MSP. Pour visualiser la spécificité des spectres MS en fonction de la partie du corps par *anophèle* espèces, des PCA ont été réalisées. Les PCA ont révélé une séparation claire des points correspondant aux spectres MS des jambes et des thorax, confirmant une spécificité des profils MS entre ces deux parties du corps pour les sept espèces d' *Anophèles* testées (Fig_S2).

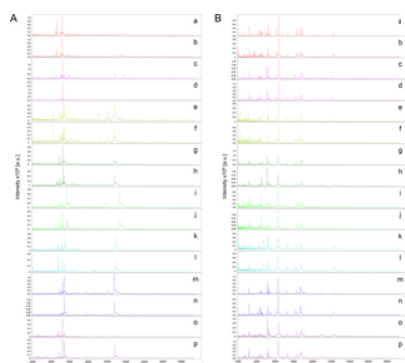


Fig 2.

Comparaison des spectres MS MALDI-TOF des pattes (A) et des thorax (B) des moustiques *Anophèles* . Spectres MS représentatifs d' *An . peryassui* (a, b), *An . intermedius* (c, d), *An . oswaldoi* (e, f), *An . aquasalis* (g, h), *An . braziliensis* (i, j), *An . darlingi* (k, l), *An . nuneztovari* (m, n) et *An . triannulatus* (o, p) sont représentés. Les spectres MS de deux spécimens distincts par espèce ont été sélectionnés, à l'exception de *An . oswaldoi* . Comme un seul spécimen était disponible pour cette espèce, les spectres MS de répliques biologiques ont été présentés. au, unités arbitraires; m / z, rapport masse / charge.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.g002>

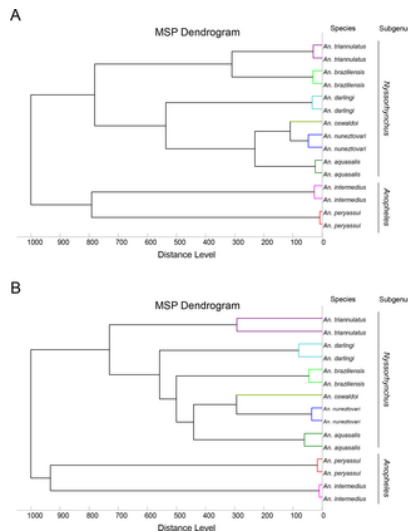


Fig 3. Dendrogramme MSP des spectres MS MALDI-TOF des pattes (A) et des thorax (B) des moustiques *Anophèles*. Deux spécimens par espèce ont été utilisés pour construire le dendrogramme, à l'exception d' *An. oswaldoi*, pour lequel un seul spécimen était disponible. Le dendrogramme a été créé à l'aide du logiciel Biotyper v3.0 et les unités de distance correspondent à la similitude relative des spectres MS. Les sous- genres *Anopheles* et *Nyssorhynchus* ont été indiqués dans la partie droite.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.g003>

Comme la classification correcte des espèces de spécimens repose principalement sur l'intensité des spectres MS résultants, nous avons évalué si les pics de masse les plus intenses des jambes et des thorax par espèce de moustique pourraient être suffisants pour distinguer ces espèces d' *Anophèles*, à l'exception d' *An. oswaldoi* pour lequel un seul spécimen était disponible. La sélection des dix premières et cinq premières listes de pics de masse par espèce a conduit à un total de 41 et 27 pics MS pour les jambes et 39 et 24 pour les thorax, respectivement (tableaux S1 et S2). Ces listes de pics MS ont été incluses dans le modèle d'algorithme génétique (GA) du logiciel ClinProTools 2.2. La combinaison de la présence / absence de ces dix premières et cinq premières listes de pics de masse par *anophèles*espèces présentaient, respectivement, des valeurs RC de 99,6% et 97,0% et des valeurs CV de 97,9% et 98,3% pour les spectres MS des jambes. Pour les spectres MS des thorax, des valeurs RC de 99,4% et 97,5% et des valeurs CV de 99,8% et 99,6% ont été obtenues pour les dix premières et cinq premières listes de pics de masse sélectionnées, respectivement.

