

Protocole MX

V.01.(01/2025) Albin Fontaine

Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), France.
Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Unité de virologie, Marseille, France.

Contexte :

La détection moléculaire des arbovirus dans les excréments de moustiques capturés sur le terrain offre une approche innovante et non invasive pour surveiller leur circulation sur un territoire. Connue sous le nom de *Molecular Xenomonitoring* (MX), cette méthode a démontré son efficacité pour détecter divers arbovirus et parasites sans nécessiter la capture ni la manipulation des hôtes vertébrés.

Les moustiques infectés excrètent des charges virales bien plus élevées dans leurs excréments que dans leur salive, améliorant ainsi considérablement la sensibilité de la détection moléculaire. Une seule femelle infectée peut libérer entre 3 et 5 log₁₀ copies d'ARN viral par jour (Fontaine et al., 2016), faisant des excréments un outil puissant pour le suivi en temps réel des virus. En exploitant ces excréments, la stratégie MX se situe à l'interface entre la surveillance entomologique et environnementale, permettant de suivre l'émergence et la circulation des arbovirus en temps réel, à faible coût tout en gardant une bonne sensibilité (Ramírez et al., 2018).

Pour optimiser cette approche, nous avons conçu un *adaptateur MX* en impression 3D, compatible avec les pièges commerciaux BG-Sentinel, BG Pro et CDC light. Ce dispositif remplace le filet de collecte et offre un environnement humide et une source de nourriture aux moustiques capturés, prolongeant leur survie et augmentant ainsi la production d'excréments. Cette innovation présente plusieurs avantages :

- (i) **Prolongation des intervalles de collecte**, réduisant la fréquence d'intervention sur le terrain.
- (ii) **Augmentation des chances de détection virale**, grâce à l'accumulation d'excréments sur plusieurs jours.
- (iii) **Réduction des coûts de surveillance**, car la détection reste indépendante du nombre de spécimens piégés.

Les échantillons d'excréments, collectés sur feuille d'aluminium, peuvent être transportés à température ambiante pour l'analyse moléculaire, suivie d'un séquençage génomique rapide des virus détectés. Contrairement aux méthodes classiques, la stratégie MX permet :

- Une **surveillance rentable**, avec la possibilité de cribler des centaines d'échantillons au coût de quelques dizaines.
- Une **détection efficace**, englobant l'ensemble d'une communauté d'insectes vecteurs.
- Une **logistique simplifiée**, avec une collecte et un transport aisés sans besoin d'équipement spécialisé.
- Une **compatibilité avec des analyses complémentaires**, telles que l'identification des espèces vectrices, l'estimation de la prévalence d'infection et l'isolement viral.

Grâce à ces modifications des pièges, le MX permet un suivi viral en continu avec des intervalles de collecte prolongés, améliorant ainsi l'efficacité de la surveillance tout en réduisant les coûts opérationnels. Cette approche rapide, évolutive et adaptée au terrain renforce la détection précoce des menaces virales émergentes (Bigeard et al., 2024; L'Ambert et al., 2023).

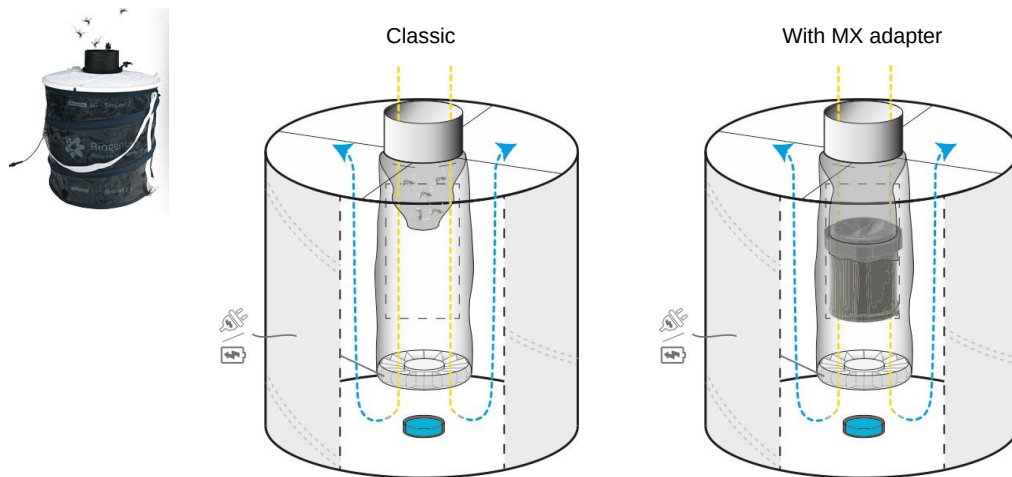


Fig1. Vue et illustration du piège BG-Sentinel (Biogents) dans sa configuration classique et optimisée pour la récolte d'excrétion avec l'adaptateur MX.