Étape de création et de validation de la base de données de spectres de référence MS

Les spectres MS des jambes et des thorax des 15 échantillons utilisés pour l'analyse du dendrogramme MSP (tableau 1 et fichier S1), validés morphologiquement et moléculairement, ont été ajoutés à notre base de données de spectres MS (DB) comprenant déjà des spectres MS de référence pour les jambes et les thorax de huit moustiques distincts espèces [37]. Les spectres MS des jambes et des thorax des 96 échantillons restants ont été interrogés par rapport à cette base de données améliorée. Fait intéressant, 100% des résultats d'identification étaient concordants entre les spectres de SEP appariés des jambes et des thorax. Parmi eux, l'identification par MS de 95 échantillons corroborait les résultats morphologiques. Un spécimen, classé comme *An. periyassui* sur la base de critères morphologiques a été identifié comme *An. intermedius* basé sur l'outil MS avec des LSV de 2,40 et 2,49 pour les jambes et le thorax, respectivement, confirmant les résultats du séquençage du gène *COI*. Les VBV variaient de 1,84 à 2,56 pour les jambes et de 1,60 à 2,61 pour les thorax (Fig S3). Comme un seuil LSV supérieur à 1,8 est requis pour une identification fiable [26 , 42], une classification correcte pourrait être envisagée pour 100% (96/96) des spectres MS des jambes et 96,9% (3/96) des thorax. Cependant, si l'on considère les résultats LSV d'échantillons appariés par échantillon, 100% des moustiques testés ont réussi à obtenir un LSV supérieur à 1,8 pour au moins une partie du corps (Fig 4). Fait intéressant, une augmentation de la valeur seuil du LSV à 2,0, qui améliore la confiance d'identification, a révélé que 95,8% (92/96) et 88,5% (85/96) des échantillons atteignaient ce seuil, en fonction de leurs jambes et de leur thorax spectres MS, respectivement. Cependant, le taux d'au moins une partie du corps à partir d'échantillons appariés par échantillon atteignant ce seuil (LSV> 2,0) est resté à 100%.

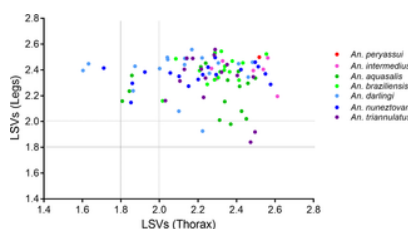


Fig 4. Comparaison de LSV de parties du corps appariées à partir de spectres MS d' espèces *Anopheles*. Les lignes pointillées représentent les valeurs de seuil (noir et gris pour le seuil LSV de 1,8 et 2,0, respectivement), pour une identification pertinente. LSV, valeur du score du journal.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.g004>

Discussion

L'identification correcte des espèces de moustiques est essentielle pour une gestion de lutte adaptée, permettant d'indexer les espèces en circulation dans une région donnée et, par conséquent, d'estimer les risques de transmission de maladies vectorielles. Les régions frontalières comme la Guyane française peuvent être influencées par leurs pays voisins. Le flux légal et illégal d'êtres humains et de marchandises à travers cette frontière pourrait induire la migration des moustiques vecteurs et conduire à la colonisation de nouvelles zones. Seule une méthode de surveillance rapide, précise et peu coûteuse des moustiques réussira à améliorer les mesures de contrôle.

En Guyane française, *An. darlingi* est le principal vecteur de la malaria transmette plusieurs *Plasmodium* espèces, telles que *P. falciparum* et *P. vivax* [45], ce dernier représentant environ 75% des cas humains [46]. En plus d' *An. darlingi* , d'autres espèces d' *Anopheles* auraient transmis des agents pathogènes du *Plasmodium* dans cette zone pendant leur alimentation par le sang [2 , 3 , 10 , 40]. De plus, ces vecteurs du paludisme vivent en sympatrie avec d'autres espèces d'anophèles non vecteurs du paludisme [39]. En effet, dans un programme efficace visant à prévenir ou à éliminer la transmission du paludisme, une identification précise des espèces d' *Anopheles* reste un facteur clé. Le récent succès répétilif de l'utilisation du profilage MS MALDI-TOF pour l'identification des arthropodes, y compris les moustiques, a été appliqué dans le présent travail pour implémenter notre DB de spectres de référence MS fait maison avec des spécimens d'anophèles de Guyane française et pour pallier les limites de la morphologie et analyses moléculaires [25].

Dans la présente étude, nous avons confirmé que les spectres MS des jambes et des thorax des spécimens appariés de la même espèce étaient distincts au moins pour les sept espèces pour lesquelles plus d'un spécimen était disponible. La spécificité d'espèce démontrée pour chaque partie du corps, a souligné que ces deux compartiments pouvaient être utilisés indépendamment pour l'identification des moustiques. La soumission indépendante par MS de plusieurs parties du corps à MALDI-TOF MS pour l'identification des échantillons, a été récemment rapportée pour les moustiques [37] mais aussi pour les tiques [47 , 48]. Les avantages de tester deux parties distinctes du corps sont la possibilité de contre-valider les résultats et d'améliorer le taux de confiance et de fiabilité d'identification. En effet, la combinaison des résultats obtenus indépendamment par la requête contre la base de données de référence MS conduit à des résultats concordants pour chaque partie du corps testée. Ici, sur la base de critères morphologiques, un spécimen a été classé comme *An. peryassui* . La soumission par MS de ses jambes et de son thorax indiquait une correspondance avec *An. Spectres de référence intermédiaires* MS pour les deux parties du corps avec des LSV élevés (> 2,40), ce qui concordait avec le *COI* séquençage génique. De plus, si le seuil de coupure du LSV pour considérer l'identification comme fiable était porté à 2,0, 100% des échantillons ont réussi à atteindre ce seuil avec les spectres MS d'au moins une partie du corps. Il est intéressant de noter que, pour l'identification des bactéries, on a supposé que les espèces étaient attribuées pour des VBV supérieurs ou égaux à 2,0, et les genres ont été attribués pour des scores supérieurs ou égaux à 1,7 mais inférieurs à 2,0 [49 , 50]. Ensuite, la combinaison des résultats des deux parties du corps a permis d'améliorer le ratio de LSV supérieur ou égal à 2,0 pour chaque échantillon par rapport à l'utilisation d'une seule partie du corps.

Enfin, la concordance des résultats d'identification MS entre les deux parties du corps plus l'atteinte du seuil LSV de 2,0 pour au moins une partie du corps, sont des données complémentaires qui améliorent la confiance d'identification. L'étude précédente utilisant deux parties du corps pour l'identification des moustiques a été réalisée sur des moustiques de genres distincts [37]. Ici, les huit espèces de moustiques provenaient toutes du genre *Anopheles*, y compris deux sous-genres, *Nyssorhynchus* et *Anopheles* . L'identification correcte des spécimens de moustiques par le profilage MALDI-TOF MS pour ces espèces d' *Anophèles* proches confirme la précision de cet outil innovant.

Parmi les espèces de moustiques inclus dans les MS référence spectres DB, 4 espèces sont des vecteurs du paludisme (*An. Darlingi* , *An. Nuneztovari sl* , *Un. Intermedius* , *An. Oswaldoi sl*), pour les 4 autres espèces de leur compétence antivectorielle n'a pas encore été démontrée (*An. Aquasalis* , *An. Braziliensis* , *An. Triannulatus sl* , *An. Peryassui*) [5]. Fait intéressant, les vecteurs et les non-vecteurs du paludisme sont présents dans chacun de ces deux sous-genres, soulignant l'importance de les classer correctement pour la prévention des maladies et la lutte antivectorielle des espèces vivant en sympatrie.