1. Préparation et Installation du Piège à Moustiques :

1.1 Matériel Nécessaire sur le terrain :

- Piège à moustiques BG Pro / BG Sentinel ou CDC light Trap.
- Adaptateurs imprimé 3D (MosquitoBox) pour collecte des moustiques et des excréments.
- Sucre dilué à 10% (10g dans 100 mL d'eau) pour imprégner du coton qui sera placé dans la mangeoire à l'intérieur de l'adaptateur.
- Abri pour protéger le piège des intempéries (vent et pluie).
- Papier aluminium prédécoupé pour la collecte des excréments.
- (Optionnel) Bouteilles de dioxyde de carbone pressurisé.

- (Optionnel) Batteries 12V pour alimentation si absence de prises secteurs.

Note à l'utilisateur : Il est conseillé de préparer à l'avance l'adaptateur imprimé en 3D en plaçant un cercle de papier aluminium au fond et du coton imbibé d'eau sucrée dans la mangeoire. L'adaptateur peut être ainsi stocké à 4°C plusieurs jours avant utilisation. Vous gagnerez ainsi du temps sur le terrain et vous éviterez de mettre de l'eau sucrée au sol, ce qui peut attirer les fourmis.

1.1 Préparation de l'adaptateur MX :

1.1.1 Présentation du dispositif imprimé 3D

L'adaptateur est un cylindre fermé dans ces deux extrémités et traversé dans sa verticalité d'un tube creux. Il se compose en 4 parties :

- Un tube fileté (le corps de l'adaptateur)
- Un fond (partie traversée par le plus petit tube qui est fermé par une grille)
- Un haut (partie traversée par le plus long tube)
- Une mangeoire
- Un filet (pour le maintenir à la bouche d'entrée du piège)

L'ensemble des pièces sont disponibles [ici](#) avec les instructions d'impression.



Fig2. Vues de l'adaptateur MX avec son filet.

1.1.2 Création du filet

- Préparer un gabarit avec un cercle de 16,5 cm, avec un trou de 4 cm au centre. Gardez un angle de 165 degrés, ajoutez une bande de 1,5 cm d'un côté pour la couture.



- b. Utilisez le gabarit pour tracer le contour des pièces sur le tissu (moustiquaire ou tissu qui laisse passer l'air mais pas les insectes).
- c. Coupez des sections de cordelette tressée en polyester (environ 50 cm) et brulez leurs extrémités au briquet.
- d. Formez une gouttière avec la cordelette à l'intérieur avec des pinces.
- e. Coudre la gouttière en enlevant les pinces, coudre la bordure droite pour former un cône.
- f. Le filet peut être installé à l'adaptateur (dévissez l'embout supérieur, le placer à la base du filet (petit trou) et revissez l'ensemble.

1.1.3 Préparation de la nourriture (eau sucrée 10%)

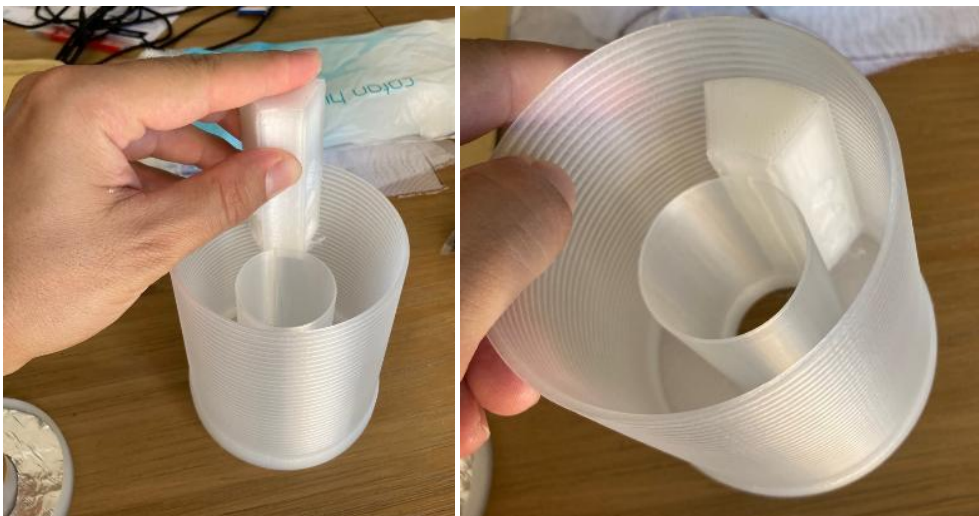
- Commencez par dévisser le fond pour accéder à l'intérieur et retirez la mangeoire en la tirant vers le bas.



- Remplir la mangeoire de coton hydrophile préalablement imbibé dans de l'eau sucrée 10% (10g pour 100 mL). Cette opération peut être faite la veille, dans ce cas garder les mangeoires à 4°C.



- Remettre la mangeoire dans l'adaptateur, ouverture vers le haut, en la glissant le long de la paroi.



1.1.4 Préparation des supports d'excréments en papier aluminium

- Découper le papier aluminium à l'aide du patron de découpe (donuts). Il est possible d'en découper plusieurs à la fois.
-



On va créer des emporte pièces pour faciliter cette tâche.

- Déposer une feuille, partie mate vers le haut, au fond de l'adaptateur. Revisser le fond au cylindre pour fermer l'adaptateur.



1.2 Installation du Piège adapté MX :

- Placer le piège à l'abri du vent et de la pluie (sous un toit, sous une table, etc). *MX déteste la pluie, elle rince le matériel génétique déposé sur la feuille d'aluminium.*
- Assembler le piège BG Pro selon les instructions fournies.
- Installer l'adaptateur MX à l'intérieur du piège.



L'adaptateur peut être fixé à la bouche d'entrée du piège avec le filet comme indiqué sur la photo. On peut aussi d'abord placer l'adaptateur à l'intérieur du piège, ouvrir le filet de maintien et le faire déborder autour de l'entrée du piège et fixer la bouche du piège par-dessus. En bref, débrouillez vous du moment que les moustiques passent dedans et que le ventilateur tourne c'est bon 😊

- Installer l'appât odorant BG lure (Biogents) ou (optionnel) la bouteille de dioxyde de carbone pour attirer les moustiques.

- Vérifier que le piège fonctionne correctement et est alimenté en énergie (pile ou secteur). *Vérifier que le clapet s'ouvre.*

2. Collecte des Excréments et des Moustiques :

2.1 Procédure de Collecte :

- Capturer les moustiques adultes sur une période de 3 à 7 jours consécutifs.
- Lors de la collecte, retirer délicatement l'adaptateur MX du piège BG Pro lorsque le ventilateur est encore en marche, cela évitera les échappées.
- Transportez les moustiques vivants dans l'adaptateur en pliant le filet à l'intérieur du tube de l'adaptateur pour éviter les échappés.
- Les moustiques peuvent être maintenu comme ceci à température ambiante plusieurs jours.
- Une fois au laboratoire, placer les adaptateurs à -20°C pendant au minimum 30 min pour tuer les insectes capturés.
- Transférez les moustiques neutralisés dans un tube de 50 mL. Les placer à -20°C.
- Retirer le papier aluminium couvert d'excréments et le placer dans un sac plastique scellé annoté (ou entre deux feuilles de papier, c'est plus écologique).



Dans certains cas il peut être nécessaire de décoller les amas d'insectes ou les excréments d'escargots, les feuilles mortes, etc...avec une pince pour dégager le papier aluminium. Vous pouvez visualiser sur ces photos à quoi ressemble les excréments de moustiques.

- Identifier clairement chaque échantillon avec la date et le lieu de collecte. *Il est important de pouvoir revenir sur les collectes une fois la détection de virus effectuées sur les excréments.*

3. Transport des Échantillons :

- Envoyer les papiers aluminium contenant les excréments par voie postale au laboratoire d'analyse, à température ambiante. L'ARN viral se conserve plusieurs jours à température ambiante même en été.

4. Traitement des Échantillons au Laboratoire :

4.1 Réception et Enregistrement :

- À la réception des échantillons, enregistrer chaque échantillon dans une base de données avec les informations de collecte (date, lieu, etc.).