Les principaux risques de mauvaise identification ou d'échec de l'identification par profilage MS MALDI-TOF sont généralement attribués soit à l'exhaustivité des espèces incluses dans la base de données de référence MS, soit plus fréquemment à la faible intensité des spectres MS. Le problème de la base de données MS de référence incomplète pourrait être facilement résolu en exécutant *COI* séquençage génique de spectres MS de bonne qualité non appariés, en utilisant la partie restante du corps de l'échantillon (c'est-à-dire la tête, l'abdomen ou les ailes). Dans le cas de nouvelles espèces de moustiques, l'ajout des spectres MS respectifs, non encore inclus dans la base de données de référence MS, pourrait être fait. L'application de cette stratégie pourrait résoudre pas à pas les spectres MS de bonne qualité en ne trouvant pas de correspondance dans la base de données MS de référence. Concernant les spectres MS non appariés, attribués à la faible intensité des profils protéiques, ce phénomène est fréquemment observé pour les spectres MS des jambes en raison de la faible quantité de protéines contenue dans ce compartiment [26]. De plus, comme les pattes sont très fragiles, il est fréquent que le relâchement d'une à cinq pattes se soit produit pendant le prélèvement, le transport ou le stockage des échantillons. Cette diminution du nombre de pattes réduit le taux de réussite de l'identification des échantillons [42]. De plus, pour les spécimens qui ont perdu toutes les pattes, leur identification devient impossible si l'identification était basée uniquement sur ce compartiment par MS. La création de spectres MS de référence à partir de deux parties distinctes du corps du moustique permet de réussir l'identification des échantillons par cette approche protéomique rapide.

De plus, dans le présent travail, il a été souligné que la classification des espèces d' *Anopheles* pouvait être correctement effectuée en utilisant les pics de MS les plus intenses. En effet, la sélection du top-10 ou encore du top-5 des pics MS possédant l'intensité la plus élevée est apparue suffisamment discriminante pour classer correctement ces espèces de moustiques. Cette classification correcte est valable pour les deux parties du corps. Ces résultats soulignent qu'une identification correcte reste possible avec des spectres MS de faible intensité pour lesquels seuls les pics MS les plus intenses ont pu être détectés.

La comparaison des dendrogrammes MSP entre les pattes et les thorax a révélé que, bien que les espèces du même sous-genre soient regroupées dans la même branche, l'ordination des espèces à l'intérieur de ces branches n'était pas similaire. Cette classification non reproductible objective que la proximité des profils de SEP était différente entre les espèces d' *Anopheles* pour les jambes et le thorax. Ces ordonnances distinctes des espèces en fonction de leurs profils de SEP devraient réduire le risque de mauvaise identification par la soumission des deux parties du corps. Fait intéressant, aucun de ces dendrogrammes MSP n'a proposé une classification comparable à celles obtenues en utilisant des séquences de gènes *COI* pour la construction d'arbres phylogénétiques. Les dendrogrammes MSP ne sont pas adaptés pour les analyses phylogénétiques comme indiqué précédemment [51 , 52].

Conclusion

La surveillance des moustiques avec des outils rapides, hautement reproductibles et fiables tels que MALDI-TOF apparaît essentielle dans le scénario de mondialisation actuel. La spécificité des profils protéiques de la SEP pour les pattes et les thorax des moustiques a confirmé que ces deux parties du corps sont pertinentes pour l'identification des échantillons. De plus, comme il a été démontré que les pics MS les plus intenses sont suffisants pour une classification correcte, l'échantillon qui générera des spectres MS de faible qualité, pourrait de toute façon être identifié. Le partage des spectres MS de référence est primordial pour accélérer la diffusion de cet outil innovant pour une utilisation en routine dans l'identification des moustiques contribuant à adapter le contrôle des vecteurs.

Renseignements à l'appui

S1 Fig. Arbres à maximum de vraisemblance non racinés basés sur les séquences du gène COI des 15 spécimens inclus dans la base de données MS.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.s001>
(TIF)

S2 Fig. Analyse en composantes principales (ACP) à partir des spectres MS des pattes et des thorax des moustiques *Anophèles*.
Image dimensionnelle PCA à partir des spectres MS des jambes (points rouges) et des thorax (points verts) de *An. intermedius* (A), *An. aquasalis* (B), *An. braziliensis* (C), *An. darlingi* (D), *An. nuneztovari* (E), *An. triannulatus* (F) et *An. peryassui* (G). Respectivement, 10, 22, 18, 22, 20, 20 et 3 spécimens par espèce ont été inclus. Un quadruple de chaque échantillon par partie du corps a été présenté.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.s002>
(TIF)

S3 Fig.
LSV obtenus suite à une requête de base de données de référence MS faite maison avec des spectres MS des jambes (A) et des thorax (B) de moustiques *Anophèles*. Les lignes pointillées horizontales représentent la valeur seuil pour une identification fiable (noir et gris pour le seuil LSV de 1,8 et 2,0, respectivement). LSV, valeurs de score du journal; au, unités arbitraires.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.s003>
(TIF)

Tableau S1. Liste des cinq et dix premiers pics de masse par espèce de moustique en utilisant les pattes comme matériel biologique.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.s004>
(DOCX)

Tableau S2. Liste des cinq et dix premiers pics de masse par espèce de moustique utilisant des thorax comme matériel biologique.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.s005>
(DOCX)

Fichier S1. Spectres MS bruts provenant des pattes et des thorax des moustiques ajoutés à la base de données de référence MS.
Les spectres MS ont été obtenus en utilisant le spectromètre de masse Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234098.s006>
(7Z)

Remerciements

Nous tenons à remercier Samuel Vezenegho et Antoine Adde, de l'Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, Guyane, pour leur implication dans la gestion des échantillons. Nous remercions également Albin Fontaine (UPE, IRBA, Marseille) pour son aide dans la création de cartes.

Les références

1. Ardillon V, Carvalho L, Prince C, Abboud P, Djossou F. Bilans 2013 et 2014 de la situation du paludisme en Guyane. Bull Veille Sanit. 2015; 1: 16-20.
[Voir l'article](#) • [Google Scholar](#)
2. Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, et al. Le paludisme en Guyane est lié à l'extraction illégale d'or. Emerg Infect Dis. 2016; 22: 344-346. pmid: 26811971
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
3. Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, et al. Les études épidémiologiques et entomologiques d'une épidémie de paludisme parmi les forces armées françaises déployées sur des sites miniers d'or illégaux révèlent de nouveaux aspects de la transmission de la maladie en Guyane. Malar J. 2016; 15: 35. pmid: 26801629
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
4. Douine M, Sanna A, Hiwat H, Briolant S, Nacher M, Belleoud D, et al. Enquête sur une éventuelle épidémie de paludisme dans une mine d'or illégale en Guyane: une approche originale dans la forêt amazonienne reculée. Malar J. 2019; 18: 91. pmid: 30902054
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
5. Talaga S, Dejean A, Carinci R, Gaborit P, Dusfour I, Girod R. Mise à jour de la liste de contrôle des moustiques (Diptera: Culicidae) de Guyane française. J Med Entomol. 2015; 52: 770-782. pmid: 26336249
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
6. Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Fouque F. *Anopheles darlingi* bionomics et transmission de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae* dans les villages amérindiens de la forêt amazonienne du Haut-Maroni, Guyane française. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103: 702-710. pmid: 19057822
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
7. Girod R, Roux E, Berger F, Stefani A, Gaborit P, Carinci R, et al. Démêler les relations entre les densités d'*Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae), les facteurs environnementaux et l'incidence du paludisme: comprendre les modèles variables de transmission du paludisme en Guyane (Amérique du Sud). Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105: 107-122. pmid: 21396247