4.2 Préparation des papiers aluminium recouverts d'excréments :

- Utiliser des gants et des équipements de protection individuelle pour manipuler les échantillons.
- Enrouler le papier aluminium en une cigarette épaisse. Faire une boulette grossière marche tout aussi bien. La glisser dans un tube de 14mL avec bouchon.

4.3 Extraction de l'ARN Viral des Excréments :

- Ajouter 800 uL de tampon de lyse RAV1 (NucleoSpin 96 virus core kit, Macherey-Nagel) et 10 µL de phage MS2 (contrôle interne d'extraction) dans chaque tube.

Un autre tampon de lyse ou du PBS peut être utilisé à cette étape.

- Vortexer énergiquement pendant 1 min pour dissoudre les excréments dans le tampon liquide.
- Ajoutez 800 uL d'éthanol à 96-100%, puis les charger sur des colonnes NucleoSpin Virus en plusieurs étapes pour extraire l'ARN/DNA selon les instructions du fabricant.
- *[OPTIONEL] Il est possible d'éluer dans un volume plus grand, de changer de tampon de lyse ou de kit d'extraction ou d'éluer dans du PBS. Tout fonctionne et à déjà été testé. Adaptez à votre protocole local. Le but est d'éluer les excréments solides dans du liquide qui sera extrait. Les doses d'ARN viral sont fortes, dites-vous que le volume dans lequel on reprend l'échantillon n'aura pas un grand impact sur la sensibilité de détection.*
- Conserver les éluas à 4°C jusqu'à la détection ou à -20°C pour un stockage à long terme.

5. Détection des Virus par RT-PCR :

5.1 Préparation de la RT-PCR :

Nous utilisons diverses méthodes d'extractions et de détections. Toutes nos méthodes de détections moléculaires utilisent une Q-RT-PCR avec un système d'amorces et de sondes

provenant de d'EVAg, l'European Virus Archive. Vous y trouverez tous nos systèmes de détections ainsi qu'un large choix de contrôles internes avec protocoles.

Depuis 2008, l'European Virus Archive (EVA) est une infrastructure dédiée à la caractérisation, la production et la distribution de ressources virales de référence pour soutenir la recherche en virologie en Europe. Elle regroupe des laboratoires de l'UE et hors UE en virologie humaine, animale et végétale, selon le concept de "One Virology". Similaire au concept "One Health", qui lie santé humaine, animale et environnementale, "One Virology" met l'accent sur le rôle central des virus dans ces systèmes, faisant de la virologie une discipline clé.

EVA fournit un accès constant à des souches virales, outils diagnostiques et matériaux de recherche. Cette disponibilité renforce la préparation aux épidémies, stimule l'innovation en vaccins, antiviraux et diagnostics, et facilite le transfert de connaissances. Son action soutient la santé publique, la sécurité mondiale et renforce la souveraineté de l'UE face aux menaces pandémiques.



[EVAg portal list](#) | EVAg

References

- Bigéard, C., Pezzi, L., Klitting, R., Ayhan, N., L'Ambert, G., Gomez, N., Piorkowski, G., Amaral, R., Durand, G. A., Ramiara, K., Migné, C., Grard, G., Touzet, T., Zientara, S., Charrel, R., Gonzalez, G., Duvignaud, A., Malvy, D., De Lamballerie, X., & Fontaine, A. (2024). *Molecular Xenomonitoring (MX) allows real-time surveillance of West Nile and Usutu virus in mosquito populations*. <https://doi.org/10.1101/2024.04.10.588707>
- Fontaine, A., Jiolle, D., Moltini-Conclois, I., Lequime, S., & Lambrechts, L. (2016). Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes. *Scientific Reports*, 6, 24885. <https://doi.org/10.1038/srep24885>

- L'Ambert, G., Gendrot, M., Briolant, S., Nguyen, A., Pages, S., Bosio, L., Palomo, V., Gomez, N., Benoit, N., Savini, H., Pradines, B., Durand, G. A., Leparç-Goffart, I., Grard, G., & Fontaine, A. (2023). Analysis of trapped mosquito excreta as a noninvasive method to reveal biodiversity and arbovirus circulation. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 410–423. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13716>
- Ramírez, A. L., Hall-Mendelin, S., Doggett, S. L., Hewitson, G. R., McMahon, J. L., Ritchie, S. A., & van den Hurk, A. F. (2018). Mosquito excreta: A sample type with many potential applications for the investigation of Ross River virus and West Nile virus ecology. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(8), e0006771. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006771>