[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

8. Fouque F, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Girod R. Variations annuelles du nombre de cas de paludisme liées à deux modèles différents de potentiel de transmission d'*Anopheles darlingi* dans la région de Maroni en Guyane française. *Malar J.* 2010; 9: 80. pmid: 20307300
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
9. Hiwat H, Issaly J, Gaborit P, Somai A, Samjawan A, Sardjoe P, et al. Hétérogénéité comportementale d'*Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) et dynamique de transmission du paludisme le long du fleuve Maroni, Suriname, Guyane française. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104: 207-213. pmid: 19732925
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- dix. Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R. Incrimination of *Anopheles (Anopheles) intermedius* Peryassú, An. (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón, An. (Nys.) Oswaldoi Peryassú comme vecteurs naturels de *Plasmodium falciparum* en Guyane française. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107: 429-432. pmid: 22510842
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
11. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Sallum MAM, Velez ID, et al. Systématique du complexe oswaldoi (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) en Amérique du Sud. *Vecteurs de parasites.* 2013; 6: 324. pmid: 24499562
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
12. Conn JE, Wilkerson RC, Segura MNO, de Souza RTL, Schlichting CD, Wirtz RA, et al. Émergence d'un nouveau vecteur néotropical du paludisme facilité par la migration humaine et les changements d'utilisation des terres. *Suis J Trop Med Hyg.* 2002; 66: 18-22. pmid: 12135261
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
13. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, et al. Espèces vectorielles du paludisme en Colombie: une revue. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106 Suppl 1: 223-238. pmid: 21881778
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
14. Beebe NW, Cooper RD. Systématique des vecteurs du paludisme avec une référence particulière au groupe *Anopheles punctulatus*. *Int J Parasitol.* 2000; 30: 1-17. pmid: 10675739
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
15. Munstermann LE, Conn JE. Systématique des vecteurs de maladies des moustiques (Diptera, Culicidae): impact de la biologie moléculaire et analyse cladistique. *Annu Rev Entomol.* 1997; 42: 351-369. pmid: 9017898
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
16. Van Rensburg AJ, Hunt RH, Koekemoer LL, Coetzee M, Shiff CJ, Minjas J. *J Am Mosq Control Assoc.* 1996; 12: 271-274. pmid: 8827604
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
17. Figueiredo MAP, Di Santi SM, Manrique WG, Gonçalves LR, André MR, Machado RZ. Identification moléculaire de *Plasmodium* spp. et les sources de repas sanguins d'anophèles dans les réserves environnementales de l'île de São Luís, état de Maranhão, Brésil. *Vecteurs de parasites.* 2017; 10: 203. pmid: 28441969
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
18. Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Lourenço-de-Oliveira R, Flores-Mendoza C, et al. Relations anophéliques du vecteur du paludisme amazonien interprétées à partir des séquences d'ADNr ITS2. *Med Vet Entomol.* 2005; 19: 208-218. pmid: 15958027
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
19. Nebbak A, Koumare S, Willcox AC, Berenger JM, Raoult D, Almeras L, et al. Application sur le terrain de MALDI-TOF MS sur l'identification des larves de moustiques. *Parasitologie.* 2018; 145: 677-687. pmid: 28768561
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
20. Ratnasingham S, Hebert PDN. bold: Le système de données de code-barres de la vie (<http://www.barcodinglife.org>). *Notes de Mol Ecol.* 2007; 7: 355-364. pmid: 18784790
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
21. Versteirt V, Nagy ZT, Roelants P, Denis L, Breman FC, Damiens D, et al. Identification des espèces de moustiques belges (Diptera: Culicidae) par code-barres ADN. *Mol Ecol Resour.* 2015; 15: 449-457. pmid: 25143182
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
22. Norris LC, Norris DE. Phylogénie des espèces d'anophèles (Diptera: Culicidae) en Afrique australe, basée sur les gènes nucléaires et mitochondriaux. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol.* 2015; 40: 16-27. pmid: 26047180
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
23. Laurito M, Oliveira TMP de, Almirón WR, Sallum MAM. Code à barres COI versus identification morphologique des espèces de *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae): une étude de cas utilisant des échantillons d'Argentine et du Brésil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108 Suppl 1: 110-122. pmid: 24473810
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
24. Wang G, Li C, Guo X, Xing D, Dong Y, Wang Z et al. Identification des principales espèces de moustiques en Chine sur la base du code-barres ADN. *PloS One.* 2012; 7: e47051. pmid: 23071708
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

25. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Outils émergents pour l'identification des vecteurs arthropodes. *Future Microbiol.* 2016; 11: 549-566. pmid: 27070074
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
26. Yssouf A, Parola P, Lindström A, Lilja T, L'Ambert G, Bondesson U, et al. Identification d'espèces européennes de moustiques par MALDI-TOF MS. *Parasitol Res.* 2014; 113: 2375-2378. pmid: 24737398
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
27. Dieme C, Yssouf A, Vega-Rúa A, Berenger JM, Failloux AB, Raoult D, et al. Identification précise des Culicidae aux stades de développement aquatiques par profilage MALDI-TOF MS. *Vecteurs de parasites.* 2014; 7: 544. pmid: 25442218
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
28. Schaffner F, Kaufmann C, Pflüger V, Mathis A. Le profilage rapide des protéines facilite la surveillance des espèces de moustiques envahissantes. *Vecteurs de parasites.* 2014; 7: 142. pmid: 24685094
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
29. Mewara A, Sharma M, Kaura T, Zaman K, Yadav R, Sehgal R. Identification rapide des moustiques médicalement importants par spectrométrie de masse à temps de vol par désorption / ionisation laser assistée par matrice. *Vecteurs de parasites.* 2018; 11: 281. pmid: 29720246
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
30. Müller P, Pflüger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, et al. Identification des espèces de moustiques anophèles cryptiques par profilage moléculaire des protéines. *PLoS One.* 2013; 8: e57486. pmid: 23469000
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
31. Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath MO, Sougoufara S, Dehecq JS, et al. Ionisation par désorption laser assistée par matrice - spectrométrie de masse à temps de vol: un outil émergent pour l'identification rapide des moustiques vecteurs. *PLoS One.* 2013; 8: e2380. pmid: 23977292
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
32. Raharimalala FN, Andrianinarivomanana TM, Rakotondrasoa A, Collard JM, Boyer S. Utilité et précision de la spectrométrie de masse MALDI-TOF comme outil supplémentaire pour identifier les espèces de moustiques vecteurs et investir dans le développement d'une base de données internationale. *Med Vet Entomol.* 2017; 31: 289-298. pmid: 28426182
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
33. Tandina F, Almeras L, Koné AK, Doumbo OK, Raoult D, Parola P. Utilisation de MALDI-TOF MS et culturomics pour identifier les moustiques et leur microbiote intestinal. *Vecteurs de parasites.* 2016; 9: 495. pmid: 27613238
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
34. Nebbak A, Almeras L. Identification des moustiques Aedes par biotypage MALDI-TOF MS à l'aide de signatures protéiques d'exuvies larvaires et pupales. *Vecteurs de parasites.* 2020; 13: 161. pmid: 32238178
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
35. Nebbak A, El Hamzaoui B, Berenger JM, Bitam I, Raoult D, Almeras L, et al. Analyse comparative des conditions de stockage et des méthodes d'homogénéisation des espèces de tiques et de puces pour identification par MALDI-TOF MS. *Med Vet Entomol.* 2017; 31: 438-448. pmid: 28722283
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
36. Nebbak A, Willcox AC, Bitam I, Raoult D, Parola P, Almeras L. Standardisation de l'homogénéisation des échantillons pour l'identification des moustiques à l'aide d'un outil protéomique innovant basé sur le profilage des protéines. *Protéomique.* 2016; 16: 3148-3160. pmid: 27862981
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
37. Vega-Rúa A, Pagès N, Fontaine A, Nuccio C, Hery L, Goindin D, et al. Amélioration de l'identification des moustiques par biotypage MALDI-TOF MS à l'aide de signatures protéiques de deux parties du corps. *Vecteurs de parasites.* 2018; 11: 574. pmid: 30390691
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
38. Adde A, Roux E, Mangeas M, Dessay N, Nacher M, Dusfour I, et al. Cartographie dynamique des densités d'*Anopheles darlingi* dans une zone de transmission résiduelle du paludisme en Guyane française à l'aide de données de télédétection et météorologiques. *PLoS One.* 2016; 11: e0164685. pmid: 27749938
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
39. Adde A, Dusfour I, Roux E, Girod R, Briolant S. *Anopheles* Faune du littoral de Cayenne, Guyane française: modélisation et cartographie de la présence d'espèces à l'aide de données de couverture terrestre télédéteectées. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111: 750-756. pmid: 27982304
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
40. Vezenegho SB, Adde A, Pommier de Santi V, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, et al. Forte transmission du paludisme dans un foyer de paludisme boisé en Guyane française: comment *Anopheles darlingi* exophagique peut-il contrecarrer les mesures de lutte antivectorielle et de prévention? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111: 561-569. pmid: 27653361
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
41. Amorces ADN Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. pour l'amplification de la sous-unité I du cytochrome c oxydase mitochondriale à partir de divers invertébrés méazoaires. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994; 3: 294-299. pmid: 7881515
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

42. Nebbak A, Willcox AC, Bitam I, Raoult D, Parola P, Almeras L. Standardisation de l'homogénéisation des échantillons pour l'identification des moustiques à l'aide d'un outil protéomique innovant basé sur le profilage des protéines. *Protéomique*. 2016; 16: 3148–3160. pmid: 27862981
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

43. Lafri I, Almeras L, Bitam I, Caputo A, Yssouf A, Forestier CL, et al. Identification des vecteurs de phlébotomine des sables algériens capturés sur le terrain par MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10: e0004351. pmid: 26771833
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

44. Tamura K, Nei M. Estimation du nombre de substitutions de nucléotides dans la région de contrôle de l'ADN mitochondrial chez l'homme et les chimpanzés. *Mol Biol Evol*. 1993; 10: 512-526. pmid: 8336541
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

45. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. Une carte mondiale des vecteurs dominants du paludisme. *Vecteurs de parasites*. 2012; 5: 69. pmid: 22475528
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

- Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Le paludisme sur le bouclier guyanais: un bilan de la situation en Guyane française.
46. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109: 525-533. pmid: 25184998
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

47. Boyer PH, Boulanger N, Nebbak A, Collin E, Jaulhac B, Almeras L. Évaluation du biotypage MALDI-TOF MS pour la détection de *Borrelia burgdorferi* sl chez *Ixodes ricinus*. *PloS One*. 2017; 12: e0185430. pmid: 28950023
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

48. Boyer PH, Almeras L, Plantard O, Grillon A, Talagrand-Reboul É, McCoy K, et al. Identification d'espèces *Ixodes* étroitement apparentées par profilage des protéines avec spectrométrie de masse MALDI-TOF. *PloS One*. 2019; 14: e0223735. pmid: 31622384
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

49. Murugaiyan J, Lewin A, Kamal E, Bakula Z, van Ingen J, Ulmann V, et al. Base de données MALDI Spectra pour la discrimination rapide et le sous-typage de *Mycobacterium kansasii*. *Microbiol avant*. 2018; 9: 587. pmid: 29670585
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

50. Piamsomboon P, Jaresitthikunchai J, Hung TQ, Roytrakul S, Wongtavatchai J. *BMC Vet Res*. 2020; 16: 52. pmid: 32046727
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

51. Kumsa B, Laroche M, Almeras L, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. Identification par spectrométrie de masse morphologique, moléculaire et MALDI-TOF d'espèces de tiques ixodides collectées à Oromia, Ethiopie. *Parasitol Res*. 2016; 115: 4199–4210. pmid: 27469536
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

52. Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, Hoffmann B, et al. Détermination des espèces et caractérisation des stades de développement des tiques par spectrométrie de masse par désorption / ionisation laser assistée par matrice animale entière. *Tiques Tick-Borne Dis*. 2012; 3: 78–89. pmid: 22487425
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)